

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Carcinomul hepatocelular – mecanisme de carcinogeneză și factori de risc

Doctorand: **Bogdan-Călin Pinte**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Etiologia carcinomului hepatocelular	17
2. Mecanisme patogenetice implicate în dezvoltarea carcinomului hepatocelular	
2.1. Modificări moleculare și căi patogenetice identificate în carcinogeneza hepatică	22
2.2. Patogeneza dezvoltării carcinomului hepatocelular asociată cu infecțiile virale cu virus hepatitic B și C, consumul de alcool și steato-hepatita non-alcoolică	25
3. Hepatocarcinogeneza. Aspecte morfofopatologice cu aplicabilitate clinică	27
4. Diagnosticul carcinomului hepatocelular precoce și al precursorilor acestuia. Biomarkeri clinici și patologici ai carcinogenezei hepatice	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 – Rolul biomarkerilor în diagnosticul hepatocarcinomului și al tumorilor mixte hepato-biliare. Neoplazii primare multiple în asociere cu hepatocarcinomul	
3.1. Introducere	45
3.2. Obiective	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	54
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 – Rolul biomarkerilor în predicția prognosticului hepatocarcinomului. Citocrom P₄₅₀1A2 ca marker de prognostic al stresului oxidativ și al recurenței hepatocarcinomului în infecția cronică cu VHC	
4.1. Introducere	71
4.2. Obiective	72
4.3. Material și metodă	72
4.4. Rezultate	76
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	90
5. Studiul 3 – Rolul celulelor stem canceroase în carcinogeneza hepatică. Caracterizarea riscului de recurență a hepatocarcinomului	
5.1. Introducere	91

5.2. Obiective	92
5.3. Material și metodă	92
5.4. Rezultate	96
5.5. Discuții	101
5.6. Concluzii	106
6. Concluzii generale	109
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	111
REFERINȚE	113

CUVINTE CHEIE: hepatocarcinom, colangiocarcinom, hepato-colangiocarcinom, celule stem canceroase hepatice, hepatocarcinogeneza, citocrom P₄₅₀1A2, neoplazii primare multiple, steato-hepatita non-alcoolică, virus hepatitic B, virus hepatitic C, noduli displazici hepatici, alfa-feto-proteina, antigen carbohidrat, recurența HCC.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiectivele tezei de doctorat

1. Studiul rolului biomarkerilor serici, histologici, imunohistochimici și de analiză moleculară în diagnosticul hepatocarcinomului și al tumorilor mixte hepato-biliare (hepato-colangiocarcinoame).
2. Diagnosticul diferențial al leziunilor primare hepatice (hepatocarcinom și colangiocarcinom) cu leziunile secundare reprezentate de metastazele hepatice ale adenocarcinomului colonic.
3. Evaluarea morfopatologică a metastazelor hepatice dezvoltate într-un ficat cirotic.
4. Studiul biologiei neoplaziilor primare multiple în asociere cu hepatocarcinomul și rolul acestora în procesul de management terapeutic.
5. Evaluarea rolului biomarkerilor identificați imunohistochimic în predicția prognosticului hepatocarcinomului după rezecție chirurgicală.
6. Evaluarea rolului citocromului P₄₅₀1A2 la pacienții cu hepatocarcinom dezvoltat în contextul unor infecții hepatice cronice de etiologie virală VHB sau VHC sau pe fond dismetabolic (steatoza hepatică non-alcoolică/steatohepatita non-alcoolică).

7. Validarea rolului citocromului P₄₅₀1A2 ca predictor al recurenței hepatocarcinomului asociat infecției cronice cu VHC în biopsiile hepatice.

8. Studiul rolului citocromului P₄₅₀1A2 ca marker al stresului oxidativ hepatic.

9. Identificarea celulele stem canceroase în hepatocarcinom și evaluarea rolului acestora în carcinogeneza hepatică.

10. Caracterizarea riscului de recurență tumorală relaționat cu prezența celulelor stem canceroase în hepatocarcinom.

11. Studiul relației dintre infecția cronică cu VHB și celulele stem canceroase hepatice, prin identificarea unor fenotipuri de hepatocarcinom cu agresivitate crescută și evoluție rapidă a bolii.

