



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Andreja Petrović

**PROMJENE TRANSKRIPTOMA
HEPATOCELULARNOG KARCINOMA
ALKOHOLNE ETIOLOGIJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur i na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, pod vodstvom prof. dr. sc. Petre Korać kao prve mentorice i prof. dr. sc. Slavka Gašparova, dr. med. kao drugog mentora, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Informacije o prvoj mentorici:

Prof. dr. sc. Petra Korać završila je diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu 2002. godine, gdje je 2007. godine i doktorirala u području imunobiologije i fiziologije. Godine 2009. završila je stručni magisterij Upravljanje u znanosti, na Medicinskom fakultetu/Školi narodnog zdravlja „Andrija Štampar“. Od svibnja 2004. godine bila je zaposlena kao znanstveni novak-asistent/viši asistent Medicinskog fakulteta u Zagrebu s radnim mjestom u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur. Od rujna 2012. godine zaposlena je na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje trenutno radi kao redoviti profesor. Predaje na kolegijima „Genomi“, „Medicinska genetika“, „Molekularna dijagnostika“, „Metode istraživanja u molekularnoj biologiji“, „Razvoj znanstvene misli u biologiji“, „Rezistencija virusa na lijekove“, „Molekularna dijagnostika neoplazmi“, „Biology 1“ i „Biology 2“. Predavač je i na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u istraživanjima europskih i hrvatskih projekata u području biologije tumora, molekularne dijagnostike, medicinske genetike i infektivnih bolesti. Do sada je objavila 40 znanstvenih i 11 stručnih radova i sudjelovala u istraživanjima koja su rezultirala s 84 izlaganja na znanstvenim i stručnim skupovima. Bila je mentor velikog broja završnih i diplomskih radova na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i na Zdravstvenom veleučilištu. Usavršavala se na znanstvenim ustanovama u Njemačkoj, Nizozemskoj, Francuskoj, Velikoj Britaniji i Gani. Znanstvena je suradnica u polju kliničkih medicinskih znanosti te znanstvena savjetnica u polju biologije.

Informacije o drugom mentoru:

Prof. dr. sc. Slavko Gašparov, dr. med. završio je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1989. godine. Na istom fakultetu 2000. godine obranio je magistarski rad, a 2004. godine obranio je doktorsku disertaciju. Specijalistički ispit iz patologije položio je 1997. godine za potrebe KB Merkur. Od 1998. godine vanjski je suradnik u Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. god. je naslovni docent, a od 2012. izvanredni profesor u kumulativnom radnom odnosu. Od 2020. radi kao redoviti profesor u Zavodu za patologiju MF Sveučilišta u Zagrebu. Predstojnik je Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur od 2011. godine do danas. Voditelj je tri kolegija (Bolesti jetre i bilijarnog trakta, Bolesti gastrointestinalnog sustava i Bolesti krvi i krvotvornih organa) na Sveučilišnom poslijediplomskom specijalističkom studiju Patologija i citologija, a od 2021. je i voditelj istog studija. Voditelj je kolegija Hematopatologija i citologija u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog specijalističkog studija Hematologija te voditelj kolegija Imuno-hematopatologija i citologija u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog specijalističkog studija Laboratorijska imunologija. Od 2010. god. glavni je mentor liječnicima na specijalizaciji iz patologije i citologije za potrebe KB Merkur i više hrvatskih županijskih bolnica. Od 2023. godine dopredsjednik je hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM). Mentor je na više doktorskih disertacija i završnih radova. Autor je više desetaka znanstvenih i stručnih radova, a sudjelovao je aktivno kao pozvani predavač ili putem kongresnih priopćenja na desetke domaćih i međunarodnih skupova i kongresa. Usavršavao se u institucijama u SAD-u, Nizozemskoj i Španjolskoj.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Petri Korać na vođenju kroz poslijediplomski studij i stručnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije. Posebno joj hvala na neiscrpnom strpljenju prilikom čitanja mojih kreativnih gluposti te na mudrim životnim savjetima koji su često bili korisniji od same literature. Bez njezine podrške i smijeha ova disertacija vjerojatno nikad ne bi ugledala svjetlo dana.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Slavku Gašparovu na stručnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije, ali još više na preživljavanju mojih pitanja tijekom specijalizacije. Uvijek mi je bio puno više od mentora – pravi prijatelj, terapeut i povremeni spasilac zdravog razuma. Takvi se mentori zaista rijetko nađu, vjerojatno s dobrim razlogom!

Zahvaljujem se kolegici Pauli Gršković na stručnoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada. Paula je bila jedna od onih koje rade iz sjene, u potpunoj tajnosti – baš poput profesorice McGonagall kad je trebalo spasiti situaciju u Hogwartsu. Bez njezine diskretne čarolije, ovaj rad bi bio samo još jedan obični „muggle“ uradak. Hvala joj što je uvijek vjerovala da moja disertacija može letjeti, čak i kad sam ja bila uvjerena da je riječ o običnoj metli.

Zahvaljujem se cijelom histološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur za svu pomoć s uzorcima, ali i na tome što su hrabro podnosili moje životne krize tijekom specijalizacije te što su bili uz mene u svim fazama mog specijalističkog sazrijevanja – od stadija izgubljenog mladunca do gotovo ozbiljne odrasle osobe!

Zahvaljujem se svojim prijateljima, koji do samog kraja nisu imali ni najmanju ideju o čemu se zapravo radi u ovom istraživanju, a razlog tomu je vrlo jednostavan – nikad nisu ni pitali. Hvala vam što ste sačuvali moj ego od teških stručnih pitanja i što ste moju doktorsku temu uvijek tretirali kao „onu neku stvar koju radim“.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja me uvijek u svemu podržavala.

Ovaj rad posvećujem svojoj ženi, najboljoj osobi koju sam ikad upoznala, bez čije podrške, strpljenja i ljubavi bih već odavno odustala od svega ovoga. Hvala joj što je vjerovala u mene i onda kad ja nisam vjerovala sama sebi, i što mi je uvijek bila svjetlo kad bi mi se sve činilo preteško i prekomplikirano. Ona je razlog zbog kojeg svaki korak vrijedi.

PROMJENE TRANSKRIPTOMA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA ALKOHOLNE ETIOLOGIJE

ANDREJA PETROVIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet

Hepatocelularni karcinom (HCC) najčešći je primarni karcinom jetre, zauzima šesto mjesto po učestalosti među svim karcinomima u svijetu te je četvrti vodeći uzrok smrti povezanih s karcinomom. Većina slučajeva HCC-a nastaje u ciroznoj jetri, obično kao posljedica kroničnih bolesti jetre, poput infekcija hepatitisom B (HBV), hepatitisom C (HCV) i alkoholizma. miRNA-221 istražena je kao faktor koji utječe na razvoj HCC-a induciranog virusom, no malo je poznato o njezinim učincima na ekspresiju gena kod HCC-a induciranog alkoholom. Ova studija imala je za cilj istražiti potencijalno slične promjene ekspresije gena koji se javljaju kod HCC-a induciranog virusom i alkoholom. Analizirani su dostupni podaci transkriptoma iz netumorskih hepatocita i tkiva HCC-a induciranog virusima. Najznačajnije razlike u ekspresiji gena povezane s miRNA-221 između netumorskih hepatocita i HCC-a induciranog virusom odnosile su se na gene *NTF-3* i *MYBL1*. Pri procjeni tih podataka u slučaju HCC-a izazvanog alkoholom, ispitano je 111 uzoraka tkiva: tumorsko tkivo i cirozno tkivo jetre od 37 pacijenata s HCC-om te 37 uzoraka netumorskog tkiva jetre korištenjem metode RT-Q PCR. Nije pronađena značajna razlika u ekspresiji gena *NTF-3*, ali je ekspresija gena *MYBL1* bila značajno niža u tumorskom tkivu HCC-a u usporedbi s netumorskim hepatocitima i ciroznim tkivom. Ovi rezultati ističu važnost gena *MYBL1* u razvoju HCC-a i naglašavaju potrebu za različitim pristupima u procjeni tumorskih mehanizama.

(72 stranica, 13 slika, 13 tablica, 139 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *NTF-3*, *MYBL1*, hepatocelularni karcinom, alkoholna etiologija, miRNA-221

Mentori: prof. dr. sc. Petra Korać i prof. dr. sc. Slavko Gašparov

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Inga Urlić, prof. dr. sc. Maja Matulić, prof. dr. sc. Tajana Filipec Kanižaj, dr. med.

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of biology

CHANGES IN THE TRANSCRIPTOME OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA OF ALCOHOLIC ETIOLOGY

ANDREJA PETROVIĆ

Faculty of Science

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most prevalent primary liver cancer, ranking as the sixth most common cancer worldwide and the fourth leading cause of cancer-related deaths. Most HCC cases originate from cirrhotic livers, typically due to chronic liver diseases, such as hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) infections, and alcoholism. miRNA-221 has been explored as a factor affecting HCC development in HCC of viral etiology, but little is known about its effects on gene expression in alcohol-associated HCC. This study aimed to explore potentially similar gene expression aberrations underlying viral and alcohol-induced HCC. I analyzed available transcriptome data from non-tumor hepatocytes and viral-induced HCC tissues. The most notable differences in gene expression associated with miRNA-221 between non-tumor hepatocytes and viral-induced HCC involved *NTF-3* and *MYBL1* genes. To assess these data in alcohol-induced HCC, I examined 111 tissue samples: tumor tissue and cirrhotic tissue samples from 37 HCC patients and 37 samples from non-tumor liver tissue using RT-Q PCR. I found no significant difference in *NTF-3* expression, but *MYBL1* expression was significantly lower in HCC tissue compared to non-tumor hepatocytes and cirrhotic tissue. This study findings highlight the importance of the *MYBL1* gene in HCC development and emphasize the need for diverse approaches in evaluating tumor mechanisms.

(72 pages, 13 figures, 13 tables, 139 references, original in Croatian)

Keywords: *NTF-3*, *MYBL1*, hepatocellular carcinoma, alcohol etiology, miRNA-221

Supervisor: Prof. Petra Korać and Prof. Slavko Gašparov

Reviewers: prof. dr. sc. Inga Urlić, prof. dr. sc. Maja Matulić, prof. dr. sc. dr. med. Tajana Filipec Kanižaj, MD

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Hipoteza i ciljevi doktorskog rada	3
2. Literaturni pregled	4
2.1. Hepatocelularni karcinom	4
2.2. Molekularna patogeneza hepatocelularnog karcinoma	8
2.3. miRNA-221	20
3. Materijali i metode	23
3.1. Bioinformatička analiza	23
3.1.1. Javno dostupni skupovi podataka	23
3.1.2. Kontrola kvalitete i mapiranje	31
3.1.3. Analiza glavnih komponenti	31
3.1.4. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena reguliranih s miRNA-221 kod HCC-a induciranog virusom i primarnih hepatocita	31
3.2. Analiza tumorskog tkiva	32
3.2.1. Uzorci pacijenata	32
3.3. Metode	35
3.3.1. Izolacija RNA	35
3.3.2. Reverzna transkripcija	36
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	37
3.3.4. Statistička analiza rezultata	39
4. Rezultati	40
4.1. Diferencijalno eksprimirani geni između HCC-a induciranog virusom i primarnih hepatocita	40
4.2. Geni karakteristični za HCC koje regulira miRNA-221	42
4.3. Analiza ekspresije gena <i>NTF-3</i> i <i>MYBL1</i> u uzorcima pacijenata s hepatocelularnim karcinom, ciroznom jetrom i netumorskim tkivom jetre	44
4.3.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata, cirozne jetre i netumorskog tkiva jetre	44
4.3.2. Usporedba ekspresije gena <i>NTF-3</i> i <i>MYBL1</i> u uzorcima HCC-a induciranog alkoholom, ciroznog tkiva jetre i netumorskog tkiva jetre	44
4.4. Analiza laboratorijskih parametara u uzorcima pacijenata s hepatocelularnim karcinom/ ciroznim tkivom jetre i netumorskom tkivu jetre	46
5. Rasprava	51
7. Literatura	59
8. Životopis	72

1. Uvod

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najčešća primarna maligna epitelna neoplazija jetre (1). Šesti je najčešći karcinom u svijetu s najvećom incidencijom u Africi i jugoistočnoj Aziji, a četvrti je vodeći uzrok smrti nastalih kao posljedica karcinoma što ga čini jednim od vodećih zdravstvenih problema u svijetu (1, 2). Između 80 % i 90 % hepatocelularnih karcinoma se razvija iz cirozno promijenjene jetre koja nastaje kao krajnji stadij kroničnih bolesti jetre, a ciroza jetre je i jedan od vodećih rizičnih faktora za razvoj HCC-a (1-3). Uzroci kronične bolesti jetre su mnogobrojni, s rasponom od virusne etiologije, nasljednih bolesti (npr. hemokromatoza i bolesti nakupljanja glikogena), toksične etiologije (npr. lijekovi, alkohol i aflatoksin B1) do kronične bolesti jetre nepovezane s alkoholom (NAFLD od eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, i NASH, od eng. *non-alcoholic steatohepatitis*) (1–6). Svaki od ovih uzročnika može dovesti do razvoja ciroze te kao takav predstavlja i rizik za razvoj HCC-a (1–3). Infekcija virusom hepatitisa B i C (HBV i HCV) te alkoholizam su najčešći rizični faktori za razvoj kroničnih bolesti i ciroze jetre i odgovorni su za nastanak više od 80% svih HCC-a (1–3, 5-8). Liječenje HCC-a prilagođava se stadiju bolesti i obuhvaća kirurške metode, lokalne tretmane, ciljane terapije i imunoterapiju. Kirurška resekcija i transplantacija jetre nude potencijalno izlječenje kod ranih slučajeva, dok se transarterijska kemoembolizacija (TACE, od eng. *transarterial chemoembolization*) primjenjuje kod pacijenata s više tumorskih lezija bez udaljenog širenja. U naprednim stadijima ključnu ulogu imaju sistemske terapije, uključujući inhibitore tirozinske kinaze i imunoterapije. Novi terapijski pravci istražuju epigenetske mehanizme i personalizirane pristupe kako bi se poboljšali ishodi liječenja i smanjile nuspojave (9–12).

Iako HCC može nastati kao posljedica djelovanja različitih štetnih faktora, danas je poznato da ipak postoje neke zajedničke karakteristike mehanizma nastanka HCC-a različitih etiologija kao npr. virusne i alkoholne etiologije. Svaki od rizičnih faktora, kroz duži period djelovanja na stanice jetre može dovesti do somatskih i epigenetskih mutacija i promjena u oštećenoj stanici te samim tim do razvoja HCC-a (13, 14). U stanicama HCC- a može se dokazati između 60 i 70 somatskih mutacija (14). Postoje oko 34 mutacije koje se mogu dokazati kod svih HCC-a neovisno o njihovoj etiologiji (14), a najviše sličnosti u mutacijama postoji između stanica HCC-a induciranog infekcijom HBV-om i stanica HCC-a induciranog prekomjernom konzumacijom alkohola (15). Najčešća somatska mutacija u stanicama HCC-a je ona koja zahvaća promotorsku regiju gena *TERT* (od eng. *telomerase reverse*

transcriptase). *TERT* je glavni regulator duljine telomera i ova mutacija se može dokazati čak u 60% svih HCC-a (13, 14). Postoji nekoliko signalnih putova koji su aktivirani u stanicama HCC-a, a čija je uloga bitna u njegovom nastanku (15, 16). Najčešće su zabilježene promjene u signalnom putu fosfatidilinositol-3-kinaze i proteinske kinaze B (PI3K/AKT, od eng. *the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)*)), signalnom putu Wnt/ β -katenin (od eng. *wingless-type MMTV integration site family member*), Myc te signalnom putu Hedgehog (16). Glavne mutacije gena koji sudjeluju u regulaciji signalnog puta Wnt/ β -katenin su mutacije gena *aksin 1* i *2* (*AXIN1/2*, od eng. *Axin-1, Axin-2*) te *beta-katenina* (*CTNNB1*, od eng. *Catenin Beta 1*) (13–16). Mutacije gena *AXIN1/2* dovode do prekomjerne aktivacije signalnog puta Wnt/ β -katenin što dovodi do poremećaja regulacije staničnog ciklusa (16). Mutacije gena *CTNNB1* dovode do promjene u strukturi β -katenina koji se zbog njih ne može razgraditi (16). Mutacije gena za tumorski supresor p53 (*TP53*, od eng. *tumor protein P53*) koje dovode do njegove supresije su prisutne u oko 27% HCC-a (14). Osim navedenih mehanizama nastanka HCC-a jako važnu ulogu ima i oksidacijski stres (17) koji dovodi do nastanka različitih vrsta štetnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, od eng. *reactive oxygen species*) koji mogu dovesti do promjena u različitim signalnim putevima (17). U hepatocitima inficiranim HBV-om dolazi do povišenih razina ROS-a zbog oštećenja mitohondrija, a samim metabolizmom alkohola koji se odvija u jetri dolazi do nastanka acetaldehida koji dovodi do oštećenja mitohondrija (17). Osim navedenog, do nastanka oksidacijskog stresa mogu dovesti i mutacije u različitim genima mogu dovesti npr. gena *NFE2L2* (od eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (13).

Na osnovu mutacija zabilježenih u tumorskim stanicama HCC-a postoje dvije molekularne skupine HCC-a. Proliferativna skupina, koja je više se češće nalazi kod HCC-a induciranog HBV-om, ujedno ima lošiju prognozu. Za nju je karakteristična ne samo proliferacija tumorskih stanica, nego i genetska nestabilnost, kao i mutacije u genima *TP53* i ciklin D1 (*CCND1*, od eng. *Cyclin D1*), te promjene u signalnim putovima transkripcijskog faktora 1 E2F (*E2F1*, od eng. *E2F transcription factor 1*) i PI3K/AKT (13, 14, 19). Neproliferativna skupina, u koju se najčešće ubrajaju hepatocelularni karcinomi alkoholne i HCV etiologije i koja ima bolju prognozu, obuhvaća promjene u promotoru gena *TERT* i genu *CTNNB1* (13, 14, 19). Cjelokupna podjela HCC-a u molekularne skupine je puno složenija (14, 19).

Osim opisanih promjena u genima i u signalnim putevima, postoji sve više istraživanja o mikro RNA (miRNA, od eng. *microRNA*) koje kontroliraju ekspresiju bitnih proteina te na taj način sudjeluju u tumorigenezi. Novija su istraživanja pokazala da važnu

ulogu u patogenezi fibroze tkiva jetre nastale kao posljedica infekcije hepatocita virusima hepatitisa ima miRNA-221 koja sudjeluje u kontroli apoptoze i proliferacije stanica (7, 18, 20). U zdravom tkivu jetre je do sad otkriveno više od 250 miRNA, a upravo jedna od najznačajnijih u mehanizmu nastanka hepatocelularnog karcinoma je miRNA-221 (6, 20–24). Statistički značajne povišene razine miRNA-221 su zapažene u HCC-u različitih etiologija, posebno u podtipovima vezanim uz virusnu etiologiju gdje su njena uloga, kao i geni koje ona regulira najviše istraženi (20, 21, 23–25) dok njen značaj za razvoj HCC-a alkoholne etiologije još nije poznat.

1.1. Hipoteza i ciljevi doktorskog rada

Hipoteza ovog istraživanja je da mehanizam nastanka hepatocelularnog karcinoma uključuje promijenjenu ekspresiju istih gena neovisno o njegovoj etiologiji.

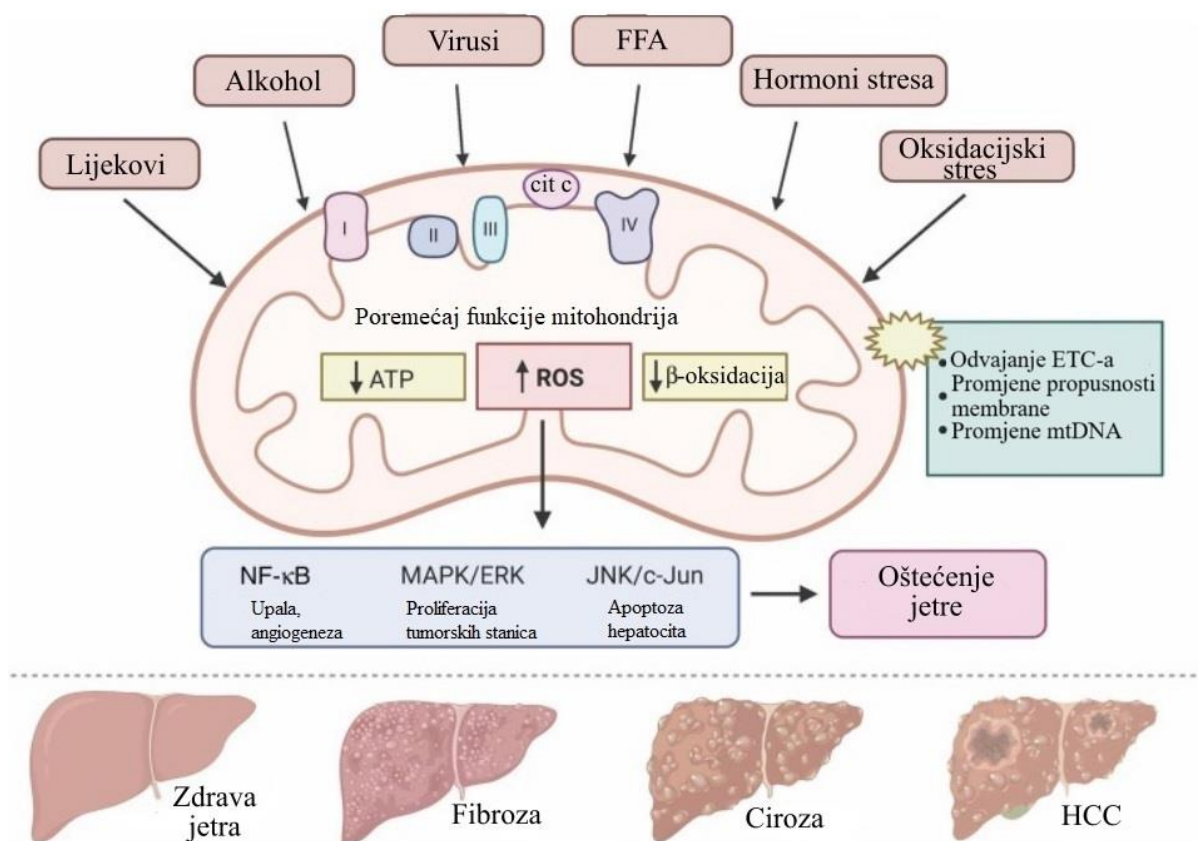
Opći cilj istraživanja je analizirati promjene u ekspresiji specifičnih gena u stanicama HCC-a alkoholne etiologije.

Specifični ciljevi istraživanja su u bioinformatičkoj bazi podataka Gene Expression Omnibus istražiti promjene u transkriptomu hepatocelularnog karcinoma koje nastaju zbog promijenjene razine miRNA-221 u infekciji virusima hepatitisa B i C u odnosu na transkriptom netumorskih hepatocita, zatim u bazi podataka Gene Expression Omnibus odabrati gene specifične za nastanak HCC-a čija je uloga istražena u mehanizmu nastanka HCC-u virusne etiologije, a čiju razinu ekspresije regulira miRNA-221. Nakon toga cilje je odabrati uzorke tkiva nepromijenjenih hepatocita koji će biti kontrolna skupina, ciroznog tkiva jetre i tkiva hepatocelularnog karcinoma alkoholne etiologije te na uzorcima nepromijenjenih hepatocita, ciroznog tkiva jetre i tkiva hepatocelularnog karcinoma alkoholnog porijekla analizirati ekspresiju prethodno odabranih gena bitnih za nastanak HCC-a virusne etiologije.

