

MAŁGORZATA MARSZAŁEK

*Zakład Biofizyki Błón*

*Katedra Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki*

*Uniwersytet Łódzki*

*Banacha 12/16, 90-237 Łódź*

## RAK WĄTROBOWOKOMÓRKOWY — ETIOLOGIA I ROZPRZESTRZENIENIE

### WSTĘP

Z racji rozlicznych i różnorodnych pod względem biochemicznym funkcji fizjologicznych, które najogólniej można określić jako czynności o charakterze regulacyjnym, stopień skomplikowania struktury i architektoniki wątroby jest bardzo wysoki. Na przykład wyraża się to heterogennością w obrębie samych tylko hepatocytów, które stanowią 70% masy wątroby. Hepatocyty, w zależności od położenia w obrębie zrazika wątrobowego, cechuje inny profil metaboliczny, odmienny stopień zróżnicowania komórkowego, czy różnice w ploidalności (większość komórek wątroby jest poliploidalna). Powoduje to, że praktycznie wszystkie stany patologiczne wątroby stanowią niezwykle trudny problem naukowy zarówno biologiczny, jak i — z oczywistych względów — medyczny. Jednym z licznych przykładów szeroko rozumianych stanów patologicznych wątroby są, z reguły śmiertelne, pierwotne nowotwory. Terminem tym określa się zmiany nowotworowe wywodzące się z komórek budujących narząd (lub tkankę), w którym pojawia się pierwotne ognisko nowotworowe.

Praktycznie każdy rodzaj komórek budujących narząd wewnętrzny może być zaangażowany w proces nowotworzenia. Przykład może stanowić wątroba, gdyż zarówno komórki nabłonkowe, to jest hepatocyty (około 60–70% masy wątroby) i komórki kanalików żółciowych — cholangiocyty (około 3–5%), jak i nieparenchymalne komórki mezenchymatyczne przestrzeni za-

tokowej — sinusoidalnej (około 30–35%), to jest komórki śródbłonkowe, makrofagi wątrobowe zwane komórkami Browicza-Kupffera i komórki ziarniste zwane także komórkami ziarnkowymi (ang. pit cells), oraz przestrzeni okołozatokowej — perisinusoidalnej, to jest komórki tłuszczowe okołozatokowe — lipocyty, zwane również komórkami gwiazdzistymi lub komórkami Ito, mogą stanowić tarczę dla szeroko rozumianych czynników karcynogennych (nazwy komórek, mianownictwo histologiczne i cytofizjologiczne — patrz SAWICKI 1998).

Wiadomo jednak, że nie tylko zróżnicowane i w pełni dojrzałe formy, ale również pierwotne, niezróżnicowane komórki nabłonkowe wątroby, to jest komórki macierzyste (ang. stem cells), do których zaliczane są na przykład „komórki owalne” (ang. oval cells), choć stanowią niewielki odsetek masy wątroby, to jednak uczestniczą w procesie hepatokarcynogenezy. Wyniki licznych prac wskazują, że także komórki macierzyste są zaangażowane w histogenezę pierwotnych nowotworów wątroby, choć należy zaznaczyć, że jest to nadal przedmiotem dyskusji (RUCK i współaut. 1996, 1997; ROBRECHTS i współaut. 1998; WU i współaut. 1999; prace przeglądowe MARSZAŁEK 1999a, b, c, d, 2000).

Odrębny, choć nie mniej istotny problem, stanowią ułożone w wątrobie przerzuty nowotworów z innych narządów, w których znajdują się pierwotne miejsca nowotworzenia. Takie guzy wątroby określa się mianem nowotwo-

Stosowane skróty: AFB<sub>1</sub> — aflatoksyna B<sub>1</sub>; — CC rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych; CH — marskość wątroby; GST — transferaza glutationowa; HCC — rak wątrobowokomórkowy; HBV — wirus B zapalenia wątroby; HCV — wirus C zapalenia wątroby; HDV — wirus D zapalenia wątroby; HGV — wirus G zapalenia wątroby; MC — mikrocytyna.

rów wtórnych. Wtórne nowotwory wątroby są znacznie częstsze od nowotworów pierwotnych. Nowotworem stosunkowo często metastazującym do wątroby jest rak okrężnicy (LYGIDAKIS i PEARL 1997). Także pierwotny rak wątroby może dawać przerzuty do innych narządów wewnętrznych, najczęściej do płuc.

Przedmiotem artykułu jest jeden z nowotworów pierwotnych wątroby — rak wątrobowokomórkowy, który jako fenomen biologiczny

dotyczy zarówno ludzi, jak i zwierząt. Stanowi tym samym problem zarówno dla medycyny, jak i dla nauk podstawowych. W celu zobrazowania rozmiaru, skali i zasięgu tej choroby przedstawiono ją na tle danych epidemiologicznych i danych statystycznych, dotyczących różnych czynników etiologicznych i zwiększających ryzyko rozwoju raka. W piśmiennictwie określane są one także terminem: czynniki patogenetyczne.

#### PIERWOTNE NOWOTWORY WĄTROBY

Pierwotne nowotwory wątroby u dorosłych to w 68% rak wątrobowokomórkowy *carcinoma hepatocellulare* (HCC, ang. hepatocellular carcinoma, liver cell carcinoma), w 19% rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych *carcinoma cholangiocellulare* (CC, ang. cholangiocarcinoma), w 13% mięsaki, z czego 51% stanowi naczyniakomięsak krwionośny *haemangiosarcoma*. Znacznie mniejszy odsetek przypada na mięsaki wywodzące się z komórek przestrzeni okołozatokowej — *perisinusoidal sarcoma*. W 1,0%–4,7% pierwotne nowotwory wątroby stanowi guz o typie mieszanym, łączący cechy dwóch pierwszych wymienionych nowotworów (HCC-CC, ang. combined hepatocellular and cholangiocarcinoma lub MHC, ang. mixed hepatocellular and cholangiocarcinoma). Histogeneza tego guza budzi nadal spore kontrowersje (CARRIAGA i HENSON 1995, HAUBEN i współaut. 1996, YANO i współaut. 1996). Dyskusyjny jest również problem histogenezy stosunkowo rzadko występującego wątrobiaka płodowego — *hepatoblastoma*, nowotworu wykrywanego u dzieci i sporadycznie u dorosłych. W świetle

ostatnich badań przypuszcza się, że komórki nowotworowe zidentyfikowane w różnych subtypach tego guza wywodzą się z wielopotencjalnych komórek macierzystych wątroby i/lub z komórek owalnych (RUCK i współaut. 1997). Podobną histogenezę przypisuje się wspomnianemu nowotworowi o typie mieszanym (HCC-CC), a także nowotworowi zbudowanemu z komórek o cechach pośrednich pomiędzy hepatocytami a cholangiocytami (ang. primary liver tumour of intermediate phenotype), który został niedawno opisany po raz pierwszy (ROBRECHTS i współaut. 1998).

W piśmiennictwie można czasem spotkać termin *hepatoma* — wątrobiak, który stosowany jest jednak dość niejednoznacznie. Mianem tym określano bowiem wszelkie nowotwory złośliwe wątroby lub jedynie raka wątrobowokomórkowego traktując termin — *hepatoma* jako synonim — *hepatocellular carcinoma*. Ponadto ze względu na to, że słowo *hepatoma* nie wskazuje histogenezy nowotworu zalecono, aby w literaturze przedmiotu nazwy tej nie stosować (SQUIRE i LEVITT 1975, GIBSON i SABIN 1978).

#### RAK WĄTROBOWOKOMÓRKOWY JAKO PROBLEM W SKALI ŚWIATA

Rak wątrobowokomórkowy stanowi 4,5% wszystkich guzów złośliwych i jest jednym z dziesięciu najczęściej występujących nowotworów złośliwych narządów mięsaszowych u człowieka. Rocznie w skali świata notuje się od 500 tysięcy do 1 miliona nowych przypadków klinicznych, a zasięg i częstotliwość zachorowań na HCC wzrasta z roku na rok. Pod względem liczby zachorowań w skali świata HCC jest na 7-mym miejscu u mężczyzn, na 9-tym u kobiet (CASELMAN i ALT 1996, HILDT i współaut. 1996, CARRIAGA i HENSON 1995, TSUKUMA i współaut. 1994). Również w Polsce częściej występuje u mężczyzn niż u kobiet, zajmując odpowiednio 8 i 9 miejsce (ZATOŃSKI i TYCZYŃSKI 1994). Stosunek liczby zachorowań mężczyzn do liczby zachorowań kobiet wynosi w

Hongkongu 7 : 1, a w Anglii 5 : 1. Większość przypadków, bo aż 70% zachorowań na HCC, występuje w rejonach endemicznych dla tej choroby, to jest w Afryce Sub-Saharyjskiej, Azji Południowej i Południowo-Wschodniej, gdzie udział raka wątroby w ogólnej liczbie zachorowań na nowotwory złośliwe dochodzi do 40%. Na przykład w Chinach pod względem liczby zachorowań HCC jest na trzecim miejscu u mężczyzn, na czwartym u kobiet. Inny, ważny problem ilustrują dane wyrażające stosunek liczby zachorowań w krajach rozwiniętych do liczby zachorowań w krajach o niskim poziomie rozwoju cywilizacyjnego, co jest wyrazem złej jakości usług medycznych i niedostatecznej higieny; wynosi on 1 : 3,7 (BUENDIA 1992, GONZALEZ 1995).

