

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Rezumatul tezei de doctorat

**Rolul angiogenezei în dezvoltarea hepatocarcinomului pe ficat cirotic. Studiu
pe celule stem tumorale**

Doctorand **Teodora Atena Pop**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Monica Acalovschi**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1. Angiogeneza tumorală	7
2. Modificări hemodinamice hepatice specifice la pacienții cirofici cu HCC	17
3. Modelarea matematică în cercetarea angiogenezei tumorale	26
4. Folosirea nanotehnologiei în medicină – Nanomedicina	28
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	31
1. Evidențierea procesului de angiogeneză în HCC	33
1.1. Studiu privind evidențierea imunohistochimică a fenomenului de angiogeneză în HCC	33
1.2. Rolul markerilor tumorali și serici în procesul de angiogeneză în HCC	45
1.3. Modularea terapeutică in vitro a angiogenezei tumorale	54
1.4. Corelația între răspunsul angiogenic in vitro și parametrii anatomo-patologici la cazurile de HCC	71
2. Caracterizarea tumorilor hepatice primare cu ajutorul ecografiei Doppler și a markerilor serologici tumorali și de angiogeneză	75
3. Analiza angiogenezei tumorale utilizând modelare matematică	92
3.1. Studiul formării capilarelor în stadiul incipient al angiogenezei prin modelare matematică	92
3.2. Studiul dezvoltării tumorale și angiogenezei tumorale utilizând modelele macroscopice	97
3.3. Estimarea modificărilor în hemodinamica hepatică și tumorală la pacienții cu hepatocarcinom prin modelare matematică	102
4. Dezvoltarea și testarea în vivo a unui nano-biosistem pe bază de albumină serică conjugată cu nanoparticule de aur pentru nanofototermoliza mediată laser a carcinomului hepatocelular	107
4.1. Introducere	107
4.2. Obiectivele studiului	108
4.3. Marcarea imunocitochimică a receptorilor -target pentru terapia nou-generată	109
4.4. Sinteza GNP-Ab și administrarea nano-biosistemului. Cuantificarea necrozei celulare după administrarea de GNP-Ab în culturile de celule HepG2 urmata de tratament laser	111
4.5. Realizarea modelului animal de carcinom hepatic uman. Nanofototermoliza laser in vivo mediată de Alb-GNPs pe șoareci CD 1 imunosupresați cu xenotransplant de carcinom hepatic uman	114
5. Concluzii finale	125
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	129
REFERINȚE	133

Cuvinte cheie: hepatocarcinom (HCC), angiogeneză, VEGF (factorul de creștere vasculo endotelial), MVD (densitatea microvascularizației), ecografia vasculară, hemodinamica hepatică, modelare matematică, nanofototermoliza mediată laser

Introducere

Teza prezentată în paginile următoare și-a propus să evalueze neovascularizația tumorală în HCC, folosind informații extrase din practica clinică cu ajutorul ecografiei de înaltă performanță. Aceste informații au fost corelate cu tehnici de imunohistochimie și alte tehnici imagistice (RMN și CT cu contrast), mai reproductibile, de identificare și caracterizare a circulației tumorale.

Pentru realizarea obiectivelor proiectului, într-o primă etapă de cercetare experimentală, am efectuat studiul circulației în nodulii tumorali și s-au stabilit loturile de pacienți, protocoalele de examinare eco 2D/3D (Anexa 1), ecoDoppler, Angiopower. Am ales ca metodă de studiu US deoarece este neinvazivă și cuantifică global și in vivo neovascularizația tumorală, spre deosebire de metoda convențională (densitatea microvascularizației - MVD).

Carcinomul hepatocelular a fost evaluat în dinamică urmărind istoria naturală a bolii în scopul extragerii de informații pentru realizarea modelului matematic (datorită diagnosticului de obicei tardiv și condițiilor particulare de tratament ale cancerului hepatic, acesta se pretează la urmăriri - criteriu major de includere în studiu). La fiecare pacient s-au efectuat aprecieri morfometrice (măsurarea tumorii în trei dimensiuni, aprecierea volumului, caracterizarea texturală pe secțiuni perpendiculare, aprecierea demarcației tumorale față de țesuturile învecinate) și hemodinamice (aprecierea calitativă și cantitativă folosind un soft specializat a amplitudinii circulației tumorale de ansamblu, caracterizarea modelului circulator intratumoral, măsurarea indicilor de impedanță în tumoră și în vasele de aport). Datele obținute au fost verificate prin evaluarea imunohistopatologică a modelului explorat la un subgrup de pacienți. De asemenea, la același lot de pacienți s-a evaluat nivelul seric de factor vasculo-endotelial și AFP. Explorarea ecografică a fost efectuată folosind un protocol riguros cu reexaminarea pacienților la interval de 6 săptămâni pe o perioadă de minim 2 ani.

Ultima parte a tezei cuprinde dezvoltarea și testarea în vivo a unui nano-biosistem pe bază de albumină serică conjugată cu nanoparticule de aur pentru nanofototerapia mediată laser a carcinomului hepatocelular.

Contribuția personală

Studiul I Evidențierea procesului de angiogeneză în HCC

Ipoteza de lucru:

Semnificația prognostică a MVD tumorale la HCC prezintă o importanță clinică deosebită. Deși HCC mic, sub 2 cm este considerat precoce (stadiul 1) în clasificarea BCLC, recidiva tumorală este frecventă post rezecție, agresivitatea tumorală nemaifiind o variabilă strict dependentă de volumul tumoral.

Datorită exprimării semnificative a VEGF la nivelul HCC și a corelării acestuia cu angiogeneza, agresivitatea și metastazarea tumorală, precum și a studiilor care au demonstrat semnificația prognostică a nivelului seric al VEGF în multe tipuri de tumori solide inclusiv în HCC, este logică ipoteza că nivelul seric al VEGF poate avea semnificație prognostică la pacienții cu HCC.

Studii clinice și experimentale indică faptul că supraviețuirea pacienților cu HCC și progresia HCC (metastazarea) este asociată cu angiogeneza.

Scop

Obiectivul studiului nostru a fost evaluarea corelației dintre nivelele serice ale AFP și VEGF în HCC, dacă combinarea nivelelor plasmatiche ale AFP și VEGF se vor corela cu trăsăturile clinico-patologice ale pacienților cu HCC, astfel rafinându-se și stratificându-se prognosticul acestor pacienți.

Un alt obiectiv a fost decelarea corelației între vascularizația în HCC (determinarea MVD), dimensiunea tumorii și trăsăturile histologice de agresivitate tumorală ale HCC, cum ar fi gradul de diferențiere, invazia venei porte și stadiul tumoral.

Material și metodă

120 de pacienți cu hepatocarcinom dezvoltat pe ciroză (72 bărbați și 48 femei; vârsta medie $62 \pm 8,8$ ani) internați în Clinica Medicală III, și 50 pacienți cirofici (35 bărbați și 15 femei; vârsta medie $60 \pm 7,8$ ani) fără leziuni focale hepatice au fost incluși în lotul de studiu, respectiv lotul martor, între anii 2006-2009. Criteriile de includere au fost: existența unei mase hepatice detectată imagistic US/CT sau MRI, tablou clinic evocator, probe funcțional-biochimice modificate și sugestive, diagnostic morfologic (prin biopsie, chirurgie, autopsie). Diagnosticul de HCC a fost stabilit conform ghidurilor în vigoare în momentul studiului, folosind în funcție de mărimea nodulului 1-2 tehnici imagistice cu contrast (CEUS, CT sau MRI cu contrast).

Fragmentele tumorale obținute prin prelevare intraoperatorie (în Clinica Chirurgie III, Prof. Dr. Cornel Iancu) au fost fixate în formol și incluse în parafină (la Laboratorul de Anatomie Patologică al Institutul Oncologic Cluj-Napoca "Prof.dr.Ion Chiricuță"). Din blocurile de parafină s-au efectuat secțiuni de $5 \mu\text{m}$, care au fost apoi colorate cu hematoxilina-eozină și imunohistochemic cu CD31 (DakoCytomation) prin tehnica de colorare cu peroxidază. S-au efectuat și colorații pentru α feto-proteina, Ki67 și β HCG.