2. Literaturni pregled

2.1. Hepatocelularni karcinom

U jetri mogu nastati različite vrste primarnih tumora: epitelni tumori (hepatocelularni adenom, hepatocelularni karcinom, karcinom žučnih vodova i dr.), mezenhimski tumori poput hemangioma ili limfomi (1–3). Izrazito česti su epitelni tumori, a najčešći je HCC koji je ujedno i najčešća primarna maligna epitelna neoplazija jetre (1-3). Šesti je najčešći karcinom u svijetu s najvećom incidencijom u Africi i jugoistočnoj Aziji, a četvrti je vodeći uzrok smrti nastalih kao posljedica karcinoma što ga čini jednim od vodećih zdravstvenih problema u svijetu. Češće se javlja u muškaraca nego u žena, pa je tako u pojedinim dijelovima svijeta peti najčešći maligni tumor u muškaraca, dok je u žena na 8. mjestu (1, 3). Incidencija HCC-a u Republici Hrvatskoj za 2021. godinu je 494/100 000 stanovnika, od toga je 318 muškaraca i 176 žena, od čega se u oba spola najčešće pojavljuje u dobi iznad 55 godina. U odnosu na 2019. godinu, kada je incidencija HCC-a iznosila 544, incidencija HCC-a u 2021. godini bila je niža. Kod muškaraca je HCC 10. najčešći karcinom u Republici Hrvatskoj, a 15. je najčešći karcinom kod žena. U Republici Hrvatskoj je HCC sedmi po redu uzrok smrti od malignih bolesti (26). Iako se HCC može razviti u tkivu jetre koje nema kroničnih bolesti tkiva ili u tkivu jetre bez ciroze kao npr. fibrolamelarni podtip HCC-a koji se razvija najčešće u zdravih mladih muškaraca, ipak HCC najčešće nastaje u tkivu jetre s cirozom (1–3, 27). Između 80% i 90 % HCC-a se razvija iz cirozno promijenjene jetre koja nastaje kao krajnji stadij kroničnih bolesti jetre (1, 3). U skupinu kroničnih bolesti jetre ubrajamo: masno promijenjenu jetru (steatoza jetre), upalne bolesti jetre (hepatitisi) i fibrozu jetre (1-4). Gotovo svi pacijenti s HCC-om imaju cirozu jetre za koju se smatra da je ne samo vodeći rizični faktor za razvoj HCC-a nego i prekancerozno stanje (1, 2, 28). Svi uzročnici koji mogu dovesti do razvoja kroničnih bolesti jetre dovode do razvoja ciroze jetre i ujedno predstavljaju rizik za razvoj HCC-a (1-3). Uzroci kronične bolesti jetre su mnogobrojni, s rasponom od virusne etiologije, nasljednih bolesti (npr. hemokromatoza i bolesti nakupljanja glikogena), toksične etiologije (npr. lijekovi, alkohol i aflatoksin B1) do kronične bolesti jetre nepovezane s alkoholom (NAFLD i NASH) (Slika 1.) (1–6).

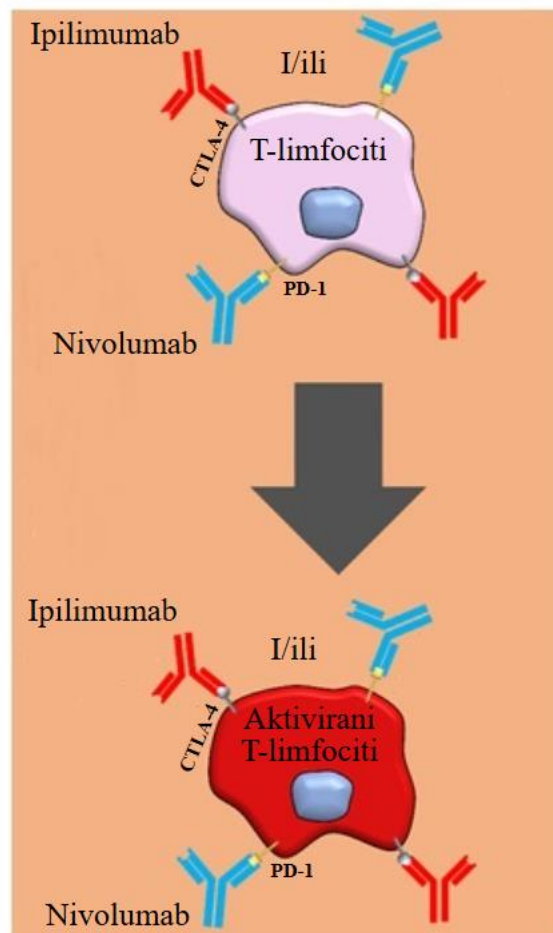


Slika 1. Indukcija oštećenja jetre preko poremećaja funkcije mitohondrija. Preko djelovanja raznih štetnih faktora (lijeikovi, alkohol, virusi, slobodne masne kiseline (FFAs), hormoni stresa i oksidativni stres) dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija. Poremećaj funkcije može nastati kao razdvajanja lanca prijenosa elektrona (ETC), poremećaj propusnosti membrane mitohondrija (MPT mitochondrial permeability transition) ili promjene mitohondrijske DNA (mtDNA), što dovodi do iscrpljenja ATP-a, smanjenja β -oksidacije masnih kiselina i povećanog nakupljanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Ovo stimulira nekoliko signalnih puteva, uključujući NF- κ B, proteinsku kinazu aktiviranu mitogenom (MAPK)/kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom (ERK) i c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK)/c-Jun. Poremećaji u navedenim putevima vode do oštećenja jetre. Na dnu je prikazana progresija zdrave jetre prema jetri s hepatocelularnim karcinomom (HCC) budući da se oštećenja u jetri nakupljaju tijekom vremena. Cit c, citokrom c. Prilagođeno prema Banerjee i suradnicima (29).

Infekcija HBV-om i HCV-om te alkoholizam najčešći su rizični faktori za razvoj kroničnih bolesti i ciroze jetre te potiču nastanak više od 80% svih HCC-a (1–3, 5-7). Oko 5 % svjetske populacije je inficirano HBV-om, a rizik za razvoj HCC-a u pacijenata inficiranih HBV-om je između 20 i 50% (3, 5). U pacijenata inficiranih HCV-om rizik je za razvoj HCC-a 17 puta

veći u odnos na populaciju koja nije inficirana HCV-om, a u pojedinim zemljama čini čak i do 50% novo otkrivenih slučajeva (3, 19). U oko 35% ovisnika o alkoholu se razvije neki oblik kronične bolesti jetre, a oko 47% svih ciroza jetre povezano je s prekomjernom konzumacijom alkohola (4, 5, 8). Liječenje HCC-a temelji se na stadiju bolesti i uključuje kirurške zahvate, lokalno-regionalne terapije, ciljanu terapiju i imunoterapiju. Kirurški zahvati, uključujući resekciju jetre i transplantaciju, predstavljaju potencijalno kurativne metode kod ranog stadija HCC-a kao što su pacijenti s dobro očuvanom funkcijom jetre i pojedinačnim tumorom ili pacijenti koji ne ispunjavaju kriterije za resekciju, a tumor zadovoljava Milanske kriterije (jedan tumor ≤ 5 cm ili do tri tumora ≤ 3 cm). Jedna od minimalno invazivnih vrsta terapije TACE koristi se kod pacijenata s multifokusnom bolešću bez vaskularne invazije ili ekstrahepatičkog širenja. Međutim, kod mnogih pacijenata dijagnoza sepostavlja u uznapredovaloj fazi, gdje su sistemske terapije ključne. Među sistemskim terapijama, sorafenib, inhibitor tirozinske kinaze, dugo je bio standardni terapijski izbor za uznapredovali HCC, ali njegova učinkovitost je ograničena. Noviji inhibitori tirozinske kinaze, poput lenvatiniba, također pokazuju kliničku učinkovitost kao terapija prve linije. Imunoterapija je značajno unaprijedila liječenje HCC-a. Atezolizumab je imunoterapijski lijek koji blokira ligand 1 za programiranu smrt stanice (PD-L1, od eng. *programmed cell death ligand 1*), koji se nalazi na površini tumorskih stanica, a čija uloga je deaktivacija T-limfocita imunološkog sustava. Ekspresija PD-L1 omogućava tumoru da izbjegava uništenje od strane imunološkog sustava. Kada ligand PD-L1 veže svoj receptor, protein 1 za programiranu smrt stanice (PD-1, od eng. *programmed cell death protein 1*) receptor na T-limfocitima, imunološki odgovor protiv tumora slabi. Inhibicijom ovog puta, atezolizumab ponovno aktivira T-limfocite i omogućava im da napadaju tumorske stanice. Bevacizumab je monoklonsko protutijelo koje cilja VEGF, molekulu ključnu za angiogenezu, stvaranje novih krvnih žila tumora. Blokiranjem VEGF-a, bevacizumab smanjuje dotok krvi u tumor i smanjuje njegovu sposobnost rasta. U kombinaciji, ovi lijekovi omogućuju jači imunološki odgovor protiv tumora i smanjuju opskrbu tumora kisikom i hranjivim tvarima. Kombinacija antitijela atezolizumaba i bevacizumaba pokazala je bolju učinkovitost u usporedbi sa sorafenibom, čime je postala preferirana opcija u prvoj liniji liječenja. Drugi imunoterapijski režimi uključuju nivolumab i ipilimumab, koji ciljaju PD-1 i CTLA-4 (od eng. *cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4*) te su posebno korisni kod pacijenata koji ne odgovaraju na prve linije terapije. Nivolumab blokira receptor PD-1 na T-limfocitima (Slika 2.), što sprječava da tumorske stanice uspore ili deaktiviraju imunološki odgovor. Time se pojačava aktivnost T-limfocita koje mogu ubijati tumorske stanice. Ipilimumab je blokator

CTLA-4, još jednog kočničkog receptora na T-limfocitima. CTLA-4 normalno ograničava imunološke reakcije kako bi spriječio autoimunu reakciju. Njegovim blokiranjem ipilimumab potakne snažniju i trajniju aktivaciju T-limfocita što omogućava učinkovitije uništavanje tumorskih stanica (Slika 2.). Kombinacija nivolumaba i ipilimumaba pojačava aktivaciju i proliferaciju T-limfocita na više razina imunološkog odgovora i produžuje preživljenje kod pacijenata s uznapredovalim HCC-om.



Slika 2. Djelovanje nivolumaba i ipilimumaba u kombinaciji ili samostalno. PD-1 - protein programirane stanične smrti 1 (eng. *programmed cell death protein 1*), CTLA-4 – protein 4 povezan s citotoksičnim limfocitima (eng. *cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4*). Prilagođeno prema Kooshkaki i suradnicima (30)

Osim ciljanih terapija, istražuju se i epigenetski mehanizmi u razvoju HCC-a, a potencijalne terapijske strategije uključuju inhibitore metilacije DNA i modulatore miRNA, koji bi mogli omogućiti preciznije liječenje na temelju individualnih molekularnih karakteristika tumora. Budući smjerovi terapije usmjereni su na personalizirani pristup, gdje se kombiniraju genetski (kao npr. mutacije, polimorfizmi i translokacije) i epigenetski biomarkeri (kao npr.

metilacija DNA, histonske modifikacije i ekspresija miRNA) s ciljem optimizacije terapijskih režima, čime bi se poboljšalo preživljenje i smanjile nuspojave (9– 4).

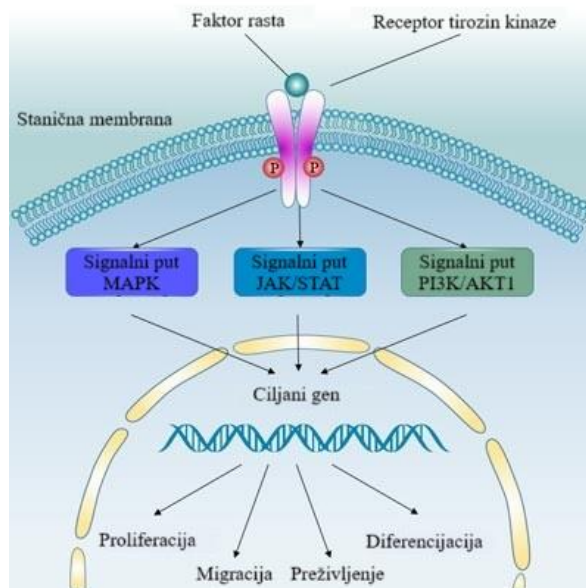
2.2. Molekularna patogeneza hepatocelularnog karcinoma

Iako postoji velik broj različitih rizičnih faktora za razvoj HCC-a, dosadašnja su istraživanja pokazala neke zajedničke karakteristike u mehanizmu nastanka HCC-a različite etiologije, posebno virusne i alkoholne etiologije. HCC nastaje u stanicama koje su kroz niz dioba, zbog kontinuiranog djelovanja štetnog faktora, poprimile somatske mutacije i epigenetske promjene (13, 14). U stanicama HCC-a može se dokazati između 60 i 70 somatskih mutacija (14). Ove promjene su najčešće usputne mutacije (od eng. *passenger mutations*) koje se nakupljaju tijekom tumorskog razvoja, ali nemaju značajnu ulogu u pokretanju ili održavanju rasta HCC-a (13, 14). U HCC-u, identificirane su brojne takve mutacije. Na primjer, mutacije u genu *TTN* (od eng. *titin*) često se nalaze u HCC-u, ali se smatraju putničkim mutacijama bez značajne uloge u karcinogenezi. Ove mutacije ne pružaju selektivnu prednost tumorskim stanicama i stoga nisu ključne za razvoj ili progresiju HCC-a. (31, 32). *MUC16* (od eng. *Mucin 16*) kodira veliki transmembranski protein uključen u zaštitu epitela i interakciju sa staničnim okolišem. Iako su mutacije u *MUC16* često otkrivene u genomskim analizama HCC-a, one nemaju ključnu ulogu u pokretanju ili održavanju tumorskog rasta. Ove mutacije su obično sekundarne, nastale zbog povećane genomske nestabilnosti u tumorskim stanicama, ali ne utječu značajno na glavne signalne putove tumorigeneze (31, 32). Najbitnije su pokretačke mutacije (od eng. *driver mutations*) koje izravno potiču tumorigenezu jer mijenjaju funkciju ključnih gena koji kontroliraju proliferaciju, apoptozu i staničnu diferencijaciju (13, 14). Primjeri pokretačkih i najčešćih mutacija u HCC-u su mutacije u *TP53*, *CTNNB1*, mutacije u promotorskoj regiji *TERT* koje omogućuju besmrtnost tumorskih stanica produljenjem telomera te mutacije gena *AXIN1* koji je negativni regulator signalnog puta Wnt/ β -katenin. Njegove mutacije potiču aktivaciju β -katenina i tumorigenezu. Česte su mutacije gena *PIK3CA* (od eng. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) koji kodira podjedinicu enzima PI3K, a koje aktiviraju signalni put PI3K/AKT/mTOR (od eng. *phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin*), čime se potiče preživljavanje tumorskih stanica (1, 13–16, 19, 27, 28, 33–41). Osim u HCC-u, pokretačke mutacije istražene su i definirane i u nastanku drugih tumora. Mutacija gena *BRAF*, posebno *V600E* (od eng. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, variant V600E*), uzrokuje konstantnu aktivaciju signalnog puta MAPK (od eng. *mitogen-activated protein kinase*), što dovodi do

nekontrolirane proliferacije melanocita (42). Drugi primjer pokretačkih mutacija koja je jedna od najčešćih mutacija u tumorima, a značajna ne samo u mehanizmu nastanka i razvoja tumora, nego i u pristupu liječenja je mutacija u genu *KRAS* (od eng. *Kirsten rat sarcoma virus proto-oncogene*). Mutacije u genu *KRAS* često dovode do konstantne aktivacije signalnog puta RAS/MAPK (od eng. *RAS/mitogen-activated protein kinase*), što rezultira nekontroliranom proliferacijom stanica i razvojem različitih tipova karcinoma, uključujući kolorektalni karcinom, karcinom pluća i pankreasa (43, 44). Ove mutacije također mogu uzrokovati otpornost tumora na inhibitore epidermnog faktora rasta (EGFR, od eng. *epidermal growth factor receptor*), poput cetuksimaba (44). Aktivirajuće mutacije u *EGFR* su također jedan od primjera pokretačkih mutacija, a dovode do hiperaktivacije tirozinske kinaze, što rezultira povećanom stopom stanične diobe u karcinomu pluća ne-malih stanica (NSCLC, od eng. *non-small-cell lung cancer*) (45). U karcinomima dojke i jajnika jedna od najvažnijih pokretačkih mutacija je u genima *BRCA1* i *BRCA2* (od eng. *breast cancer susceptibility protein 1 and 2*). Geni *BRCA1* i *BRCA2* imaju ključnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma, prvenstveno kroz sudjelovanje u procesima popravka oštećenja DNA, regulacije transkripcije i kontrole staničnog ciklusa. Kada dođe do oštećenja DNA, *BRCA1* djeluje kao signalni regulator koji inicira mehanizme popravka, uključujući homolognu rekombinaciju, proces koji omogućava precizan popravak dvostrukih lomova DNA. Ovaj gen također sudjeluje u regulaciji transkripcije i kontroli staničnog ciklusa kako bi se spriječila proliferacija stanica s oštećenim genomom. S druge strane, *BRCA2* ima izravnu ulogu u procesu popravka DNA jer omogućava pravilnu funkciju proteina Rad51 (od eng. *RAD51 recombinase*), koji je ključan za homolognu rekombinaciju. Mutacije u genu *BRCA2* dovode do smanjene sposobnosti stanica da popravljaju dvostruke lomove DNA, što rezultira povećanom akumulacijom mutacija i rizikom od nastanka malignih bolesti (41, 46–48).

Osim mutacija pojedinih gena za tumorske supresore ili onkogeni, poznate su i promjene u genima koji imaju značajnu ulogu u signalnim putovima koji reguliraju ključne stanične procese poput preživljavanja, angiogeneze i metastaziranja te imaju značajnu ulogu u razvoju HCC-a (16). Promjene u signalnim putovima mogu biti uzrokovane mutacijama, ali i drugim mehanizmima, poput epigenetskih promjena ili deregulacije ekspresije proteina. To dovodi do neravnoteže u cijelom signalnom sustavu, što omogućava nekontrolirani rast tumora. Najvažniji signalni putovi koji su deregulirani u HCC-u su: signalni put Wnt/ β -katenin koji je često aktiviran zbog mutacija u *CTNNB1*, što potiče proliferaciju tumorskih stanica, signalni put PI3K/AKT/mTOR pri čemu deregulacija ovog puta poboljšava stanično

preživljavanje, rast i otpornost na apoptozu, signalni put MAPK/ERK koji aktiviran u HCC-u potiče proliferaciju i metastaziranje (Slika 3.) (1, 13–16, 19, 27, 28, 33–40).



Slika 3. Uloga signalni put tirozin kinaze receptora. MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenom (od eng. *mitogen-activated protein kinase*), JAK/STAT - Janus kinaza/prijenosnik signala i aktivator transkripcije (od eng. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), PI3K/AKT - fosfatidilinositol-3-kinaza i proteinska kinaza B (od eng. *the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)*). Prilagođeno prema CUSABIO timu i suradnicima (49).

Postoji oko 30 mutacija koji se mogu dokazati kod svih HCC-a neovisno o njihovoj etiologiji (Tablica 1.) (1, 13–16, 19, 27, 28, 33–40, 50–71)

Tablica 1. Pokretačke mutacije gena u hepatocelularnom karcinomu

Mutirani gen	Funkcija gena	Vrsta promjene u genu
<i>TERT</i>	Održavanje telomera	Mutacija promotora, amplifikacija
<i>TP53</i>	Regulacija staničnog ciklusa	Gubitak funkcije
<i>ATM</i>	Popravlak DNA oštećenja i održavanje stanične stabilnosti	Gubitak funkcije

Tablica 1. Nastavak

Mutirani gen	Funkcija gena	Vrsta promjene u genu
<i>RBI</i>	Sprječava nekontroliranu proliferaciju stanica blokirajući prijelaz stanice iz faze G1 u fazu S	Gubitak funkcije
<i>MYC</i>	Regulira proliferaciju	Amplifikacija
<i>CTNNB1</i>	Regulacija proliferacije, prijelaz stanice iz faze G1 u fazu S	Aktivirajuća mutacija
<i>AXIN1</i>	Regulacija signalnog puta Wnt/ β -katenin	Gubitak funkcije
<i>APC</i>	Uloga u regulaciji signalnog puta Wnt/ β -katenin	Gubitak funkcije
<i>ARID1A</i>	Kontrolira stanični ciklus, popravak DNA i ekspresiju gena preko kompleksa za remodeliranje kromatina SWI/SNF	Gubitak funkcije
<i>ARID2</i>	Kontrolira stanični ciklus, popravak DNA i ekspresiju gena preko kompleksa za remodeliranje kromatina SWI/SNF	Gubitak funkcije
<i>KMT2A</i>	Sudjeluje u metilaciji H3K4 regije histona, važan faktor u regulaciji ekspresije gena	Gubitak funkcije
<i>KMT2C</i>	Preko histonske metiltransferaze utječe na ekspresiju gena za tumorske supresore poput <i>CDKN2A</i> i na ekspresiju <i>MYC</i> -a	Gubitak funkcije

Tablica 1. Nastavak

Mutirani gen	Funkcija gena	Vrsta promjene u genu
<i>KMT2B</i>	Prekohistonske metiltransferaze inhibira ekspresiju gena za tumorske supresore poput <i>CDKN2A</i> i <i>TP53</i>	Gubitak funkcije
<i>BAP1</i>	Kao deubikvitinaza (DUB) sudjeluje u kontroli stabilnosti, lokalizacije i funkcije proteina uključenih u epigenetsku regulaciju, popravak DNA, staničnu proliferaciju i apoptozu	Gubitak funkcije
<i>RPS6KA3</i>	Kodira RSK2 (ribosomal S6 kinase 2), serinsku/treoninsku kinazu uključenu u signalni put MAPK/ERK	Inaktivacija
<i>PIK3CA</i>	Kodira pojediniću enzima PI3K te sudjeluje u signalnom putu PI3K/AKT/mTOR	Aktivirajuća mutacija
<i>KRAS</i>	Kodira GTPazu uključenu u signalni put RAS/MAPK	Aktivirajuća mutacija
<i>NRAS</i>	Kodira GTPazu uključenu u signalni put RAS/MAPK	Aktivirajuća mutacija
<i>PDGFRA</i>	Kodira PDGFR α , receptor tirozinske kinaze (RTK) koji sudjeluje u signalnim putovima MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR i JAK/STAT	Prekomjerna ekspresija
<i>EGFR</i>	Kodira receptor tirozinske kinaze i sudjeluje u signalnim putovima RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR i JAK/STAT	Aktivirajuća mutacija

Tablica 1. Nastavak

Mutirani gen	Funkcija gena	Vrsta promjene u genu
<i>PTEN</i>	Kodira fosfatazu odgovornu za negativnu regulaciju signalnog puta PI3K/AKT/mTOR	Gubitak funkcije
<i>FGF19</i>	Preko FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4) sudjeluje u regulaciji različitih signalnih putova	Amplifikacija
<i>VEGFA</i>	Kodira VEGF-A, faktor rasta koji regulira angiogenezu, vaskularnu permeabilnost i preživljavanje endotelnih stanica	Amplifikacija
<i>NFE2L2</i>	Kodira NRF2 (od eng. <i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>), ključni transkripcijski faktor koji regulira antioksidacijski odgovor i detoksifikaciju u stanicama	Aktivirajuća mutacija
<i>KEAP1</i>	Kodira negativni regulator NRF2 (kodiran genom NFE2L2), čime kontrolira antioksidacijski odgovor i metabolizam stanice	Aktivirajuća mutacija
<i>ALB</i>	Kodira albumin koji ima ključnu ulogu u održavanju osmotske ravnoteže, transportu molekula (lipida, hormona, lijekova) i antioksidacijskoj zaštiti	Mutacija/snižena regulacija

Tablica 1. Nastavak

Mutirani gen	Funkcija gena	Vrsta promjene u genu
<i>APOB</i>	Kodira apolipoprotein B (ApoB), ima važnu ulogu u metabolizmu lipida, transportu kolesterola i triglicerida	Mutacija/smanjena ekspresija
<i>IL6ST</i>	Kodira gp130, važan posrednik u signalnom putu JAK/STAT	Mutacija
<i>JAK1</i>	Član porodice JAK (Janus kinaza) koja sudjeluje u prijenosu signala iz citokinskih receptora putem signalnog puta JAK/STAT	Mutacija
<i>ACVR2A</i>	Kodira ACVR2A, receptor za aktivine, koji pripadaju porodici signalnih puteva te sudjeluje u regulaciji signalnih putova poput PI3K/AKT i MAPK	Gubitak funkcije
<i>IGF2R</i>	Kodira receptor za inzulinu sličan faktor rasta 2 (IGF-2R), koji ima tumor-supresorsku ulogu u regulaciji rasta stanica, internalizacije liganda i razgradnje IGF-2	Mutacija

TERT – telomerazna reverzna transkriptaza (od eng. *telomerase reverse transcriptase*), *TP53* – tumorski protein p53 (od eng. *tumor protein p53*), *ATM* – mutirana ataksija-telangiektazija (od eng. *ataxia-telangiectasia mutated*), *RBI* – retinoblastomski protein 1 (od eng. *retinoblastoma 1*), *MYC* – protoonkogen MYC (od eng. *MYC proto-oncogene*, *BHLH Transcription Factor*), *CTNNB1* – beta-katenin (od eng. *catenin beta 1*), *AXIN1* – Aksin 1 (od eng. *Axin 1*), *AXIN2* – Aksin 2 (od eng. *Axin 2*), *APC* – adenomatozna polipoza kolona (od eng. *adenomatous polyposis coli*), *ARID1A* – gen za domenu interakcije bogatu AT sekvencama 1A (od eng. *AT-rich interaction domain 1A*), *ARID2* – gen za domenu