Rak wątrobowokomórkowy jest chorobą śmiertelną. Na świecie z powodu HCC umiera rocznie około miliona osób. W Chinach i w Gambii jest on przyczyną aż 300 tysięcy zgonów rocznie. W USA rak wątroby nie należy do grupy nowotworów najczęściej występujących, a i tak jest przyczyną 2% zgonów rocznie, to jest około 12–13 tysięcy osób. W większym stopniu dotyka populację czarnych niż białych Amerykanów. HCC rozwija się około 30. roku życia, a ujaw-

niany jest na ogół dopiero powyżej 60. roku życia. Jest więc bardzo rzadkim przypadkiem klinicznym u kobiet w wieku reprodukcyjnym. W Hongkongu i Anglii HCC wykryto odpowiednio około 2,3% i 4,3% pacjentek w ciąży. Przeciętny czas życia pacjenta od momentu rozpoznania do zgonu nie przekracza 6–12 miesięcy (BOSCH i MUNOZ 1989, CARRIAGA i HENSON 1995, GONZALEZ 1995, LAU i współaut. 1995).

#### CZYNNIKI ETIOLOGICZNE I ZWIĘKSZAJĄCE RYZYKO ROZWOJU HCC U LUDZI

Głównym czynnikiem etiologicznym raka wątroby u człowieka są wirusy. Ponad 90% przypadków HCC wiąże się z infekcją hepadawirusem — wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV, ang. hepatitis B virus) bądź wirusem RNA — wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. hepatitis C virus). Niejednokrotnie rozwojowi HCC o etiologii wirusowej towarzyszy marskość wątroby (CH, ang. cirrhosis hepatis), która może mieć także podłoże alkoholowe. Również koinfekcja innymi wirusami rozważana jest jako czynnik ryzyka rozwoju HCC. Niektóre czynniki, w tym wirusy, mają charakter endemiczny. Przykładem mogą być karcynogenne mykotoksyny, na przykład aflatoksyna B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) czy hepatotoksyny, na przykład mikrocystyna (MC). Kolejną grupę czynników stanowią zanieczyszczające środowisko związki chemiczne, niektóre środki farmakologiczne i wspomniany już alkohol. Czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju HCC są także niektóre choroby uwarunkowane genetycznie.

#### WIRUSY HBV I HCV

Z grupy nowotworów, których przyczyną są infekcje wirusowe (około 15% wszystkich zachorowań na świecie), aż 30% stanowi rak wątrobowokomórkowy wywołany wirusem HBV. Na obszarach endemicznych dla HBV około 85%–90% przypadków HCC wiąże się z infekcją wirusową, a ryzyko rozwoju raka jest 3–4 krotnie większe u mężczyzn niż u kobiet. Za obszar hyperendemiczny dla tego wirusa uznaje się Tajwan. W Europie i USA oraz w Japonii około 20% przypadków HCC wiąże się z infekcją HBV (BUENDIA 1992, MILICH i współaut. 1994, HOPPE-SEYLER i BUTZ 1995, CHEN i współaut. 1996b, HILDT i współaut. 1996).

Infekcja wirusem HBV może nastąpić w okresie perinatalnym, co zwłaszcza dotyczy endemicznych dla wirusa obszarów Azji i Afryki, a także postnatalnie, która to forma zakażenia częściej występuje w Europie i Ameryce Północnej. Około 2%–10% osób zainfekowanych, po ostrej fazie infekcji, staje się nosicielami wirusa. Liczbę nosicieli szacuje się na około 300 milionów osób, co stanowi 5% populacji w skali całego globu. Rocznie z powodu chorób związanych z infekcją wirusem HBV umiera około 2 milionów ludzi, z czego 700 000 stanowią zgony na HCC. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że w 2000 roku liczba nosicieli wirusa HBV wzrośnie do około 400 milionów. Nosicielstwo wirusa HBV jest podstawą 100-krotnego wzrostu ryzyka rozwoju HCC (BUENDIA 1992, CHISARI i FERRARI 1995, HILDT i współaut. 1996).

Liczbę osób zainfekowanych wirusem HCV szacuje się na około 100 milionów (SLATER i CLARKE 1996). Zakażenie odbywa się postnatalnie, a główną przyczyną są transfuzje krwi lub jej produktów (ok. 35%), a także parenteralna podaż leków (ok. 21%). Równie wysoki odsetek (ok. 39%) stanowią zakażenia o niezidentyfikowanej drodze transmisji wirusa. Czynniki środowiskowe i socjologiczne zjawiska o charakterze patologicznym odgrywają mniejszą rolę w infekcji wirusem. Szacuje się, że ryzyko rozwoju HCC jest 70-krotnie wyższe u pacjentów seropoztywnych na przeciwciała anty-HCV, w porównaniu z seronegatywną grupą osób, we wszystkich regionach świata (ZEUZEM i współaut. 1996).

Wirus HCV występuje wszędzie na świecie, choć znacznie wyższy odsetek osób zainfekowanych tym wirusem stwierdzono na obszarach, które nie są endemiczne dla HBV. I tak u osób, u których stwierdzono HCC, infekcje wirusem

HCV szacuje się na 70%–90% w Japonii, 72% w Hiszpanii, 58% we Francji, 49%–62% we Włoszech, 26% w Niemczech, 9%–36% w USA. Na obszarach endemicznych dla HBV: na Tajwanie, w Tajlandii i w Hongkongu, gdzie odsetek osób zainfekowanych tym wirusem wynosi odpowiednio 53%, 60% i 80%, liczba infekcji wirusem HCV jest znacznie mniejsza i wynosi odpowiednio 9%, 38% i 4% (CSELMANN i ALT 1996, ZEUEM i współaut. 1996). Do obszarów, na których HCV uważa się za główny czynnik etiologiczny rozwoju HCC należy przede wszystkim Japonia, gdzie liczba przypadków HCC z powodu infekcji wirusem HCV (68,9%) jest 3–4-krotnie wyższa niż z powodu zainfekowania wirusem HBV (17,8%). Liczba infekcji wirusem HBV w ostatnim dziesięcioleciu znacznie zmalała w Japonii (EDAMOTO i współaut. 1996, NISHIBE i współaut. 1996). Częstotliwość obecności przeciwciał anti-HCV we krwi ludności Japonii wynosi 1,3% i przewyższa wskaźniki z Włoch i Hiszpanii, które wynoszą odpowiednio 0,87% i 0,5%–0,83%. Należy jednak zaznaczyć, że w obu tych krajach, podobnie jak w Japonii, bardzo wysoki odsetek HCC (około 50%–70%) związany jest właśnie z infekcją wirusem HCV (HADZIANIS i współaut. 1995). Najniższy odsetek osób, u których wykryto przeciwciała anti-HCV, stanowią mieszkańcy Finlandii — 0,01%. Z kolei na obszarach, gdzie przytoczony wskaźnik jest najwyższy: Burundia — 11,1%, Madagaskar — 4,4%, Senegal — 3,0%, inne czynniki aniżeli HCV odgrywają większą rolę w etiologii HCC (CASELMANN i ALT 1996, EDAMOTO i współaut. 1996).