Metodologia generală

Teza cuprinde 3 studii clinice și de laborator efectuate în:

1. Departamentele de Gastroenterologie și Chirurgie generală al Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Octavian Fodor și Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, România

2. Laboratorul de biologie celulară tumorală al Institutului Oncologic Ion Chiricuță Cluj-Napoca, România și Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, România

3. Departamentul de Anatomie patologică și analiză moleculară al Institutului Clinic Humanitas, Milano, Italia și Universitatea de Studii din Milano, Italia

4. Departamentul de Hepato-gastroenterologie și Oncologie digestivă al Spitalului Saint André și Universitatea Bordeaux, Franța

5. Departamentul de Patologie, Universitatea de Medicină Yonsei, Seul, Coreea de Sud

6. Departamentul de Patologie, Universitatea Washington, Seattle, Statele Unite ale Americii

Studiile au fost efectuate în perioada 2009-2016.

Primul studiu care cuprinde analiza hepato-colangiocarcinomului și a depistării sincrone a metastazei hepatice a unui adenocarcinom colonic, prin efect biologic de “tumoră în tumoră” este un studiu unicentric efectuat la Institutul Clinic Humanitas Milano, Italia, cel de-al doilea studiu de validare a unui marker predictiv al prognosticului hepatocarcinomului în infecția cronică cu VHC este un studiu multicentric, european (Milano-Italia, Bordeaux-Franța), american (Seattle, SUA) și asiatic (Seul, Coreea de Sud), iar cel de-al treilea studiu este un studiu unicentric efectuat în colaborare cu cercetătorii Centrului de Cercetare asociat Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca.

Metode clinice:

- evaluarea și monitorizarea clinică a pacienților luați în studiu; urmărirea post-operatorie a acestora în vederea identificării unor posibile recidive tumorale și pentru cuantificarea timpului de supraviețuire fără recurență (RFS);
- preluarea, sortarea și analizarea datelor medicale din dosarele pacienților incluși în studiu; analiza datelor imagistice (ecografie abdominală, CT, RMN cu substanță de contrast) și a protocoalelor terapeutice după intervențiile chirurgicale hepatice;
- discutarea rezultatelor medicale în cadrul echipei multidisciplinare formată din gastroenterologi, imagiști, chirurghi hepatici și oncologi;
- compararea datelor obținute cu cele existente în literatură

Metode de laborator la nivel de:

1. laborator de analize biochimice:

- dozarea probelor hematologice, biochimice și a markerilor tumorali pentru încadrare în diagnostic, prelevate de la pacienți aflați în repaus alimentar timp de cel puțin 12 ore și efectuate pe analizoare automate;

2. laborator de anatomie patologică:

- piesele de rezecție hepatică ale leziunilor tumorale HCC/CC prelucrate prin fixare în soluție de formaldehidă 10 %, analizate macroscopic, iar probele din tumoră și din ficatul adiacent tumorii au fost incluse în parafină pentru analiza histopatologică;
- biopsii hepatice de la nivelul leziunii tumorale și a țesutului hepatic adiacent hepatocarcinomului;
- piesele colorate standard cu Hematoxilina-Eozina (HE); au fost realizate și colorații imunohistochimice pentru citocrom P₄₅₀1A2, HepPar1, MOC31, GPC3, HSP70, GS, CDX-2, CK19, EpCAM conform protocoalelor de lucru;

3. laborator de medicină moleculară și culturi celulare: în primul studiu s-a realizat analiza genomică mutațională a genei β -cateninei și a k-ras prin metoda PCR standardizată; în studiul al 3-lea, fragmentul tumoral recoltat a fost prelucrat pentru îndepărtarea sângelui, fragmentat și cultivat în medii de cultură specifice (DMEM/F12 îmbogățit); s-a urmărit formarea coloniilor de celule stem canceroase hepatice, expansiunea clonală și formarea sferelor tumorale; pentru confirmarea originii stem a celulelor cultivate, s-a realizat extracția și analiza ARN-ului genelor CXCR4 și Oct3/4 prin metoda RT-PCR și evidențierea celulelor CD133+ și CD90+ prin metoda imunocitochimică;

- în vederea evaluării rezistenței la chimioterapicele uzuale a CSC cultivate, s-a efectuat testul de excludere cu Rodamina 123 și testarea *in vitro* a celulelor la doxorubicină și carboplatină și s-a cuantificat numărul relativ de celule viabile prin analiză MTT standardizată.

Standardele eticii medicale:

Toate studiile au fost efectuate după obținerea consimțământului informat al pacienților și au respectat toate standardele eticii medicale.