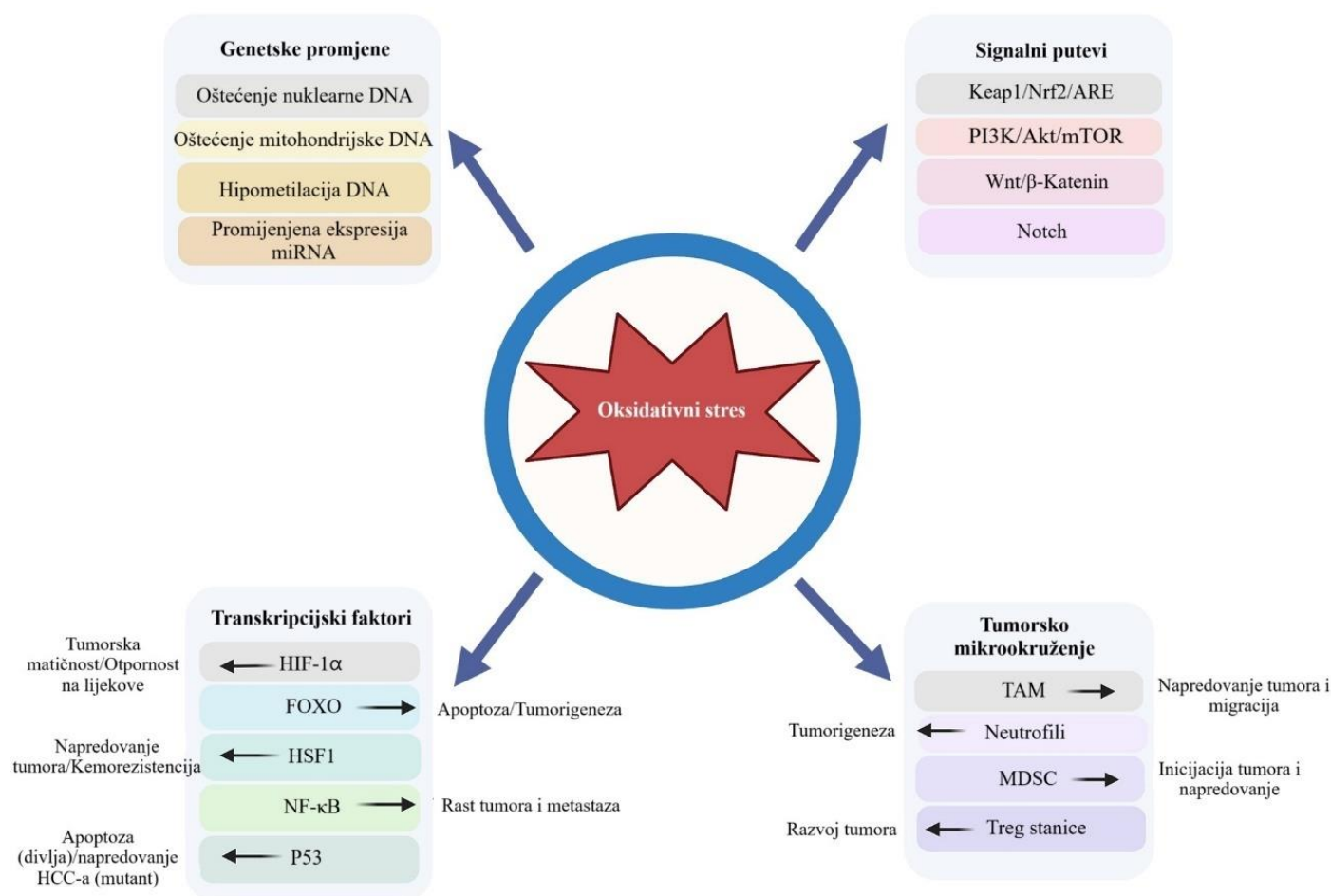
interakcije bogatu AT sekvencama 2 (od eng. *AT-rich interaction domain 2*), *KMT2A* – histolizin metiltransferaza 2A (od eng. *lysine methyltransferase 2A*), *KMT2C* – histolizin metiltransferaza 2C (od eng. *lysine methyltransferase 2C*), *KMT2B* – histolizin metiltransferaza 2B (od eng. *lysine methyltransferase 2B*), *BAP1* –BRCA1 pridruženi protein 1 (od eng. *BRCA1 associated protein 1*), *RPS6KA3* – ribosomska proteinska S6 kinaza alfa 3 (od eng. *ribosomal protein S6 kinase A3*), *PIK3CA* – alfa katalitička podjedinica fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaze, (od eng. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), *KRAS* – Kristen-ov virus sarkoma u štakora (od eng. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*) *NRAS* – neuroblastomski virusni onkogen RAS (od eng. *neuroblastoma RAS viral oncogene*), *PDGFRA* – alfa receptor faktora rasta izoliran iz trombocita (od eng. *platelet-derived growth factor receptor alpha*), *EGFR* – receptor epidermnog faktora rasta (od eng. *epidermal growth factor receptor*), *PTEN* – homolog fosfataze i tenzina (od eng. *phosphatase and tensin homolog*), *FGF19* – faktor rasta fibroblasta 19 (od eng. *fibroblast growth factor 19*), *VEGFA* – vaskularni endotelni faktor rasta A (od eng. *vascular endothelial growth factor A*), *NFE2L2* – faktor 2 srodan nuklearnom eritroidnom faktoru 2 (od eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), *KEAP1* - Kelch-povezani ECH-pridruženi protein 1 (od eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), *ALB* – Albumin (od eng. *Albumin*), *APOB* – apolipoprotein B (od eng. *apolipoprotein B*), *IL6ST* – signalni transduktor interleukina 6 (od eng. *interleukin 6 signal transducer*), *JAK1* – Janus kinaza 1 (od eng. *Janus kinase 1*), *ACVR2A* – aktivinski receptor tipa 2A (od eng. *activin A receptor type 2A*), *IGF2R* – receptor faktora rasta sličan inzulinu (od eng. *insulin-like growth factor 2 receptor*), Wnt/ β -katenin (od eng. *Wingless-type MMTV integration site family member*), SWI/SNF kompleks (od eng. *SWItch/Sucrose non-fermentable*), *CDKN2A* - inhibitor kinaze 2A ovisne o ciklinu (od eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), MAPK/ERK (od eng. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), PI3K/AKT/mTOR (od eng. *phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin*), RAS/MAPK (od eng. *RAS/mitogen-activated protein kinase*), JAK/STAT - Janus kinaza/prijenosnik signala i aktivator transkripcije (od eng. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), TGF- β - transformirajući faktor rasta beta (od eng. *transforming growth factor beta*)

Pokazano je da najviše sličnosti u mutacijama postoji između stanica HCC-a induciranog infekcijom HBV-om i stanica HCC-a induciranog prekomjernom konzumacijom alkohola (15). U navedenim etiologijama postoji čak 25% sličnosti i preklapanja mutiranih

gena ključnih za nastanak HCC-a (15, 16). Najčešće pronađene mutacije gena su u promotoru gena *TERT*, genu *CTNNB1* i genu za tumorski supresor *TP53* (1, 13, 33). Najčešća somatska mutacija u stanicama HCC-a je ona koja zahvaća promotorsku regiju gena *TERT*, a može se dokazati čak u 60% svih HCC-a neovisno o njegovoj etiologiji. *TERT* je glavni regulator aktivnosti enzima telomeraze te je i glavni regulator duljine telomera pa njegove mutacije omogućuju održavanje telomera i preživljenje tumorskih stanica (1, 13, 14, 27, 34). Mutacije u genu *TERT* su jedna od najranijih promjena koje se mogu dokazati u stanicama HCC-a (1, 34). Druga najčešća mutacija koje se može vidjeti u stanicama HCC-a je mutacija gena *TP53* (1, 14, 35–37). Gen *TP53* je dobio naziv „čuvara genoma“ te je općenito jedan od najčešće mutiranih gena u procesu tumorigeneze, a sudjeluje u brojnim procesima regulacije dijeljenja stanica i sprječavanja oštećenja genoma (14, 35). *TP53* djeluje kao zaštitni mehanizam protiv nastanka karcinoma jer nadzire ključne procese u stanici, poput diobe, popravka DNA i apoptoze. Kada u stanici nastane genetsko oštećenje, *TP53* se aktivira kako bi zaustavio proliferaciju stanice i omogućio popravak DNA. Ako je oštećenje preveliko, *TP53* potiče programiranu staničnu smrt kako bi se spriječila nekontrolirana dioba oštećene stanice. *TP53* sudjeluje u nadzoru prijelaza iz faze G1 u fazu S staničnog ciklusa, gdje dolazi do replikacije DNA. Ako su otkrivene pogreške u genetskom materijalu, *TP53* uzrokuje transkripciju *CDKN1A* (od eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) koji kodira protein p21, koji blokira aktivnost CDK2 (od eng. *cyclin-dependent kinase 2*) i CDK4/6 (od eng. *cyclin-dependent kinase 4/6*), zaustavlja stanični ciklus. Ovim mehanizmom *TP53* osigurava da se stanice ne dijele s oštećenom DNA, čime se sprječava nakupljanje genetskih oštećenja koje mogu dovesti do malignih promjena. Kada u stanici nastane oštećenje genoma, *TP53* potiče ekspresiju proteina uključenih u mehanizme popravka DNA, poput GADD45 (od eng. *growth arrest and DNA damage-inducible 45*) i p53R2 (od eng. *p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2*). Na taj način *TP53* omogućuje obnavljanje stabilnosti genoma i sprječava razvoj mutacija koje bi mogle doprinijeti nastanku karcinoma. Ako popravak nije moguć, *TP53* pokreće apoptotske puteve kako bi eliminirao stanicu s oštećenom DNA. Ako je DNA teško oštećena i nije moguć popravak, *TP53* aktivira gene poput *BAX* (od eng. *BCL2-associated X protein*), *PUMA* (od eng. *p53 upregulated modul of apoptosis*) i *NOXA* (od eng. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), koji potiču apoptozu. Ovaj mehanizam osigurava da stanica ne nastavi živjeti i dijeliti se s nestabilnim genomom, čime se smanjuje vjerojatnost maligne transformacije. Gubitak *TP53* često dolazi zajedno s aktivacijom signalnih putova Wnt/ β -katenina i PI3K/AKT/mTOR, što dodatno potiče rast i preživljavanje tumorskih stanica. U hepatocelularnom karcinomu često dolazi do mutacija

TP53, zbog čega tumorske stanice izbjegavaju apoptozu i postaju otpornije na terapijske strategije (13–15, 19, 21, 58, 64, 65, 70–73). Mutacije gena za tumorski supresor *TP53* najčešće dovode do njegove supresije, a prisutne su u 12 do 48% HCC-a (1, 14, 36, 38). Iako se mutacije u *TP53* genu mogu naći u svim tipovima HCC-a neovisno o njegovoj etiologiji, najčešće su pronađene u stanicama hepatocelularnog karcinoma induciranog virusom (1). Postoji nekoliko signalnih putova koji su aktivirani u stanicama HCC-a, a čija je uloga bitna u njegovom nastanku (15, 16). Najčešće su zabilježene promjene u signalnom putu fosfatidilinositol-3-kinaze i proteinske kinaze B (PI3K/AKT), signalnom putu Wnt/ β -katenin, MYC te signalnom putu Hedgehog (16, 35, 37, 39). Signalni put PI3K/AKT ima ključnu ulogu u kontroli procesa regulacije metabolizama glukoze (15). Signalni put PI3K/AKT neposredno može regulirati i proces apoptoze, što je pokazano u stanicama HCC-a i virusne i alkoholne etiologije gdje dovodi do supresije apoptoze (15). Signalni put Wnt/ β -katenin sudjeluje u mnogim staničnim procesima kao što su apoptoza, rast i dioba te diferencijacija stanica (16, 39). U netumorskom tkivu jetre je razina β -katenina snižena zbog putova njegove regulacije (16), dok je u stanicama HCC-a značajno povećana aktivnost puta Wnt/ β -katenin (16, 39). Glavne mutacije gena koji sudjeluju u regulaciji signalnog puta Wnt/ β -katenin su mutacije gena *AXIN1/2* te *CTNNB1* (13–16, 35). Češće su mutacije gena *CTNNB1* koje dovode do promjene u strukturi β -katenina koji se zbog toga ne može razgraditi (16, 34, 35, 39). Osim što su mutacije gena *CTNNB1* česte u stanicama HCC-a, one se mogu pronaći i u benignim tumorima jetre kao što je hepatocelularni adenom. Ovi adenomi s mutacijama u genu *CTNNB1* imaju i veći rizik za transformaciju u HCC (1, 34). Puno rjeđe su zabilježene mutacije gena *AXIN1/2* koje dovode do prekomjerne aktivacije signalnog puta Wnt/ β -katenin što dovodi do poremećaja regulacije staničnog ciklusa (16). Mutacije gena *AXIN1/2* se mogu pronaći u čak 15% svih HCC-a, a najčešće je u onima induciranom virusom hepatitisa B ili C (1). Promjena u genu *CTNNB1* koja dovodi do promjena u signalnom putu Wnt/ β -katenin treća je najčešća promjena koje se može dokazati u 20 % do 40% svih HCC-a (13, 14, 16, 34, 35, 38). Sve navedene mutacije u pojedinim genima mogu se pronaći u različitom postotku u HCC-u, što ovisi ne samo o etiologiji hepatocelularnog karcinoma nego i o epidemiološkoj rasprostranjenosti HCC-a (33–36, 39). Mutacije u promotoru gena *TERT*, kao i mutacije u genu *CTNNB1* su najčešće prisutne u HCC-u induciranom alkoholom i virusom, posebno HCC-u induciranom infekcijom virusom hepatitisa C (33, 34, 38, 39). Mutacije u genu *TP53* su češće prisutne u HCC-u induciranom virusom hepatitisa B i HCC-u induciranom alkoholom, ali ipak najčešće su dokazane u HCC-u induciranom prekomjernom izlaganju aflatoksinu B1 (13, 35–38). Osim navedenih mehanizama nastanka HCC-a jako važnu ulogu

ima i oksidacijski stres koji je jedan od glavnih mehanizama nastanka HCC-a alkoholne etiologije (17, 38). U oksidacijskom stresu dolazi do nastanka različitih vrsta štetnih ROS-a koji ne samo da dovode do DNA-hipometilacije i promjene ekspresije tumor supresor gena u stanici, nego mogu mijenjati i signalne putove kao što su MAPK, Wnt/ β -katenin i druge (Slika 4.) (17, 38, 40).



Slika 4. Uloga oksidativnog stresa u mehanizmu nastanka HCC-a. PI3K/AKT/mTOR (od eng. *phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin*), Wnt/ β -katenin (od eng. *wingless-type MMTV integration site family member*), KEAP1/NRF2/ARE put, HIF-1 α - alfa podjedinica faktora 1 inducirano hipoksijom (od eng. *hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit*), FOXO (od eng. *forkhead box O3*), HSF1 - faktor toplinskog šoka 1 (od eng. *heat shock factor 1*), NF- κ B – nuklearni faktor kappa B (od eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), p53 - tumorski supresor p53 (TP53, od eng. *tumor protein P53*), TAM - tumoru pridruženi makrofagi (od eng. *tumor-associated macrophages*), MDSC – supresorske stanice mijeloidnog podrijetla (od eng. *myeloid-derived suppressor cells*), Treg – regulatorne T-stanice (od eng. *regulatory T cells*). Prilagođeno prema Li i suradnicima (74).

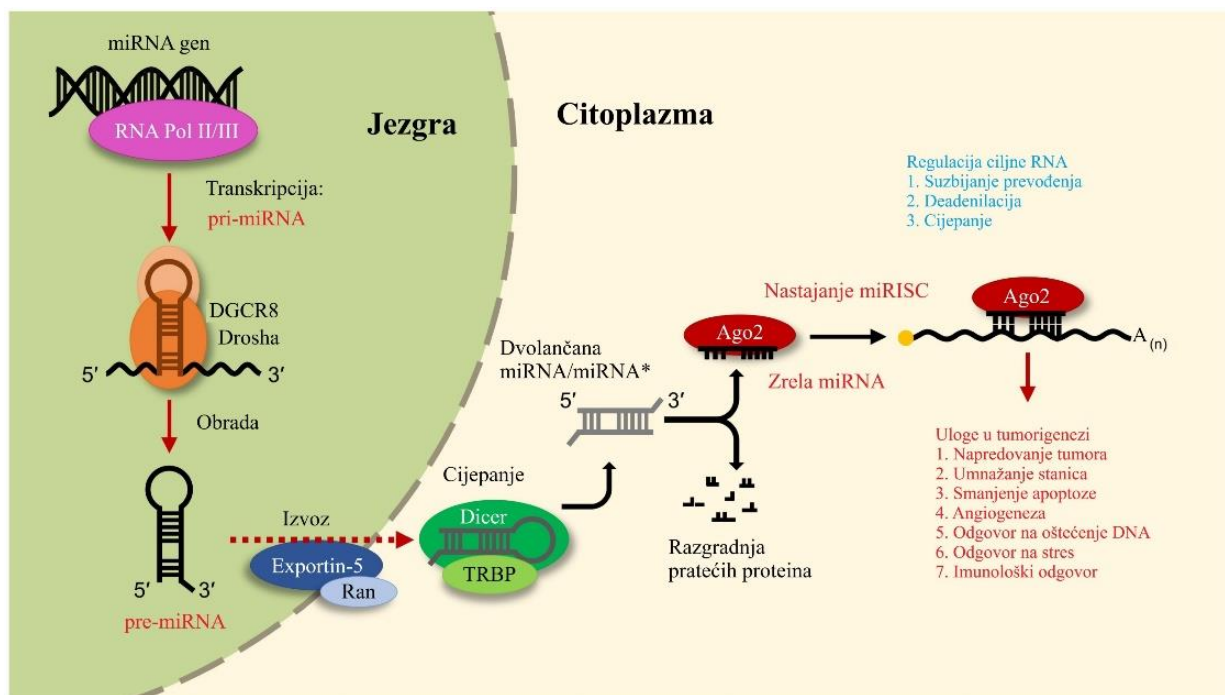
Glavni metabolizam alkohola odvija se u jetri enzimom acetil-dehidrogenazom. Uz pomoć tog enzima nastaje acetaldehid koji je karcinogen. U jetri, enzim CYP2E1 (od eng. *cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*) oksidira etanol, što dovodi do oksidacijskog stresa, oštećenja mitohondrija, povišenih razina ROS-a te do poremećaja u regulaciji staničnih procesa (17, 40). Infekcija HBV-om dovodi do oštećenja mitohondrija koji su glavni izvor ROS-a te na taj način neposredno dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora NF- κ B (od eng. *nuclear factor kappa B subunit 1*) i signalnog puta MAPK (17). S druge strane, mutacije u različitim genima mogu dovesti do nastanka oksidacijskog stresa, porasta ROS-a te na taj način dovesti i do razvoja HCC-a, a to je dokazano npr. kod mutacija gena *NFE2L2* ili mutacije u genu koji kodira mijeloperoksidazu (*MPO*, od eng. *Myeloperoxidase*) (13, 40). Od svih navedenih mutacija, jedino je mutacija promotora gena *TERT* zabilježena i u ciroznom tkivu jetre, tj. u displastičnim čvorovima ciroznog tkiva jetre (1, 14).

Hepatocelularni karcinom pokazuje izrazitu molekularnu heterogenost, što je omogućilo njegovu podjelu u različite podtipove na temelju genomske, transkriptomске i epigenomske analize. Ova klasifikacija, iako još uvijek nije standardizirana u kliničkoj praksi, pruža vrijedne informacije o biološkim svojstvima tumora, njihovoj prognozi i mogućnostima ciljane terapije. Prema molekularnim karakteristikama, HCC se može podijeliti u dvije glavne skupine: proliferativnu i neproliferativnu. Približno polovica slučajeva HCC-a pripada proliferativnoj skupini i povezani su s nepovoljnijim ishodom bolesti. Često su povezani s infekcijom HBV-om i karakterizirani aktivacijom signalnih puteva koji reguliraju rast i preživljavanje stanica, uključujući signalne puteve PI3K-AKT-mTOR i MAPK signalnih puteva.. U ovim tumorima često se nalaze mutacije gena *TP53*, kao i amplifikacije gena povezanih s rastom tumora, poput faktor rasta fibroblasta 19 (*FGF19*, od eng. *fibroblast growth factor 19*) i *CCND1*. Ova skupina dodatno se dijeli na podskupine, pri čemu jedna podskupina pokazuje aktivaciju signalizacije transformirajućim faktorom rasta beta (TGF- β , od eng. *transforming growth factor beta*), dok druga ima obilježja matičnih stanica, s visokom ekspresijom EPCAM (od eng. *epithelial cell adhesion molecule*), AFP (od eng. *alpha-fetoprotein*) i IGF2 (od eng. *insulin-like growth factor 2*). Suprotno tome, tumori u neproliferativnoj skupini imaju stabilniji genom i bolje kliničke ishode. Često su povezani s alkoholnom bolesti jetre i infekcijom HCV-om. Ovi tumori zadržavaju hepatocitni fenotip i u njima se često otkrivaju mutacije gena *CTNBI*, što dovodi do aktivacije signalnog puta Wnt/ β -katenin. Zbog toga ovi tumori pokazuju otpornost na imunoterapiju, što predstavlja

značajan izazov u njihovom liječenju. Pored molekularnih obilježja, HCC se može razvrstati i prema imunološkim karakteristikama u dvije glavne skupine: tumore s izraženom imunosnom aktivnošću (koji se u radovima nazivaju još i "vrući" tumori) i one s isključenim imunosnim odgovorom ("hladni" tumori). Tumori s jakom imunološkom infiltracijom, koji čine otprilike trećinu slučajeva, karakterizirani su visokom ekspresijom PD-1 i PD-L1 (od eng. *programmed cell death ligand 1*), kao i aktivacijom interferonskog signalnog puta, što ih čini pogodnim kandidatima za imunoterapiju. Nasuprot tome, tumori s aktivacijom signalnog puta Wnt/ β -katenin često pokazuju imunološku otpornost („hladni“ tumor), što otežava primjenu imunoterapija u ovim slučajevima. Razumijevanje molekularnih i imunoloških klasa HCC-a ima značajan terapijski potencijal. Ove spoznaje omogućuju precizniji i personaliziraniji pristup liječenju HCC-a, otvarajući put razvoju terapijskih strategija koje će biti prilagođene biološkim karakteristikama pojedinačnih tumora (13, 14, 19, 64).

2.3. miRNA-221

Osim navedenih genskih mutacija, unatrag 30-ak godina istražuju se mikroRNA (miRNA). miRNA su nekodirajuće, jednolančane molekule RNA koje se sastoje od oko 22 nukleotida (75, 776). Važnu ulogu imaju u reguliranju ekspresije gena. Reguliraju oko 30% gena koji kodiraju proteine, na posttranskripcijskoj razini (75, 77). Glavno mjesto djelovanja miRNA je mRNA s posljedicom inhibicije translacije mRNA (od eng. *messenger RNA*) i promjene ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini (75, 78, 79). Djelujući na mRNA, miRNA regulira translaciju i nastanak proteina koji imaju izvršnu funkciju u proliferaciji stanica, apoptozi, angiogenezi ili koji djeluju kao signali rasta (75, 78, 79 75). Jedna miRNA može djelovati na više različitih mRNA, a isto tako više različitih miRNA mogu djelovati na jednu mRNA (75, 79). Unatrag nekoliko godina poseban naglasak je stavljen na istraživanje funkcije i uloge miRNA u procesu tumorigeneze (Slika 5.).