Przypuszcza się, że poznanie geograficznego rozmieszczenia wyróżnionych — jak dotąd — sześciu głównych genotypów HCV (w ramach każdego wyróżniono kilka subgenotypów) będzie miało duże znaczenie w oszacowaniu ryzyka rozwoju HCC. W Europie, Stanach Zjednoczonych i Australii występuje genotyp oznaczony jako 1, 2 i 3, choć, na przykład w USA, wyraźnie dominuje 1a — 58% i 1b — 21%. W Hongkongu występuje wirus o genotypie 6, w Afryce Południowej o genotypie 5, w Afryce Północnej o genotypie 4. Wydaje się, że subtelne różnice budowy genomu wirusa są istotne dla procesu nowotworzenia. Wirus HCV o genotypie oznaczonym 1b wydaje się być najagresywniejszym i najbardziej cytopatogennym wirusem, gdyż jest przyczyną choroby o ostrym i ciężkim przebiegu. Dlatego też ryzyko rozwoju HCC u nosicieli tego wirusa jest największe (HATAKIS i współaut. 1996, ZEIN i współaut. 1996).

Jednoniciowy RNA wirusa wykazuje dodatkowy stopień zróżnicowania genetycznego —

zróżnicowanie cząsteczek wirusa w zainfekowanym organizmie. Przypuszcza się, że uwarunkowane jest to wysoką aktywnością replikacyjną wirusa. Różnorodne formy RNA, oznaczane terminem „quasispecies”, tworzą swoistą dla danego osobnika mozaikę, trudną do rozpoznania przez układ immunologiczny gospodarza. Również i to zjawisko składa się na fakt, że obraz choroby wywołanej HCV, w tym i HCC, ma charakter zindywidualizowany (FERRI i współaut. 1997).

Wirus HCV, podobnie jak HBV, wykazuje zarówno hepatotropizm, jak i limfocytotropizm. Zaangażowany jest w rozwój nie tylko HCC, ale także nowotworów wywodzących się z komórek hemopoetycznych. Mechanizm hepatokarcynogenezy indukowanej przez oba wirusy jest zupełnie odmienny. Genom HBV może zostać zintegrowany z genomem komórek gospodarza, co prowadzi do poważnych zmian w obrębie chromosomów, takich jak: delecje dużych fragmentów, translokacje czy duplikacje, a także do mutogenezy (HILDT i współaut. 1996, MILICH i współaut. 1994). W procesie transformacji nowotworowej odgrywają rolę białka wirusa, zwłaszcza białko X, jako transaktywator ekspresji genów. Sądzi się, że istotne znaczenie ma także oddziaływanie tego białka z białkiem p53 (SIDORKIEWICZ 1997). Przypuszcza się, że w procesie hepatokarcynogenezy istotne jest także zjawisko proliferacji hepatocytów, które następuje w efekcie zmniejszenia liczby komórek uszkodzonych przez HBV. W przypadku HCV nie obserwuje się, z powodu braku odwrotnej transkryptazy, integracji wirusowego DNA z genomem komórki gospodarza; nie występuje zatem zjawisko mutogenezy insercyjnej. Sugeruje się, że transformujący mechanizm działania HCV na komórkę jest zupełnie inny niż HBV, przebiega w sposób pośredni i ma charakter raczej epigenetyczny. Jest on jednak znacznie słabiej rozpoznany niż mechanizm działania HBV.

W literaturze wiele uwagi poświęca się białkom wirusa HCV. Ich rola w procesie transformacji nowotworowej i rozwoju HCC nie jest jeszcze wyjaśniona. RNA wirusa koduje poliproteinę złożoną z około 3010–3033 aminokwasów, która w efekcie działania proteaz zarówno wirusowych, jak i komórkowych przekształcana jest w białka strukturalne i niestrukturalne wirusa. Niestrukturalne białko NS3 ma aktywność proteinazy i helikazy. W badaniach *in vitro* wykazano, że transfekcja komórek NIH 3T3 (linia komórkowa fibroblastów myszy) za pomocą cDNA białka NS3 prowadzi do transformacji nowotworowej komórek, które po wszczepieniu

myszom pozbawionym grasicy rozwijają włóknakiomięsaka (*fibrosarcoma*) (SACAMURO i współaut. 1995).

W centrum zainteresowań jest także strukturalne białko rdzeniowe wirusa HCV. Stwierdzono, że 191 — aminokwasowe białko nukleokapsydu zawiera w N-końcowej części trzy sekwencje NLS (ang. nuclear localization sequence), rozmieszczone pomiędzy 5 a 13, 38 a 43 i 58 a 71 aminokwasem, warunkujące jego lokalizację w jądrze komórkowym. Z kolei domena C-końcowa, zawierająca hydrofobowy fragment, maskujący część N-terminalną, warunkuje cytoplazmatyczną lokalizację tego białka. Białko pozbawione tej domeny wykazuje lokalizację jądrową. Stwierdzono, że białko obecne w komórkach HCC rozwijającego się w wątrobie marskiej cechują mutacje części N-końcowej, nadające białku charakter bardziej zasadowy (pI 12.08–12.69) niż charakter białka natywnego (pI 11.95). Przypuszcza się, że bardziej zasadowy charakter zmutowanego białka może sprzyjać jego interakcji z DNA. O ile sam fakt translokacji białka rdzeniowego wirusa do jądra komórek gospodarza wydaje się nie odpowiadać za proces transformacji nowotworowej, o tyle jego interakcja z DNA może mieć wpływ na ekspresję wielu genów — zwłaszcza onkogenów (CHANG i współaut. 1994, SUZUKI i współaut. 1995, RUSTER i współaut. 1996). Wykazano także, że komórki linii komórkowej, które cechuje trwała i stabilna ekspresja białek rdzeniowych wirusa HCV, przechodzą proces transformacji nowotworowej zależny od poziomu tej ekspresji (CHANG i współaut. 1998). Mechanizm odpowiedzialny za proces transformacji nowotworowej jest przedmiotem licznych badań. Stwierdzono, że białko to z jednej strony może hamować proces apoptozy komórek, z drugiej zaś może uczestniczyć jako efektor w aktywacji procesu proliferacji komórek. Mechanizm oddziaływań białka z czynnikami regulującymi procesy apoptozy i proliferacji nie został jednak jeszcze wyjaśniony (RAY i współaut. 1996, 1998). Z 1985 roku pochodzi koncepcja, zaproponowana przez Cloustona i Kerra, że apoptoza komórek zainfekowanych wirusami jest jednym z mechanizmów obrony gospodarza. Wyniki licznych badań wskazują, że wirusy kodują białka, które są inhibitorami procesu apoptozy (literatura — patrz VAUX i STRASSER 1996). Czy taką cechę posiada także omawiane białko HCV?

Zakażenie wirusem HCV aż w 40% przypadków prowadzi do marskości wątroby, a u ponad 50% chorych z tej grupy rozwija się HCC (SHERLOCK 1995). Nie zawsze jednak rozwój HCC z

powodu infekcji HCV przebiega przez stadium marskości (DE MITRI i współaut. 1995).

#### MARSKOŚĆ WĄTROBY

W przypadku HCC o etiologii alkoholowej lub wywołanego infekcją wirusem HBV bądź HCV bardzo często ujawniana jest marskość wątroby (CH), która poprzedza rozwój nowotworu. W Azji około 80%-90% zachorowań na HCC, wywołanych infekcją wirusem HBV lub HCV, ma związek z marskością. W Afryce odsetek ten jest mniejszy, wynosi około 40%–60%. Z kolei w grupie pacjentów z marskością HCC rozwija się w 5%–10% przypadków. Dane te potwierdzają także wyniki autopsji — w około 10%–15% przypadków CH stwierdza się HCC. Czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju HCC jest również pierwotne, stwardniające zapalenie kanalików wątroby (ang. primary sclerosing cholangitis), które także prowadzi do marskości (IKEDA i współaut. 1993, TERADA i NAKANUMA 1995, EDAMOTO i współaut. 1996, HARNOIS i współaut. 1997).