Rezultate

Sensibilitatea VEGF a fost comparabilă cu a AFP: sensibilitate 77,36% (95%CI 68.2 - 84.9) vs. 73,81% (95%CI 58.0 - 86.1). Specificitatea a fost în schimb mult mai scăzută: 25% (95%CI 9.8 - 46.7) vs. 50% (95%CI 15.7 - 84.3), astfel că AUC a fost mai bună pentru AFP decât VEGF: 0,690 (95% CI 0.505 to 0.838) vs. 0,560 (95% CI 0.378 to 0.732), $p=0,47$. Curba ROC a AFP a fost la limita statistică de 0,7 în ceea ce privește acceptarea unui test ca și diagnostic. Curba ROC a VEGF a fost mai mică decât curba ROC pentru AFP, putându-se concluziona că acuratețea VEGF seric nu este suficientă ca și marker diagnostic pentru HCC (Fig 1).

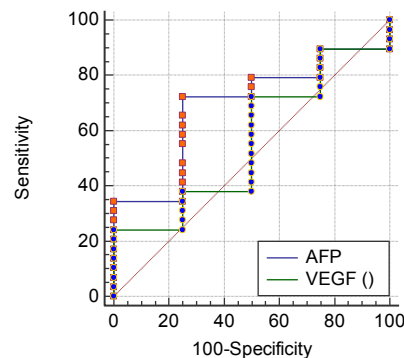


Fig. 1. Comparația curbelor ROC la cei doi biomarkeri: AFP și VEGF.

Nivelul seric al VEGF s-a corelat direct proporțional, intensitatea corelației fiind mare, cu procentul de vase imature și intermediare. Tot o corelație de intensitate mare, invers proporțională a fost evidențiată între valoarea serică a VEGF și procentul de vase mature. În ciuda intensității corelației, p nu a fost semnificativ; posibil datorită faptului că au fost incluse doar 5 explanturi.

Nivelul seric al VEGF s-a corelat și cu MVD; corelația a fost moderată, de tip pozitiv; nu s-a atins semnificația statistică.

Concluzii

Angiogeneza reprezintă un proces important în hepatocarcinogeneza foarte precoce. Calea de semnalizare VEGF pare să fie mai puțin importantă la HCC avansat, rezultatele noastre sugerând că VEGF este implicat în fazele inițiale ale hepatocarcinogenezei.

Rămâne neconcludent dacă VEGF seric poate servi ca și un nou marker de prognostic independent de markerii convenționali patologici, cum ar fi invazia venoasă.

Este important de demonstrat această corelație înainte de a valida folosirea VEGF seric ca și marker de diagnostic al HCC la pacienții cu ciroză hepatică și marker prognostic la pacienții cu HCC supuși la terapii radicale.

Studiul II Caracterizarea tumorilor hepatice primare cu ajutorul ecografiei Doppler și a markerilor serologici tumorali și de angieneză

Ipoteza de lucru

Carcinomul hepatocelular este o tumoră hipervasculară, dependentă de neovascularizație. Densitatea histologică arteriolară din structura tumorii se corelează nu doar cu aspectul angiografic hipervascular, ci și cu proliferarea celulară și, mai important, cu supraviețuirea pacientului.

Scop

S-a considerat că evaluarea circulației hepatice este un indicator indirect al existenței unui proces intrahepatic avid de sânge – cum este cazul tumorilor primare – sau că, în prezența unei tumori hepatice apar modificări importante ale circulației intrahepatice. La un număr de pacienți s-au efectuat măsurători ale circulației hepatice la nivelul hilului plecând de la premiza că aportul sangvin hepatic, îndeosebi la bolnavii cu ciroză, poate constitui un element de evaluare suplimentară și de înțelegere a factorilor de dezvoltare în tumori primare (hepatocarcinom – HCC).

Material și metodă

În perioada ianuarie 2006 – decembrie 2009 au fost examinați 185 de pacienți cirofici dintre care 120 cu tumori hepatice primare (HCC). Criteriile de includere au fost: existența unei mase hepatice detectată imagistic US/CT sau RMN, tablou clinic evocator, probe funcționale – biochimice modificate și sugestive, diagnostic morfologic (prin biopsie, chirurgie, autopsie). Diagnosticul de HCC a fost stabilit conform ghidurilor în vigoare, folosind în funcție de mărimea nodulului 1-2 tehnici imagistice cu contrast (CEUS, CT sau RMN cu contrast). 15 pacienți au fost excluși din studiu deoarece au prezentat formațiuni focale benigne (hemangiom). Modelul vascular Doppler a luat în calcul 120 pacienți cu HCC dezvoltat pe ciroză (72 bărbați și 48 femei; vârsta medie $62 \pm 8,8$ ani) internați în Clinica Medicală III, și 50 pacienți cirofici (35 bărbați și 15 femei; vârsta medie $60 \pm 7,8$ ani) fără leziuni focale hepatice. Pacienții cu ciroză hepatică fără formațiuni focale (lotul martor) au intrat într-un program de supraveghere la 6 luni prin ecografie abdominală și determinare serică a valorii AFP.

S-a utilizat US ca procedură de recoltare a informației (Catedra de Imagistică Medicală/Departamentul de Ecografie IRGH “Prof.dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca, coordonat de Prof.dr. Radu Badea). Protocolul US a fost standardizat și a constat din obținerea de secțiuni perpendiculare, recoltarea de imagini 2D și 3D din zona de interes necesare pentru prelucrarea combinată cu măsurători în trei axe ale tumorii, caracterizarea circulației intratumorale în condiții native și după contrast (SonoVue, Bracco), măsurarea circulației hepatice la nivelul hilului. La fiecare pacient s-a efectuat o evaluare complexă a circulației hepatice prin măsurarea caracteristicilor Doppler la nivelul hilului folosind tehnica Doppler.

Rezultate

Pacienții cu HCC au prezentat un flux arterial hepatic crescut comparativ cu lotul martor – semnificație statistică border-line ($139,8 \text{ mL/mm} \pm 350,18$ vs. $69,2 \text{ mL/min} \pm 158,24$.08 la pacienții cirofici; $p = 0,075$). Analiza semnalului vascular a decelat valori medii ale indicelui de pulsilitate al arterei hepatice semnificativ scăzute la lotul de studiu comparativ cu pacienții cirofici fără HCC ($0,33$ vs. $0,36$, $p = 0,036$), în timp ce IP al venei porte a fost semnificativ crescut la lotul martor comparativ cu pacienții cu HCC ($0,305$ vs $0,24$), semnificație statistică marginală ($p=0,072$).

Nivelul seric al VEGF s-a corelat semnificativ cu volumul tumoral și cu indicele de rezistență la flux (RI), intensitatea corelației putând fi apreciată ca moderată ($r = 0,317$, $p = 0,012$). Nivelul seric al acestuia nu s-a corelat însă cu valoarea serică a AFP și indicele de pulsilitate tumorală (IP). Corelația dintre valoarea serică a VEGF și numărul de pediculi vasculari ai formațiunii tumorale (implicit dimensiunea neovascularizației) a fost de tip pozitiv,

direct proporțională și semnificativă border-line ($p=0,075$). Intensitatea corelației poate fi apreciată ca fiind moderată ($r=0,254$)

Concluzii

Hepatocarcinomul prezintă vascularizație arterială cu rezistență joasă. Vitezele sistolice sunt relativ înalte, corelat cu metabolismul crescut al acestor formațiuni. Vasele intraumorale au o dispoziție dezordonată, anarhică. Concomitent, există o creștere semnificativă a debitului și vitezei în artera hepatică. Ecografia Doppler este utilă în diagnosticul diferențial cu nodulii de regenerare care în general nu prezintă flux arterial.