Slika 5. Nastanak miRNA i njena uloga u stanici. RNA pol II/II – RNA polimeraza II/III (od eng. *RNA polymerase II/II*), pri-miRNA – primarna mikro RNA (od eng. *primary micro RNA*), DGCR8 (od engl. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), pre-miRNA - prekursorska mikro RNA (od eng. *precursor micro RNA*), TRBP – protein koji veže RNA element odgovoran za transaktivaciju (od eng. *transactivation response element RNA-binding protein*), Ago2 – argonautski protein 2 (od eng. *argonaute protein 2*) i miRISC – utišavački kompleks induciran pomoću RNA (od eng. *microRNA-induced silencing complex*). Prilagođeno prema Rhim i suradnicima (80).s

Ovisno o ekspresiji gena koje reguliraju, miRNA imaju tumor-supresorsku ili onkogenu ulogu. Uloga miRNA nije uvijek jasno definirana jer jedna miRNA može djelovati na više mRNA, a isto tako i više miRNA mogu djelovati na jednu mRNA te iste miRNA u jednom tkivu mogu djelovati kao tumorski supresori, a u drugom kao onkogeni (75, 79). Ako miRNA inhibira ekspresiju onkogene, tj. inhibira translaciju onkogene mRNA onda ima ulogu tumorskog supresora. U procesu razvoja karcinoma kod kojih određene miRNA imaju ovakvu funkciju, su najčešće smanjeno eksprimirane unutar stanica. Također miRNA mogu inhibirati ekspresiju tumorskih supresora te djelovati kao onkogen, a kao takve su posebno važne u procesima koji dovode do metastaziranja karcinoma. Onkogene miRNA, za razliku od tumor-supresorskih miRNA prekomjerno su eksprimirane u tumorskim stanicama (78, 79). U zdravom tkivu jetre je do sad otkriveno više od 250 miRNA, a jedna od najznačajnijih u

mehanizmu nastanka HCC-a je miRNA-221 (81–85). Novija su istraživanja pokazala da važnu ulogu u patogenezi fibroze tkiva jetre nastale kao posljedica infekcije hepatocita virusima hepatitisa ima upravo miRNA-221 koja sudjeluje u kontroli apoptoze i proliferacije stanica (82, 86, 87). Osim u cirozi inducirane virusom, miRNA-221 ima i važnu ulogu u mehanizmu nastanka HCC-a iste etiologije. Razine MiRNA-221 u stanicama HCC-a su povišene (84). Pokazano je da miRNA-221 regulira ekspresiju proteina p53 i PUMA (21, 86, 88). Jedan od mehanizama preko kojeg miRNA-221 sudjeluje u kontroli apoptoze stanica jest da snižava ekspresiju proteina PUMA, ali točan mehanizam djelovanja je još uvijek neistražen (21, 86, 88). miRNA-221 potiče proliferaciju stanice inhibicijom tumorskih supresora p27 i p57, čime uklanja blokadu staničnog ciklusa, aktivira PI3K/AKT signalni put i omogućuje ulazak stanice u S-fazu (21, 82, 86, 88). Također prekomjerna ekspresija miRNA-221 pridonosi tumorigenezi regulacijom *DDIT4* (od eng. *DNA damage-inducible transcript 4*), *TIMP3* (od eng. *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*) i *PTEN* (od eng. *phosphatase and tensin homolog*) te njihovom regulacijom sudjeluje u aktivaciji signalnog puta PI3K/AKT (21, 82–84). Statistički značajne povišene razine miRNA-221 su detektirane u stanicama HCC-a, posebno u podtipovima vezanim uz virusnu etiologiju (21, 82, 84) ali njena uloga još nije istražena u stanicama HCC-a alkoholne etiologije.

3. Materijali i metode

3.1. Bioinformatička analiza

3.1.1. Javno dostupni skupovi podataka

Za određivanje diferencijalne genske ekspresije između netumorskih primarnih hepatocita, netumorskog tkiva jetre i tkiva HCC, korišteni su javno dostupni skupovi podataka. Za skupove podataka o primarnim hepatocitima korišteni su podaci iz baze podataka *Gene Expression Omnibus* (GEO) pod pristupnim kodom GSE43984 i oni iz baze *Sequence Read Archive* (SRA) pristupniog broja ERR030887, dok su za netumorska tkiva jetre i tkiva HCC-a 25 pacijenata korišteni podaci iz baze podataka *Gene Expression Omnibus* (GEO) GSE105130. Informacije o skupovima podataka dostupne su u Tablici 2. Za eksploratornu i klastersku analizu preuzeti su genski brojevi iz kohorte TCGA-LIHC, koji su generirani pomoću programa STAR mapper. Podaci o genskim brojevima dobiveni su korištenjem paketa TCGABiolinks u programu R (89). Dodatno, kliničke informacije za kohortu TCGA-LIHC preuzete su iz studije Ally i suradnika (90).

Za analizu diferencijalno eksprimiranih gena karakterističnih za HCC, koji su regulirani miRNA-221, izrađen je popis gena korištenjem pretraživanja literature i popisa Qiagen RT2 Profiler PCR Array (Tablica 3).

Tablica 2. Informacije o skupovima podataka

Identifikacijski broj uzorka	Grupa	Ispitanik	Izvorni uzorci parova	Tip	Vrsta uzorka	Pristupni kod
SRR656273	Primarni hepatociti	SRS389152	GSE43984	<i>single read</i>		
ERR030887	Primarni hepatociti	ERR030887	ERR030887	<i>paired end</i>		
SRR651663	Primarni hepatociti	SRS382947		<i>paired end</i>		
SRR651664	Primarni hepatociti	SRS382947		<i>paired end</i>		
SRR6188339	HCC	P1		<i>paired end</i>	Tumor	GSM2819768

Tablica 2. Nastavak

Identifikacijski broj uzorka	Grupa	Ispitanik	Izvorni uzorci parova	Tip	Vrsta uzorka	Pristupni kod
SRR6188341	HCC	P2		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281977 0
SRR6188343	HCC	P3		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281977 2
SRR6188345	HCC	P4		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281977 4
SRR6188347	HCC	P6		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281977 6
SRR6188349	HCC	P7		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281977 8
SRR6188351	HCC	P8		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281978 0
SRR6188353	HCC	P9		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281978 2
SRR6188355	HCC	P10		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281978 4
SRR6188357	HCC	P11		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281978 6
SRR6188359	HCC	P12		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281978 8
SRR6188361	HCC	P13		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281979 0
SRR6188364	HCC	P14		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281979 3
SRR6188366	HCC	P15		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281979 5
SRR6188368	HCC	P16		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281979 7

Tablica 2. Nastavak

Identifikacijski broj uzorka	Grupa	Ispitanik	Izvorni uzorci parova	Tip	Vrsta uzorka	Pristupni kod
SRR6188370	HCC	P17		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281979 9
SRR6188372	HCC	P18		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281980 1
SRR6188374	HCC	P19		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281980 3
SRR6188376	HCC	P20		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281980 5
SRR6188378	HCC	P21		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281980 7
SRR6188380	HCC	P22		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281980 9
SRR6188382	HCC	P23		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281981 1
SRR6188384	HCC	P24		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281981 3
SRR6188386	HCC	P25		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281981 5
SRR6188389	HCC	P28		<i>paired end</i>	Tumor	GSM281981 8

Tablica 3. Popis gena reguliranih miRNA-221

Šifra gena	Gen
27113	<i>BBC3</i>
10018	<i>BCL2L11</i>
90427	<i>BMF</i>
664	<i>BNIP3</i>
1027	<i>CDKN1B</i>

Tablica 3. Nastavak

Šifra gena	Gen
1028	<i>CDKN1C</i>
58487	<i>CREBZF</i>
54541	<i>DDIT4</i>
27123	<i>DKK2</i>
2099	<i>ESR1</i>
2353	<i>FOS</i>
2309	<i>FOXO3</i>
3383	<i>ICAM1</i>
3815	<i>KIT</i>
4312	<i>MMP1</i>
4603	<i>MYBL1</i>
5520	<i>PPP2R2A</i>
5728	<i>PTEN</i>
6648	<i>SOD2</i>
29110	<i>TBK1</i>
3267	<i>AGFG1</i>
23452	<i>ANGPTL2</i>
55608	<i>ANKRD10</i>
378	<i>ARF4</i>
648	<i>BMI1</i>
55589	<i>BMP2K</i>
54897	<i>CASZ1</i>
865	<i>CBFB</i>
961	<i>CD47</i>
22856	<i>CHSY1</i>
3491	<i>CCN1</i>
10238	<i>DCAF7</i>
54165	<i>DCUN1D1</i>
54878	<i>DPP8</i>
8669	<i>EIF3J</i>

Tablica 3. Nastavak

Šifra gena	Gen
2114	<i>ETS2</i>
2332	<i>FMR1</i>
22862	<i>FNDC3A</i>
3344	<i>FOXN2</i>
79690	<i>GAL3ST4</i>
2771	<i>GNAI2</i>
2887	<i>GRB10</i>
3020	<i>H3-3A</i>
143279	<i>HECTD2</i>
10527	<i>IPO7</i>
55614	<i>KIF16B</i>
5597	<i>MAPK6</i>
1955	<i>MEGF9</i>
90007	<i>MIDN</i>
4302	<i>MLLT6</i>
23164	<i>MPRIIP</i>
4801	<i>NFYB</i>
51701	<i>NLK</i>
4908	<i>NTF3</i>
10605	<i>PAIP1</i>
56137	<i>PCDHA12</i>
5295	<i>PIK3R1</i>
23228	<i>PLCL2</i>
10154	<i>PLXNC1</i>
5529	<i>PPP2R5E</i>
5861	<i>RAB1A</i>
6047	<i>RNF4</i>
22838	<i>RNF44</i>
222194	<i>RSBN1L</i>
7095	<i>SEC62</i>

Tablica 3. Nastavak

Šifra gena	Gen
6492	<i>SIMI</i>
6500	<i>SKP1</i>
51312	<i>SLC25A37</i>
81539	<i>SLC38A1</i>
6579	<i>SLCO1A2</i>
8467	<i>SMARCA5</i>
8723	<i>SNX4</i>
8428	<i>STK24</i>
25777	<i>SUN2</i>
6938	<i>TCF12</i>
9874	<i>TLK1</i>
23023	<i>TMCC1</i>
9760	<i>TOX</i>
1831	<i>TSC22D3</i>
7326	<i>UBE2G1</i>
389856	<i>USP27X</i>
7716	<i>VEZF1</i>
22911	<i>WDR47</i>
55884	<i>WSB2</i>

BBC3 – komponenta 3 koja veže BCL2 (od eng. *BCL2 binding component 3*), BCL2L11 – protein 11 sličan BCL-2 (od eng. *BCL2 like 11*), BMF – Bcl-2 modificirajući faktor (od eng. *Bcl2 modifying factor*), BNIP3 –protein 3 koji interagira s BCL2 (od eng. *BCL2 interacting protein 3*), CDKN1B – inhibitor 1B kinaze ovisne o ciklinu (od eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), CDKN1C – inhibitor 1C kinaze ovisne o ciklinu (od eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), CREBZF – CREB/ATF transkripcijski faktor cinkova prsta (od eng. *CREB/ATF BZIP transcription factor zinc finger*), DDIT4 – transkript 4 induciran oštećenjem DNA (od eng. *DNA damage inducible transcript 4*), DKK2 – Dickkopf homolog 2 inhibitor signalnog puta WNT (od eng. *Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2*), ESR1 – Estrogenski receptor 1 (od eng. *estrogen receptor 1*), FOS – Fos protoonkogen, podjedinica transkripcijskog faktora AP1 (od eng. *fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*),

FOXO3 (od eng. *forkhead box O3*), ICAM1 – unutarstanična adhezijaska molekula 1 (od eng. *intercellular adhesion molecule 1*), KIT – KIT protoonkogen, receptor tirozin kinaze (od eng. *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), MMP1 –matriks 1 metaloproteinaza (od eng. *matrix metalloproteinase 1*), MYBL1 – protoonkogen sličan MYB (od eng. *MYB proto-oncogene like 1*), PPP2R2A – regulatorna podjedinica B alfa proteinske fosfataze 2 (od eng. *protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha*), PTEN – fosfataza i tenzin homolog (od eng. *phosphatase and tensin homolog*), SOD2 – superoksid dismutaza 2 (od eng. *superoxide dismutase 2*), TBK1 – kinaza 1 vezana za TANK (od eng. *TANK binding kinase 1*), AGFG1 (od eng. *ArfGAP with FG repeats 1*), ANGPTL2 – protein sličan angiopoetinu (od eng. *angiopoietin Like 2*), ANKRD10 – ankirin ponavljajuća domena 10 (od eng. *Ankyrin Repeat Domain 10*), ARF4 – faktor 4 ADP-ribozilacije (od eng. *ADP ribosylation factor 4*), BMI1 – BMI1 protoonkogen, član Polikomb kompleksa s prstenastom prst domenom (od eng. *BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger*), BMP2K – kinaza inducirana BMP2 (od eng. *BMP2 inducible kinase*), CASZ1 – Castor transkripcijski faktor s cinkovim prstom 1 (od eng. *castor zinc finger 1*), CBFB – beta podjedinica ključnog faktora vezanja jezgre (od eng. *core binding factor beta subunit*), CD47 – CD47 antigen (integrinski vezujući protein) (od eng. *CD47 molecule*), CHSY1 – kondroitin-sulfat sintetaza 1 (od eng. *chondroitin sulfate synthase 1*), CCN1 – faktor 1 stanične komunikacijske mreže (od eng. *cellular communication network factor 1*), DCAF7 – faktor 7 povezan s DDB1 i CUL4 7 (od eng. *DDB1 and CUL4 associated factor 7*), DCUN1D1 – DCN1 protein, regulator E3 ubikvitinskih ligaza (od eng. *DCN1, ubiquitin ligase E3 regulator 1*), DPP8 – dipeptidil peptidaza 8 (od eng. *dipeptidyl peptidase 8*), EIF3J – eukariotski inicijacijski faktor translacije 3, podjedinica J (od eng. *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J*), ETS2 – ETS protoonkogen 2, transkripcijski faktor (od eng. *ETS proto-oncogene 2, transcription factor*), FMR1 – gen za mentalnu retardaciju 1 kod fragilnog X kromosoma (od eng. *fragile X mental retardation 1*), FNDC3A – protein koji sadrži domenu tipa III fibronektina 3A (od eng. *fibronectin type III domain containing 3A*), FOXN2 (od eng. *forkhead box N2*), GAL3ST4 – galaktoza 3-sulfotransferaza 4 (od eng. *galactose-3-O-sulfotransferase 4*), GNAI2 – alfa I2 podjedinica G-proteina (od eng. *G protein subunit alpha I2*), GRB10 – protein 10 vezan za receptor faktora rasta (od eng. *growth factor receptor bound protein 10*), H3-3A – Histonski protein H3, član obitelji 3A (od eng. *H3 histone family member 3A*), HECTD2 – E3 ubikvitinska ligaza s HECT domenom 2 (od eng. *HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 2*), IPO7 – importin 7 (od eng. *importin 7*), KIF16B – član obitelji kinezina 16B (od eng. *kinesin family member 16B*), MAPK6 – mitogen-aktivirana protein kinaza 6 (od eng. *mitogen-activated*

protein kinase 6), MEGF9 – protein s više EGF-sličnih domena 9 (od eng. *multiple EGF like domains 9*), MIDN – Midnolin (od eng. *Midnolin*), MLLT6 – mijeloidni/limfoidni ili mješoviti leukemijski gen; translociran na lokus 6 (od eng. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 6*), MPRIP – Rho-vezujući protein miozinske fosfataze (od eng. *myosin phosphatase rho interacting protein*), NFYB – nuklearni transkripcijski faktor Y, podjedinica beta (od eng. *nuclear transcription factor Y subunit beta*), NLK – Nemo-slična kinaza (od eng. *Nemo like kinase*), NTF-3 – neurotrofin 3 (od eng. *neurotrophin 3*), PAIP1 – protein 1 koji interagira s poli(A) vezujućim proteinom (od eng. *poly(A) binding protein interacting protein 1*), PCDHA12 – protokadherin alfa 12 (od eng. *protocadherin alpha 12*), PIK3R1 – regulatorna podjedinica 1 fosfatidilinozitol-3-kinaze (od eng. *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*), PLCL2 – fosfolipaza C-sličan protein 2 (od eng. *phospholipase C like 2*), PLXNC1 – Plexin C1 (od eng. *Plexin C1*), PPP2R5E – regulatorna podjedinica B' epsilon proteinske fosfataze 2 (od eng. *protein phosphatase 2 regulatory subunit B' epsilon*), RAB1A – RAB1A, član RAS obitelji onkogeni (od eng. *RAB1A, member RAS oncogene family*), RNF4 – protein prstenjaka 4 (od eng. *ring finger protein 4*), RNF44 – protein prstenjaka 44 (od eng. *ring finger protein 44*), RSNB1L – proteinu 1 sličan osnovni protein okruglih spermata (od eng. *round spermatid basic protein 1 like*), SEC62 – SEC62 homolog, faktor za translokaciju preproteina (od eng. *SEC62 homolog, preprotein translocation factor*), SIM1 – transkripcijski faktor 1 iz obitelji Single-minded (bHLH tip) (od eng. *single-minded family BHLH transcription factor 1*), SKP1 – protein 1 povezan s kinazom S-faze (od eng. *S-phase kinase associated protein 1*), SLC25A37 – prijenosnik otopljenih tvari, obitelj 25, član 37 (mitoferrin-1) (od eng. *solute carrier family 25 member 37*), SLC38A1 – prijenosnik otopljenih tvari, obitelj 38, član 1 (od eng. *solute carrier family 38 member 1*), SLCO1A2 – prijenosnik organskih aniona, obitelj SLCO, član 1A2 (od eng. *solute carrier organic anion transporter family member 1A2*), SMARCA5 – regulator kromatina ovisan o aktinu, povezan s matriksom i SWI/SNF kompleksom, podskupina A, član 5 (od eng. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 5*), SNX4 – sortirni neksin 4 (od eng. *sorting nexin 4*), STK24 – serin/treonin kinaza 24 (od eng. *serine/threonine kinase 24*), SUN2 – protein jezgrine ovojnice koji sadrži sad1 i UNC84 (od eng. *Sad1 and UNC84 domain containing 2*), TCF12 – transkripcijski faktor 12 (od eng. *transcription factor 12*), TLK1 – tousled-slična kinaza 1 (od eng. *tousled like kinase 1*), TMCC1 – protein s transmembranskim i zavojnicama povezanim domenama 1 (od eng. *transmembrane and coiled-coil domains 1*), TOX – visokomobilna skupina boks-protein povezana s odabirom timocita (od eng. *thymocyte*

selection associated high mobility group box), TSC22D3 – član 3 obitelji TSC22 domena (od eng. *TSC22 domain family member 3*), UBE2G1 – ubikvitin konjugirajuć enzim E2 G1 (od eng. *ubiquitin conjugating enzyme E2 G1*), USP27X – X-povezana ubiquitinska specifična peptidaza 27 (od eng. *ubiquitin specific peptidase 27 X-linked*), VEZF1 – transkripcijski faktor vaskularnog endotela s cinkovim prstima (od eng. *vascular endothelial zinc finger 1*), WDR47 – protein s WD ponavljajućom domenom 47 (od eng. *WD repeat domain 47*), WSB2 – protein koji sadrži WD ponavljanja i SOCS kutiju 2 (od eng. *WD repeat and SOCS box containing 2*). Popis gena reguliranih miRNA-221 je izrađen korištenjem pretraživanja literature i popisa Qiagen RT2 Profiler PCR Array.

3.1.2. Kontrola kvalitete i mapiranje

Kontrola kvalitete preuzetih neobrađenih sljedova procijenjena je alatom FASTQC-om (verzija v0.11.9) (91). Neobrađeni sekvencijski podaci (raw reads) filtrirani su tako da su uklonjeni dijelovi duljine kraće od 10 baza te oni s kvalitetom manjom od 25. Zatim su uklonjeni adapteri iz sljedova, a sljedovi kraći od 60 bp i prosječne kvalitete ispod 20 uklonjeni su pomoću alata Trimmomatic (verzija 0.32) (92). Sljedovi su mapirani prema sekvencama ljudskog genoma (hg38) pomoću alata STAR (verzija 2.5.3a) (93) sa zadanim postavkama. Mapirani sljedovi izbrojani su preko anotiranih gena iz baze podataka Ensembl (GRCh38.105) pomoću alata FeatureCounts v.2.0.0. (94).

3.1.3. Analiza glavnih komponenti

Sekvence gena s manje od 10 očitavanja u svim uzorcima su uklonjeni. Očitavanja su prilagođena primjenom transformacija za stabilizaciju varijance prije provođenja analize glavnih komponenti (PCA, od eng. *principal component analysis*). PCA je provedena koristeći 3000 najvarijabilnijih značajki. Ovaj proces je proveden zasebno za kombinirane brojeve očitavanja iz svih skupova podataka i za uzorke HCC-a s poznatim etiologijama.

3.1.4. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena reguliranih s miRNA-221 kod HCC-a induciranog virusom i primarnih hepatocita

Za analizu diferencijalno eksprimiranih gena odabrani su uzorci HCC-a inducirani virusom iz skupa podataka GSE105130 i uzorci primarnih hepatocitima. Za diferencijalnu ekspresiju kodirajućih gena između svih grupa uzoraka korišten je paket DESeq2 (95) s postavkom *LFC shrinkage* (96). Diferencijalno eksprimirani geni (DEG) definirani su kao geni s većom apsolutnom vrijednosti logaritamske promjene omjera ekspresije između dvije

skupine od 2 i manjom korigiranom p-vrijednosti s Benjamini-Hochbergovom korekcijom od 0,05. Sve analize provedene su programskom okruženju R verzije 4.3.3 (97).

3.2. Analiza tumorskog tkiva

3.2.1. Uzorci pacijenata

U ovo istraživanje uključeno je ukupno 111 uzoraka tkiva koji su podijeljeni u 3 skupine. Prvu i drugu skupinu skupinu tkiva činila su tkiva 37 pacijenata s novootkrivenim HCC-om dijagnosticiranim u Kliničkoj bolnici Merkur. Prva skupina se sastojala od tumorskog tkiva, a druga od ciroznog tkiva jetre. Treću, kontrolnu, skupinu tkiva činila su tkiva jetre koja nije zahvaćena primarnim tumorom već su to tkiva jetre u kojima su se nalazile metastaze tumora koji nisu tumori jetre i koje je uzeto s mjesta na jetri koje je udaljeno od metastaze te se zbog toga smatraju netumorskim tkivima. U istraživanje su uključeni pacijenti oba spola, koji su stariji od 18 godina, koji imaju dokazanu kroničnu konzumaciju alkohola uz isključenje infekcije virusom hepatitisa B i C te metaboličkog sindroma, koji su imali transplantaciju jetre te koji do pristupanja istraživanju nisu primili niti jedan oblik terapije za liječenje HCC-a. Svi bolesnici obuhvaćeni istraživanjem dali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur na sjednici održanoj 03. listopada 2023. godine s urudžbenim brojem 03/1-7631/3 i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na sjednici održanoj 23. svibnja 2024. godine s urudžbenim brojem 251-59-10106-24-111/51.

Ispitivana skupina, uzorci tkiva HCC-a i ciroznog tkiva jetre su uklopljeni u parafin, fiksirani formalinom, dobiveni su od pacijenata s dijagnozom HCC-a i ciroze jetre koji su zaprimljeni u Kliničku bolnicu Merkur u periodu od 2013. do 2020. godine. Uzorci su prikupljeni iz arhive Zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu. Uzorci tkiva bili su prerezi tkiva debljine 10 µm, pohranjeni u epruvete na sobnoj temperaturi do izolacije nukleinskih kiselina. Opći podaci o pacijentima kojima je dijagnosticiran HCC i ciroza jetre nalaze se u Tablici 4. Bitni laboratorijski parametri pacijenata ispitivane skupine se nalaze u Tablici 5. Svi laboratorijski podaci ispitanika skupine s HCC-om i cirozom jetre uzeti su najmanje 6 mjeseci prije operacije pacijenata tj. prije transplantacije jetre.

Tablica 4. Opći podaci pacijenata ispitivane skupine.

		N	%
Spol	Žene	2	5
	Muškarci	35	95
Dob	≤ 44 godine	1	3
	> 44 godine	36	97
Prosječna dob u vrijeme dijagnoze	62 godine (raspon od 44 godine do 76 godina)		
Gradus	Dobro diferenciran (G1 i G2)	19	51
	Slabo diferenciran (G3 i G4)	18	49
Limfovaskularna invazija	Da	10	27
	Ne	27	73

Među pacijentima najveći je udio muškaraca i pacijenata starijih od 44 godine. Samo je jedan pacijent u vrijeme postavljene dijagnoze imao 44 godine, dok su ostali stariji od 44 godine (97 % pacijenata ispitivane skupine). Prosječna dob u vrijeme dijagnoze je 62 godine.

Tablica 5. Laboratorijski parametri ispitivane skupine.