Czy HCC i marskość wywołują te same czynniki, czy też marskość *per se* może być czynnikiem rozwoju HCC? Wzmógłony poziom proliferacji hepatocytów, wykazany u pacjentów z CH, może sugerować u nich większy poziom ryzyka rozwoju HCC. Być może wiąże się to z naturą czynnika wywołującego CH i indukującego w ten sposób proliferację, a nie z samym procesem proliferacji jako takim (BALLARDINI i współaut. 1994, TARAO i współaut. 1994). W przypadkach chronicznego zapalenia wątroby, CH rozpoznawana jest często zbyt późno, gdyż definiowana jest w zasadzie jako stadium prekarcynogenne. Wykazano, że przynajmniej część guzków regeneracyjnych, pojawiających się w marskiej wątrobie pacjentów zainfekowanych wirusem HCV, cechuje obecność komórek, których klonalny rozrost w efekcie wzmóżonej proliferacji może prowadzić do rozwoju HCC (AIHARA i współaut. 1994, TERADA i NAKANUMA 1995). Infekcja wirusem HCV powoduje uszkodzenie komórek i ich nekrozę, za co, być może, odpowiada mechanizm immunopatologiczny. Trwała i ciągła destrukcja hepatocytów, a w konsekwencji ubytek masy narządu, prowadzi z kolei do odpowiedzi regeneracyjnej, to znaczy do wzmóżonej proliferacji komórek. Rozwój wczesnych zmian przednowotworowych, tak zwanych preneoplastycznych, w kierunku HCC, uwarunkowany jest akumulacją w zmienionych komórkach kolejnych zmian genetycznych, które składają się na wieloetapowy proces nowotworzenia. Proliferacja stanowi dodatkowy czynnik

promocyjny w tym procesie. Podobny scenariusz rozwoju HCC jako ognisk w ogniskach (ang. foci within foci) lub guzków w guzkach (ang. nodule within nodule) wykazano w wielu modelach hepatokarcynogenezy eksperymentalnej z zastosowaniem różnych czynników karcynogennych. Wykazano także, że u pacjentów z HCC, w obszarze marskiej wątroby znacznie wzrasta liczba komórek diploidalnych, z jednoczesną redukcją populacji komórek poliploidalnych (RUA i współaut. 1996). Podobne zjawisko zaobserwowano w wątrobie zwierząt podczas chemicznie indukowanej hepatokarcynogenezy.

Ryzyko rozwoju HCC u pacjentów z alkoholową etiologią CH jest wysokie. Szczególnie podkreśla się tę korelację w Szwecji, gdzie alkohol uznano za najpoważniejszy czynnik rozwoju HCC. Wirus HCV jest drugim po alkoholu czynnikiem ryzyka rozwoju HCC, a zakażenie wirusem HBV odgrywa tu znikomą rolę (NALPAS i współaut. 1995, KACZYŃSKI i współaut. 1996).

#### SYNERGIZM CZYNNIKÓW — KOINFIEKCJA WIRUSOWA I ALKOHOL

U pacjentów zakażonych HCV w rozwoju HCC duże znaczenie ma również koinfekcja wirusem HBV i alkohol. Interesujący jest fakt, że w wielu przypadkach osoby te są seropoztywne na przeciwciała anty-HCV i anty-HBc (antygen rdzeniowy), ale jednak sero-negatywne na przeciwciała anty-HBs (antygen powierzchniowy). Alkohol spożywany w ilości 40–80 g/dzień jest przyczyną 2-krotnego, a powyżej 80 g/dzień — 4-krotnego wzrostu ryzyka rozwoju HCC (KOIKE i współaut. 1996, TAGGER i współaut. 1999). Przypuszcza się, że z infekcją wirusem HCV i ostrym, bądź przewlekłym, zapaleniem wątroby związane są inne, nowo odkryte wirusy RNA, a mianowicie: GBV-C, GBV-A i GBV-B, nazwane czynnikami GB (inicjały pierwszego pacjenta, u którego wykryto te wirusy). Ostatnie dwa wirusy prawdopodobnie nie są wirusami ludzkimi. Wysoki stopień homologii sekwencji nukleotydowej — 85% i aminokwasowej — 95% pomiędzy wspomnianym wirusem GBV-C a odkrytym w 1996 roku wirusem HGV (ang. hepatitis G virus; oznaczony, po wirusie HFV, kolejną literą alfabetu), sugeruje ich ścisły związek (SCHLEICHER i współaut. 1996). Wspomniane czynniki GB nie są genotypami wirusa HCV, ponieważ mają nie więcej niż 32% wspólnych sekwencji aminokwasowych, a stopień homologii sekwencji nukleotydowej GBV-C/HGV i HCV wynosi mniej niż 25% (KUBO i współaut. 1997, PESSOA i WRIGHT 1996, SLATER i CLARKE 1996). Jakże ma znaczenie dla rozwoju HCC — niezależna od genotypu wirusa HCV —

koinfekcja wirusem GBV-C/HGV pozostaje sprawą do wyjaśnienia, zwłaszcza ze względu na problem ryzyka zakażenia tym wirusem przy transfuzjach krwi. Jeszcze innym problemem do rozwiązania jest odpowiedź na pytanie: jakie znaczenie w rozwoju przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby, marskości wątroby i HCC z powodu infekcji HCV bądź HBV ma ujawniona koinfekcja z innym wirusem RNA, to jest ludzkim wirusem delta (HDV, ang. hepatitis delta virus) (DE BAC i współaut. 1994, CENAC i współaut. 1995) ?

#### AFLATOKSYNY

Choć pierwsze opisy symptomów aflatoksemii u zwierząt pochodzą z 1891 roku, a doniesienia o trujących właściwościach „kukurydzy z pleśnią” z 1938 roku, to aflatoksyny uznano jako karcynogeny dla ludzi i zwierząt dopiero w 1987 roku. Mykotoksyny te, obecne w wielu produktach żywnościowych pochodzenia roślinnego, szczególnie w ziarnach kukurydzy *Zea mays* L, są metabolitami wytwarzanymi przez *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus nomius* (STEYN 1995, WINSTROM 1996). Za najbardziej rakotwórczą spośród aflatoksyn uznano AFB<sub>1</sub>. Wydaje się, że jest to najefektywniejszy związek spośród znanych karcynogenów. Jest 1000 razy silniejszy, jako karcynogen, od benzo-pyrenu.

Aktywacja metaboliczna aflatoksyny prowadzi do wytworzenia wysoce reaktywnych pochodnych, zdolnych do tworzenia kowalencyjnych połączeń z DNA i białkami — zwanych adduktami. O ile system naprawczy DNA nie usunie premutagennych zmian powstałych w wyniku działania czynnika chemicznego, zostaną one utrwalone w genomie i staną się zmianami mutacyjnymi. Wykazano, że spośród dwóch stereoizomerów diolepoksydowych metabolitów AFB<sub>1</sub>, forma *exo*-epoksydowa wiąże się efektywniej z DNA i jest 500-krotnie silniejszym mutagenem niż forma *endo*. Będąc czynnikiem cytotoksycznym i mutagenicznym AFB<sub>1</sub> staje się także karcynogenem, czego wyrazem są między innymi: pęknięcia nici DNA, wymiana chromatyd, aberracje chromosomalne i formowane mikrojądra. AFB<sub>1</sub> jest inhibitorem syntezy DNA i białek, a także hamuje aktywność polimerazy RNA zależnej od DNA. (WANG i GROOPMAN 1999).

Jednoznacznie, trudno wskazać krytyczne dla karcynogenezy miejsca genomu. Oprócz onkogenu *c-myc* i *c-Ha-ras* w kręgu zainteresowań jest także gen supresorowy *p53*. W komórkach HCC, gorące miejsce mutacyjne tego genu (ang. hot-spot), zlokalizowane w 249 kodonie, często

— ale nie zawsze — niesie ze sobą zmiany genetyczne (EATTON i GALLAGHER 1994, STEWART i współaut. 1996). Innym rozważanym mechanizmem odpowiedzialnym za karcynogenność AFB<sub>1</sub> jest utrata heterozygotyczności w efekcie procesu zwanego rekombinacją mitotyczną (LOH, ang. loss of heterozygosity), na przykład utrata jednego dzikiego allelu genu *p53* (SENGSTAG 1997). W świetle wyników, wskazujących na peroksydację lipidów indukowaną przez AFB<sub>1</sub>, rozważa się również oksydacyjny mechanizm powstawania cytotoksycznych uszkodzeń komórek (SHEN i współaut. 1994).

Wyniki badań nie pozwalają jednak, jak dotąd, na jednoznaczną odpowiedź jaki jest molekularny mechanizm hepatokarcynogenezy indukowanej przez aflatoksyny. Tym bardziej jest to trudne, że liczne czynniki mogą wywierać modulujący efekt na proces nowotworzenia. Dlatego też karcynogenność AFB<sub>1</sub> dla różnych gatunków zwierząt, w tym i dla człowieka, jest różna. Przypuszcza się, że związane jest to — między innymi — z genetycznie uwarunkowanym polimorfizmem form transferazy glutationowej (GST), które należą do klasy M1 i — być może — do klasy T1. Wydaje się, że te właśnie formy enzymu odpowiedzialne są za detoksykację metabolitów aflatoksyny. Izoenzymy należące do klasy M1 kodowane są przez trzy allele oznaczone jako: *GSTM1*\*A, *GSTM1*\*B oraz *GSTM1*\*O null. Jedynie homozygoty o genotypie null/null charakteryzuje brak izoenzymu i w związku z tym obniżona zdolność do detoksykacji karcynogenu. Przypuszcza się, że osobnicy tacy mają zwiększone ryzyko rozwoju HCC. Głównie organem docelowym dla AFB<sub>1</sub> jest wątroba, choć nowotwory indukowane przez ten związek ujawniane są i w innych narządach, na przykład w płucach (CHEN i współaut. 1996b, WIDERSTEN i współaut. 1996, STEWART i współaut. 1996).