Studiul III Analiza angiogenezei tumorale utilizând modelare matematică

Ipoteza de lucru

Înțelegerea mecanismului formării mugurilor capilari ca rezultat al migrării celulelor endoteliale este fundamentală în diverse situații fiziologice și patologice.

Scop

Studiul are ca obiectiv utilizarea unui model matematic pentru analiza agregării celulelor endoteliale și degradării laminei vasculare. Prin simulare numerică se pot obține informații privind evoluția în timp și spațiu a densității celulelor endoteliale, concentrației enzimelor proteolitice și densității fibronectinei de-a lungul unui capilar. Simulările se pot realiza pentru diferite forme ale sursei factorului angiogenic și prezic distribuția densității fibronectinei care indică localizarea și timpul formării mugurilor capilari.

Material și metodă

Studiul de modelare matematică a fost efectuat între anii 2007-2010, la Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca, Departamentul de Automatică condus de Prof.dr.ing. Liviu Miclea. Datele experimentale au fost colectate de la pacienți internați în IRGH “Prof.Dr. Octavian Fodor” din Cluj-Napoca.

Rezultate

Viteza de producere a factorilor angiogenici crește rapid și abrupt până când atinge o valoare maximă, la care și rămâne pentru o perioadă, timp în care și dimensiunea tumorii este constantă, apoi este urmată de o creștere mai înceată a volumului vaselor, care va ajunge la o valoare staționară. Între timp, tumora crește lent și ajunge la o primă valoare staționară, unde va rămâne pentru o perioadă de 20 de zile. În acest caz, după perioada în care nu își schimbă dimensiunea, tumora va reîncepe să crească până la a doua valoare staționară unde se va și opri (i.e. metastazează).

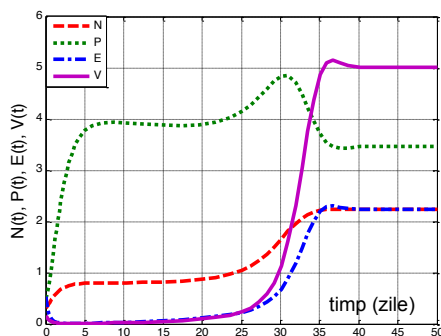


Fig. 2. Dimensiunea tumorii, cantitatea de factor angiogenic, densitatea efectivă a vaselor și volumul vaselor când f_1, f_2, f_3 au viteza de variație mică

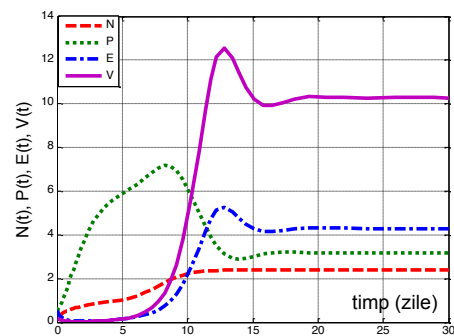


Fig. 3. Dimensiunea tumorii, cantitatea de factor angiogenic, densitatea efectivă a vaselor și volumul vaselor când f_1, f_2, f_3 au viteza de variație mare

După atingerea regimului staționar, producția de factor angiogenic scade și ajunge la o valoare constantă, păstrând în acest fel maturarea vaselor constantă (Fig 2). Perioada de latență din evoluția tumorii, este validă din punct de vedere medical, fiind observată clinic pentru anumite cazuri.

În cazul în care vitezele de variație sunt mari, densitatea vascularizației crește mult mai rapid în timp față de modelul lent ceea ce conduce probabil la metastazarea precoce și agresivitatea tumorală. Fereastra de producere a VEGF durează mult mai puțin comparativ cu modelul lent, ipoteză importantă în determinarea momentului optim de aplicare a terapiei antiangiogenice (Fig 3).

Concluzii

Datele noastre arată că analiza sistemelor dinamice în formularea modelelor matematice joacă un rol important în înțelegerea comportamentului tumoral al HCC.

Utilizarea corectă a unor astfel de metode și integrarea tuturor trăsăturilor HCC, incluzând stadiul tumoral, agresivitatea, răspunsul terapeutic, recidiva pot furniza cercetătorilor o înțelegere aprofundată a naturii și comportamentului proceselor interdependente care apar în această patologie de o complexitate particulară.

Studiul IV Dezvoltarea și testarea în vivo a unui nano-biosistem pe bază de albumină serică conjugată cu nanoparticule de aur pentru nanofototerapia mediată laser a carcinomului hepatocelular

Ipoteza de lucru

Nanotehnologia a oferit deja rezultate promițătoare în studiul și tratamentul HCC. Ablația prin microunde și ablația prin radiofrecvență au fost propuse pentru tratamentul HCC. Nanoparticulele de aur administrate intratumoral în combinație cu iradierea laser s-au dovedit a fi eficiente în tratamentul hepatocarcinomului pe modele animale. Cu toate acestea, o provocare majoră în tratarea HCC este reprezentată de terapiile direcționate strict către celulele tumorale în interiorul parenchimului hepatic.

Scop

În această cercetare am inițiat experimente de targeting cu anticorpi împotriva cancerului hepatic (albumina serică), care au dovedit deja specificitate pentru acest tip de cancer. Ne-am propus să atașăm anticorpi specifici pe suprafața nanoparticulelor de aur GnP pentru asimilarea celulară selectivă și să optimizăm răspunsul nanoparticulelor funcționalizate la radiațiile NIR, astfel încât acestea să poată produce căldura necesară pentru a distruge celulele canceroase prin iradiere cu laser, dar în concentrații mici, pentru a evita eventuala lor toxicitate sistemică nedorită.

Din perspectiva noastră clinică, cu scopul de a obține o ablație fototermică nanomediata selectivă a cancerului hepatic avansat la om, ne-am propus să dezvoltăm, în cadrul acestei cercetări, un nanobiosistem nou bazat pe nanoparticule de aur netoxice, care pot fi administrate în siguranță în studiile clinice.

Material și metodă

Studiu s-a efectuat între anii 2011-2012 la Departamentul de Nanomedicină al Catedrei Chirurgie III, din cadrul IRGH "Prof.Dr. Octavian Fodor", condus de Prof.Dr.Cornel Iancu.

Rezultate

Capacitatea bioconjugatelor ALB-GNPS marcate fluorescent cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) de a se internaliza în celulele tumorale după administrare vasculară, a fost evaluată prin microscopie confocală (Fig 4).

Zona cu cea mai mare concentrație de ALB-GNPS a fost observată în tumoră, unde majoritatea celulelor maligne au fost marcate cu ligand fluorescent. Nu am evidențiat fluorescență sugestivă în secțiunile prelevate din ficat. Astfel,

am furnizat dovezi imagistice care să ateste că HSA (albumina serică umană) poate acționa ca vehicul specific de administrare al nanoparticulelor de aur.

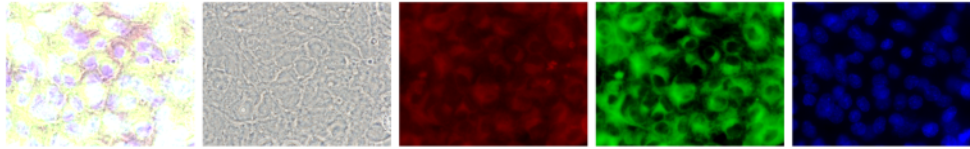


Fig. 4. Evaluarea expresiei receptorilor GP60 in celulele maligne de carcinom hepatic. Se observă superpoziția imaginilor fluorescente (FITC-Alb GNP) cu fluorescența Cy3 (receptorii GP60)

Nu am găsit nici o dovadă de patologie cardiovasculară crescută la animalele tratate, inclusiv tromboză, ateroscleroză, accident vascular cerebral sau infarct miocardic. Un șoarece a prezentat inflamații în splină, peretele atrului drept, artera pulmonară și țesutul hepatic, probabil într-o situație de bacteriemie. Șoarecii tratați au prezentat cantități mici de pigment brun-negru distinctiv, fin granular, în întregul țesut hepatic, care este probabil să fie nanoparticule de aur. Pigmenții au fost localizați în cadrul macrofagelor hepatice (celule imunitare responsabile de fagocitoza materialelor străine, cum ar fi virușii, bacteriile sau particulele de praf). Macrofagele hepatice normale nu au dat dovadă de nici o leziune celulară, și au conținut în mod normal o cantitate mică de pigment auriu-marou, care era mai închis la culoare și mai fin granular decât hemosiderina, un pigment auriu-marou comun, strâns legat de vârstă, rezultat în urma defalcării hemoglobinei găsite în multe țesuturi.