Studiul 1. Rolul biomarkerilor în diagnosticul HCC și al tumorilor mixte hepato-biliare. Neoplazii primare multiple în asociere cu HCC

Rezultate

Caracterizarea clinică

Se descrie cazul unui barbat în vârstă de 59 ani, care s-a prezentat la spital cu simptomele unei impregnări neoplazice (astenii-fatigabilitate, scădere ponderală importantă, lipsa apetitului). Din antecedentele personale patologice se rețin: ciroza hepatică de etiologie etanolică și depistarea în urmă cu 6 luni a unui adenocarcinom al colonului transvers cu antigen carcino-embrionic (CEA) crescut care a fost rezecat chirurgical (pT₃N₀M₀).

Examenele clinice, paraclinice și biologice au indicat prezența unei formațiuni tumorale cu dimensiuni de 55 mm, situată la nivelul segmentelor hepatice VI-VII, cu aspect inomogen, fără dilatarea ductelor biliare retrograde, cu captare rapidă periferică în "inel" în faza arterială și captare în zona centrală în faza tardivă, creșterea alfa-feto-proteinei (AFP) serice și valori normale ale CEA și antigenului carbohidrat CA 19-9.

Având în vedere istoricul recent neoplazic al pacientului, s-a considerat că tumora ar putea fi o metastază hepatică a adenocarcinomului colonic, dar prezența CEA normală, creșterea AFP, aspectul imagistic (CT abdominal cu substanță de contrast) și prezența cirozei hepatice înclinau spre o leziune tumorală primară hepatică de tip hepatocarcinom, motiv pentru care pacientului i s-a propus și a acceptat efectuarea unei biopsii hepatice aspirative cu ac fin (FNA). Aceasta a identificat celule maligne de tip glandular, cu aspect puțin probabil a fi metastază de adenocarcinom colonic.

Pacientul fiind cu ciroză hepatică compensată Child-Pugh A, s-a intervenit chirurgical și s-a practicat rezecția formațiunii tumorale hepatice. Post-operator, recuperarea s-a realizat fără complicații majore. A decedat 4 luni mai târziu din cauza decompensării funcției hepatice pe fondul cirozei și a apariției metastazelor pulmonare.

Analiza anatomopatologică

Macroscopic, piesa de rezecție hepatică a prezentat, pe fondul unei ciroze micronodulare, o formațiune tumorală de 64x56x55 mm, neîncapsulată, cu aspect heterogen și în imediata vecinătate la distanțe sub-milimetrice, 5 leziuni nodulare cu dimensiuni între 5 și 10 mm diametru. Marginile de rezecție au fost libere de tumoră.

Din punct de vedere microscopic, tumora principală și 4 din cei 5 noduli sateliți prezentau un aspect heterogen cu structuri diferite celulare fuzionând unele într-altele de tip hepato-colangiocarcinom. Ariile de hepatocarcinom au fost pozitive pentru hepatocyte-paraffin 1 (HepPar1) și pentru panel-ul de markeri imunohistochimici: glican-3 (GPC3), proteina de șoc termic 70 (HSP70) și glutamin sintetază (GS), markeri

indicatori ai originii hepatocitare tumorale, iar ariile de colangiocarcinom au fost pozitive pentru colorațiile imunohistochemice cu MOC31.

În schimb, unul dintre nodulii sateliți prezenta structuri glandulare bine diferențiate, cu celulele tumorale pozitive la colorația cu imunomarkerii CK 20 și CDX-2, ceea ce a condus la diagnosticul de metastază hepatică a adenocarcinomului colonic.

Analiza genomică

Tumora principală prezenta imuno-reactivitate la colorația cu β -catenină, motiv pentru care s-a procedat la analiza genomică, mutațională a CTNNB1/ β -catenină din fragment de microdisecție recoltat de la nivelul tumorii principale și dintr-un nodul satelit. Totodată s-a procedat prin aceeași metodă la analiza mutațională a genei K-ras.

Analiza atentă a leziunii tumorale corelată cu colorațiile imunohistochemice, au descris la interfața dintre cele 2 tipuri tumorale, HCC și CC, arii celulare cu morfologie intermediară între componenta biliară și cea hepatocitară, cu fenotip al celulelor stem/progenitoare pozitive pentru molecula de adeziune a celulelor epiteliale (EpCAM).