	Bilirubin	AST	ALT	GGT	ALP	Albumini	AFP
Referentna vrijednost	3 – 20 μmol/L	11 – 34 U/L	8 – 41 U/L	9 – 35 U/L	64 – 153 U/L	41 – 51 g/L	< 7 μg/L
Promijenjeno	31	31	19	36	9	31	18
Sniženo	0	0	0	0	1	31	0
Povišeno	31	31	19	36	8	1	18
Uredno	6	6	18	1	28	3	17
Nema podataka						2	2

AST – aspartat-aminotransferaza, ALT – alanin-aminotransferaza, GGT – gama-glutamil transferaza, ALP – alkalna fosfataza, AFP – alfa-fetoprotein

Sve referentne vrijednosti laboratorijskih parametara određene su prema postupniku na Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. 84 % pacijenata ispitivane skupine imali su povišene vrijednosti, a 16 % pacijenata uredne vrijednosti bilirubina i aspartat-aminotransferaze (AST-a) u krvi. 51 % pacijenata ispitivane skupine imao je povišene vrijednosti, a 49 % pacijenata uredne vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT-a) u krvi, dok je 97 % pacijenata imalo povišene vrijednosti gama-glutariltransferaze (GGT-a). Snižene vrijednosti albumina imalo je 84 % pacijenata ispitivane skupine, dok je 49 % pacijenata imalo povišene vrijednosti alfa-fetoproteina (AFP). Više od 50 % pacijenata ispitivane skupine nije imalo podatak o vrijednostima laktat-dehidrogenaze (LDH) te je zbog toga ovaj parametar isključen iz daljnje obrade u istraživanju.

Kontrolna skupina sadržavala je 37 uzoraka tkiva zdrave jetre uklonjenih zbog metastaze nekog drugog tumora obrađenih na Zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu u razdoblju od 2020. do 2022. godine. Uzorci tkiva bili su prerezi tkiva debljine 10 µm, pohranjeni u epruvete na sobnoj temperaturi do izolacije nukleinskih kiselina. Opći podaci pacijenata kontrolne skupine se nalaze u Tablici 6. Bitni laboratorijski parametri pacijenata kontrolne skupine se nalaze u Tablici 7. S obzirom da se pacijentima koji idu na operaciju jetre zbog neke druge bolesti, u ovom slučaju resekciju metastaze u jetri, ne rade svi laboratorijska parametri najmanje 6 mjeseci prije same operacije, te velik dio podataka nije bio dostupan za sve pacijente kontrolne skupine. Gotovo svi pacijenti kontrolne skupine nemaju laboratorijski nalaz AFP-a.

Tablica 6. Opći podaci pacijenata kontrolne skupine.

		N	%
Spol	Žene	20	54
	Muškarci	17	46
Dob	≤ 44 godine	4	11
	> 44 godine	33	89
Prosječna dob u vrijeme dijagnoze	63 godine (raspon od 41 godine do 78 godina)		

Među pacijentima kontrolne skupine veći je udio žena i pacijenata starijih od 44 godine. Tri pacijenta su u vrijeme postavljanja dijagnoze mlađa od 44 godine. Srednja dob postavljanja dijagnoze (metastaze) je 63 godine.

Tablica 7. Laboratorijski parametri pacijenata kontrolne skupine.

	Bilirubin	AST	ALT	GGT	ALP
Referentna vrijednost	3 – 20 μmol/L	11 – 34 U/L	8 – 41 U/L	9 – 35 U/L	64 – 153 U/L
Promijenjeno	0	7	5	15	10
Sniženo	0	0	0	1	6
Povišeno	0	7	5	14	4
Uredno	37	30	32	22	27

AST – aspartat-aminotransferaza, ALT – alanin-aminotransferaza, GGT – gama-glutamil transferaza, ALP – alkalna fosfataza, AFP – alfa-fetoprotein

Sve referentne vrijednosti laboratorijskih parametara su određene prema postupniku na Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. Nijedan pacijent kontrolne skupine nema promijenjene vrijednosti bilirubina u krvi. 81 % pacijenata je imalo uredne vrijednosti AST-a u krvi. 14 % pacijenata kontrolne skupine imalo je povišene vrijednosti, a 86 % pacijenata uredne vrijednosti ALT-a u krvi, dok je 38 % pacijenata imalo povišene vrijednosti GGT-a. Budući da su pacijenti kontrolne skupine podvrgnuti resekciji jetre zbog metastaza drugih tumora, a ne zbog primarnog tumora jetre, ti pacijenti nisu imali podatke o vrijednostima LDH-a, alfa-fetoproteina i albumina, zbog čega su ovi parametri isključeni iz daljnje obrade u istraživanju.

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija RNA

Izolacija RNA iz uzoraka tkiva jetre uklopljenih u parafin, fiksirani formalinom učinjena je setom kemikalija Quick-DNA/RNATM FFPE Kit (Zymo Research, Tustin, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Prije izolacije pripremljene su otopine proteinaze K, DNaze I i pufera za ispiranje nakon čega su uzorci inkubirani 1 minutu na 55°C u deparafinacijskoj otopini kako se uklonio parafin. Nakon uklanjanja deparafinacijske otopine, uzorci su inkubirani u smjesi digestijskog pufera (2x Digestion Buffer), vode bez DNaze i

RNaza i proteinaze K tri sata na 55°C, nakon čega je proteinaza inaktivirana zagrijavanjem na 94°C 20 minuta. Dobivenim uzorcima je dodan pufer za lizu (DNA/RNA lysis pufer) te su centrifugirani. U dobivenu otopinu RNA na dnu kolektorske epruvete dodan je jednak volumen 100%-tnog etanola, smjesa je prenesena na novu kolonu ZymoSpin IICR te je centrifugirana. RNA na koloni je tretirana DNazom I 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je isprana puferom za ispiranje. Kolone su prebačene u sterilne epruvete i eluirana RNA u 25 µL vode bez DNaza i RNaza. Nakon završenog postupka izolacije RNA, 2 µL uzorka u vodi bez nukleaza korišteno je za određivanje koncentracije i apsorbancije nukleinskih kiselina (A260/280 i A260/230) pomoću spektrofotometrijskog uređaja NanoVue (GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD). Uzorci RNA pohranjeni su na -20 °C do trenutka provođenja nizvodnih analiza.

3.3.2. Reverzna transkripcija

Izolirana RNA reverznom transkripcijom je prepisana u cDNA korištenjem seta kemikalija PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara, Kusatsu, Japan) prema uputama proizvođača navedenima u Tablici 8. i 9. uz korištenje nasumičnih heksamera kao početnica (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD).

Tablica 8. Sadržaj reakcijske smjese I za reverznu transkripciju.

Smjesa	Reagens	Konačna koncentracija
Smjesa I	Nasumični heksameri (50 µM) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)	5 µM
	Smjesa deoksinukleotida (10 mM) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)	1 mM
	RNA	≤ 8 µL (380 ng)
	voda AccuGene (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do 10 µL

Uzorci smjese I zagrijani su u trajanju od 5 minuta na 65°C u uređaju SimpliAmp (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD). RNA izolirana iz svježih stanica HeLa služila je kao pozitivna kontrola. Kao negativna kontrola poslužila je voda bez RNaza AccuGene Molecular Biology Water (Lonza Group, Basel, Švicarska). Nakon hlađenja

uzoraka na ledu 5 minuta, u smjesu I dodana je smjesa II koja je sadržavala reverznu transkriptazu PrimeScript i pripadajući pufer te inhibitor RNaza i vodu.

Tablica 9. Sadržaj reakcijske smjese II za reverznu transkripciju.

Smjesa	Reagens	Konačna koncentracija
Smjesa II	Smjesa I	10 μ L
	pufer 5x PSRT (Takara, Kusatsu, Japan)	1x
	Reverzna transkriptaza PrimeScript (200 U/ μ L) (Takara, Kusatsu, Japan)	5 U/ μ L
	Rekombinantni inhibitor RNaza (40 U/ μ L) (Takara, Kusatsu, Japan)	1 U/ μ L
	voda AccuGene (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do 20 μ L

Reverzna transkripcija je provedena u uređaju SimpliAmp (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) prema protokolu: 10 minuta na 30°C, 60 minuta na 42°C i 15 minuta na 70°C. Uzorci cDNA pohranjeni su na -20°C do lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, qPCR (od eng. *quantitative polymerase chain reaction*) provedena je uporabom seta kemikalija PowerUp Sybr Green (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD), specifičnih početnica za gene od interesa (Origene Technologies Inc., Rockville, MD, SAD) kao i početnica za endogenu kontrolu, gena za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH) (98) prema protokolu navedenom u Tablici 10.

Tablica 10. Sadržaj reakcijske smjese za qPCR.

Reagens	Konačna koncentracija
2x PowerUp Sybr Green Mastermix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)	1x
Uzvodna početnica (10 μ M) (Macrogen, Seul, Južna Koreja)	0,05 μ M
Nizvodna početnica (10 μ M) (Macrogen, Seul, Južna Koreja)	0,05 μ M
cDNA	do 50 ng
AccuGene voda (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do 20 μ L

Sekvencije početnica za gene od interesa *NTF-3*, *MYBL1* i endogenu kontrolu (*GAPDH*) nalaze se u Tablici 11. Temperatura prijanjanja je bila ista za sve početnice (57°C). Kod svih uzoraka analizirana je ekspresija svih gena od interesa.

Analiza Q-RT PCR provedena je na uređaju QuantStudio5 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) tijekom 40 ciklusa, prema optimiziranim uvjetima reakcije: aktivacija enzima HotStart DNA Taq Polimeraza na 95 °C tijekom 10 minuta; denaturacija na 95 °C tijekom 15 sekundi; prijanjanje i produljivanje lanca na 72 °C tijekom jedne minute.

Tablica 11. Sekvencije početnica za određivanje ekspresije gena *NTF-3*, *MYBL1* i endogene kontrole (*GAPDH*).

Ime gena	Ime početnice	Sekvencija početnice
<i>NTF-3</i>	NTF-3 F	5'-CAAGCAGATGGTGGACGTTAAGG-3'
	NTF-3 R	5'-TCGCAGCAGTTCGGTGTCCATT-3'
<i>MYBL1</i>	MYBL1 F	5'-CGTGGAGGCAAACGCTGTGTTA-3'
	MYBL1 R	5'-GGTGGATTTGATAGGAGAAGCAG-3'
<i>GAPDH</i>	GAPDH F	5'-TCAAGGCTGAGAACGGGAAG-3'
	GAPDH R	5'-CGCCCCACTTGATTTTGGAG-3'

F - uzvodna početnica, R - nizvodna početnica.

Nakon provedenog qPCR-a na temelju očitanih vrijednosti Ct (od eng. *cycle threshold*) napravljena je kvantifikacija ekspresije gena od interesa metodom relativne kvantifikacije ddCt kako bi se vidjelo postoji li razlika u ekspresiji gena od interesa između zdravog tkiva jetre, ciroznog tkiva jetre i tkiva hepatocelularnog karcinoma.

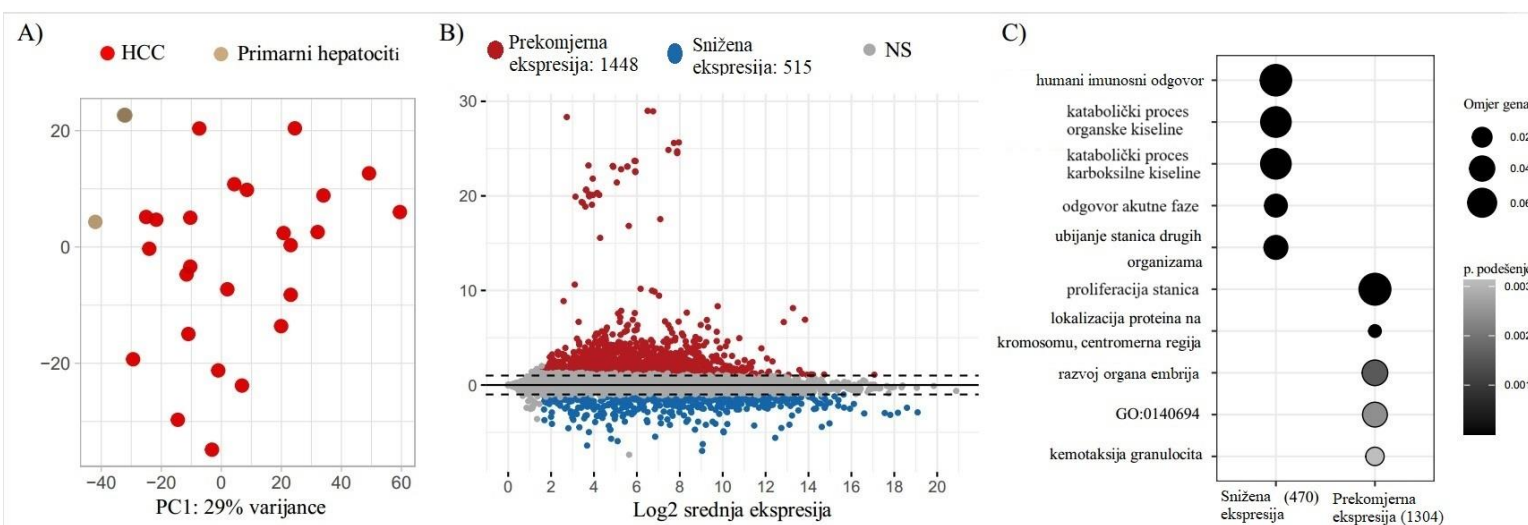
3.3.4. Statistička analiza rezultata

Za usporedbu razlika u laboratorijskim podacima i genskoj ekspresiji između pojedinih skupina korišten je Mann–Whitney U-test. Za procjenu moguće ovisnosti između laboratorijskih podataka i genske ekspresije u svakoj skupini uzoraka korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Statistička analiza provedena je pomoću softvera STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD), a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Diferencijalno eksprimirani geni između HCC-a induciranog virusom i primarnih hepatocita

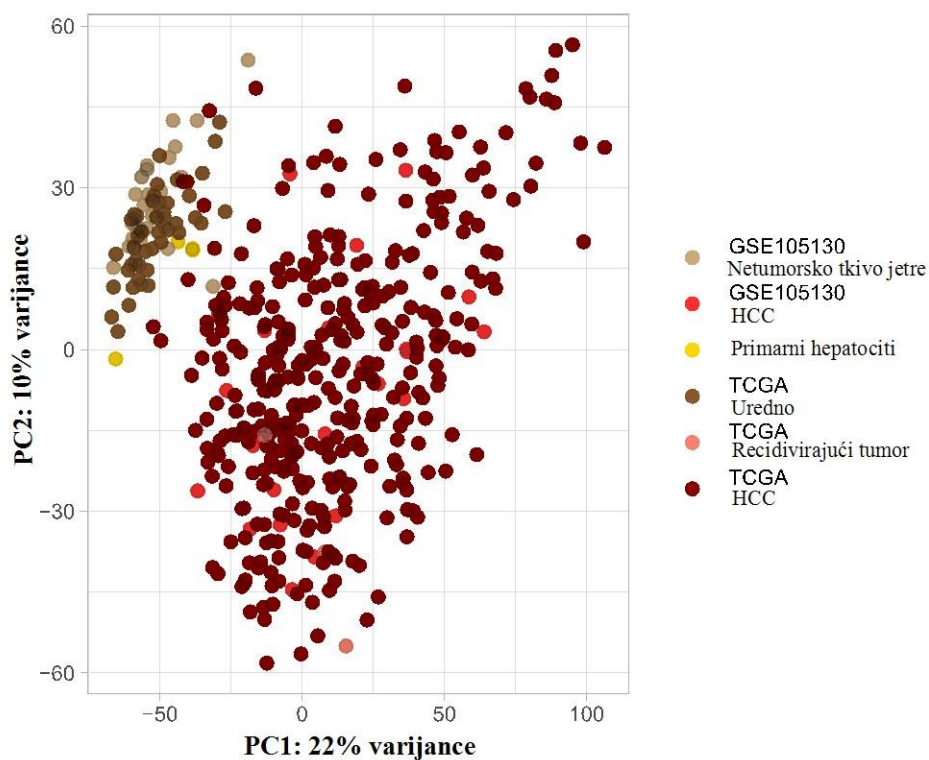
Za analizu diferencijalne genske ekspresije između netumorskih primarnih hepatocita, netumorskog tkiva jetre i HCC tkiva (GSE105130) korišteni su javno dostupni skupovi podataka. Analiza glavnih komponenti (PCA) jasno je razlikovala dvije zasebne skupine koje odgovaraju svakoj grupi (Slika 6.). Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) pokazale su 40% ukupne varijance.



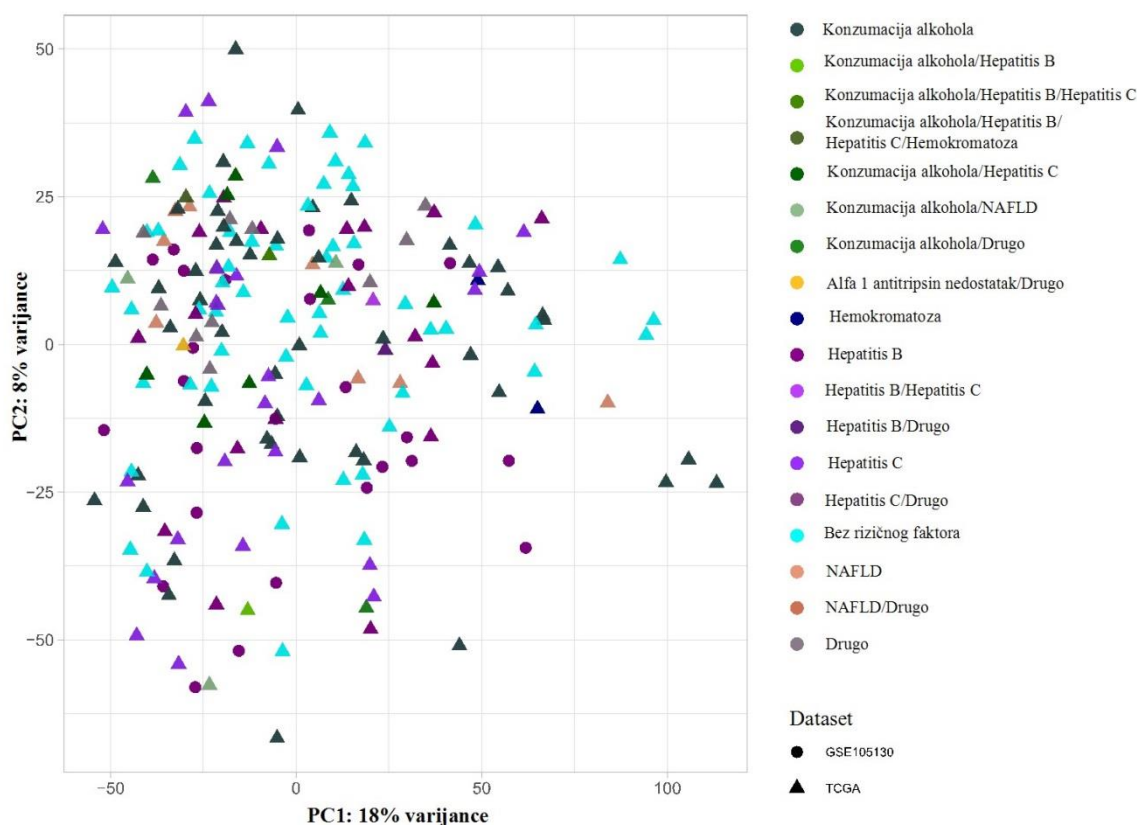
Slika 6. Analiza diferencijalne ekspresije između tkiva hepatocelularnog karcinoma (HCC) i primarnih hepatocita. Analiza glavnih komponenti (PCA) prikazuje ukupnu varijabilnost ekspresije gena između javno dostupnih uzoraka tkiva HCC-a i netumorskih tkiva iz skupa GSE105130, primarnih hepatocita iz baze EGA te uzoraka urednog tkiva iz baze TCGA-LIHC (A). Analiza PCA samo za pacijente s HCC-om za koje je poznat etiološki rizični faktor. Dijagrami MA koji prikazuju diferencijalno eksprimirane gene između HCC-a iz skupa GSE105130 i primarnih hepatocita, pri čemu su geni grupirani na temelju apsolutne promjene ekspresije log2 veće od 1 i p-vrijednosti manje od 0,05, određeno Waldovim testom pomoću paketa DESeq2. (B). Analiza prekomjerne zastupljenosti (od eng. *Over-representation analysis*) prema odrednicama baze Gene ontology (GO) gena čija je ekspresija povećana ili smanjena u HCC-u iz skupa GSE105130 u usporedbi s primarnim hepatocitima (C).

Ukupno je identificirano 1448 prekomjerno i 515 smanjeno eksprimiranih diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) u HCC-u u usporedbi s primarnim hepatocitima (Slika 6B.). Analiza podataka iz baze Gene Ontology (GO) pokazala je da geni koji su imali manju ekspresiju u HCC-u u odnosu na primarne hepatocite su uglavnom uključeni u

humoralni imunosni odgovor, odgovor akutne faze i procese katabolizma organskih kiselina (Slika 6C). Nasuprot tome, prekomjerno eksprimirani DEG-ovi prvenstveno su povezani s diobom stanice (Slika 6C). Dodatno, provedena je analiza PCA na odabranom skupu podataka uzoraka HCC-a induciranog virusom i uzorcima TCGA-LIHC (Slika 7.). Odabrani GEO-uzorci grupirani su s uzorcima HCC-a i TCGA, bez uočenih dodatnih podskupova temeljenih na etiologiji (Slika 8.).



Slika 7. Analiza glavnih komponenti (PCA) na odabranom skupu podataka uzoraka HCC-a induciranog virusom i uzorcima TCGA-LIHC. PC1 i PC2 - prve dvije glavne komponente

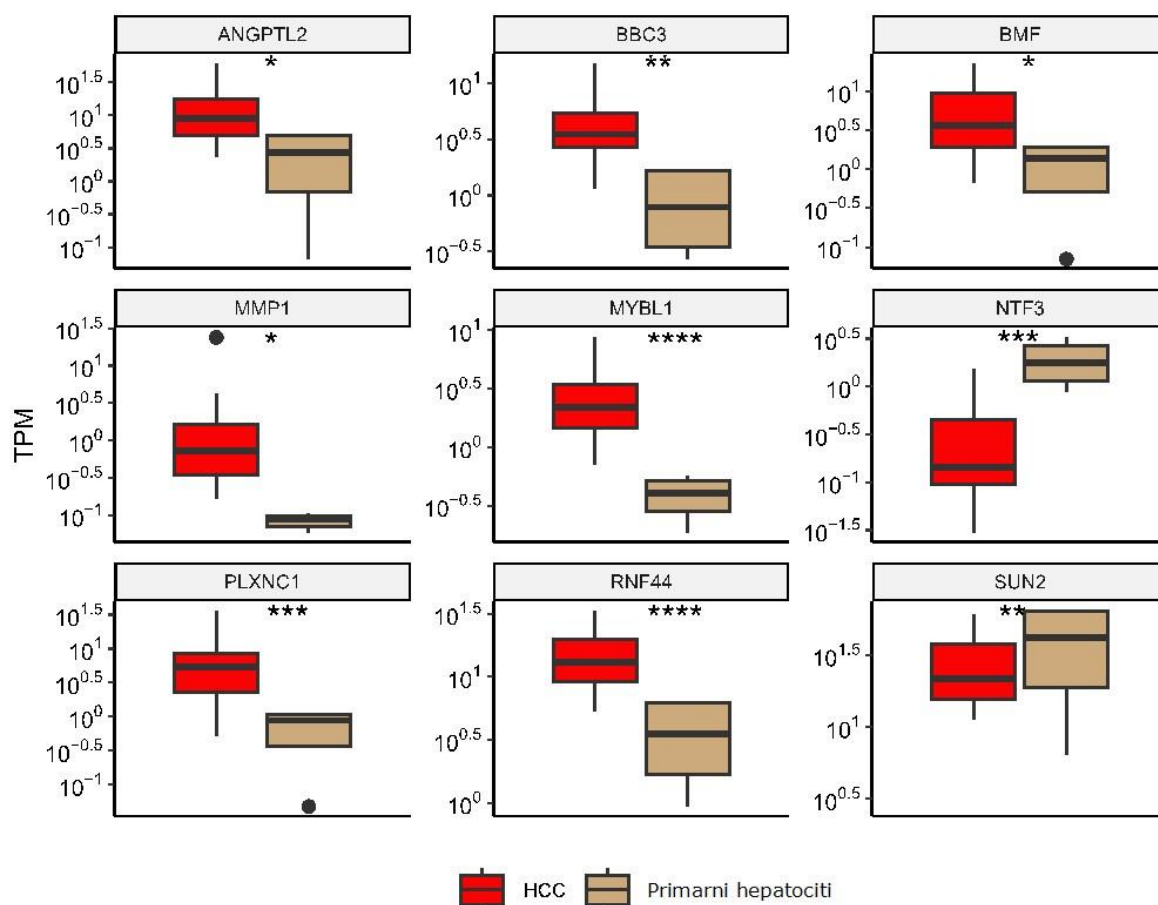


Slika 8. Odabrani GEO-uzorci grupirani s uzorcima HCC-a i TCGA, bez dodatnih podskupova temeljenih na etiologiji. GEO - Gene Expression Omnibus, PC1 i PC2 - prve dvije glavne komponente, NAFLD - kronične bolesti jetre nepovezane s alkoholom (od eng. *non-alcoholic fatty liver disease*), GSE105130 – uzorci tkiva HCC-a, TCGA - uzorci urednog tkiva iz baze TCGA-LIHC.