Țesutul tumoral hepatic a absorbit o mare parte din nanoparticulele administrate (prin prelevarea de biopsii excizionale în intervalul 1-5 h astfel, zona cu cea mai mare concentrație de GNPS a fost observată în tumoră, unde majoritatea celulelor maligne au conținut nanoparticule de aur. Biopsiile prelevate de la nivelul ficatului au evidențiat o cantitate semnificativ mai redusă a nanoparticulelor de aur (utilizând softul producătorului), observații care atestă că HSA (albumina serică umană) poate acționa ca vehicul specific de administrare al nanoparticulelor de aur (Fig 5).

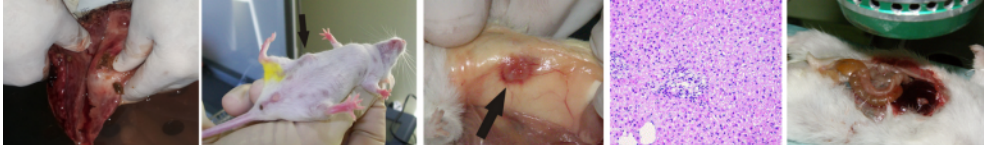


Fig. 5. Obținerea modelului animal de hepatocarcinom și iradierea laser post administrare de GNPs-Alb

Concluzii

Dezvoltarea terapiei țintite reprezintă o abordare nouă și interesantă în tratamentul HCC. Conceptual vorbind, un medicament țintit reprezintă o moleculă receptivă atașată la un transportator cu afinitate pentru proteinele receptoare de suprafață specifice, situate pe membranele celulelor. Acest proces de internalizare nu este posibil în condiții normale. În acest experiment in vivo, am utilizat GNPs ca agenți de activare termică a radiației laser, pentru a obține o necroză selectivă a leziunilor maligne. Această metodă se bazează pe prezența și gruparea GNPs în interiorul celulelor țintă.

Capacitatea de absorbție optică ridicată a undelor laser generează efecte termice sub iradierea cu NIR, în sistemele biologice cum ar fi celule sau țesuturi cu absorbție scăzută și transparență ridicată. Tranzițiile optoelectronice și interacțiunile fonon-fonon de la suprafața GNPs generează energie termică prin mecanism de rezonanță plasmonică, care se difuzează rapid în compartimentele subcelulare, unde sunt prezente nano-bioconjugatele.

Concluzii finale

1. Studiul nostru a arătat că angiogeneza reprezintă un proces important în stadiul timpuriu al hepatocarcinogenezei. Nivelul seric al VEGF s-a corelat direct proporțional, intensitatea corelației fiind mare, cu procentul de vase imature și intermediare, ceea ce sugerează că VEGF este implicat în fazele inițiale ale hepatocarcinogenezei.
2. Hepatocarcinoamele moderat diferențiate au prezentat cele mai crescute valori ale densității microvascularizației (MVD), precum și procentul cel mai mare de vase imature. Astfel, este posibil ca angiogeneza să fie foarte activă în stadiile preneoplazice, pe ficat cirotic cu fibroză avansată, și să se reducă în HCC avansate.
3. În studiul nostru sensibilitatea și specificitatea AFP s-au situat la 73,81, respectiv, 50% la valori serice de >5,8 ng/ml cut-off, care se încadrează în intervalul de valori normale. Specificitatea de 100% a fost atinsă la valori >20ng/ml (20 ng/ml fiind limita superioară a intervalului de valori normale). Se și SP sunt similare valorilor din literatura, dar valorile cut-off obținute de noi sunt descrise în literatură ca având valoare de prognostic pentru AFP și nu de diagnostic.
4. Nivelul seric al VEGF a prezentat cea mai bună sensibilitate și specificitate de 77,36% (95%CI 68.2 - 84.9) și, respectiv, 25% (95%CI 9.8 - 46.7) la valori serice de >96.39 ng/ml cut-off. Valoarea scăzută a AUC nu susține importanța sa ca biomarker diagnostic pentru HCC.
5. Celulele endoteliale sunt activate și proliferază sub acțiunea unor stimuli pro-angiogenici cum sunt factorii de creștere bFGF, IGF-I, VEGF. Cel mai intens efect de stimulare a proliferării, migrării și formării de noi structuri capilare a fost produs de bFGF, urmat de IGF-I și apoi de VEGF. În familia factorilor de creștere TGF- β , BMP4 are un efect asupra proliferării și migrării mai puțin pronunțat decât al celorlalți factori de creștere, deși induce activarea celulelor endoteliale.
6. Hepatocarcinoamele cu cel mai crescut MVD au dezvoltat spontan *in vitro* rețeaua capilară, în condiții de stimulare angiogenică bazală (fibrină + Endothelial Growth Factor), MVD fiind astfel un indicator al potențialului angiogenic tumoral.
7. Densitatea microvascularizației, deși este un indicator al potențialului angiogenic al HCC, nu poate prezice răspunsul tumoral la terapia anti-angiogenică, deoarece în categoria tumorilor cu MVD crescut există și cazuri care sunt nereceptive la tratamentul cu agenți anti-receptori VEGF.
8. Modelul 3D de angiogeneză tumorală *in vitro* poate aduce informații utile pentru studiul potențialului angiogenic al HCC, și permite de asemenea individualizarea terapiei. Acest model a fost util în elaborarea unui model matematic de cuantificare a angiogenezei *in vitro*, datorită potențialului de reproductibilitate ridicată dată de caracterul celulelor HUVEC (linie celulară stabilizată).
9. Tumorile primare hepatice prezintă reducerea fluxului sangvin portal însoțită de creșterea fluxului arterial hepatic.
10. În cazul unei mase hepatice, creșterea fluxului arterei hepatice și reducerea fluxului venei porte pot crește suspiciunea prezenței unei formațiuni maligne.
11. Particularitățile circulatorii ale HCC pot conduce la o serie de concluzii practice:
 - a. Identificarea unor zone de exacerbare a vascularizației după modelul descris mai sus poate echivala cu detectarea de arii celulare probabil maligne
 - b. Caracterul anarhic al circulației tumorale poate explica evoluția adesea „paradoxală” a acestor afecțiuni, uneori cu remisiuni inexplicabile sau cu perioade de stagnare prelungite

- c. Terapia antiangiogenetică poate constitui o „piesă” esențială în tratamentul bolii canceroase după cum identificarea unui anumit model vascular poate sugera un anumit răspuns la terapia cu agenți antiangiogenici.
12. Modelarea matematică a datelor furnizate de evaluarea clinică a pacienților cu HCC incluși în studiu a arătat că simularea numerică utilizând date hemodinamice ale ficatului, a validat modelul matematic și permite predicția evoluției dimensiunii tumorii. În cazul în care vitezele de variație sunt mari, densitatea vascularizației crește mult mai rapid în timp față de modelul lent ceea ce conduce probabil la metastazarea precoce și agresivitatea tumorală. Fereastra de producere a VEGF durează mult mai puțin comparativ cu modelul lent, ipoteză importantă pentru determinarea momentului optim de aplicare a terapiei antiangiogenice.
13. Nanoparticulele de aur funcționalizate cu albumină reprezintă compuși biocompatibili, cu rată neglijabilă de citotoxicitate.
14. Nanobiosistemul Alb-GNP dezvoltat reprezintă o soluție eficientă de internalizare intracelulară a nanoparticulelor de aur.
15. Terapia iradiantă LASER în vivo realizată după administrare de Alb-GNPs este o metodă eficientă de necroză selectivă tumorală. Condițiile necesare și suficiente de obținere a unei rate de necroză optimă este iradierea tisulară după administrarea unei concentrații de 1-50mg/l.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de față și-a propus să evalueze semnificația diagnostică și prognostică a nivelului seric al unuia dintre cei mai importanți factori angiogenici, VEGF, la pacienții cu HCC, care este unul dintre cele mai vascularizate cancere umane.