Pe baza datelor clinice, anatomopatologice și moleculare obținute s-a susținut diagnosticul de neoplazie primară multiplă (NPM) constând în tumoră mixtă hepatobiliară, subtip cu caracteristici ale celulelor stem, stadiul IVA, pT_{3a}N₁M₀, cu identificare sincronă a unei metastaze hepatice de adenocarcinom colonic dezvoltate pe fondul unei ciroze hepatice etanolice Child-Pugh A prin fenomen biologic de „tumoră în tumoră”.

Pe baza datelor obținute și a studiilor existente, lucrarea a propus și un algoritm de diagnostic pozitiv și diferentiat al leziunilor hepatice primare.

Studiul 2. Rolul biomarkerilor în predicția prognosticului HCC. Citocromul P₄₅₀1A2 ca marker de prognostic al stresului oxidativ și al recurenței HCC în infecția cronică cu virus hepatitic C

Rezultate

Analiza clinică și patologică a cazurilor incluse în studiu

Majoritatea pieselor de rezecție tumorală au provenit de la subiecți bărbați (76,7%) cu o vârstă medie de 60,6 ani ($\pm 10,9$) și afectare hepatică în stadiu de ciroză (57,2%). Majoritatea pacienților au prezentat un singur nodul de HCC (139, 77,2%) cu o dimensiune medie tumorală de 4,5 cm ($\pm 3,5$), cu grad de diferențiere tumorală Edmonson-Steiner moderat până la slab diferențiat (G2-3) în 87,2 % din cazuri, în timp ce invazia vasculară microscopică a fost observată la 43,9%, cele mai multe fiind la cazurile de etiologie virală (în special infecție cronică virală HBV). În funcție de stadiul

BCLC, cazurile au fost distribuite aproximativ egal între stadiul A și B, cu doar 5 cazuri încadrate în stadiul C (2,8%), toate prezentând noduli de HCC dezvoltăți în contextul NAFLD/NASH. De remarcat este ponderea foarte scăzută a HCC dezvoltate în ficat remaniat cirotic pe fondul NAFLD/NASH (14,3%): la aceștia și dimensiunea tumorală a fost mult mai crescută fără de cazurile cu afectare virală (o medie 8,9 cm, dublă față de dimensiunea leziunilor tumorale din infecțiile virale), iar invazia microvasculară a fost redusă (22,9%). Intervenția chirurgicală a fost cu intenție curativă, la 89,4% din cazuri marginile de rezecție fiind negative. În timpul perioadei de urmărire post-operatorie, recurența s-a înregistrat la aproximativ jumătate din cazuri (51,7%), cele mai multe în HCC asociate cu infecție cronică virală C (63%), unde și rata subiecților cu margini de rezecție negativă a fost mai scăzută.

Ficatul extratumoral al pacienților cu HCC asociate cu infecție cronică HCV și NAFLD/NASH au prezentat, în majoritatea cazurilor, expresia scăzută a CYP1A2 la imunohistochimie, în timp ce hiperexpresia CYP1A2 a fost în mare parte o caracteristică a ficatului non-tumoral asociat infecției cronice VHB.

Prin compararea caracteristicilor subiecților incluși în cele 3 loturi, s-a observat că o serie de caracteristici clinico-patologice precum vârsta și sexul subiecților, multicentricitatea și dimensiunea HCC, prezența cirozei, gradul de recurență tumorală și expresia extratumorală a CYP1A2 au înregistrat diferențe semnificativ statistic.

Supraviețuirea după rezecția hepatică

Am analizat asocierea dintre factorii clinico-patologici și curbele de supraviețuire fără recurență ale pacienților incluși în studiu în funcție de loturile etiologice. Mediana timpului de supraviețuire fără recurență (RFS) a fost de 31 luni pentru întregul lot luat în studiu și de 23, 43,7 și respectiv 48 luni pentru loturile HCV, HBV și respectiv NAFLD/NASH considerate separat. În cadrul întregului lot de subiecți, analiza univariată a arătat că vârsta avansată și ciroza au fost asociate semnificativ statistic cu RFS mai scurt.

Analiza de supraviețuire a fost ulterior efectuată diferențiat pe cele 3 loturi cu etiologie diferită, date fiind biologia și heterogenitatea clinică a grupurilor.