Aflatoksemia jest trudnym do rozwiązania problemem w południowej Azji i w Afryce, gdzie ciepłe, wilgotne, tropikalne warunki środowiskowe sprzyjają rozwojowi pleśni. Zanieczyszczenie orzeszków ziemnych AFB<sub>1</sub> na niektórych obszarach, na przykład na należących do Tajwanu — Peskadorach, sięga 167 µg/kg. Zatrważające dane pochodzą także z Indii. Analiza podstawowych produktów żywnościowych, którymi w tym regionie świata są: ryż, kukurydza, proso i orzeszki ziemne, wykazała, że około 20%–25% zbadanych próbek ma przekroczoną dopuszczalną w Indiach zawartość AFB<sub>1</sub> (30 µg/kg). Wręcz niewiarygodnie brzmią dane mówiące o zawartości AFB<sub>1</sub> w roślinach pochodzących z obfitujących w deszcze regionów Indii: w kukurydzy 250–15600 µg/kg, w ryżu do

1130 µg/kg (CHEN i współaut. 1996a, VASANTHI i BHAT 1998).

Oszacowano, że dzienna ekspozycja na AFB<sub>1</sub> w USA może osiągać wielkość 25–75 ng, w Indiach 0,25–77,7 µg, w Chinach aż 75–250 µg na osobę. Przypuszcza się, że w niektórych regionach Indii, wraz z dobowo spożywanym pokarmem, ilość przyjętej AFB<sub>1</sub> mogła w pewnych okresach wynosić 2–6 mg, to jest w przeliczeniu na osobę o wadze 50 kg około 40–120 µg/kg masy ciała/dzień. Wydaje się, że dla człowieka za „jeszcze bezpieczną” dawkę AFB<sub>1</sub> można uznać wielkość 0,26 ng/kg/dzień. W niektórych regionach świata, na przykład w Indiach, Chinach, na Tajwanie i w Meksyku, gdzie ekspozycja na AFB<sub>1</sub> jest wysoka, drugim, synergistycznie działającym czynnikiem, związanym z rozwojem HCC, może być infekcja wirusem HBV (BECHTEL 1989, GONZALEZ 1995, CHEN 1996a, SOINI i współaut. 1996, VASANTHI i BHAT 1998).

#### HEPATOTOKSYNY

Do endemicznych czynników środowiskowych, które odgrywają rolę w rozwoju HCC, należą sinice. W północno-wschodniej prowincji Chin — Haimen śmiertelność ludności spowodowana HCC wynosiła 100/100 000 (dla porównania — w Japonii z powodu HCC rejestruje się około 17 zgonów na 100 tysięcy). Po wykluczeniu obecności i działania znanych czynników etiologicznych wykazano, że za rozwój HCC na tym terenie odpowiada wyłącznie cykliczny peptyd: mikrocystyna. Te silne, termostabilne hepatotoksyny produkowane są przez różne gatunki sinic, na przykład mikrocystis (*Microcystis aeruginosa*), drgalnice (*Oscillatoria* sp), żyjące w stawach, kanałach i rzekach w różnych regionach świata, w tym i w zbiornikach wodnych Polski (TARCZYŃSKA i ZALEWSKI 1994, UENO i współaut. 1996).

#### INNE CZYNNIKI

Spośród czynników etiologicznych HCC należy także wymienić: zanieczyszczenia chemiczne środowiska takimi związkami jak nitrozoaminy, dimetylohydrazyna, epichlorhydrina, chlorek winylu czy nieorganiczne związki arsenu; także egzogenne hormony — syntetyczne estrogeny, anaboliczne steroidy, doustne środki antykoncepcyjne; stosowany dawniej w radiologii dwutlenek toru oraz spożywany w nadmiernej ilości alkohol (MILLS i współaut. 1995, PITOT i DRAGAN 1994). Obniżony poziom konsumpcji warzyw i idący w ślad za tym obniżony poziom retinolu w surowicy krwi coraz częściej

traktuje się jako dodatkowy czynnik zwiększający ryzyko rozwoju HCC. Dotyczy to zwłaszcza nosicieli wirusa HBV oraz palaczy (YU i współaut. 1996).

Wydać się, że u ludzi glikogenoza typu 1a, której przyczyną jest wrodzony, genetycznie uwarunkowany defekt glukozy 6-fosfatazy, stanowi kolejny, choć zupełnie odmienny czynnik ryzyka rozwoju HCC. W wątrobie ludzi chorych na glikogenozę typu 1a, na CH, na CCC i na HCC ujawniono liczne ogniska określane w literaturze jako „focal hepatic glycogenosis”. Komórki ognisk gromadzą w nadmiernej ilości glikogen; charakteryzuje je również znacząca aktywność proliferacyjna w porównaniu z hepa-

tocytami zewnątrzogniskowymi. Zidentyfikowane zmiany odpowiadają wykrytym wcześniej u zwierząt ogniskom typu glikogenotycznego tak zwanym „clear cell foci” oraz ogniskom typu mieszanego — „mixed cell foci” powstającym na wczesnych etapach hepatokarcynogenezy eksperymentalnej. U zwierząt stwierdzono ścisłą korelację między obecnością tego typu zmian w wątrobie a rozwojem HCC. Inne genetycznie uwarunkowane schorzenia, które również uważa się za czynniki zwiększające ryzyko rozwoju HCC, to hemochromatoza (HARTLEB i WALUGA 1999) i tyrozinoza (OCKNER i współaut. 1993, BANNASCH i współaut. 1997).

#### CZYNNIKI ETIOLOGICZNE HCC U ZWIERZĄT

Czynnikami etiologicznymi rozwoju HCC u zwierząt, podobnie jak u ludzi, są wirusy zapalenia wątroby i czynniki chemiczne — środowiskowe bądź stosowane w badaniach, celowo podawane zwierzętom w celu indukcji zmian nowotworowych.

##### WIRUSY

U zwierząt wykryto kilka gatunkowo specyficznych hepadnawirusów, które są spokrewnione z ludzkim HBV. Wirusy zapalenia wątroby wykryto u ssaków: świstaka wschodniego i północnoamerykańskiego *Marmota monax* (WHV, ang. woodchuck hepatitis virus), susła *Spermophilus beecheyi* (GSHV, ang. ground squirrel hepatitis virus), a także u ptaków: kaczki *Anas* sp. (DHBV, ang. duck hepatitis virus) i czapli siwej *Ardea cinerea* L. (HHBV, ang. heron hepatitis virus). Choć wszystkie wymienione zwierzęce hepadnawirusy wykazują podobieństwo w budowie genomu, to jednak genom ptasich wirusów wydaje się być bardziej oddalony od prototypowego genomu wirusa HBV (COVA i współaut. 1994, MILICH i współaut. 1994).

U świstaka w 50% przypadków czynnikiem etiologicznym HCC jest infekcja wirusem WHV. U zwierząt zainfekowanych tym wirusem w sposób naturalny lub eksperymentalnie, HCC rozwija się w 100% przypadków, a okres rozwoju wynosi od dwóch do czterech lat. Wirus ten jest bardziej onkogenny niż HBV i inne hepadnawirusy. Sądzi się, że model badawczy wykorzystujący świstaka zainfekowanego WHV jest z punktu widzenia patobiologii układem badawczym najbardziej zbliżonym do wirusowego zapalenia wątroby u człowieka (CULLEN i współaut. 1994, MICHALAK i współaut. 1995, TOSHKOV i współ-

aut. 1990, YANG i współaut. 1993). W przypadku wirusa GSHV jedynie ostra infekcja prowadzi w około 66% przypadków do HCC, którego rozwój następuje po 7 latach od momentu zainfekowania; przewlekła infekcja nie powoduje ostrych i rozległych zmian o charakterze zapalnym i nie prowadzi do rozwoju HCC (BANNASCH 1996, BANNASCH i współaut. 1995, CULLEN i MARION 1996).

##### CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

Za cytotoksyczne uszkodzenie hepatocytów, przewlekłe aktywne zapalenie wątroby i rozwój HCC u wielu szczepów myszy, nawet u tych, u których normalnie bardzo rzadko rozwija się HCC (szczep A/JCr), odpowiada przypuszczalnie bakteria *Helicobacter hepaticus*. Fakt, że w warunkach *in vitro* bakteria jest niewrażliwa na składniki żółci, tłumaczy liczniejsze jej występowanie w świetle kanalików żółciowych niż w hepatocytach. Do wyjaśnienia pozostaje jednak mechanizm cytotoksycznego uszkodzenia komórek wątroby, za który — być może — odpowiedzialne są produkty metabolizmu mocznika, wytwarzane przez obecną w dużej ilości ureazę, bądź produkowana przez bakterię rozpuszczalna hepatotoksyna (FOX i współaut. 1996). Wspomniana już mikrocystyna jest również dla zwierząt, zwłaszcza wodnych, poważnym czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju HCC (TARCZYŃSKA i ZALEWSKI 1994).

##### CZYNNIKI CHEMICZNE

Okolo 60% związków chemicznych uznanych w USA za karcynogenne indukuje nowotwory wątroby u myszy i szczurów. Z grupy 354 związków karcynogennych dla szczura, 143

związki, to jest 40%, stanowią hepatokarcynogeny, a u myszy z grupy 299 aż 57% indukuje nowotwory wątroby (MILLS i współaut. 1995, WARD i współaut. 1996).

#### NOWOTWORY SPONTANICZNE U ZWIERZĄT

Analiza wątroby noworodków myszy i szczurów, a więc zwierząt nigdy nie ekspozowanych bezpośrednio na czynniki karcynogenne, ujawniła obecność komórek, które mają cechy podobne do cech charakteryzujących komórki zainicjowane w procesie hepatokarcynogenezy. Komórki takie, nazwane komórkami endogennie zainicjowanymi (EIC, ang. endogenous initiated cells), mogą w miarę rozwoju organizmu namnażać się i ujawniać jako ogniskowe zmiany proliferacyjne, a z czasem rozwinać się w kierunku HCC. Mogą też przez całe życie organizmu pozostać w stanie „uśpienia”, stanowiąc populację komórek „drzemiących”. Przypuszcza się, że komórki EIC odpowiadają za obecność zarówno u zwierząt, jak i u ludzi tak zwanych nowotworów spontanicznych, których etiologia

jest obecnie niemożliwa do sprecyzowania (LOMBARDI i SMITH 1994). Wskaźnik guzów spontanicznych jest jednym z najistotniejszych czynników przesądających o wykorzystaniu szczurów w badaniach hepatokarcynogenezy. Jest on na ogół relatywnie niski, choć różny w zależności od rasy szczura, na przykład u szczurów Fischer 344 wynosi on 0,3%–0,5% (GILL i współaut. 1989, NAMIENO i współaut. 1996). Rozwój tak zwanego spontanicznego HCC obserwuje się także u mutantów szczurów LE z wrodzonym zapaleniem wątroby, oznaczonych symbolem LEC (ang. Long Evans rat with cinnamon coat). Charakteryzuje je wyjątkowo wysoki odsetek rozwoju HCC. W 18–20 tygodniu życia szczura rozwija się ostre zapalenie wątroby, które następnie przechodzi w stan przewlekły, a w 60. tygodniu rozpoczyna się rozwój HCC, obserwowany po 90. tygodniach u 60%–100% zwierząt. Szczury LEC są nowym, obiecującym modelem badawczym HCC, gdyż proces nowotworzenia dobrze naśladuje stadia rozwoju choroby u człowieka (NAMIENO i współaut. 1996, SONE i współaut. 1996).

#### UWAGI KOŃCOWE

W świetle danych statystycznych dotyczących HCC jako jednostki chorobowej człowieka, a także ze względu na różnorodny charakter czynników etiologicznych tego schorzenia zarówno u ludzi, jak i u zwierząt waga zaprezentowanego zagadnienia jako problemu medycznego i naukowego wydaje się bezsporna. Właśnie ze względu na tę różnorodność proces nowotwo-

żenia wątrobowokomórkowego ma charakter zindywidualizowany, co w sposób oczywisty utrudnia jego badania i komplikuje obraz zagadnienia. Jednak podejmowanie prób poznania molekularnych podstaw tego i innych procesów karcynogenezy jest nie tylko obowiązkiem naukowym, ale i etycznym.

### HEPATOCELLULAR CARCINOMA — AETIOLOGY AND INCIDENCE

#### Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC), one of the most common malignancies, represents worldwide 4.5% of all malignant tumours. More than 1 million new cases per year are diagnosed around the world and its relative frequency is increasing. A review is presented of both etiological and risk

factors in the development of HCC in humans, based on the background of statistical data from different geographical regions. The article includes a short review of an etiological factors in animals.

#### LITERATURA

- AIHARA T., NOGUCHI S., SASAKI Y., IMAOKA S., 1994. *Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis*. Gastroenterology 107, 1805–1811.
- BALLARDINI G., GROFF P., ZOLI M., BIANCHI G. P., GIOSTRA F., FRANCESCO R., LENZI M., ZAULI D., CASSANI F., BIANCHI F., 1994. *Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation*. J. Hepatol. 20, 218–222.
- BANNASCH P., 1996. *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes*. BOYER J. L., OCKNER R. K., W. B. Saunders Company str. 161–197.
- BANNASCH P., KHOSHKHOU N.I., HACKER H. J., RADAIEVA S., KOPP-SCHNEIDER A., HABERKORN U., ELGAS M., TOLLE T., ROGGENDORF M., TOSHKOV I. 1995. *Synergic hepatocarcinogenic effect of hepadnaviral infection and dietary Aflatoxin B<sub>1</sub> in woodchucks*. Cancer Res. 55, 3318–3330.
- BANNASCH P., JAHN U.-R., HACKER H. J., SU Q., HOFMANN W., PICHLMAYR R., OTTO G., 1997. *Focal hepatic glycogenosis: a putative preneoplastic lesion associated with neoplasia and cirrhosis in explanted human livers*. Int. J. Oncol. 10, 261–268.