În primul rând, pentru elucidarea corelației între vascularizația HCC (determinarea MVD), dimensiunea tumorii și trăsăturile histologice de agresivitate tumorală ale HCC, de exemplu: gradul de diferențiere, invazia venei porte și stadiul tumoral, s-a încercat evidențierea imunohistochimică a fenomenului de angiogeneză în hepatocarcinoame. Am constatat că pacientul cu ciroză cu noduli de regenerare cu celule potențial maligne (posibil surprinderea unui nodul displazic) a prezentat cele mai mari valori ale MVD, un proces de neoangiogeneză foarte intens, care întărește suspiciunea că activarea angiogenezei are loc deja în fazele foarte precoce ale carcinogenezei, posibil fără a mai crește ulterior în timpul progresiei tumorale. Astfel, este posibil ca angiogeneza să fie foarte activă în stadiile preneoplazice, pe ficat cirotic cu fibroză avansată, și să scadă în HCC avansate. Căile de semnalizare implicate în activarea fibrozei și menținerea inflamației pot fi la rândul lor implicate în activarea și întreținerea procesului de neoangiogeneză făcând foarte dificilă abordarea unei terapii antitumorale. Rămâne de demonstrat existența corelației dintre multiplele semnale angiogenice activate de celulele tumorale.

Al doilea studiu reprezintă prima cercetare din România care a evaluat corelația dintre nivelele serice ale AFP și VEGF în HCC și rolul acestora în procesul de angiogeneză în HCC. Folosirea nivelului circulant al VEGF în locul VEGF exprimat de tumoră prezintă avantajul important că nu necesită explantul tumoral pentru evaluare, deci poate fi măsurat atât la pacienții operabili cât și la cei inoperabili. Mai mult, permite evaluarea preoperatorie a activității angiogenice, ceea ce poate fi folositor pentru selectarea pacienților pentru terapia neoadjuvantă. De asemenea, dozarea poate fi repetată înainte și după tratament.

Valoarea de screening a VEGF în studiul nostru a fost scăzută, neîndeplinind criteriul minim statistic ($AUC > 0,7$) pentru un test diagnostic. Un raport recent a demonstrat că folosirea combinată a valorii serice a AFP $> 19,8$ g/mL și VEGF seric la o valoare $> 355,2$ pg/mL au crescut sensibilitatea de screening pentru HCC la 95,5%, comparativ cu valorile individuale de 68,2% și, respectiv, 86,4%, dar valoarea serică a VEGF a fost determinată pentru VEGF total, și nu pentru fracțiunea VEGF-A, cea determinată în studiul nostru. Nivelul seric al VEGF s-a corelat cu volumul

tumoral, fiind semnificativ mai mare la cei cu tumori ≥ 5 cm în diametru ($p=0,012$). De aceea, monitorizarea nivelului seric al VEGF ar deveni o investigație clinică necesară în ceea ce privește prognosticul bolii.

Prezentul studiu este primul studiu din România care a arătat că angiogeneza reprezintă un proces important în hepatocarcinogeneza foarte precoce. Calea de semnalizare VEGF pare să fie mai puțin importantă în cazul HCC avansat. Astfel, crește interesul în ceea ce privește VEGF ca un biomarker predictor pentru apariția HCC și pentru modalitatea de evoluție din punct de vedere al agresivității. În sprijinul ipotezei că nivelul circulant al VEGF reflectă exprimarea crescută a VEGF de către celulele maligne hepatice sugerăm corelația dintre VEGF și MVD și vasele imature, deși nivelul seric crescut al VEGF poate reflecta, de asemenea, microcirculația hepatică alterată asociată hipertensiunii portale: studiul nostru a arătat și prezența unei corelații între nivelul seric al VEGF și rezistivitatea crescută a hemodinamicii hepatice și tumorale. Rămâne neconcludentă posibilitatea ca nivelul VEGF seric să reprezinte un nou marker de prognostic independent de markerii convenționali patologici, cum ar fi invazia venoasă.

Este important de demonstrat această corelație înainte de a valida folosirea VEGF seric ca marker de diagnostic al HCC la pacienții cu ciroză hepatică și ca marker prognostic la pacienții cu HCC supuși la terapii radicale.

Modelele 2D și 3D de angiogeneză, studiate în premieră națională, au condus spre o concluzie comună și anume că celulele endoteliale sunt activate și proliferază sub acțiunea unor stimuli pro-angiogenici cum sunt factorii de creștere bFGF, IGF-I, VEGF. Folosirea de substrăte matriceale diferite în modelul 3D poate influența comportamentul angiogenic *in vitro* al explantelor tumorale, în special în modelul 3D gel de fibrina+matrigel. Pentru evaluarea MVD este necesară obținerea de piesă tumoral, fiind necesar un fragment suficient de mare pentru păstrarea structurii spațiale a tumorii. Avantajul modelului 3D îl reprezintă faptul că este suficientă și cantitatea obținută la o biopsie hepatică.

Cele 5 tumori hepatice studiate au prezentat potențiale angiogenice diferite în condiții bazale, precum și răspunsuri diferite la stimularea cu factorii de creștere și la tratamentul cu doxorubicină și bevacizumab. Individualizarea terapiei după obținerea unor informații precise legate de fenomenul de angiogeneză al fiecărei tumori se poate realiza prin testarea *in vitro* a diferiților agenți anti-angiogenici pe aceste modele 3D, permițând translația în clinica oncologică a studiilor preclinice.

Pentru furnizarea de date necesare realizării modelului matematic al angiogenezei *in vitro*, tehnicile necesită experimente repetate pentru a mări reproductibilitatea acestora. Aplicarea unui model matematic de analiza a imaginilor preluate la microscop ar permite o cuantificare ce ar fi utilă apoi modelului clinico-imagistic prin informațiile suplimentare oferite.

Studiul cu privire la caracterizarea tumorilor hepatice primare cu ajutorul ecografiei Doppler și a markerilor serologici tumorali și de angiogeneză a arătat că hepatocarcinomul prezintă vascularizație arterială cu rezistență joasă. Vitezele sistolice sunt relativ înalte, corelat cu metabolismul crescut al acestor formațiuni. Vasele intratumorale au o dispoziție dezordonată, anarhică. Concomitent, există o creștere semnificativă a debitului și vitezei în artera hepatică. Ecografia Doppler este utilă în diagnosticul diferențial cu nodulii de regenerare care în general nu prezintă flux arterial.

O altă contribuție personală a fost modelarea matematică a datelor furnizate de evaluarea clinică și ecografică a pacienților cu HCC incluși în studiu, prima cercetare de acest fel din România. Pe plan European mai există un singur proiect demarat în cadrul FP7, cu termen de încheiere în 2015 care urmărește modelarea dezvoltării HCC folosind căile de semnalizare Ras și beta catenina [<http://www.ifado.de/cancersys/index.html>].