În lotul pacienților cu VHC, analiza univariată a arătat că ciroza hepatică (HR 2,144, CI 1,034 - 4,322, $p=0,040$) și expresia imunohistochimică scăzută a CYP1A2 (HR 3,311, 95% CI 1,545-7,097, $p=0,002$) au fost asociate cu RFS scăzut la o valoare semnificativă statistic. În consecință, aceste două variabile au fost introduse în analiză multivariată, gradul tumorii fiind considerat factor de corecție. Analiza multivariată a indicat faptul că doar expresia scăzută a markerului CYP1A2 a fost asociată cu RFS la o valoare semnificativă statistic (HR 2.814, CI 1.300 - 6.093, $p=0.009$). De remarcat că în acest grup de pacienți cu infecție cronică cu VHC și HCC, expresia scăzută a CYP1A2 în țesutul hepatic peritumoral a fost asociată cu recurența postoperatorie într-un interval de maxim de 24 de luni la majoritatea cazurilor evaluate (22/34 cazuri, 65%).

În seria pacienților cu VHB, analiza univariată a arătat că doar prezența cirozei a fost semnificativ asociată cu RFS mai scurt (HR 4.294, 95% CI 1.698 - 10.856, $p=0.002$). Prin urmare, nu a mai fost efectuată analiză multivariată.

În lotul pacienților cu NAFLD/NASH, doar încadrarea stadială a HCC în stadiu inițial BCLC A s-a asociat semnificativ statistic cu RFS mai scurt (HR 4.331, CI 95% CI 1.086 - 17.277, $p=0.038$). Astfel, din cauza mărimii eșantionului și a rezultatelor, am decis să nu efectuăm o analiză multivariată.

Imunoreactivitatea CYP1A2 la cazurile “pereche” biopsie hepatică – piesă de rezecție tumorală hepatică

Expresia scăzută a CYP1A2 în piesele de rezecție chirurgicală a HCC la pacienții infectați cronic cu VHC indică un prognostic rezervat și posibilitatea de apariție a recurenței HCC în primele 24 de luni de monitorizare oncologică. În studiul nostru s-a dorit totodată extinderea și verificarea aplicabilității imunomarkerului la nivelul biopsiilor hepatice efectuate cu ocazia evaluării diagnostice a HCC. În acest sens, am evaluat performanța testului imunohistochimic în probe “perechi” recoltate de la același pacient înainte și după rezecția tumorală chirurgicală. Analizele au fost efectuate la 23 de cazuri care au prezentat atât biopsie hepatică preoperatorie cât și specimenul de rezecție hepatică prelevat la un interval de cel mult 3 luni de la diagnostic. Nu au fost observate diferențe semnificative între cele două probe perechi în ceea ce privește procentajul celulelor colorate imunoreactiv. Concordanța s-a realizat în majoritatea cazurilor (20/23 cazuri, 87%); La analiză, nici unul dintre cazurile clasificate ca având expresie scăzută a CYP1A2 în biopsia hepatică nu a fost încadrat ca având expresie crescută a CYP1A2 în piesa chirurgicală (NPV = 100%, PPV = 81,25%). Coeficientul de corelație Cohen kappa a fost de 0,72, indicând o corelație substanțială între biopsii și echivalentul din piesa chirurgicală.

Studiul 3. Rolul celulelor stem canceroase în carcinogeneza hepatică. Caracterizarea riscului de recurență a HCC

Rezultate

Evaluarea clinică, prelevarea probei tumorale și monitorizarea pacientului

Materialul biptic utilizat pentru izolarea CSC hepatice a provenit de la un pacient în vârstă de 47 ani, cu istoric de hepatită cronică virală B, tratat cu terapie antivirală care s-a prezentat în Departamentul de Gastroenterologie al Clinicii Medicală 3, Cluj Napoca în stare generală alterată, cu semne și simptome ale impregnării neoplazice (asteniefatigabilitate, scădere ponderală importantă).

Examinările efectuate au condus la diagnosticul de ciroză hepatică de etiologie virală B și un hepatocarcinom unicentric la nivelul segmentului VI hepatic cu dimensiuni de 20 mm fără semne imagistice de invazie loco-regională sau vasculară macroscopică, BCLC A.

La 3 luni după intervenția chirurgicală, pacientul a revenit la control ocazie cu care s-a efectuat examen RMN și dozarea AFP care nu au indicat recurența tumorii, dar la 2 ani după operație, cu ocazia reevaluării, s-a depistat un nou nodul de HCC.

Caracterizarea anatomopatologică a cazului

Piesa de rezecție chirurgicală a fost analizată în Laboratorul de Anatomie Patologică a Clinicii Medicală 3 și s-a observat că prezenta o proliferare de celule maligne de tip HCC, G2, înconjurată de o pseudocapsulă fibroasă pe care nu o invadează, fără imagini de invazie vasculară microscopică. Profilul diagnostic imunohistochimic efectuat a cuprins markerii: HepPar1, AFP, β -HCG, iar indicele de proliferare tumorală, ki67, a prezentat valori crescute - 20%.