- BECHTEL D.H., 1989. *Molecular dosimetry of hepatic Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts: linear correlation with hepatic cancer risk*. Regulatory Toxicol. Pharmacol. 10, 74-81.
- BOSCH F.X., MUNOZ N., 1989. *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*. [W:] *Liver cell carcinoma*. Kluwer Academic, Dordrecht, str. 3-12.
- BUENDIA M. A., 1992. *Hepatitis B viruses and HCC*. Adv. Cancer Res. 59, 167-226.
- CARRIAGA M. T., HENSON D. F., 1995. *Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas*. Cancer 75 (Suppl.), 171-190.
- CSELMANN W.H., ALT M., 1996. *Hepatitis C virus infection as a major risk factor for hepatocellular carcinoma*. J. Hepatology 24, 61-66.
- CENAC A., PEDROSO M-L., DJIBO A., DEVELOUX M., PICHOUND Ch. LAMOTHE F., TREPO Ch., WARTER A., 1995. *Hepatitis B, C, and D virus infections in patients with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma: a comparative study in Niger*. Am. J. Med. Hyg. 52, 293-296.
- CHANG J., YANG S. H., CHO Y. G., HWANG S. B., HAHN Y.S., SUNG Y. C., 1998. *Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene*. J. Virol. 72, 3060-3065.
- CHANG S. C., YEN J-H., KAENG H-Y., JANG M-H., CHANG M-F., 1994. *Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1284-1290.
- CHEN Ch-J., WANG L-Y., LU S-N., WU M-H., YOU S-L., ZHANG Y-J., WANG L-W., CHIAMPASERT S., MATIN F., HIRVONEN BELL D.A., SANTELLA R. M. 1996a. *Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma*. Hepatology 24, 38-42.
- CHEN CH-J., YU M-W., LIAW Y-F., WANG L-W., MATIN F., HIRVONEN BELL D. A., SANTELLA R. M., 1996b. *Chronic hepatitis B carriers with null genotypes of GST M1 and T1 polymorphisms who are exposed to aflatoxin are at increased risk of HCC*. Am. J. Hum. Genet. 59, 128-134.
- CHISARI F.V., FERRARI C., 1995. *HBV virus immunopathogenesis*. Annu. Rev. Immunol. 13, 29-60.
- COVA L. MEHROTA R., WILD C. P., CHUTIMATAEWIN S., CAO S. F., DUFLLOT A., PRAVE M., YU S. Z., MONTESANO R., TREPO C., 1994. *Duck hepatitis virus infection, aflatoxin B<sub>1</sub> and liver cancer in domestic Chinese ducks*. Br. J. Cancer 69, 104-109.
- CULLEN J. M., LINZEY D. W., GEBHARD D. H., 1994. *Nuclear ploidy of normal and neoplastic hepatocytes from WHV infected and uninfected woodchucks*. Hepatology 19, 1072-1078.
- CULLEN J. M., MARION P. L., 1996. *Non-neoplastic liver disease associated with chronic Ground Squirrel Hepatitis Virus infection*. Hepatology 23, 1324-1329.
- DE BAC C., STROFFOLINI T., GAETA G. B., TALLANI G., GIUSTI G., 1994. *Pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 28 1225-1230.
- DE MITRI M. S., POUSSIN K., BACCARINI P., POTISSO P., D'ERRICO A., SIMON N., GRIGIONI W., AALBERTI A., BEAUGRAND M., PISI E., BRECHOT Ch., PATERLINI P., 1995. *HCV-associated liver cancer without cirrhosis*. Lancet, 345, 413-415.
- EATON D. L., GALLAGHER E. P., 1994. *Mechanisms of Aflatoxin carcinogenesis*. Pharmacol. Toxicol. 34, 135-172.
- EDAMOTO Y., TANI M., KURATA T., ABE K., 1996. *Hepatitis C and B virus infections in hepatocellular carcinoma*. Cancer 77, 1787-1791.
- FERRI C., LA CIVITA L., ZIGNEGO A. L., PASERO G., 1997. *Viruses and cancers: possible role of hepatitis C virus*. Europ. J. Clin. Invest. 27, 711-718.
- FOX J. G., LI X., YAN L., CAHILL R. J., HURLEY R., LEWIS R., MURPHY J. C., 1996. *Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent Helicobacter hepaticus infection: a model of Helicobacter-induced carcinogenesis*. Infection and Immunity 64, 1548-1558.
- GIBSON J. B., SOBIN L. H., 1978. *Histological typing of tumours of the liver, biliary tract and pancreas*. World Health Organization, Geneva.
- GILL III T. J., SMITH G. J., WISSLER R. W., KUM H. W., 1989. *The rat as an experimental animal*. Science 245: 269-276.
- GONZALEZ F., 1995. *Genetic polymorphism and cancer susceptibility: fourteen Sapporo cancer seminar*. Cancer Res. 55, 710-715.
- HADZIYANNIS S., TABOR E., KAKLAMANI E., TZONOU A., STUVER S., TASSOPOULOS N., MUELLEN N., 1995. *A case-control study of hepatitis B and C virus infections in the etiology of hepatocellular carcinoma*. Int. J. Cancer 60, 627-631.
- HARNOIS D. M., GORES G. J., LUDWIG J., STEERS J. L., LA RUSSO N. F., WIESNER R. H., 1997. *Are patients with cirrhotic stage primary sclerosing cholangitis at risk for the development of hepatocellular cancer?* J. Hepatol. 27, 512-516.
- HARTLEB M., WALUGA M., 1999. *Hemochromatoza pierwotna - wizerunek po odkryciu genu*. Hepatologia Polska 6, 141-147.
- HATZAKIS A., KATSOLIDOU A., KAKLAMANI E., TOULOUMI G., KOUMANTAKI Y., TASSOPOULOS N. C., KARVOUNTZIS G., GIOUSTOZI A., HADZIYANNIS S., TRICHOPOULOS D., 1996. *Hepatitis C virus 1b is the dominant genotype in HCV-related carcinogenesis: a case-control study*. Int. J. Cancer 6, 51-53.
- HAUBEN E., STRUYF N., MICHIELSEN P., VAN MARCK E., 1996. *Cytokeratin profiles and mucin secretion in combined hepatocellular-cholangiocarcinoma*. Path. Res. Pract. 192, 488-491.
- HILDT E., HOFSCHEIDER A., URBAN S., 1996. *The role of hepatitis B virus HBV in the development of hepatocellular carcinoma*. Virology 7, 333-347.
- HOPPE-SEYLER F., BUTZ K., 1995. *Molecular mechanisms of virus induced carcinogenesis: the interaction of viral factors with cellular tumor suppressor proteins*. J. Mol. Med. 73, 29-38.
- IKEDA K., SAITOH S., KOIDA I., 1993. *A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis*. Hepatology 18, 47-53.
- KACZYŃSKI J., HANSSON G., HERMONDSSON S., OLSON R., WÄLTERSTEDT S., 1996. *Minor role of hepatitis B and C virus infection in the etiology of hepatocellular carcinoma in a low-endemic area*. Scand. J. Gastroenterol. 31, 809-813.
- KOIKE K., NAKAMURA Y., KOBAYASHI M., TAKADA S., URASHIMA T., SAIGO K., KOBAYASHI S., ISONO K., HAYASHI I., FUJII A., 1996. *Hepatitis B virus DNA integration frequently observed in the hepatocellular carcinoma DNA of hepatitis C virus-infected patients*. Int. J. Oncol. 8, 781-784.
- KUBO S., NISHIGUCHI S., KUROKI T., HIROHASHI K., TANAKA H., TANAKA T., SHUTO T., KINOSHITA H., 1997. *Poor association of GBV-C viremia with hepatocellular carcinoma*. J. Hepatol. 27, 91-95.
- LAU W. Y., LEUNG W. T., HO S., LAMA S. K., L C. Y., JOHNSON P.J., WILLIAMS R., L A.K.C., 1995. *Hepatocellular carcinoma during pregnancy and its comparison with other pregnancy-associated malignancies*. Cancer 75, 2669-2676.
- LOMBARDI B., SMITH M. L., 1994. *Tumorigenesis, protooncogene activation, and other abnormalities in methyl-deficiency*. J. Nutr. Biochem. 5, 2-9.
- LYGIDAKIS N. J., PEARL A., 1997. *Metastatic Liver Disease*. Hepato-Gastroenterol. 44, 1484-1487.
- MARSZALEK M., 1999a. *Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część I. Postępy Biologii Komórki* 26, 135-157.