Sunt necesare studii ulterioare care să conecteze informațiile privind căile de semnalizare cu comportamentul tumoral. Pentru aceasta, integrarea evenimentelor intracelulare cu răspunsul sistemic al organismului la nivelul modelului este esențială. Provoacă o constituie dezvoltarea unui formalism matematic care să permită conectarea evenimentelor produse la momente de timp diferite. În concluzie, combinarea datelor clinice și experimentale cu modelarea matematică promite să furnizeze instrumente care să permită abordarea tabloului complex caracteristic pentru HCC și să faciliteze dezvoltarea de terapii țintite, personalizate.

Implicația terapeutică a acestui studiu are, de asemenea, valoare clinică importantă. Originalitatea tezei constă în faptul că ne-am propus să atașăm anticorpi specifici pe suprafața nanoparticulelor de aur GnP pentru asimilarea celulară selectivă și să optimizăm răspunsul nanoparticulelor functionalizate la radiațiile NIR, astfel încât acestea să poată produce caldura necesară pentru a distruge celulele canceroase prin iradiere cu laser, dar în concentrații mici, pentru a evita eventuala lor toxicitate sistemică nedorită. Din perspectivă clinică, cu scopul de a obține o ablație fototermică nanomediata selectivă a cancerului hepatic avansat la om, ne-am propus să dezvoltăm, în cadrul acestei cercetări, un nanobiosistem nou bazat pe nanoparticule de aur netoxice, care pot fi administrate în siguranță în studiile clinice.

Valoarea înalt prognostică a VEGF la pacienții cu HCC sugerează existența unor căi moleculare cu valoare critică ce pot deveni țintă terapeutică pentru HCC, ceea ce este extrem de important dat fiind faptul că chimioterapia convențională sistemică nu este eficientă în HCC. În prezent, echipa noastră lucrează la un studiu cu privire la rolul căii de semnalizare Hedgehog în procesul de angiogeneză în HCC și posibilitatea folosirii inhibitorilor acestei căi în terapia HCC. Studii similare privind inhibarea receptorilor VEGF sunt în desfășurare în alte centre, iar datele vor fi disponibile într-un viitor nu foarte îndepărtat. Terapia anti-angiogenică este foarte importantă nu doar pentru tratamentul sistemic al HCC, dar și ca terapie adjuvantă pentru îmbunătățirea eficacității TACE și scăderea recidivelor după rezecția sau ablația HCC.

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

PhD Thesis Summary

Role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis patients. Cancer stem cells study

PhD Student: **Teodora Atena Pop**

PhD Thesis Supervisor: **Prof. Dr. Monica Acalovschi**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
STATE OF THE ART	5
1. Tumoral angiogenesis	7
2. Specific changes in hepatic hemodynamics due to primary liver tumours	17
3. Mathematical modelling in cancer angiogenesis research	26
4. Nanomedicine	28
PERSONAL CONTRIBUTION	31
1. Angiogenesis in HCC	33
1.1. Hepatocellular carcinoma angiogenesis assessment using immunohistochemistry	33
1.2. Role of serum and tumoral expressed markers in HCC angiogenesis	45
1.3. Tumoral angiogenesis <i>in vitro</i> therapeutic modulation	54
1.4. In vitro HCC angiogenesis and histological parameters correlation	71
2. Value of Doppler ultrasonography, tumoral and angiogenesis markers in the depiction of changes in hepatic hemodynamics due to primary liver tumours	75
3. Mathematical modeling and control strategies for tumor-induced angiogenesis	92
3.1. Capillary development in early stages of tumoral angiogenesis using mathematical modeling	92
3.2. Tumor and angiogenesis development study using macroscopic modelling	97
3.3. Mathematical modelling of liver and tumoral hemodynamic changes in patients with liver cirrhosis and HCC	102
4. Development and in vivo testing of an albumin bioconjugated system with gold nanoparticles for HCC targeted nanophotothermolysis	107
4.1. Introduction	107
4.2. Study objectives	108
4.3. Immunocytochemical labelling of target receptors for the new-generated therapy	109
4.4. GNP-Ab synthesis and nano-biosystem administration. Cell necrosis assessment after GNP-Ab delivery in HepG2 cell cultures followed by the laser treatment	111
4.5. Steps taken for the animal model of human HCC delivery. In vivo laser nanophotothermolysis mediated by Alb-GNPs on CD 1 immunodeficient mice with human HCC xenograft	114
5. General conclusions	125
6. Thesis innovation and originality	129
REFERENCES	133

KEY WORDS: hepatocellular carcinoma (HCC), angiogenesis, VEGF (vascular endothelial growth factor), MVD (microvessels density), vascular ultrasound, liver hemodynamics, mathematical modelling, laser nanophotothermolysis

Introduction

This PhD thesis general aim was to assess HCC neoangiogenesis using data from both clinical practice and high performance ultrasound examination. These data were correlated with immunohistochemistry and other imaging techniques (contrast MRI and CT), with higher accuracy, in order to identify and characterize the tumoral blood supply.

As a first step we studied the tumour blood circulation, established the study and control groups, ultrasound ecoDoppler, Angiopower examination protocols. We choose US as study method due to its non-invasive quality, the possibility to quantify *in vivo* the tumoral neoangiogenesis, as compared with the conventional method (microvessels density - MVD).

Hepatocellular carcinoma was evaluated at specific time periods in order to follow the natural history – dynamic follow-up for the mathematical modelling (due to the advanced stage at diagnosis and particular treatment conditions, a lot of HCC patients only entered a palliative monitoring – major study inclusion criteria). In every patient morphometric (3D tumor measurement, volume, textural characterization, delineation from the peritumoral tissue) and hemodynamic (qualitative and quantitative evaluation of tumoral circulation, spatial tumor circulatory model, arterial signal, circulatory speed and impedances indexes both at tumoral and liver hilum level) assessment were conducted. These data were correlated with immunohistopathological data in some patients. Also, in the same study group the serum level of VEGF and AFP were assessed. The US examination was conducted using a rigorous protocol design with every 6 weeks monitoring for a minimum 2 years follow-up.

The last chapter describes the development and *in vivo* testing of an albumin bioconjugated system with gold nanoparticles for HCC targeted nanophotothermolysis.

Personal contribution

Study I Angiogenesis in HCC

Premises:

Tumoral MVD has a specific clinical importance as a prognostic factor in HCC patients: although a small, below 2 cm, HCC is considered early (stage 1) in BCLC classification, recurrence is very frequent after surgical resection. In this case, the tumor aggressiveness is no longer a variable strictly dependant of the tumor volume.

It was shown that there was a significant tumoral VEGF expression in HCC patients and the serum VEGF level held a prognostic significance in several solid tumors; also several studies have demonstrated its correlation with angiogenesis, tumor aggressivity and metastazation. Thus, it seemed worthy to study further the hypothesis that VEGF serum level could have a prognostic and diagnostic significance in patients with HCC.

Clinical and experimental studies showed that HCC patients' survival and HCC progression (metastazation) were associated with angiogenesis.

Aim

Our study objective was the correlation between the AFP and VEGF serum levels in patients with HCC; a secondary objective aimed to prove if AFP and VEGF serum levels will correlate with HCC histology. Of particular interest was the link between HCC vascularization (MVD assessment), tumor volume and HCC aggressivity, as differentiation, portal vein invasion and tumoral stage.

Material and Methods

120 patients with liver cirrhosis and HCC (72 men, 48 women; medium age 62 ± 8.8 years) admitted to the 3rd Medical Clinic, and 50 patients with liver cirrhosis without HCC (35 men and 15 women; medium age 60 ± 7.8 years) were included between 2006-2009. HCC diagnosis was established according to the current guidelines.

The tumoral explants (3rd Surgery Clinic, Prof.Dr.Cornel Iancu) were assessed (Histopathology Laboratory, Cancer Institute Cluj-Napoca “Prof.dr.Ion Chiricuță”) using $5\mu\text{m}$ slices, studied with hematoxylin–eosin stain and immunohistochemistry using CD31 (DakoCytomation), α feto-proteina, Ki67 and β HCG staining.