Evidențierea creșterii CSC hepatice și formarea sferelor tumorale în mediu de cultură

Cu ocazia intervenției chirurgicale un fragment tumoral a fost prelevat și procesat în Laboratorul de Biologie celulară tumorală al Institutului Oncologic Ion Chiricuță Cluj-Napoca.

La aproximativ 12-14 zile de la procesarea în laborator a biopsiei hepatice și cultivarea fragmentelor în mediu adecvat de cultură, au fost observate la microscop în jurul explanturilor tumorale un monostrat de celule aderente cu aspect fibroblastic. În momentul în care acestea au atins subconfluența de 70-80% s-a realizat pasajul celulelor care au continuat să se dezvolte astfel încât la 24 zile s-au putut izola celule tumorale cu proprietăți stem/progenitoare având capacitatea de expansiune clonală și potențial proliferativ crescut, unele dintre acestea formând sfere tumorale de 15-20 celule stem agregate.

CSC hepatice exprimă gene ale celulelor stem/progenitoare

S-a urmărit expresia genelor specifice celulelor stem/progenitoare. În acest sens, ARN-ul obținut din monostratul aderent de celule a fost analizat prin metoda revers-transcriptazei - reacția în lanț a polimerazei (RT-PCR) pentru a se identifica genele CXCR4 și Oct-3/4, caracteristice acestor celule.

În etapa următoare s-a obținut prin colorare imunocitochimică și imunofluorescența CSC hepatice cu markeri specifici ai celulelor stem canceroase universale CD133+ și CD90+.

CSC organizate sub formă de sfere tumorale sunt rezistente la chimioterapia convențională

În studiul nostru am demonstrat indirect prezența pompei de eflux (transportatorul proteic transmembranar ABCG2) de la nivelul membranei CSC hepatice, cu ajutorul testului de excludere a colorantului fluorescent Rodamina 123. Întrucât Rodamina folosește aceleași căi de eflux membranar ca și chimioterapicele folosite în tratamentele oncologice, s-a putut determina dacă sferile tumorale obținute din cultură au exprimat proteinele responsabile de rezistența multiplă la medicamente. Astfel s-a observat că CSC hepatice au prezentat un eflux direct al colorantului Rodamina 123 de două sau de trei ori mai mare decât celulele ovariene diferențiate (MLS) sau fibroblaștii pulmonari (HFL), luate ca și control, confirmând astfel multi-rezistența la chimioterapicele convenționale.

Pentru a examina dacă CSC hepatice prezintă fenotipul de chimio-rezistență multiplă întâlnit la celulele stem/progenitoare, am testat sensibilitatea celulară la carboplatină și doxorubicină în condiții de celule stem. S-a observat că atât la 24 de ore cât și la 48 de ore de la cultivarea în condițiile descrise mai sus și adăugarea dozelor terapeutice de chimioterapice, CSC hepatice au fost cel puțin de 2 ori mai rezistente la agenții citostatici, în comparație cu liniile de celule normale, respectiv tumorale luate în studiu.

Rezultatele evidențiază rolul CSC în rezistența tumorii la chimioterapice precum și posibilitatea de recurență tumorală.

Concluzii generale

1. Studiile noastre au arătat că hepatocarcinomul este o tumoră hepatică cu fenotip heterogen.
2. Hepato-colangiocarcinomul (cHCC-CC) este o tumoră primară hepatică rară, care prezintă caracteristici clinice, biologice și imagistice dificil de evaluat preoperator, diagnosticul fiind în majoritatea cazurilor stabilit în urma analizei anatomopatologice a piesei de rezecție chirurgicală prin analiza imunohistochimică și ocazional genică mutațională.
3. Metastazele hepatice ale adenocarcinomului colonic, deși frecvente într-un ficat indemn, sunt rare în ciroza hepatică. Clinicianul are obligația de a analiza posibilitatea ca în prezența unei leziuni focale hepatice la un pacient cunoscut cu istoric de adenocarcinom colonic și ciroză să ia în considerare un posibil diagnostic de determinare secundară.

4. Descoperirea sincronă a unui hepato-colangiocarcinom și a unei metastaze hepatice a unui adenocarcinom prin fenomen biologic de “tumoră în tumoră” este un eveniment biologic incidental, dar posibil.