4.2. Geni karakteristični za HCC koje regulira miRNA-221

Na temelju pregleda literature sastavljen je popis diferencijalno eksprimiranih gena u HCC-u induciranom virusom koji su regulirani molekulom miRNA-221. Taj je uspoređen s detektiranim diferencijalno eksprimiranim genima (DEG-ovima). Od 84 gena koje regulira miRNA-221, za devet gena je pokazano da su različito eksprimirani u HCC-u u usporedbi s primarnim hepatocitima (protein sličan angiopoetinu (*ANGPTL2*, od eng. *angiopoietin Like 2*), komponenta 3 koja veže BCL2 (*BBC3*, od eng. *BCL2 binding component 3*), modifirajući faktor bcl2 (*BMF*, od eng. *Bcl2 modifying factor*), matriksna metaloproteinaza-1 (*MMP1*, od eng. *matrix metalloproteinase 1*), protoonkogen sličan MYB-u (*MYBL1*, od eng. *MYB proto-oncogene like 1*), neurotrofin 3 (*NTF-3*, od eng. *neurotrophin 3*), pleksin C1 (*PLXNC1*, od eng. *Plexin C1*), protein RING 44 (*RNF44*, od eng. *ring finger protein 44*) i protein jezgrine

ovojnice koji sadrži sad1 i UNC84 (*SUN2*, od eng. *Sad1 and UNC84 domain containing 2*)) (Slika 9.).



Slika 9. Diferencijalno eksprimirani geni regulirani miRNA-221 u pacijenata s HCC-om u usporedbi s primarnim hepatocitima. Geni su identificirani kao statistički značajno diferencijalno eksprimirani na temelju apsolutne vrijednosti $\log_2$ promjene ekspresije veće od 1 i p-vrijednosti manje od 0,05, određene Waldovim testom korištenjem DESeq2 paketa.

ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

ANGPTL2 - protein sličan angiopoetinu, *BBC3* - komponenta 3 koja veže BCL2, *BMF* - modificirajući faktor bcl2, *MMP1* - matriksna metaloproteinaza-1, *MYBL1* - protoonkogen sličan MYB, *NTF-3* - neurotrofin 3, *PLXNC1* - pleksin C1, *RNF44* - protein RING 44 i *SUN2* - protein jezgrine ovojnice koji sadrži sad1 i UNC84

Geni *MYBL1* i *NTF-3* su pokazali najveću razliku u ekspresiji između HCC-a i primarnih hepatocita. U HCC-u su *MYBL1* i *RNF44* značajno više eksprimirani, dok je *NTF-3* značajno manje eksprimiran u odnosu na hepatocite.

4.3. Analiza ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u uzorcima pacijenata s hepatocelularnim karcinom, ciroznom jetrom i netumorskim tkivom jetre

4.3.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata, cirozne jetre i netumorskog tkiva jetre

Koncentracije RNA izolirane iz 37 uzoraka HCC-a uklopljenih u parafin, fiksiranih formalinom bile su u rasponu između 8,6 i 231,2 ng/μL. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm bili su u rasponu između 1,567 i 1,98, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda. Omjeri apsorbancija pri 260 i 230 nm su bili između 0,556 (kod jednog uzorka) i 3,214, ali kod većine uzoraka bili su blizu ili veći od 2 te je RNA bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda.

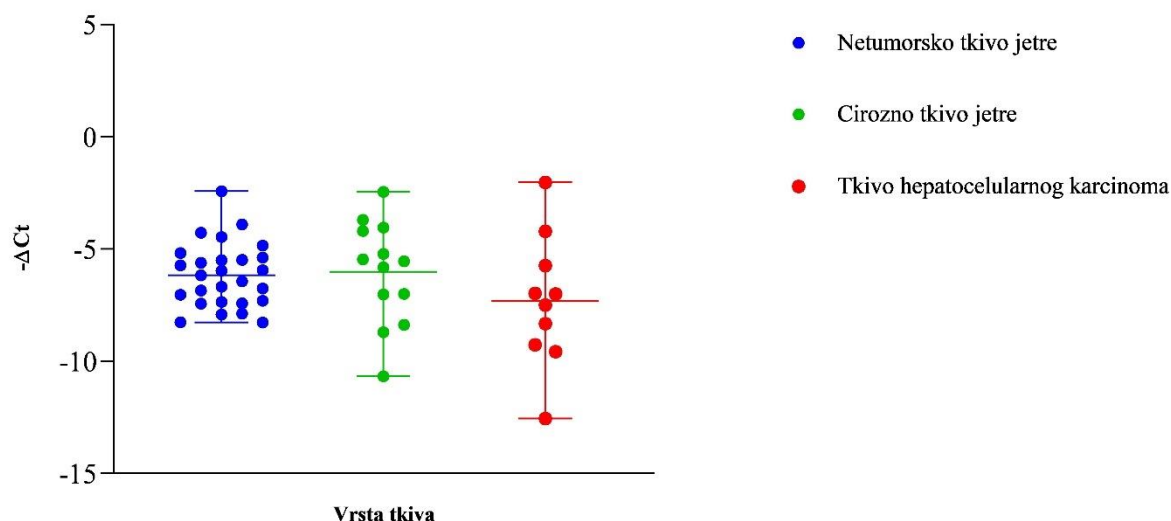
Koncentracije RNA izolirane iz 37 uzoraka cirozne jetre uklopljenih u parafin, fiksiranih formalinom bile su u rasponu između 8,5 i 282 ng/μL. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm bili su u rasponu između 1,319 i 1,879, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda. Omjeri apsorbancija pri 260 i 230 nm su bili između -4,132 (kod uzorka kod kojeg je koncentracija izolirane RNA bila 8,5 ng/ μL) i 3,284, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda.

Koncentracije RNA izolirane iz 37 uzoraka netumorskog tkiva jetre uklopljenih u parafin, fiksiranih formalinom bile su u rasponu između 9,5 i 353,2 ng/μL. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm bili su u rasponu između 1,069 (jedan uzorak) i 1,67, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda. Omjeri apsorbancija pri 260 i 230 nm bili su niži od idealnih, između 1,063 i 1,967, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu nizvodnih metoda.

4.3.2. Usporedba ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u uzorcima HCC-a induciranog alkoholom, ciroznog tkiva jetre i netumorskog tkiva jetre

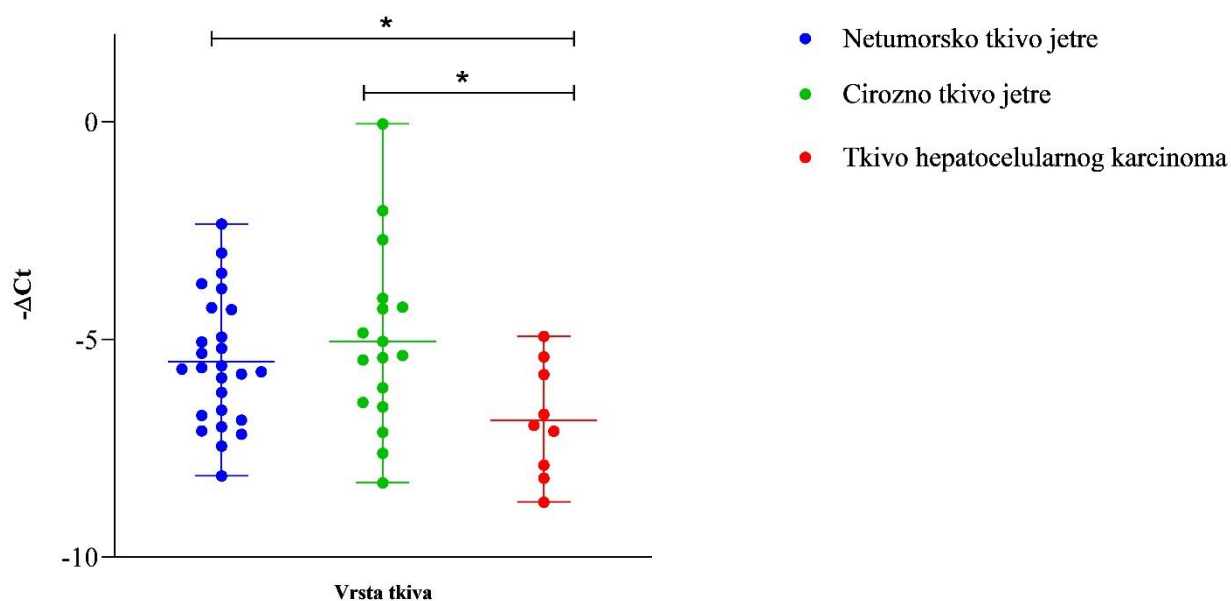
Metodom qPCR uspoređena je razina ekspresija gena *NTF-3* i *MYBL1* između uzoraka tkiva HCC-a induciranog alkoholom, ciroznog i netumorskog tkiva jetre.

Rezultati qPCR analize nisu pokazali statistički značajnu promjenu u ekspresiji gena *NTF-3* između HCC tkiva, ciroznog tkiva jetre i netumorskog tkiva jetre (Slika 10.).



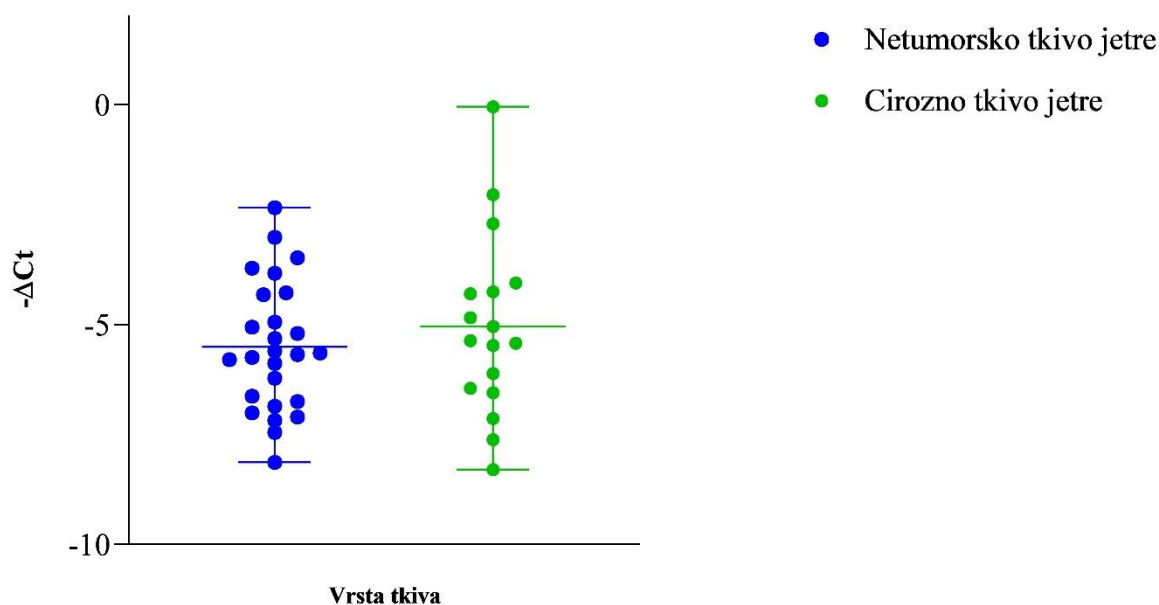
Slika 10. Relativna razlika u razini ekspresije gena neurotrofin 3 (*NTF-3*) između ispitanika s HCC-om, ciroznim tkivom jetre i netumorskim tkivom jetre ($p > 0,05$ određena je Mann–Whitney U-testom). Relativna razlika u razini ekspresije gena određena je qPCR-om. Razlika graničnih vrijednosti – ΔCt . Ciklus granične vrijednosti – Ct.

Ekspresija gena *MYBL1* statistički se značajno razlikovala između tkiva HCC-a i netumorskog tkiva jetre, kao i između tkiva HCC-a i ciroznog tkiva jetre ($p < 0,05$) (Slika 11.). Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *MYBL1* između netumorskog tkiva jetre i ciroznog tkiva jetre (Slika 12.).



Slika 11. Relativna razlika u razini ekspresije za gen protoonkogen sličan MYB (*MYBL1*, od eng. *MYB proto-oncogene like 1*) između ispitanika s HCC-om, ciroznim tkivom

jetre i netumorskim tkivom jetre (* $p < 0,05$ određena je Mann–Whitney U-testom). Relativna razlika u razini ekspresije gena određena je qPCR-om. Razlika graničnih vrijednosti – ΔCt . Ciklus granične vrijednosti – Ct.



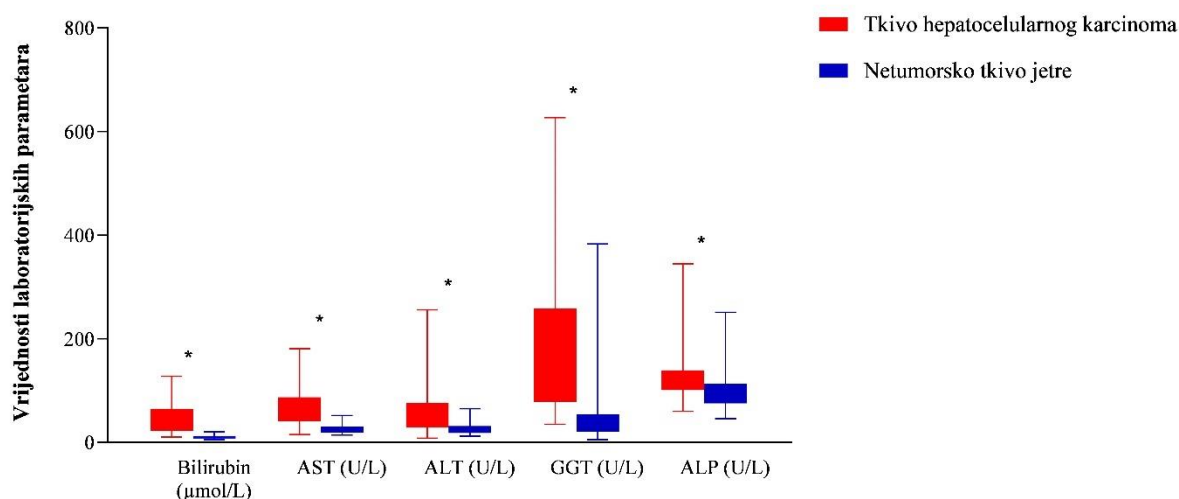
Slika 12. Relativna razlika u razini ekspresije za gen *protoonkogen sličan MYB* (*MYBL1*, od eng. *MYB proto-oncogene like 1*) između ispitanika s ciroznim tkivom jetre i netumorskim tkivom jetre ($p > 0,05$ određena je Mann–Whitney U-testom). Relativna razlika u razini ekspresije gena određena je qPCR-om. Razlika graničnih vrijednosti – ΔCt . Ciklus granične vrijednosti – Ct.

Utvrđena je pozitivna korelacija između ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u grupi ispitanika s HCC-om ($p < 0,01$). Nije pronađena statistički značajna korelacija između ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u grupi ispitanika s ciroznim tkivom jetre niti kod ispitanika s netumorskim tkivom jetre.

Statistički značajne razlike u ekspresiji gena *NTF-3* i *MYBL1* s obzirom na dob, spol, stupanj diferencijacije karcinoma, limfovaskularnu invaziju i laboratorijske parametre (AST, bilirubin, ALT, GGT, ALP i AFP) nisu utvrđene.

4.4. Analiza laboratorijskih parametara u uzorcima pacijenata s hepatocelularnim karcinom/ ciroznim tkivom jetre i netumorskom tkivu jetre

Vrijednosti laboratorijskih parametara su puno veće u skupini hepatocelularnog karcinoma i ciroze jetre u odnosu na skupinu s netumorskim tkivom jetre. Razlike u vrijednostima između ove dvije skupine su statistički značajne ($p < 0,05$) (Slika 13.). Uzorci ciroznog tkiva jetre i uzorci tkiva hepatocelularnog karcinoma potiču od istog pacijenta, pa su time i vrijednosti laboratorijskih parametara te dvije skupine iste.



Slika 13. Vrijednosti laboratorijskih parametara kod ispitanika s HCC-om i ispitanika s netumorskim tkivom jetre. Aspartat-aminotransferaze – AST, alanin-aminotransferaza – ALT, gama-glutariltransferaza – GGT, alkalne fosfataze – ALP, mikromol po litri - μmol/L, jedinica po litri – U/L (od eng. *unit per liter*) (* $p < 0,05$ određena je Mann–Whitney U-testom).

Vrijednost bilirubina u krvi ispitanika s hepatocelularnim karcinomom pokazala je statističku značajnu korelaciju s vrijednostima alkalne fosfataze u krvi ($p < 0,05$), dok je pokazala statističku značajnu negativnu korelaciju s vrijednostima albumina u krvi ($p < 0,05$). Vrijednost aspartatske aminotransferaze u krvi ispitanika s hepatocelularnim karcinomom je pokazala statističku značajnu korelaciju s vrijednostima alaninske aminotransferaze ($p < 0,01$) i vrijednostima alkalne fosfataze ($p < 0,05$), dok je pokazala statističku značajnu negativnu korelaciju s vrijednostima alfa-fetoproteina u krvi ($p < 0,05$). Osim korelacije između vrijednosti alaninske aminotransferaze i aspartatske aminotransferaze u krvi, još su i vrijednosti alaninske aminotransferaze u krvi ispitanika s hepatocelularnim karcinomom pokazale statističku značajnu korelaciju s vrijednostima gama-glutariltransferaze ($p < 0,01$). Usporedbom rezultata laboratorijske analize i gena u skupine ispitanika s hepatocelularnim karcinomom nisu utvrđene značajnije korelacije (Tablica 12.)

Tablica 12. Koeficijenti korelacije laboratorijskih parametara i gena kod ispitanika s hepatocelularnim karcinomom.

Koeficijent korelacija [§]									
Laboratorijski parametri i geni	Bilirubin	AST	ALT	GGT	ALP	Albumin	AFP	NTF-3	MYBL1
Bilirubin	1,000	0,268	-0,007	-0,205	0,395* p 0,016	-0,429* p 0,010	-0,232	-0,139	0,117
AST	0,268	1,000	0,577** p 0,00	0,158	0,346* p 0,036	-0,281	-0,414* p 0,013	-0,152	0,200
ALT	-0,007	0,577** p 0,00	1,000	0,507** p 0,001	0,242	-0,007	-0,266	-0,067	-0,117
GGT	-0,205	0,158	0,507** p 0,001	1,000	0,295	0,014	0,025	0,164	-0,050
ALP	0,395* p 0,016	0,346* p 0,036	0,242	0,295	1,000	-0,314	0,009	0,285	0,150
Albumin	-0,429* p 0,010	-0,281	-0,007	0,014	-0,314	1,000	0,176	-0,030	-0,300
AFP	-0,232	-0,414* p 0,013	-0,266	0,025	0,009	0,176	1,000	0,233	0,690
NTF-3	-0,139	-0,152	-0,067	0,164	0,285	-0,030	0,233	1,000	1,000** p < 0,0001
MYBL1	0,117	0,200	-0,117	-0,050	0,150	-0,300	0,690	1,000** p < 0,0001	1,000

§Spearmanov koeficijent korelacije; **p<0,01; *p<0,05. AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin-aminotransferaza, GGT – gama-glutamil transferaza, ALP – alkalna fosfataza, AFP – alfa-fetoprotein, MYBL1 - protoonkogen sličan MYB (od eng. *MYB proto-oncogene like 1*), NTF-3 - neurotrofin 3 (od eng. *neurotrophin 3*)

Usporedbom rezultata bilirubina u krvi s drugim laboratorijskim parametrima skupine ispitanika s netumorskim tkivom jetre nisu utvrđene značajnije korelacije. Vrijednost aspartatske aminotransferaze u krvi ispitanika s netumorskim tkivom jetre je pokazala statističku značajnu korelaciju s vrijednostima alanin-aminotransferaze ($p < 0,01$) i vrijednostima alkalne fosfataze ($p < 0,05$). Osim prethodno opisane korelacije između vrijednosti alanin-aminotransferaze i aspartat-aminotransferaze u krvi vrijednosti alanin-aminotransferaze u krvi ispitanika s netumorskim tkivom jetre pokazale su statističku značajnu korelaciju s vrijednostima gama-glutariltransferaze ($p < 0,05$) i vrijednostima alkalne fosfataze ($p < 0,01$). Osim korelacije između vrijednosti gama-glutariltransferaze i alanin-aminotransferaze u krvi, vrijednost gama-glutariltransferaza u krvi ispitanika s netumorskim tkivom jetre pokazala je statističku značajnu korelaciju s vrijednostima alkalne fosfataze ($p < 0,01$). Usporedbom rezultata laboratorijske analize i gena u skupini ispitanika s netumorskim tkivom jetre nisu utvrđene značajne korelacije (Tablica 13.).

Tablica 13. Koeficijenti korelacije laboratorijskih parametara i gena kod ispitanika s netumorskim tkivom jetre.

Korelacijski koeficijent [§]							
Laboratorijski parametri i geni	Bilirubin	AST	ALT	GGT	ALP	NTF-3	MYBL1
Bilirubin	1,000	-0,114	-0,267	-0,031	-0,158	-0,002	-0,252
AST	-0,114	1,000	0,662** p 0,000	0,240	0,332* p 0,045	0,012	0,002
ALT	-0,267	0,662** p 0,000	1,000	0,342* p 0,038	0,430** p 0,008	0,009	0,033
GGT	-0,031	0,240	0,342* p 0,038	1,000	0,453** p 0,005	0,106	-0,043
ALP	-0,158	0,332* p 0,045	0,430** p 0,008	0,453** p 0,005	1,000	-0,013	-0,005
<i>NTF-3</i>	-0,002	0,012	0,009	0,106	-0,013	1,000	0,245
<i>MYBL1</i>	-0,252	0,002	0,033	-0,043	-0,005	0,245	1,000

§Spearmanov koeficijent korelacije; **p<0,01; *p<0,05. AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT – gama-glutamil transferaza, ALP – alkalna fosfataza, AFP – alfa-fetoprotein, *MYBL1* - protoonkogen sličan MYB (od eng. *MYB proto-oncogene like 1*), *NTF-3* - neurotrofin 3 (od eng. *neurotrophin 3*)

5. Rasprava

Od svih diferencijalno ekprimiranih gena (DEG) u HCC-u indiciranog virusnom infekcijom u usporedbi s primarnim hepatocitima je u ovom istraživanju utvrđeno 1448 prekomjerno i 515 smanjeno ekprimiranih diferencijalno ekprimiranih gena. Kada je ekspresija tih gena uspoređena s genima za koje je poznato da su regulirani s miRNA-221, koja se smatra markerom za razvoj HCC-a induciranog virusom, identificirano je devet gena od interesa: *ANGPTL2*, *BBC3*, *BMF*, *MMP1*, *MYBL1*, *NTF-3*, *PLXNC1*, *RNF44* i *SUN2*. Ovi geni sudjeluju u ključnim procesima razvoja HCC-a, poput apoptoze, proliferacije stanica, angiogeneze, remodeliranja tkiva i metastaziranja. Poznato je da promijenjena razina ekspresije ovih gena kao odgovor na kroničnu virusnu infekciju i upalu može stvoriti mikrookruženje pogodno za inicijaciju i progresiju HCC-a (21, 72, 73, 83, 99–102).

Od navedenih devet gena, dva su zbog najznačajnije promijenjene ekspresije u usporedbi s primarnim hepatocitima odabrana za daljnju analizu u uzorcima pacijenata s HCC-om induciranog alkoholom. Prema bioinformatičkoj analizi ekspresija *NTF-3* statistički je značajno manja u tkivu HCC-a u usporedbi s netumorskim hepatocitima, dok je ekspresija *MYBL1* statistički značajno viša u tumorskom tkivu u usporedbi s netumorskim hepatocitima.