Results

VEGF and AFP sensitivity was similar: 77.36% (95%CI 68.2 - 84.9) vs. 73.81% (95%CI 58.0 - 86.1), but with significant lower specificity: 25% (95%CI 9.8 - 46.7) vs. 50% (95%CI 15.7 - 84.3). Thus, AUC was better for AFP as compared with VEGF: 0.690 (95% CI 0.505 to 0.838) vs. 0.560 (95% CI 0.378 to 0.732), $p=0.47$. AFP ROC curve was at the significance border of 0.7 in order for a test to gain diagnostic value. VEGF ROC curve was lower, thus the diagnostic accuracy being too low for VEGF to have diagnostic marker value (Fig 1).

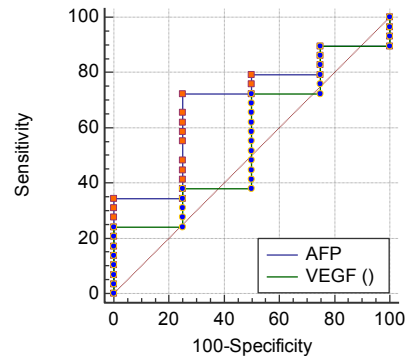


Fig. 6. AFP and VEGF ROC curves.

A direct, high correlation was noticed between VEGF serum level and the percent of immature and intermediary vessels; similar high intensity, but indirect correlation was found between VEGF serum level and mature vessels percentage; p did not reach statistical significance, most probably due to the reduced number of explants (only five explants were included).

A moderate, positive correlation was found between VEGF serum level and MVD; again, the statistical significance was not reached.

Conclusions

Angiogenesis might be an important process in the very early hepatocarcinogenesis. Our results suggest that VEGF signaling path has a lower importance in the advanced HCC evolution, being more involved in the initial steps of hepatocarcinogenesis.

One has still to prove if serum VEGF might be an useful independent prognostic marker as compared with the already established markers (venous invasion).

This correlation has to be demonstrated before introducing serum VEGF into clinical practice as a diagnostic marker for HCC in patients with liver cirrhosis and prognostic marker in HCC patients who underwent curative procedures.

Study II Value of Doppler ultrasonography, tumoral and angiogenesis markers in the depiction of changes in hepatic hemodynamics due to primary liver tumours

Premises

Hepatocellular carcinoma is a hypervascularised tumor, highly dependent of neovascularization. The tumoral arterioles density correlates not only with the imaging hypervascular pattern, but also with cancer cells proliferation and, more important, with the patients' survival.

Aim

The aim of this report was to investigate in a prospective study the usefulness of Doppler US in the evaluation and characterization of tumor vascularity in US detected liver focal lesions of patients with cirrhosis.

Material and Methods

Between January 2006 and December 2009, 185 cirrhotic patients were examined; 120 patients (72 men, 48 women; medium age 62 ± 8.8 years) with evidence of hepatic focal lesions suggestive for HCC, attending our inpatient liver unit, were enrolled. Informed consent was obtained from each patient. 50 patients (35 men and 15 women; medium age 60 ± 7.8 years) with liver cirrhosis without focal liver lesions were included in the control group, being monitored by US and AFP every 6 months.

Imaging and Doppler signals (US Department, IRGH "Prof.dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca, coordinated by Prof.dr. Radu Badea) were performed with General Electric Duplex US Logiq 7 scanner using 3,5-5 Hz convex and phased-array transducers. For quantitative Doppler spectral analysis the sample volume was positioned on the signals detected by color Doppler, usually at the boundaries of the tumor; its length ranged from 3 to 6 mm. Patients were studied after overnight fasting, in supine position, and during suspended respiration. The following Doppler parameters were assessed: (1) pattern of Doppler frequency spectrum, *i.e.*, arterial or venous; (2) resistance index (RI) calculated according to the formula: $RI = (\text{systolic peak frequency} - \text{end-diastolic frequency}) / \text{peak systolic frequency}$; (3) pulsatility index (PI) calculated according to the formula $(\text{systolic peak frequency} - \text{end-diastolic frequency}) / \text{mean frequency}$.

Blood Tests. Routine liver biochemistry, VEGF and alpha-fetoprotein (AFP) were performed. VEGF and AFP was determined by radioimmunoassay.

Statistical Analysis. Data are expressed as mean \pm SD. Differences between groups were analyzed using two tailed Student *t* test for unpaired observations. The value $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patients with HCC had a higher hepatic artery blood flow as compared with the control group – border-line significance ($139.8 \text{ mL/mm} \pm 350.18$ vs. $69.2 \text{ mL/min} \pm 158.24.08$ in patients without HCC; $p = 0.075$). Spectral analysis of the signal indicated that the mean peak RI and PI were significantly lower in cirrhotic patients with HCC than in the control group (0.33 vs. 0.36 , $p = 0.036$). Also the mean IP for portal vein was significantly higher in the control group as compared with HCC patients (0.305 vs 0.24) ($p = 0.072$).

Serum VEGF was significantly correlated with the tumoral volume and the resistance index (RI), with a moderate correlation index ($r = 0.317$, $p = 0.012$). There were no correlation between VEGF serum level and serum AFP and tumoral pulsatility index (IP).

Also, a direct, positive correlation was found between serum VEGF and the number of tumoral vascular pedicles (assumed neovascularization volume) ($p = 0.075$, $r = 0.254$)

Conclusions

Hepatocellular carcinoma has a low impedance arterial vascularization. The systolic velocity was high, probably correlated with the high tumoral metabolism. The advanced HCC was abundantly supplied by systemic arteries alone. This abundancy facilitates the angiographic diagnosis of malignancy and could differentiate non-neoplastic or preneoplastic conditions, such as liver cirrhosis, hepatocellular adenoma, focal nodular hyperplasia and adenomatous hyperplasia.

Study III Mathematical modeling and control strategies for tumor-induced angiogenesis

Premises

Angiogenesis or the formation of new blood vessels by budding from existing ones has been proven to have a widespread significance in clinical oncology.

Aim

The goal was to numerically simulate the mathematical model and correlate it with real biological systems. The tumor proliferation rate, angiogenic factors production rate and vessel growth rate were expressed as functions that describe the dependency between the variables.

Material and Methods

This study was performed between 2007-2010 at the Tehnical University Cluj-Napoca, Departament of Automation coordinated by Prof.dr.ing. Liviu Miclea. The data were extracted from patients admitted to IRGH “Prof.Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca.

Results

The evolution in time of the tumor size, V , protein production, P , and of the effective vessel density, E , can be seen in Fig. 2 and 3. The tumor will grow for a short period, but because the effective vessel density begins decreasing during the same period until it will be zero, the tumor will decrease in size too, reaching a steady state value. The case when the functions are steep and fast, but have lower amplitude is shown in Fig 3. The tumour size will reach steady state much faster as compared with the case when the functions are smooth and slow (Fig 2).

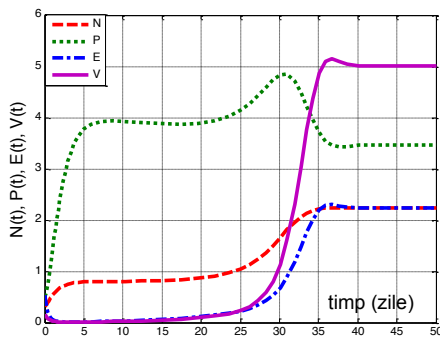


Fig. 7. The evolution of the tumor size, the amount of VEGF and the effective vessel density when f_1, f_2, f_3 have a low variation velocity

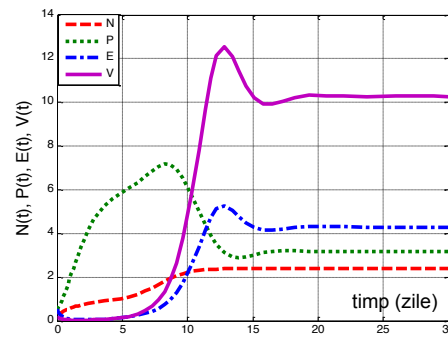


Fig. 8. The evolution of the tumor size, the amount of VEGF and the effective vessel density when f_1, f_2, f_3 have a high variation velocity

Because of the lack of vessels (i.e. nutrient and oxygen), the tumor will produce a very large quantity of angiogenic factors during the first period, which stimulate for a very short period an increase in the effective vessel density. Because the effective vessel density is zero, the tumor will become necrotic in this case, unlike the previous case when it was still vascularized so the chances were that it will develop metastases.