- MARSZALEK M., 1999b. Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część II. Postępy Biologii Komórki 26, 159-179.
- MARSZALEK M., 1999c. Komórki owalne w procesie nowotworzenia wątrobowokomórkowego — wielki spór o małe komórki. Część I. Hepatologia Polska 6, 65-75.
- MARSZALEK M., 1999d. Komórki owalne w procesie nowotworzenia wątrobowokomórkowego — wielki spór o małe komórki. Część II. Hepatologia Polska 6, 77-85.
- MARSZALEK M., 2000. Nowy nurt badań wątroby człowieka — komórki owalne. Część II — komórki owalne w różnych stanach chorobowych wątroby. Hepatologia Polska 2 (praca przyjęta do druku).
- MICHALAK T. I., CHURCHIL N. D., CODNER D., DROVER S., MARSHALL W. H., 1995. Identification of woodchuck clasi MHC antigens using monoclonal antibodies. Tissue Antigens 45, 333-342.
- MILICH D. R., HUGHES J. J., MARUYAMA T., 1994. Hepatitis B virus infection, the immune response and hepatocellular carcinoma. Wiley CHICHESTER, Ciba Foundation Symposium 187, 113-131.
- MILLS J.J., JIRTLE R.L., BOYER I.J., 1995. Mechanisms of liver tumor promotion. Liver regeneration and carcinogenesis: Molecular and cellular mechanisms. Academic Press, 199-226.
- NALPAS B., POL S., THEPOT V., BERTHELOT P., BRECHOT C., 1995. Hepatocellular carcinoma in alcoholics. Alcohol 12, 117-120.
- NAMIENO T., KONAKA S., OKADA F., HAMADA J.-I., HOSOKAWA M., UCHINO J.-I., SATO N., 1996. Pathological comparison between spontaneously developed and chemically induced liver cancers in LEC rats with hereditary hepatitis. Int. J. Oncol. 8, 791-794.
- NISHIBE M., UNE Y., KOBAYASHI M., KURAMITSU Y., HOSOKAWA M., UCHINO J., 1996. HLA class I antigens are possible prognostic factors in hepatocellular carcinoma. Int. J. Oncol. 8, 1243-1247.
- OCKNER R. K., KAIKAUS R. M., BASS N. M., 1993. Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. Hepatology 18, 669-676.
- PESSOA M. G., WRIGHT T. L., 1996. Hepatitis G: a virus in search of a disease. Hepatology 24, 461-463.
- PITOT H. C., DRAGAN Y., 1994. Chemical induction of hepatic neoplasia. [W:] The Liver: Biology and Pathobiology. ARIAS IM, BOYER J, FAUSTO N. (red.) Raven Press, Ltd., New York, str. 1467-1495.
- RAY R. B., MEYER K., RAY R., 1996. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. Virology 226, 176-182.
- RAY R. B., STEELE R., MEYER K., RAY R., 1998. Hepatitis C core protein represses 21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. Gene 208, 331-336.
- ROBRECHTS C., DE VOS R., VAN den HEUVEL M., VAN CUSTEM E., VAN DAMME B., DESMET V., ROSKAMS T., 1998. Primary liver tumour of intermediate (hepatocyte-bile duct cell) phenotype: a progenitor cell tumour. Liver 18, 288-293.
- RUA S., COMINO A., FRUTTERO A., TORCHIO P., BOUZARI H., TARAGLIO S., TORCHIO B., CAPUSSOTTI L., 1996. Flow cytometric DNA analysis of cirrhotic liver cells in patients with hepatocellular carcinoma can provide a new prognostic factor. Cancer, 78, 1195-1202.
- RUCK P., XIAO J.-C., KAISERLING E., 1996. Small epithelial cells and the histiogenesis of hepatoblastoma. Am. J. Pathol., 148, 321-329.
- RUCK P., XIAO J.-C., PIETSCH T., VON SCHWEINITZ D., KAISERLING E., 1997. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval associated antigens detected by OV-1 and OV-6. Histopathology 31, 324-329.
- RUSTER B., ZEUEM S., ROTH W. K., 1996. Hepatitis C virus sequences encoding truncated core proteins detected in a hepatocellular carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Comm. 219, 911-915.
- SACAMURO D., FURUKAWA T., TKEGAMI T., 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. J. Virol. 69, 3893-3896.
- SAWICKI W. (red.) 1998. Mianownictwo histologiczne i cytofizjologiczne polskie, angielskie i łacińskie. PZWL, Warszawa.
- SCHLEICHER S., CHAVES R. L., DEHMER T., GREGOR M., HESS G., FLEHMING B., 1996. Identification of GBV-C hepatitis G RNA in chronic hepatitis C patients. J. Med. Virol., 50, 71-74.
- SENGSTAG Ch., 1997. The molecular mechanism of Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced liver cancer: is mitotic recombination involved? Mol Carcinog., 19, 147-152.
- SHEN H.-M., SHI Ch.-Y., LEE H.-P., ONG Ch.-N., 1994. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced lipid peroxidation in rat liver. Toxicology and App Pharm. 127, 145-150.
- SHERLOCK S., 1995. VI International Symposium on viral hepatitis. J Hepatol. 22 (Suppl.), 160-164.
- SIDORKIEWICZ M., 1997. Rola biała X w przebiegu zapalenia wątroby typu B. Hepatol. POL. 4, 181.
- SLATER M. J., CLARKE B. E., 1996. Developments in viral hepatitis during 1995. Exp. Opin. Ther. Patents 6, 739-746.
- SOINI Y., CHIA S.C., BENNETT W.P., GROOPMAN J.D., WANG J.S., DeBENEDETTI V. CAWLEY H., WELSH J. A., HANSEN C., HARRIS C. C., 1996. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in HCC from Mexico. Carcinogenesis 17, 1007-1012.
- SONE H., WAKABAYASHI K., KUSHIDA H., ENOMOTO K., MORI M., TAKEICHI N., TSUDA H., SUGIMURA T., NAGAO M., 1996. Hepatocellular carcinoma induction in LEC rats by a low dose of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. Jpn. J. Cancer Res. 87, 25-29.
- SQUIRE R. A., LEVITT M. H., 1975. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. Cancer Research 35, 3214-3223.
- STEWART R. K., SERABJIT C. J., MASSEY T. E., 1996. Glutathione S-transferase-catalyzed conjugation of bioactivated AFB<sub>1</sub> in rabbit lung and liver. Toxicol. Applied. Pharmacol. 140, 499-507.
- STEYN P.S., 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol. Lett. 82, 843-851.
- SUZUKI R., MATSUURA Y., SUZUKI T., ANDO A., CHIBA J., HARADA S., SAITO I., MIYAMURA T., 1995. Nuclear localization of the truncated hepatitis C core protein with its hydrophobic C terminus deleted. J. Gener. Vir. 76, 53-61.
- TAGGER A., DONATO F., RIBERO M.L., CHIESA R., PORTERA G., GELATTI., NARDI G., 1999. Case Control study on HCV as a risk factor for HCC. Int. J. Cancer. 81, 695-699.
- TARAO K., OHKAWA S., SHIMIZU A., HARADA M., NAKAMURA Y., ITO Y., TAMAI S., 1994. Significance of hepatocellular proliferation in the development of hepatocellular carcinoma from anti-hepatitis C virus positive cirrhotic patients. Cancer 73, 1149-1154.
- TARCZYŃSKA M., ZALEWSKI M., 1994. Zintegrowana strategia ochrony i zagospodarowania systemów wodnych. Biblioteka Monitoringu Środowiska. (red.) ZALEWSKI M. Łódź.
- TERADA T., NAKANUMA Y., 1995. Multiple occurrence of borderline hepatocellular nodules in human cirrhotic livers: possible multicentric origin of HCC. Virchows Arch. 427, 379-383.
- TOSHKOV I., HACKER H.J., BANNASCH P., 1990. Phenotypic patterns of preneoplastic and neoplastic hepatic lesions in woodchucks infected with WHV. J. Cancer Clin. Oncol. 116, 581-590.
- TSUKUMA H., HIAMA T., TANAKA S., NAKAO M., YABAUCHI T., KITAMURA T., NAKANISHI K., FUJIMOTO I., INOUE A., YAMAZAKI

- H., KAWASHIMA T., 1994. Does hepatitis virus C cause hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 19, 251-255.
- UENO Y, NAGATA S, TSUTSUMI T, HASEGAWA A, WATANABE MF, PARK H-D, CHEN G-Ch, CHEN G, YU S-Z., 1996. Detection of microcystis, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17, 1317-1321.
- VASANTHI S., BHAT R. V., 1998. Mycotoxins in foods - Occurrence, health and economic significance and food control measures. *Indian J Med. Res.* 108, 21-224.
- VAUX D. L., STRASSER A., 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2239-2244.
- WANG J-S., GROOPMAN J. D., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 424, 167-181.
- WARD J. M., SHIBATA M-A., DEVOR D. E., 1996. Emerging issues in mouse liver carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 24, 129-137.
- WIDERSTEN M., HUANG M., MANNERVIK B., 1996. Optimized heterologous expression of the polymorphic human glutathione transferase M1-1 based on silent mutations in the corresponding cDNA. *Protein Expression and Purification* 7, 367-372.
- WIDSTROM N. W., 1996. The Aflatoxin problem with corn grain. *Advances Agronomy* 56, 219-280.
- WU P-Ch., LAI V.C.H., FANG J. W. S., GERBER M.A., LAI Ch.L., LAU Y.N., 1999. Hepatocellular carcinoma expressing both hepatocellular and biliary markers also expresses cytokeratin 14, a marker of bipotential progenitor cells. *J. Hepatol.* 31, 965-966.
- YANG D., ALT E., ROGLER C. E., 1993. Coordinate expression of N-myc2 and insulin-like growth factor II in precancerous altered hepatic foci in WHV carriers. *Cancer Res.* 53, 2020-2027.
- YANO H., IEMURA A., HRAMAKI M., MOMOSAKI S., OGASAWARA S., HIGAKI K., KOJIRO M., 1996. A human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell line KMCH-2 that shows the features of HCC or CC under different growth conditions. *J. Hepatol.* 24, 413-422.
- YU M-W., HSIEH H-H., PAN W-H., YANG C-S., CHEN Ch-J., 1996. Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 55, 1301-1305.
- ZATOŃSKI W., TYCZYŃSKI J., 1994. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1991 roku. Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. Warszawa.
- ZEIN N.N., RAKELA J., KRAWITT E.L., REDDY K.R., TOMINAGA T., PERSING D.H., 1996. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Annals of Internal Medicine* 125, 634-639.
- ZEUZEM S., TEUBER G., LEE J-H., RUSTER B., ROTH W. K., 1996. Risk factors for the transmission of hepatitis C. *J. Hepatology* 24, 3-10.