Bioinformatički rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala statistički značajnu smanjenu ekspresiju *NTF-3* u tkivu HCC-a u usporedbi s primarnim hepatocitima (72, 104, 109). *NTF-3* je jedan od živčanih faktora rasta, a glavna uloga gena *NTF-3* je u razvoju živčanog sustava, posebno živčanog sustava crijeva (72, 103, 104). *NTF-3* je jedini neurotrofin koji sudjeluje u diferencijaciji stanica crijevnog živčanog sustava djelujući preko receptora TrkC (od eng. *Tropomyosin related kinase C*), ali ne dovodi do njihove proliferacije (103). Osim receptora TrkC, on se veže i na receptor p75NTR (od eng. *P75 neurotrophin receptor*), ali puno slabijim afinitetom (104). Receptor TrkC je selektivan i specifičan za *NTF-3*, dok je p75NTR nespecifičan i na njega se mogu vezati svi živčani faktori rasta, ali puno slabijim afinitetom (104, 105). Osim što ima važnu ulogu u razvoju živčanog sustava, sudjeluje u cijeljenju ožiljaka živčanog tkiva (72, 103). Njegova razina ekspresije kao i razina receptora TrkC u tkivu važni su za održavanje morfologije živčanog sustava i preživljenju stanica živčanog sustava (103, 104). Premda je njegova primarna uloga vezana uz živčani sustav, *NTF-3* ima značajne funkcije i izvan živčanog sustava, uključujući ulogu u progresiji različitih tumora, poput karcinoma jetre i gušterače (72, 104–106). U tumorima središnjeg živčanog sustava, poput neuroblastoma i meduloblastoma ekspresija je

receptora TrkC vezana uz bolju prognozu (105). Više razine ekspresije *NTF-3* nađene su u pacijenata s agresivnijim tipovima meduloblastoma i neuroblastoma (100, 107). *NTF-3* sudjeluje u signalnom putu PI3K/AKT. Jedan od načina je da direktnim vezivanjem na receptor TrkC dolazi do prenošenja signala i aktivacije signalnog puta MAP ili PI3K/AKT te sprječavanja apoptoze stanica (105, 108). Drugi način je preko djelovanja različitih kinaza koje sudjeluju u prijenosu signala u signalnom putu MAP ili PI3K/AKT, kao npr. ATR (od eng. *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), CDK2 ili NEK2 (od eng. *NIMA related kinase 2*) (72). Ovi mehanizmi omogućavaju njegovu ulogu i funkciju u indirektnoj regulaciji apoptoze preko ATR, proliferaciji te diferencijaciji stanica preko MAP ili PI3K/AKT puta (72, 103, 105). Povišene razine ekspresije *NTF-3* u agresivnim neuroblastomima dovode do proliferacije tumorskih stanica djelujući na receptore TrkC, a blokiranjem veze između *NTF-3* i receptora TrkC dolazi do smrti stanica (107).

Osim njegove uloge u živčanom sustavu, sve je više istraživanja usmjerenih na ulogu *NTF-3* u drugim organskim sustavima. Novija istraživanja pokušavaju dovesti u vezu razinu ekspresije *NTF-3* gena i receptora TrkC u tumorskom tkivu, posebno u stanicama hepatocelularnog karcinoma, kod kojih je manje eksprimiran nego u netumorskom tkivu (72, 104, 105). *NTF-3* preko direktnog djelovanja na p75NTR dovodi do smrti stanica, a ovo djelovanje u stanicama hepatocelularnog karcinoma je umanjeno zbog niske razine *NTF-3* te to vodi do lošijeg preživljenja pacijenata (109). Direktnim djelovanjem *NTF-3* na p75NTR dolazi do aktivacije c-Jun N-terminalne kinaze (JNK, od eng. *c-junNH2 terminal kinase*) i p38 MAPK signalnog puta što dovodi do povećanja razine proapoptotskog proteina Bax, smanjenja razine antiapoptotskog proteina Bcl-2 te u konačnici apoptoze stanice. Preko tog mehanizma objašnjava se uloga *NTF-3* gena kao tumorskog supresora (109, 110). Direktnim vezanjem *NTF-3* na receptor TrkC dolazi do prenošenja signala i aktivacije signalnog puta PI3K/AKT te sprječavanja apoptoze stanica (105, 108). Preko gore opisanim direktnim vezanjem *NTF-3* na p75NTR dolazi do aktivacije smrti stanica (105, 109). Ovisno o receptoru i aktiviranom signalnom putu, *NTF-3* može imati suprotne učinke na preživljavanje stanica: preko TrkC receptora aktivira PI3K/Akt signalizaciju i sprječava apoptozu kortikalnih neurona (105, 108), dok se vezanjem na p75NTR receptor aktiviraju JNK i p38 MAPK putevi koji dovode do povećanja razine proteina Bax, smanjenja razine proteina Bcl-2 i indukcije apoptoze (105, 109). Iz toga proizlazi da su u stanicama hepatocelularnog karcinoma sa sniženom ekspresijom *NTF-3* upravo navedeni signalni putevi preko p75NTR promijenjeni te snižene vrijednosti *NTF-3* ne dovode do aktivacije JNK i p38 MAPK signalnog puta, što dovodi do izbjegavanja smrti stanica (109). Pokazano je i da je u

stanicama hepatocelularnog karcinoma s mutiranim *TP53* snižena ekspresija *NTF-3* u odnosu na one bez mutiranog *TP53*, ali točan mehanizam djelovanja između ova dva gena je još neistražen (72). Prethodna istraživanja pokazala su da je smanjena razina ekspresije *NTF-3* u stanicama HCC-a povezana s lošijom prognozom (72, 104, 109), što ukazuje na veću važnost interakcije između *NTF-3* i p75NTR u HCC-u u usporedbi s interakcijom između *NTF-3* i TrkC (72, 104, 105, 109).

Suprotno rezultatima bioinformatičkih analiza, u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji *NTF-3* između uzoraka tkiva HCC-a induciranog alkoholom, ciroznog tkiva i netumorskog tkiva jetre. Ovaj rezultat mogao bi biti posljedica razlika u analiziranim kohortama ispitanika. Analiza *in silico* provedena je korištenjem podataka o HCC-u induciranog virusom, dok su pacijenti u ovom istraživanju imali HCC induciran prekomjernom konzumacijom alkohola. Ovaj rezultat također bi mogao biti povezan s istraživanjima Guo i sur. (111) te Zhang i sur. (112), čije bioinformatičke analize nisu pokazale značajno promijenjenu ekspresiju *NTF-3* u HCC-u induciranom alkoholom u usporedbi s netumorskim tkivom jetre niti je *NTF-3* imao prognostičku vrijednost. Proturječni rezultati o ekspresiji *NTF-3* pronađeni su i u drugim vrstama tumora. Tumori dojke, u čijim stanicama je pokazana viša ekspresija *NTF-3* imaju veću sposobnost metastaziranja u mozak, posebno stvaranja makrometastaza u odnosu na tumorske stanice kod kojih je zabilježena niža vrijednost *NTF-3* (113). Smanjena razina *NTF-3* u stanicama tumorskog tkiva dojke u mozgu je vezana uz smanjen rast metastaza u mozgu (113). Osim povećane razine ekspresije gena *NTF-3* u karcinomima dojke, njegova ekspresija je povišena i u drugim tumorskim stanicama, kao npr. u stanicama karcinoma gušterače u odnosu na stanice netumorskog tkiva gušterače (106). Smanjena ekspresija gena *TrkC* u tumorskim stanicama debelog crijeva i snižene razine *NTF-3* dovode do preživljenja tumorskih stanica te smanjene apoptotske funkcije TrkC-a (110). Sam nedostatak *NTF-3* dovodi do promjene metilacije TrkC i njegove smanjene funkcije (110). Točan mehanizam ove veze i dalje je nejasan (110). Ekspresija receptora TrkC je nađena i u tumorima dojke te je vezana uz stupanj diferencijacije tumora: što je tumor bolje diferenciran to je ekspresija TrkC receptora veća i obrnuto (105). Iako je dokazana ekspresija *NTF-3* u drugim karcinomima, kao npr. u stanicama pločastog karcinoma pluća, njegova uloga u mehanizmu nastanka karcinoma pluća je nejasna i neistražena (114, 115).

U ovom istraživanju nije dokazana povezanost između razine ekspresije *NTF-3* gena i drugih obilježja tumora, kao što su stupanj diferencijacije tumora ili limfovaskularna invazija, što je u skladu s prijašnjim istraživanjem gdje se pokušao dokazati utjecaj razine ekspresije *NTF-3*

gena na prognozu HCC-a. Cilj tog istraživanja bio je provjeriti potencijal gena *NTF-3* kao prognostičkog markera za bolesnike s HCC-om, no u tom istraživanju nije pronađena statistički značajna povezanost između razine ekspresije *NTF-3* i drugih karakteristika tumora kao što su veličina tumora, stupanj diferencijacije tumora, limfovaskularna invazija, metastaze ili prisutnost ciroze jetre (104). U ovom istraživanju nije pronađena ni veza između razine ekspresije *NTF-3* i drugih laboratorijskih parametara u tumorskim stanicama, kao npr. vrijednostima AST-a, ALT-a, bilirubina, albumina ili AFP-a.

Rezultati koji se odnose na ekspresiju gena *MYBL1* u ovom istraživanju posebno su zanimljivi. Gen *MYBL1* je protoonkogen, koji ima ulogu transkripcijskog faktora i poznat je i pod imenom *A-MYB*. Ima važnu ulogu u regulaciji razvoja tkiva dojke, živčanog tkiva, B-limfocita te spermatogeneze (116–121). Jedan je od gena koji pripadaju porodici gena *MYB*, uz gen *MYB* (od eng. *Myeloblastosis Proto-Oncogene*) poznat i pod imenom *C-MYB* koji sudjeluje u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, posebno stanica koštane srži, živčanih stanica te stanica sluznice debelog crijeva, kao i preživljenja stanica i održavanja homeostaze stanica (116–118, 122) te *MYBL2* (poznat i pod imenom *B-MYB*) koji preko retinoblastomskog tumorskog supresora (RB) i transkripcijskog faktora E2F sudjeluje u proliferaciji stanica (117). *MYBL2* usko je povezan s osi RB–E2F koja kontrolira proliferaciju stanica. U normalnim uvjetima RB inhibira E2F transkripcijske faktore, dok njihovo oslobađanje nakon fosforilacije RB-a dovodi do aktivacije ekspresije *MYBL2* koji regulira transkripciju gena uključenih u DNA replikaciju i mitotsku progresiju, čime osigurava napredovanje staničnog ciklusa. U tumorskim stanicama, gubitak funkcije RB ili trajna aktivacija E2F rezultira povišenom ekspresijom *MYBL2*, što pridonosi nekontroliranoj proliferaciji i razvoju malignog fenotipa (117). Porodica proteina *MYB* sudjeluje u diferencijaciji, proliferaciji i smrti stanica (116–118). Iako su ovi gen eksprimirani u različitim organima, pojedini organi mogu eksprimirati više od jednog člana ove porodice (115).

Preko mjesta vezanja proteina *MYB* (MBS, od eng. *MYB binding site*), *MYBL1* djeluje kao aktivator transkripcije (117, 118). Osim što ima ulogu aktivatora transkripcijskog faktora, *MYBL1* može surađivati i s drugim transkripcijskim faktorima ili križno reagirati s njima, a to mogu biti članovi porodice proteina CEBPs za vezanje pojačivača (od eng. *CAAT enhancer binding protein*) (118, 120, 123).

Uloga *MYBL1* u proliferaciji stanica je u početku istraživana u hematopoetskom sustavu, posebno B-limfocitima. U B-limfocitima koji se dijele, poput onih u germinativnim centrima razina je proteina *MYBL1* povišena, dok je u B-limfocitima koji miruju, poput onih

u primarnim folikulima, razina proteina MYBL1 snižena (118, 124) što je dokazano još i u stanicama Burkittovog limfoma u kojima su otkrivene visoke razine ekspresije *MYBL1* (120, 121, 124). U miševa koji su imali povećanu razinu ekspresije gena *MYBL1* je nađena hiperplazija slezene i limfnih čvorova s umnoženim poliklonskim B-limfocitima (118, 121, 124). Gen *MYBL1* sudjeluje u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, preko interakcije s ciklinom A i ciklinom E sudjeluje fazi G1/S ciklusa stanica (118, 125). Njegova transkripcijska aktivnost modulirana je fosforilacijom putem ciklin E/CDK2 i ciklin A/CDK2 kompleksa, što se događa u G1 i S fazi staničnog ciklusa. Ova fosforilacija izravno utječe na sposobnost MYBL1 da regulira promotore ciljnih gena uključenih u proliferaciju, čime se ekspresija tih gena sinkronizira s napredovanjem staničnog ciklusa. MYBL1 ne djeluje izolirano, već je dio šire mreže G1/S proteina gdje se njegova aktivnost nadovezuje na E2F-posredovanu transkripciju (118, 125). Dok E2F inicira njihovu ekspresiju na početku G1/S, MYBL1 kroz fosforilacijsku kontrolu ciklin/CDK kompleksa održava i modulira njihovu aktivnost u S-fazi, čime se postiže koordinirano napredovanje staničnog ciklusa (118, 125). Istodobno, MYBL1 sudjeluje i u procesu diferencijacije određenih tkiva (npr. spermatogenezi i limfatičnom tkivu), povezujući proliferaciju s sazrijevanjem stanica (118, 125). Iz čega proizlazi da MYBL1 koji ne može biti fosforiliran gubi sposobnost pravilne regulacije ekspresije svojih ciljnih gena, što pokazuje da je fosforilacija ključna za njegovu funkciju u G1/S prijelazu (118, 125).

U analizi *in silico* uočeno je da je ekspresija *MYBL1* bila značajno viša u uzorcima tkiva pacijenata s HCC-om induciranog virusom u usporedbi s primarnim hepatocitima (Slika 9.). Međutim, rezultati ovog istraživanja provedenog na uzorcima tkiva pacijenata s HCC-om induciranog alkoholom pokazali su značajno nižu ekspresiju *MYBL1* u tkivu HCC-a u usporedbi s netumorskim tkivom jetre, kao i značajno nižu ekspresiju *MYBL1* u tkivu HCC-a u usporedbi s ciroznim tkivom jetre (Slika 11.). Budući da je *MYBL1* uključen u regulaciju proliferacije i diferencijacije stanica putem gore opisane interakcije s ciklinom A i ciklinom E, posebice u fazi G1/S staničnog ciklusa (118, 125), nije neočekivano da bilo kakva promjena u razini ekspresije *MYBL1* može uzrokovati promjene u proliferaciji i diferencijaciji stanica (117). U tom kontekstu, rezultati ovog istraživanja dobiveni iz uzoraka pacijenata mogli bi se objasniti mogućom interakcijom između miRNA-221 i mRNA *MYBL1*, s obzirom na to da je pokazano kako su visoke razine miRNA-221 povezane s nižom ekspresijom *MYBL1* u stanicama HCC-a (83, 88, 126).

Uloga *MYBL1* je u tumorigenezi izvan hematopoetskog sustava manje istražena, sada sve više istraživanja koja su preusmjerila svoj fokus sa *MYBL1* na druge članove porodice

MYB. Postoji jako malo istraživanja o genu *MYBL1* i njegovoj ulozi u hepatocelularnom karcinomu (100). Povišene razine ekspresije gena *MYBL1* pronađene su u stanicama HCC-a u odnosu na stanice tkiva jetre uz tumor (62, 91). Istraživanja su pokazala da povećana razina ekspresije *MYBL1* gena, preko ANGPT2 dovodi do povećane vaskularizacije u tkivu hepatocelularnog karcinoma (100). U ovom istraživanju nije dokazana povezanost između razine ekspresije *MYBL1* gena i drugih obilježja tumora, kao što su stupanj diferencijacije tumora ili limfovaskularna invazija.

Osim povišene ekspresije u stanicama hepatocelularnog karcinoma, povišena razina ekspresije *MYBL1* je do sada dokazana i u drugim tumorskim stanicama poput stanica tumora dojke, žlijezde slinovnice i glioma u djece (127–131).

Novija istraživanja su pokazala i da postoji veza između miRNA-221 i razine ekspresije gena *MYBL1* (126, 131). U tkivu karcinoma dojke, u čijim stanicama postoji prekomjerna ekspresija receptora HER2 (od eng. *Human epidermal growth factor receptor 2*) je promijenjena i razina miRNA-221. Povećana razina miRNA-221 dovodi do snižene ekspresije *MYB-a* i *MYBL1* koja dovodi do povećane ekspresije *TIMP2* (od eng. *tissue inhibitor of metalloproteinases 2*). *TIMP2* je regulator metaloproteinaza koji obično štiti tkivo od pretjerane razgradnje, ali u tumorskim stanicama njegova povišena razina može paradoksalno poticati migraciju i invaziju tumorskih stanica (131, 132). Povišena razina miRNA-221 u tumorskim stanicama hepatocelularnog karcinoma dovodi do snižene ekspresije *MYBL1* (83, 126).

U ovom istraživanju je pronađena statistički značajna korelacija između razine ekspresije *NTF-3* i *MYBL1* u stanicama HCC-a, ali ne i korelacija njihove ekspresije s laboratorijskim parametrima, kao npr. vrijednostima AST-a, ALT-, bilirubina, albumina ili AFP-a. Nisu pronađena druga istraživanja koja su ispitivala vezu između navedenih parametara. Zanimljivo, prilikom procjene moguće korelacije između ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u uzorcima tkiva pacijenata s HCC-om induciranog alkoholom, ciroznim tkivom i netumorskim tkivom jetre, statistički značajna pozitivna korelacija je pronađena samo u skupini HCC-a. (Tablica 12.).

Prethodna istraživanja pokazala su da povećana ekspresija *NTF3* u tumorskim stanicama nije posljedica genske amplifikacije niti pojačane promotorske aktivnosti, već je vjerojatno povezana s epigenetskom regulacijom (npr. metilacija/demetilacija DNA) (107).

U tumorima u kojima je opažena povišena ekspresija gena *MYBL1* su nađene i promjene u samom genu, a neke od njih su: fuzija gena *MYBL1::NFIB*, preuređenje *MYBL1*, višak ili manjak jednog alela *MYBL1* (128–130, 133).

Mehanizmi zbog kojih dolazi do povećanja ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u tumorskim stanicama jednog organa ili do snižene ekspresije gena *NTF-3* i *MYBL1* u tumorskim stanicama drugog organa su još nepoznati. Različita ekspresija u tumorskim stanicama različitih organskih sustava još dodatno otežava razumijevanje uloge gena *NTF-3* i *MYBL1* u mehanizmu nastanka tumora. I *NTF-3* i *MYBL1* imaju ključne uloge u staničnim procesima poput proliferacije, diferencijacije i apoptoze, iako u različitim kontekstima i mehanizmima. *NTF-3*, primarno uključen u živčani sustav, djelujući na receptore TrkC i p75NTR, utječe na signalne putove PI3K/AKT i MAPK, koji imaju ključnu ulogu u preživljavanju i diferencijaciji stanica. S druge strane, *MYBL1*, kao transkripcijski faktor, regulira staničnu proliferaciju kroz interakciju s ciklinima i drugim transkripcijskim faktorima te sudjeluje u diferencijaciji stanica određenih tkiva. Njihova potencijalna povezanost mogla bi biti preko signalnog puta PI3K/AKT, koji je aktiviran vezanjem *NTF-3* na receptor TrkC te je također uključen u regulaciju gena iz porodice *MYB*, uključujući *MYBL1* (21, 72, 82, 88, 100, 103, 105, 108, 118, 121, 125–130, 134–139). Uključenost ovog signalnog puta u stanično preživljavanje i proliferaciju sugerira da promjene u signalizaciji *NTF-3* mogu neizravno utjecati na regulacijske funkcije *MYBL1*, osobito u kontekstu tumorigenezi, gdje su oba gena pokazala promijenjenu ekspresiju.

Razumijevanje međusobnog djelovanja između signalizacije posredovane *NTF-3* i aktivnosti *MYBL1* moglo bi pružiti uvid u njihov zajednički utjecaj na razvoj i progresiju tumora. Mehanizmi koji dovode do povećane ekspresije *NTF-3* i *MYBL1* u tumorskom tkivu jednog organa ili smanjene ekspresije u tumorskom tkivu drugog organa još uvijek nisu poznati. Međutim, u HCC-u se čini da *NTF-3* i *MYBL1* usklađuju složenu regulacijsku mrežu koja utječe na različite stanične procese, uključujući kontrolu diferencijacije i proliferacije stanica, kao i apoptozu i migraciju stanica.

6. Zaključak

Između tumorskih stanica HCC-a induciranog virusom i primarnih hepatocita bioinformatičkom analizom utvrđeno je 1448 prekomjerno i 515 smanjeno eksprimiranih gena, od kojih je, nakon usporedbe s genima reguliranim s miRNA-221, identificirano devet gena od interesa: *ANGPTL2*, *BBC3*, *BMF*, *MMPI*, *MYBL1*, *NTF-3*, *PLXNC1*, *RNF44* i *SUN2*. *MYBL1* i *NTF-3* su pokazali najznačajnije promjene ekspresije u usporedbi s primarnim hepatocitima.

Analiza ekspresije gena *NTF-3* u uzorcima ispitanika oboljelih od HCC-a induciranog alkoholom nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na cirozno i netumorsko tkivo jetre.

U uzorcima pacijenata oboljelih od HCC-a induciranog alkoholom značajno je niža ekspresija gena *MYBL1* u odnosu na cirozno tkivo kao i netumorsko tkivo jetre, dok nije opažena statistički značajna razlika u ekspresiji *MYBL1* između ispitanika s ciroznim tkivom i netumorskim tkivom jetre.

Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između *NTF-3* i *MYBL1* u stanicama HCC-a induciranog alkoholom.

Korelacija između *NTF-3* i *MYBL1* u hepatocelularnom karcinomu odražava njihove isprepletene uloge u regulaciji ključnih staničnih procesa uključenih u nastanak i napredovanje tumora. Daljnje razjašnjavanje molekularnih mehanizama koji leže u pozadini njihove interakcije moglo bi pružiti vrijedan uvid u patogenezu HCC-a.

7. Literatura

1. Who classification of tumours: Digestive system tumours. Lyon: World Health Organization (WHO). 2019.
2. Srivastava, A., Allende, D.S. and Goldblum, J.R. Gastrointestinal and liver pathology: A volume in the series: Foundations in diagnostic pathology. Philadelphia: Elsevier. 2023.
3. M., F.C.D. Diagnostic histopathology of tumors. Philadelphia, PA: Elsevier. 2021.
4. Hosseini N, Shor J, Szabo G. Alcoholic Hepatitis: A Review. *Alcohol Alcohol*. 2019;54(4):408-416.
5. Das UN. Beneficial role of bioactive lipids in the pathobiology, prevention, and management of HBV, HCV and alcoholic hepatitis, NAFLD, and liver cirrhosis: A review. *J Adv Res*. 2018;17:17-29.
6. Mohr R, Özdirik B, Lambrecht J, Demir M, Eschrich J, Geisler L, Hellberg T, Loosen SH, Luedde T, Tacke F, Hammerich L, Roderburg C. From Liver Cirrhosis to Cancer: The Role of Micro-RNAs in Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1492.
7. Oura K, Morishita A, Masaki T. Molecular and Functional Roles of MicroRNAs in the Progression of Hepatocellular Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8362.
8. Xu T, Li L, Hu HQ, Meng XM, Huang C, Zhang L, Qin J, Li J. MicroRNAs in alcoholic liver disease: Recent advances and future applications. *J Cell Physiol*. 2018;234(1):382-394.
9. Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006;25(27):3866-84.
10. Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatol Int*. 2019;13(2):125-137.
11. Marks EI, Yee NS. Molecular Genetics and Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(1):53-70.
12. D'Anzeo M, Faloppi L, Scartozzi M, Giampieri R, Bianconi M, Del Prete M, Silvestris N, Cascinu S. The role of micro-RNAs in hepatocellular carcinoma: from molecular biology to treatment. *Molecules*. 2014;19(5):6393-406.
13. Cucarull B, Tutusaus A, Rider P, Hernáez-Alsina T, Cuño C, García de Frutos P, Colell A, Marí M, Morales A. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Advances. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3):621.

14. Llovet JM, Pinyol R, Kelley RK, El-Khoueiry A, Reeves HL, Wang XW, Gores GJ, Villanueva A. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer*. 2022;3(4):386-401.
15. Patil VS, Harish DR, Sampat GH, Roy S, Jalalpure SS, Khanal P, Gujarathi SS, Hegde HV. System Biology Investigation Revealed Lipopolysaccharide and Alcohol-Induced Hepatocellular Carcinoma Resembled Hepatitis B Virus Immunobiology and Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13):11146.
16. Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., Hazle, J. D., & Elsayes, K. M. Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 2018;5, 61–73.
17. Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48):6035-43.
18. Felgendreff P, Raschzok N, Kunze K, Leder A, Lippert S, Klunk S, Tautenhahn HM, Hau HM, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Sauer IM, Bartels M, Morgül MH. Tissue-based miRNA mapping in alcoholic liver cirrhosis: different profiles in cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*. 2020;25(1):62-68.
19. Goossens N, Sun X, Hoshida Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol*. 2015;2(4):371-379.
20. Morishita A, Oura K, Tadokoro T, Fujita K, Tani J, Masaki T. MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):514.
21. He XX, Guo AY, Xu CR, Chang Y, Xiang GY, Gong J, Dan ZL, Tian DA, Liao JZ, Lin JS. Bioinformatics analysis identifies miR-221 as a core regulator in hepatocellular carcinoma and its silencing suppresses tumor properties. *Oncol Rep*. 2014;32(3):1200-10.
22. Wang X, Liao X, Huang K, Zeng X, Liu Z, Zhou X, Yu T, Yang C, Yu L, Wang Q, Han C, Zhu G, Ye X, Peng T. Clustered microRNAs hsa-miR-221-3p/hsa-miR-222-3p and their targeted genes might be prognostic predictors for hepatocellular carcinoma. *J Cancer*. 2019;10(11):2520-2533.
23. Shaker O, Alhelf M, Morcos G, Elsharkawy A. miRNA-101-1 and miRNA-221 expressions and their polymorphisms as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol*. 2017;51:173-181.