Conclusions

The results of the simulation showed a good correlation with the real cases situations. Because the simulation results are plausible from the medical point of view, this model could be a start for the development of improved control laws (i.e. chemotherapy schemes).

Study IV Development and in vivo testing of an albumin bioconjugated system with gold nanoparticles for HCC targeted nanophotothermolysis

Premises

Nanomedicine had already offered promising results regarding the study and treatment of hepatocellular carcinoma. Intratumoral administration of gold nanoparticles combined with laser irradiation proved to be efficient in HCC treatment on animal models. However, a major breakthrough would be a targeted therapy to the cancer cells within the liver parenchima.

Aim

In this experimental study we aimed to target specific antibodies on the surface of the gold nanoparticles (GNP) for selective intracellular assimilation and to optimise the response of the functionalized nanoparticles to the NIR radiation. Thus, the laser irradiation would produce the necessary amount of heat in order for the cancer cells to be destroyed, in small concentration to avoid systemic toxicity.

Our goal was to deliver a nano biosystem based on non-toxic gold nanoparticles in order to achieve a selective nanophotothermic ablation of human advanced HCC.

Material and methods

This study was performed between 2011-2012 at the Nanomedicine Department, 3rd Surgery Clinic, IRGH “Prof.Dr. Octavian Fodor”, coordinated by Prof.Dr.Cornel Iancu.

Results

Confocal microscopy was used to assess the ALB-GNPS nanoparticles labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) embedding into the cancer cells (Fig 4).

The highest density of ALB-GNPS was noticed within the tumor, where most of the cancer cells were marked with the fluorescent ligand as compared with the low fluorescent density if the normal liver tissue.

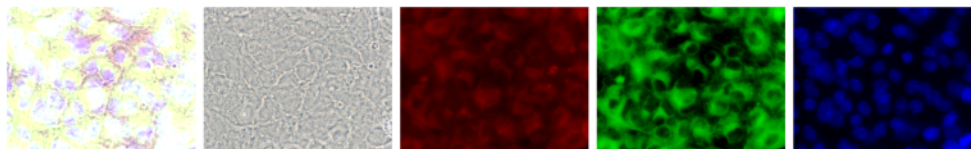


Fig. 9. GP60 receptors expression assessment in HCC cancer cells. One may notice the superposing of the fluorescent images (FITC-Alb GNP) Cy3 fluorescence (GP60 receptors).

The liver tumoral tissue absorbed the highest amount of the delivered nanoparticles (biopsies sampling within 1-5 h interval). The highest concentration of GNPS was noticed at the tumor level, most of the cancer cells containing the gold nanoparticles. The normal liver biopsies showed a significant lower density of gold nanoparticles (using the

producer software). These observations proved that HSA (human serum albumin) may be used as a specific carrier for gold nanoparticles (Fig 5).

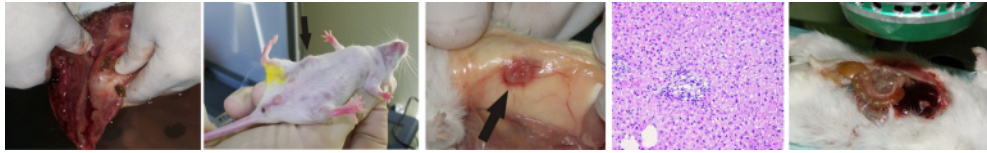


Fig. 10. HCC animal model and laser irradiation post GNPs-Alb administration

Conclusions

Targeting therapy development may bring new, interesting HCC treatment possibilities. A targeted drug represents a receptor attached to a carrier with high affinity for the specific surface protein located on the cell membrane. This embedding process is not possible under normal circumstances. In this *in vivo* experiment we used GNPs as an activation agent of the laser in order to obtain a selective necrosis of the cancer cells.

General conclusions

1. Angiogenesis might be an important process in the very early hepatocarcinogenesis. A direct, high correlation was noticed between VEGF serum level and the percent of immature and intermediary vessels. Our results suggest that VEGF signaling path has a lower importance in the advanced HCC evolution, being more involved in the initial steps of hepatocarcinogenesis.
2. HCCs with a moderate degree of differentiation had the highest values of microvascularization density (MVD), and the highest percent of immature vessels. Angiogenesis might be highly activated in the preneoplastic stages, in liver cirrhosis with advanced fibrosis, and decrease as intensity in the advanced HCC.
3. In our study the AFP sensitivity and specificity were 73.81, respectively, 50% at cut-off serum values of >5,8 ng/ml, within the normal values range. A 100% specificity was reached at >20ng/ml serum values (20 ng/ml being the high range of the normal interval). Se and SP are similar to the literature values, but our cut-off values for AFP are described as having prognostic and not diagnostic value.
4. The best sensitivity and specificity for VEGF serum values were 77.36% (95%CI 68.2 - 84.9) and, respectively, 25% (95%CI 9.8 - 46.7) at cut-off serum value of >96.39 ng/ml. VEGF ROC curve was too low for VEGF to have diagnostic marker value.
5. The endothelial cells are activated and grow using the pro-angiogenic factors as bFGF, IGF-I, VEGF. The highest effect of cell proliferation, migration and new capillaries development was noticed at bFGF, followed by IGF-I and VEGF. Within the TGF- β family, BMP4 had a slightly lower effect on cell proliferation and migration as compared with the other growth factors, although it activated the endothelial cells.
6. HCCs with the highest MVD developed spontaneously *in vitro* a capillary network, under basic angiogenic stimulation (fibrin + Endothelial Growth Factor), MVD being an indicator of the tumor angiogenic potential.
7. MVD cannot predict the tumoral evolution under anti-angiogenic therapy; there were cases of high MVD tumors that have been resistant under anti VEGF therapy.

8. The 3D tumor angiogenesis *in vitro* model might be used for HCC angiogenic potential and the treatment individualization.
9. Liver tumors have a decreased portal blood flow and an increased hepatic arterial blood flow.
10. The increase of the hepatic artery flow and the decrease of the portal vein flow may raise the suspicion of a malignant tumor.
11. HCC has a wide range of circulatory characteristics: the loss of hierarchy in tumoral circulation might be a cause for the highly particular and paradoxal evolution, with inexplicable remission or prolonged stagnation periods; a particular vascularization pattern might suggest the response to the anti-angiogenic therapy.
12. The results of the simulation showed a good correlation with the real cases situations. The tumor will grow for a short period, but because the effective vessel density begins decreasing during the same period until it will be zero, the tumor will decrease in size too, reaching a steady state value. Because of the lack of vessels (i.e. nutrient and oxygen), the tumor will produce a very large quantity of angiogenic factors during the first period, which stimulate for a very short period an increase in the effective vessel density. Because the effective vessel density is zero, the tumor will become necrotic in this case, unlike the previous case when it was still vascularized so the chances were that it will develop metastases.
13. Gold nanoparticles functionalized with albumin have a very low cytotoxicity rate.
14. Alb-GNP nano biosystem represents an operative process of gold nanoparticles embedding.
15. In vivo laser therapy after Alb-GNPs delivery represents a successful method of selective tumoral necrosis. The optimal necrosis rate was obtained after a tissue concentration of 1-50mg/l.