5. În vederea unui management clinic adecvat, în cazul în care se decelează o formațiune tumorală hepatică cu aspect biologic și imagistic complex, iar aceasta este nerezecabilă sau statusul funcțional al pacientului nu permite intervenția chirurgicală, ar trebui efectuate biopsii lezionale multiple din arii diferite ale tumorii.

6. Pentru a înțelege dezvoltarea sincronă a unor tumori primare cu mecanisme de carcinogeneză diferite, va fi necesară extinderea cercetării acestor tipuri de tumori prin analize moleculară și genetice complexe.

7. Expresia hepatică al citocromului P450 1A2, marker al stresului oxidativ, diferă la nivel tisular în funcție de mecanismele de carcinogeneză implicate în dezvoltarea hepatocarcinomului. Astfel s-au observat variații importante de expresie imunohistochimică a acestuia în diferite micromedii hepatice - infecții cronice virale cu VHC sau VHB și respectiv în contextul afectării dismetabolice a ficatului - steatoza hepatică/steato-hepatită non-alcoolică.

8. Citocromul P₄₅₀1A2, confirmat ca marker predictiv al recurenței HCC incipient “early” incipient indiferent de etiologia hepatică cronică, a fost demonstrat în studiul nostru ca marker predictor al recurenței tuturor formelor evolutive de HCC cu fenotip agresiv asociat infecției cronice hepatice cu VHC.

9. Citocromul P₄₅₀1A2 a fost validat ca predictor al recurenței HCC asociat infecției cronice cu VHC în biopsiile hepatice efectuate pentru stabilirea diagnosticului.

10. Studiul de izolare a celulelor stem canceroase hepatice CD133+CD90+ prelevate dintr-un HCC, explică rolul acestor celule în procesul de carcinogeneză hepatică. Deși s-a considerat inițial că HCC se dezvoltă predominant prin transformare mutațională a hepatocitelor diferențiate, identificarea și caracterizarea markerilor celulelor stem canceroase confirmă evoluția multistadială și evolutivă a hepatocarcinomului de la nivelul celulei stem/primoriale.

11. Prezența markerilor de suprafață ale celulelor stem canceroase hepatice cu potențial agresiv și tumorigen și corelația dintre prezența acestora și recurența rapidă a HCC după rezecție chirurgicală confirmă statutul de markeri ai recurenței rapide tumorale a CD133+CD90+.

12. Celulele stem canceroase izolate din HCC prezintă multi-rezistență la chimioterapicele uzuale comparativ cu alte linii celulare diferențiate sau stem normale.

Fenomenul implică adaptarea managementului oncologic al HCC prin identificarea unor ținte terapeutice noi, reprezentate prin structuri proteice de suprafață ale celulelor stem canceroase.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza a urmărit aspecte legate de implicarea factorilor de risc ai hepatocarcinomului în procesul de carcinogeneză hepatică și, de asemenea, posibilități de evaluare a evoluției hepatocarcinomului (diagnostic, progresie, risc de recurență). Hepatocarcinomul fiind o tumoră primară cu origine la nivelul celulei stem hepatice care are potențial de diferențiere bidirecțională pe linie hepatocitară și colangiocitară, au fost analizate și forme mixte de tumori hepatice primare.

În prezenta cercetare s-a confirmat totodată rolul deosebit de important al markerilor imunohistochimici în stabilirea diagnosticului unui proces malign.

O altă contribuție personală a constat în analiza stresului oxidativ la nivel ficatului și a implicațiilor acestuia în procese de carcinogeneză hepatică.

Originalitatea tezei constă în faptul că reprezintă:

- primul studiu din literatură în care este caracterizată asocierea sincronă dintre o tumoră hepatică mixtă de tip hepato-colangiocarcinom și o determinare secundară a unui adenocarcinom colonic; s-a realizat totodată și stabilirea etapelor clinice, biologice și anatomopatologice pentru confirmarea diagnosticului de "tumoră în tumoră" și s-a introdus un algoritm de diagnostic diferențial a hepato-colangiocarcinomului cu alte tipuri de tumori (primare sau secundare).

- primul studiu din literatură în care a fost evaluat și s-a stabilit rolul citocromului P₄₅₀ 1A2 ca marker predictor al recurenței hepatocarcinomului cu fenotip agresiv în infecția cronică cu virus hepatic C; acesta a fost validat la nivelul parenchimului hepatic adiacent hepatocarcinoamelor rezecate chirurgical, precum și în biopsiile hepatice, reprezentând astfel un instrument valoros de stabilire a prognosticului HCC anterior efectuării manoperelor intervenționale.