24. Loureiro D, Tout I, Narguet S, Benazzouz SM, Mansouri A, Asselah T. miRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C. *Viruses*. 2020;12(12):1440.
25. Bala S, Szabo G. MicroRNA Signature in Alcoholic Liver Disease. *Int J Hepatol*. 2012;2012:498232.
26. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2021. godini. URL: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/> (arhivirano 19. Maja 2024.)
27. Quaas A, Oldopp T, Tharun L, Klingensfeld C, Krech T, Sauter G, Grob TJ. Frequency of TERT promoter mutations in primary tumors of the liver. *Virchows Arch*. 2014;465(6):673-7.
28. Nault JC, Zucman-Rossi J. TERT promoter mutations in primary liver tumors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(1):9-14.
29. Banerjee P, Gaddam N, Chandler V, Chakraborty S. Oxidative Stress-Induced Liver Damage and Remodeling of the Liver Vasculature. *Am J Pathol*. 2023;193(10):1400-1414.
30. Kooshkaki O, Derakhshani A, Hosseinkhani N, Torabi M, Safaei S, Brunetti O, Racanelli V, Silvestris N, Baradaran B. Combination of Ipilimumab and Nivolumab in Cancers: From Clinical Practice to Ongoing Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4427.
31. Kasprzak A, Adamek A. Mucins: the Old, the New and the Promising Factors in Hepatobiliary Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1288.
32. Zhou W, Fang D, He Y, Wei J. Correlation analysis of tumor mutation burden of hepatocellular carcinoma based on data mining. *J Gastrointest Oncol*. 2021;12(3):1117-1131.
33. Jiao J, Watt GP, Stevenson HL, Calderone TL, Fisher-Hoch SP, Ye Y, Wu X, Vierling JM, Beretta L. Telomerase reverse transcriptase mutations in plasma DNA in patients with hepatocellular carcinoma or cirrhosis: Prevalence and risk factors. *Hepatol Commun*. 2018;2(6):718-731.
34. Lee SE, Chang SH, Kim WY, Lim SD, Kim WS, Hwang TS, Han HS. Frequent somatic TERT promoter mutations and CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(43):69267-69275.
35. Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007;13(16):2271-82.

36. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007; 26(15):2166-76.
37. Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003;21(3):201-16.
38. Jiang K, Centeno BA. Primary Liver Cancers, Part 2: Progression Pathways and Carcinogenesis. *Cancer Control*. 2018;25(1):1073274817744658.
39. Pezzuto F, Izzo F, Buonaguro L, Annunziata C, Tatangelo F, Botti G, Buonaguro FM, Tornesello ML. Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(34):54253-54262.
40. Nahon P, Nault JC. Constitutional and functional genetics of human alcohol-related hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2017;37(11):1591-1601.
41. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, Martincorena I, Alexandrov LB, Martin S, Wedge DC, Van Loo P, Ju YS, Smid M, Brinkman AB, Morganella S, Aure MR, Lingjærde OC, Langerød A, Ringnér M, Ahn SM, Boyault S, Brock JE, Brooks A, Butler A, Desmedt C, Dirix L, Dronov S, Fatima A, Foekens JA, Gerstung M, Hooijer GK, Jang SJ, Jones DR, Kim HY, King TA, Krishnamurthy S, Lee HJ, Lee JY, Li Y, McLaren S, Menzies A, Mustonen V, O'Meara S, Pauporté I, Pivot X, Purdie CA, Raine K, Ramakrishnan K, Rodríguez-González FG, Romieu G, Sieuwerts AM, Simpson PT, Shepherd R, Stebbings L, Stefansson OA, Teague J, Tommasi S, Treilleux I, Van den Eynden GG, Vermeulen P, Vincent-Salomon A, Yates L, Caldas C, van't Veer L, Tutt A, Knappskog S, Tan BK, Jonkers J, Borg Å, Ueno NT, Sotiriou C, Viari A, Futreal PA, Campbell PJ, Span PN, Van Laere S, Lakhani SR, Eyfjord JE, Thompson AM, Birney E, Stunnenberg HG, van de Vijver MJ, Martens JW, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Kong G, Thomas G, Stratton MR. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 Jun 2;534(7605):47-54. Epub 2016. Erratum in: *Nature*. 2019;566(7742):E1.
42. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012;10:85.
43. Bannoura SF, Uddin MH, Nagasaka M, Fazili F, Al-Hallak MN, Philip PA, El-Rayes B, Azmi AS. Targeting KRAS in pancreatic cancer: new drugs on the horizon. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(3):819-835.

44. Mondal K, Posa MK, Shenoy RP, Roychoudhury S. KRAS Mutation Subtypes and Their Association with Other Driver Mutations in Oncogenic Pathways. *Cells*. 2024;13(14):1221.
45. Batra U, Biswas B, Prabhash K, Krishna MV. Differential clinicopathological features, treatments and outcomes in patients with Exon 19 deletion and Exon 21 L858R EGFR mutation-positive adenocarcinoma non-small-cell lung cancer. *BMJ Open Respir Res*. 2023;10(1):e001492.
46. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004;95(11):866-71.
47. Nguyen L, W M Martens J, Van Hoeck A, Cuppen E. Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nat Commun*. 2020;11(1):5584.
48. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18(4):1358-72.
49. CUSABIO team. Introduction of Hepatocellular Carcinoma Related Signaling Pathways. <https://www.cusabio.com/c-20813.html>
50. Pinyol R, Torrecilla S, Wang H, Montironi C, Piqué-Gili M, Torres-Martin M, Wei-Qiang L, Willoughby CE, Ramadori P, Andreu-Oller C, Taik P, Lee YA, Moeini A, Peix J, Faure-Dupuy S, Riedl T, Schuehle S, Oliveira CP, Alves VA, Boffetta P, Lachenmayer A, Roessler S, Minguez B, Schirmacher P, Dufour JF, Thung SN, Reeves HL, Carrilho FJ, Chang C, Uziel AV, Heikenwalder M, Sanyal A, Friedman SL, Sia D, Llovet JM. Molecular characterisation of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2021;75(4):865-878.
51. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169(7):1327-1341.e23.
52. Xing W, Li Y, Chen J, Hu Q, Liu P, Ge X, Lv J, Wang D. Association of APC Expression with Its Promoter Methylation Status and the Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24(11):3851-3857.
53. Xing T, Li L, Chen Y, Ju G, Li G, Zhu X, Ren Y, Zhao J, Cheng Z, Li Y, Xu D, Liang J. Targeting the TCA cycle through cuproptosis confers synthetic lethality on ARID1A-deficient hepatocellular carcinoma. *Cell Rep Med*. 2023;4(11):101264.
54. Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Asahara H, Kaida A, Miura M,

- Tanabe M, Tanaka S. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol.* 2017;66(5):942-951.
55. Liu C, Lin X, Sun B, Mao Z, Chen L, Qian H, Su C. PRCC reduces the sensitivity of cancer cells to DNA damage by inhibiting JNK and ATM/ATR pathways and results in a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci.* 2021;11(1):185.
 56. Chen X, Huang A, Wang Y, Chen F, Hu B, Zhang X, Sun Y, Wang J, Cheng J, Wang P, Ji Y, Qiu S, Fan J, Zhou J, Yang X. BRCA1-associated protein 1 serves as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by deubiquitinating and stabilizing PTEN. *Am J Cancer Res.* 2021;11(5):2044-2061.
 57. Sueangoen N, Tantiwetrueangdet A, Panvichian R. HCC-derived EGFR mutants are functioning, EGF-dependent, and erlotinib-resistant. *Cell Biosci.* 2020;10:41.
 58. Golovenko D, Bräuning B, Vyas P, Haran TE, Rozenberg H, Shakked Z. New Insights into the Role of DNA Shape on Its Recognition by p53 Proteins. *Structure.* 2018;26(9):1237-1250.e6.
 59. Gu DL, Chen YH, Shih JH, Lin CH, Jou YS, Chen CF. Target genes discovery through copy number alteration analysis in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013;19(47):8873-9.
 60. Zheng QF, Xu B, Wang HM, Ding LH, Liu JY, Zhu LY, Qiu H, Zhang L, Ni GY, Ye J, Gao SB, Jin GH. Epigenetic alterations contribute to promoter activity of imprinting gene IGF2. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018;1861(2):117-124.
 61. Tsuchiya J, Miyoshi M, Kakinuma S, Kawai-Kitahata F, Kamiya A, Shimizu T, Sato A, Watakabe K, Mochida T, Inada K, Kamimae R, Kaneko S, Murakawa M, Nitta S, Nakagawa M, Watanabe M, Asahina Y, Okamoto R. Hepatitis B Virus-KMT2B Integration Drives Hepatic Oncogenic Processes in a Human Gene-edited Induced Pluripotent Stem Cells-derived Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2025;19(2):101422.
 62. Zhu C, Soto-Feliciano YM, Morris JP, Huang CH, Koche RP, Ho YJ, Banito A, Chen CW, Shroff A, Tian S, Livshits G, Chen CC, Fennell M, Armstrong SA, Allis CD, Tschaharganeh DF, Lowe SW. MLL3 regulates the *CDKN2A* tumor suppressor locus in liver cancer. *Elife.* 2023;12:e80854.
 63. De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Orton TC, Jirtle RL. M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet.* 1995;11(4):447-9.

64. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017 Mar;152(4):745-761. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048.
65. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol*. 2023;14(10):mjac074.
66. Zhu K, Pan Q, Zhang X, Kong LQ, Fan J, Dai Z, Wang L, Yang XR, Hu J, Wan JL, Zhao YM, Tao ZH, Chai ZT, Zeng HY, Tang ZY, Sun HC, Zhou J. MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression. *Carcinogenesis*. 201334(9):2071-9.
67. Huang F, Guo J, Zhao N, Hou M, Gai X, Yang S, Cai P, Wang Y, Ma Q, Zhao Q, Li L, Yang H, Jing Y, Jin D, Hu Z, Zha X, Wang H, Mao Y, Liu F, Zhang H. PTEN deficiency potentiates HBV-associated liver cancer development through augmented GP73/GOLM1. *J Transl Med*. 2024;22(1):254.
68. Duan X, Cai Y, He T, Shi X, Zhao J, Zhang H, Shen Y, Zhang H, Zhang H, Duan W, Jiang B, Mao X. The effect of the *TP53* and *RB1* mutations on the survival of hepatocellular carcinoma patients with different racial backgrounds. *J Gastrointest Oncol*. 2021;12(4):1786-1796.
69. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F, Clément B, Balabaud C, Chevet E, Laurent A, Couchy G, Letouzé E, Calvo F, Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694-8.
70. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-1239.e4.
71. Chavda V, Zajac KK, Gunn JL, Balar P, Khadela A, Vaghela D, Soni S, Ashby CR Jr, Tiwari AK. Ethnic differences in hepatocellular carcinoma prevalence and therapeutic outcomes. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2023;6 Suppl 1(Suppl 1):e1821.
72. Liu R, Li R, Yu H, Liu J, Zheng S, Li Y, Ye L. NTF3 Correlates With Prognosis and Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:795849.
73. Liu Z, Sun J, Liu B, Zhao M, Xing E, Dang C. miRNA 222 promotes liver cancer cell proliferation, migration and invasion and inhibits apoptosis by targeting BBC3. *Int J Mol Med*. 2018;42(1):141-148.

74. Li Y, Yu Y, Yang L, Wang R. Insights into the Role of Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma Development. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023;28(11):286.
75. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-61.
76. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(5):485-491.
77. Kian R, Moradi S, Ghorbian S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis. *Exp Oncol*. 2018;40(1):2-9.
78. Chen T. The role of MicroRNA in chemical carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2010;28(2):89-124.
79. Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12369-12384.
80. Rhim J, Baek W, Seo Y, Kim JH. From Molecular Mechanisms to Therapeutics: Understanding MicroRNA-21 in Cancer. *Cells*. 2022;11(18):2791.
81. Mohr R, Özdirik B, Lambrecht J, Demir M, Eschrich J, Geisler L, Hellberg T, Loosen SH, Luedde T, Tacke F, Hammerich L, Roderburg C. From Liver Cirrhosis to Cancer: The Role of Micro-RNAs in Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1492.
82. Morishita A, Oura K, Tadokoro T, Fujita K, Tani J, Masaki T. MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):514.
83. Wang X, Liao X, Huang K, Zeng X, Liu Z, Zhou X, Yu T, Yang C, Yu L, Wang Q, Han C, Zhu G, Ye X, Peng T. Clustered microRNAs hsa-miR-221-3p/hsa-miR-222-3p and their targeted genes might be prognostic predictors for hepatocellular carcinoma. *J Cancer*. 2019;10(11):2520-2533.
84. Shaker O, Alhelf M, Morcos G, Elsharkawy A. miRNA-101-1 and miRNA-221 expressions and their polymorphisms as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol*. 2017;51:173-181.
85. Loureiro D, Tout I, Narguet S, Benazzouz SM, Mansouri A, Asselah T. miRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C. *Viruses*. 2020;12(12):1440.
86. Oura K, Morishita A, Masaki T. Molecular and Functional Roles of MicroRNAs in the Progression of Hepatocellular Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8362.
87. Felgendreff P, Raschzok N, Kunze K, Leder A, Lippert S, Klunk S, Tautenhahn HM, Hau HM, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Sauer IM, Bartels M, Morgül MH. Tissue-

- based miRNA mapping in alcoholic liver cirrhosis: different profiles in cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*. 2020;25(1):62-68.
88. Song Q, An Q, Niu B, Lu X, Zhang N, Cao X. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. *J Oncol*. 2019;2019:7252013.
 89. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, Sabedot TS, Malta TM, Pagnotta SM, Castiglioni I, Ceccarelli M, Bontempi G, Noushmehr H. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(8):e71.
 90. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169(7):1327-1341.e23.
 91. Babraham Bioinformatics. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data 2023. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Accessed July 10, 2023
 92. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114-2120.
 93. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29:15-21.
 94. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30:923-930.
 95. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
 96. Stephens M, Carbonetto P, Gerard D, Lu M, Sun L, Willwerscheid J, Xiao N. ashR: Methods for Adaptive Shrinkage, using Empirical Bayes. R package version 2.2-54. 2022. <https://CRAN.R-project.org/package=ashr>.
 97. R Core Team (2024). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
 98. Dahn ML, Dean CA, Jo DB, Coyle KM, Marcato P. Human-specific GAPDH qRT-PCR is an accurate and sensitive method of xenograft metastasis quantification. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;20:398-408.
 99. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, Constantin C, Neagu M. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:9423907.

100. Zhu J, Wu Y, Yu Y, Li Y, Shen J, Zhang R. MYBL1 induces transcriptional activation of ANGPT2 to promote tumor angiogenesis and confer sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2022;13(8):727.
101. Odabas G, Cetin M, Turhal S, Baloglu H, Sayan AE, Yagci T. Plexin C1 Marks Liver Cancer Cells with Epithelial Phenotype and Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:4040787.
102. Chen X, Chen Y, Huang HM, Li HD, Bu FT, Pan XY, Yang Y, Li WX, Li XF, Huang C, Meng XM, Li J. SUN2: A potential therapeutic target in cancer. *Oncol Lett.* 2019;17(2):1401-1408.
103. Chalazonitis A. Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog Brain Res.* 2004;146:243-63.
104. Yang QX, Liu T, Yang JL, Liu F, Chang L, Che GL, Lai SY, Jiang YM. Low expression of NTF3 is associated with unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020;13(9):2280-2288.
105. Tan, F.; Thiele, C.J.; Li, Z. Neurotrophin Signaling in Cancer. In *Handbook of Neurotoxicity*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 1825–1847.
106. Ohta T, Numata M, Tsukioka Y, Futagami F, Kayahara M, Kitagawa H, Nagakawa T, Yamamoto M, Wakayama T, Kitamura Y, Terada T, Nakanuma Y. Neurotrophin-3 expression in human pancreatic cancers. *J Pathol.* 1997;181(4):405-12.
107. Bouzas-Rodriguez J, Cabrera JR, Delloye-Bourgeois C, Ichim G, Delcros JG, Raquin MA, Rousseau R, Combaret V, Bénard J, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *J Clin Invest.* 2010;120(3):850-8.
108. Liot G, Gabriel C, Cacquevel M, Ali C, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Neurotrophin-3-induced PI-3 kinase/Akt signaling rescues cortical neurons from apoptosis. *Exp Neurol.* 2004;187(1):38-46.
109. Yang Z, Zhang H, Yin M, Cheng Z, Jiang P, Feng M, Liao B, Liu Z. Neurotrophin3 promotes hepatocellular carcinoma apoptosis through the JNK and P38 MAPK pathways. *Int J Biol Sci.* 2022;18(15):5963-5977.
110. Blondy S, Christou N, David V, Verdier M, Jauberteau MO, Mathonnet M, Perraud A. Neurotrophins and their involvement in digestive cancers. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):123.

111. Guo Y, Hu J, Zhao Z, Zhong G, Gong J, Cai D. Identification of a Prognostic Model Based on 2-Gene Signature and Analysis of Corresponding Tumor Microenvironment in Alcohol-Related Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:719355.
112. Zhang X, Kang C, Li N, Liu X, Zhang J, Gao F, Dai L. Identification of special key genes for alcohol-related hepatocellular carcinoma through bioinformatic analysis. *PeerJ.* 2019;7:e6375
113. Louie E, Chen XF, Coomes A, Ji K, Tsirka S, Chen EI. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene.* 2013;32(35):4064-77.
114. Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Bronzetti E, Cavazzana A, Cardillo G, Amenta F, Bisetti A, Barbolini G. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(4):439-46.
115. Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, Pabelick CM, Mantilla CB, Zaidi S, Martin RJ. Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med.* 2010;4(3):395-411.
116. Thompson MA, Ramsay RG. Myb: an old oncoprotein with new roles. *Bioessays.* 1995;17(4):341-50.
117. Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(7):523-34.
118. Oh IH, Reddy EP. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene.* 1999;18(19):3017-33.
119. Bolcun-Filas E, Bannister LA, Barash A, Schimenti KJ, Hartford SA, Eppig JJ, Handel MA, Shen L, Schimenti JC. A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Development.* 2011;138(15):3319-30.
120. Facchinetti V, Loffarelli L, Schreek S, Oelgeschläger M, Lüscher B, Introna M, Golay J. Regulatory domains of the A-Myb transcription factor and its interaction with the CBP/p300 adaptor molecules. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 3)(Pt 3):729-36.
121. Golay J, Facchinetti V, Ying G, Introna M. The A-myb transcription factor in neoplastic and normal B cells. *Leuk Lymphoma.* 1997;26(3-4):271-9.
122. Klempnauer KH. Transcription Factor MYB as Therapeutic Target: Current Developments. *Int J Mol Sci.* 2024;25(6):3231.

123. Lemma RB, Ledsaak M, Fuglerud BM, Sandve GK, Eskeland R, Gabrielsen OS. Chromatin occupancy and target genes of the haematopoietic master transcription factor MYB. *Sci Rep.* 2021;11(1):9008.
124. DeRocco SE, Iozzo R, Ma XP, Schwarting R, Peterson D, Calabretta B. Ectopic expression of A-myb in transgenic mice causes follicular hyperplasia and enhanced B lymphocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3240-4.
125. Ziebold U, Klempnauer KH. Linking Myb to the cell cycle: cyclin-dependent phosphorylation and regulation of A-Myb activity. *Oncogene.* 1997;15(9):1011-9.
126. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):264-9.
127. Player A, Cunningham S, Philio D, Roy R, Haynes C, Dixon C, Thirston L, Ibikunle F, Boswell TA, Alnakhalah A, Contreras J, Bell M, McGuffery T, Bryant S, Nganya C, Kanu S. Characterization of MYBL1 Gene in Triple-Negative Breast Cancers and the Genes' Relationship to Alterations Identified at the Chromosome 8q Loci. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5):2539.
128. Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA. Recurrent Fusions in MYB and MYBL1 Define a Common, Transcription Factor-Driven Oncogenic Pathway in Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer Discov.* 2016;6(2):176-87.
129. Persson M, Andersson MK, Mitani Y, Brandwein-Weber MS, Frierson HF Jr, Moskaluk C, Fonseca I, Ferrarotto R, Boecker W, Loening T, El-Naggar AK, Stenman G. Rearrangements, Expression, and Clinical Significance of MYB and MYBL1 in Adenoid Cystic Carcinoma: A Multi-Institutional Study. *Cancers (Basel).* 2022;14(15):3691.
130. Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, Ramkissoon SH, Rich BE, Schumacher SE, McKenna A, Lawrence MS, Bergthold G, Brastianos PK, Tabak B, Ducar MD, Van Hummelen P, MacConaill LE, Pouissant-Young T, Cho YJ, Taha H, Mahmoud M, Bowers DC, Margraf L, Tabori U, Hawkins C, Packer RJ, Hill DA, Pomeroy SL, Eberhart CG, Dunn IF, Goumnerova L, Getz G, Chan JA, Santagata S, Hahn WC, Stiles CD, Ligon AH, Kieran MW, Beroukhir R, Ligon KL. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(20):8188-93.

131. Gorbatenko A, Søkilde R, Sorensen EE, Newie I, Persson H, Morancho B, Arribas J, Litman T, Rovira C, Pedersen SF. HER2 and p95HER2 differentially regulate miRNA expression in MCF-7 breast cancer cells and downregulate MYB proteins through miR-221/222 and miR-503. *Sci Rep.* 2019;9(1):3352.
132. Sounni NE, Rozanov DV, Remacle AG, Golubkov VS, Noel A, Strongin AY. Timp-2 binding with cellular MT1-MMP stimulates invasion-promoting MEK/ERK signaling in cancer cells. *Int J Cancer.* 2010; 126(5):1067-78.
133. Fujii K, Murase T, Beppu S, Saida K, Takino H, Masaki A, Ijichi K, Kusafuka K, Iida Y, Onitsuka T, Yatabe Y, Hanai N, Hasegawa Y, Inagaki H. MYB, MYBL1, MYBL2 and NFIB gene alterations and MYC overexpression in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Histopathology.* 2017;71(5):823-834.
134. Sala A. B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(16):2479-84.
135. Taylor D, Badiani P, Weston K. A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. *Genes Dev.* 1996;10(21):2732-44.
136. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. A comprehensive review of paediatric low-grade diffuse glioma: pathology, molecular genetics and treatment. *Brain Tumor Pathol.* 2017;34(2):51-61.
137. Nobusawa S, Hirato J, Yokoo H. Molecular genetics of ependymomas and pediatric diffuse gliomas: a short review. *Brain Tumor Pathol.* 2014;31(4):229-33.
138. Sala A, Casella I, Grasso L, Bellon T, Reed JC, Miyashita T, Peschle C. Apoptotic response to oncogenic stimuli: cooperative and antagonistic interactions between c-myc and the growth suppressor p53. *Cancer Res.* 1996;56(9):1991-6.
139. Shu GS, Lv F, Yang ZL, Miao XY. Immunohistochemical study of PUMA, c-Myb and p53 expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Int J Clin Oncol.* 2013;18(4):641-50.

8. Životopis

Andreja Petrović rođena je 5. ožujka 1989. godine u Jajcu, BiH gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij medicine završila je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je diplomirala 2016. godine. Nakon završetka pripravničkog staža i položenog državnog ispita, radila je kao liječnica u obiteljskoj medicini te nastavila specijalističko usavršavanje iz patologije i citologije u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu. Tijekom specijalizacije bila je uključena i u rad na Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Godine 2023. položila je stručni ispit i stekla naziv specijalistice patologije i citologije, a od iste godine posjeduje i njemačku aprobaciju. U Njemačkoj je radila na Institutu za opću patologiju i patološku anatomiju Sveučilišne klinike u Kölnu, a potom nastavila karijeru kao specijalistica patologije u Centru za patologiju i citologiju (MVZ – ZPZ Köln), u sklopu Amedes grupe.

Paralelno s kliničkim radom, se bavi znanstvenim istraživanjima iz područja molekularne patologije, posebice u hepatocelularnom karcinomu. Doktorski studij upisala je akademske godine 2019/2020 na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Odsjeku za biologiju.

Autorica je i koautorica znanstvenih radova objavljenih u međunarodnim časopisima te sudionica domaćih i međunarodnih kongresa iz područja patologije i citologije.

Osim hrvatskog jezika, tečno govori engleski i njemački jezik.