- colaborarea la primul studiu standardizat efectuat în România de izolare și caracterizare a populațiilor de celule stem canceroase hepatice izolate dintr-un hepatocarcinom. Pe baza prezenței markerilor de suprafață ai acestor celule la nivelul tumorii s-a caracterizat riscul de recurență a HCC în special în tumorile asociate cu infecție cronică cu VHB; totodată studiul a indicat optimizarea tratamentului medicamentos oncologic bazat pe ținte terapeutice reprezentate de celulele stem canceroase hepatice.

“IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Hepatocellular carcinoma - mechanisms of carcinogenesis and risk factors

PhD Candidate: **Bogdan-Călin Pinte**

PhD Coordinator: **Prof. Dr. Monica Acalovschi**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma	17
2. Pathogenetic mechanisms involved in the development of hepatocellular carcinoma	
2.1. Molecular changes and pathogenetic pathways identified in hepatic carcinogenesis	22
2.2. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma development associated with hepatitis B and C viral infections, alcohol consumption and nonalcoholic steatohepatitis	25
3. Hepatocarcinogenesis. Morpho-pathological aspects with clinical applicability	27
4. Diagnosis of early hepatocellular carcinoma and its precursors. Clinical and pathological biomarkers of hepatocarcinogenesis	34
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Objectives	39
2. General methodology	41
3. Study 1 - The role of biomarkers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and mixed hepatobiliary tumors. Multiple primary neoplasms related to hepatocellular carcinoma	
3.1. Introduction	45
3.2. Objectives	46
3.3. Material and method	46
3.4. Results	46
3.5. Discussion	54
3.6. Conclusions	69
4. Study 2 - The role of biomarkers in predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma. Cytochrome P₄₅₀1A2 as marker of prognosis for oxidative stress and the recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV chronic infection	
4.1. Introduction	71
4.2. Objectives	72
4.3. Material and method	72
4.4. Results	76
4.5. Discussion	83
4.6. Conclusions	90
5. Study 3 - The role of cancer stem cells in hepatocarcinogenesis. Risk characterization of hepatocellular carcinoma recurrence	
5.1. Introduction	91

5.2. Objectives	92
5.3. Material and method	92
5.4. Results	96
5.5. Discussion	101
5.6. Conclusions	106
6. General conclusions	109
7. Originality and innovative contributions of the thesis	111
REFERENCES	113

KEYWORDS: hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, liver cancer stem cells, hepatocarcinogenesis, cytochrome P₄₅₀1A2, multiple primary neoplasm, nonalcoholic steatohepatitis, hepatitis B virus, hepatitis C virus, dysplastic liver nodules, alpha-fetoprotein, carbohydrate antigen, HCC recurrence.

PERSONAL CONTRIBUTION

The thesis objectives

1. The study of the role of serum, histological, immunohistochemical and of molecular analysis biomarkers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and of mixed hepatobiliary tumors (combined hepatocellular-cholangiocarcinomas).
2. The differential diagnosis of primary liver lesions (hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma) with liver metastases of colon cancer.
3. The morpho-pathological assessment of hepatic metastases developed in a cirrhotic liver.
4. The study of multiple primary neoplasms biology in association with hepatocellular carcinoma and their role in the process of therapeutic management.
5. Assessing the role of immunohistochemically identified biomarkers in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after surgical resection.
6. Assessing the role of cytochrome P₄₅₀1A2 in patients with hepatocellular carcinoma developed in the context of chronic liver infection of HBV or HCV viral etiology or on a dysmetabolic background (nonalcoholic hepatic steatosis/nonalcoholic steatohepatitis).
7. The validation of cytochrome P₄₅₀1A2 role as predictor of HCV chronic liver infection related hepatocellular carcinoma recurrence in liver biopsies.

8. The study of the role of cytochrome P₄₅₀1A2 as marker of hepatic oxidative stress.
9. The identification of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma and the assessment of their role in hepatocarcinogenesis.
10. The risk characterization of tumor recurrence in association with the presence of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma.
11. The study of the relationship between HBV chronic infection and liver cancer stem cells by identifying some hepatocellular carcinoma phenotypes with increased aggressiveness and rapid disease progression.

General methodology

The thesis consists of 3 clinical and laboratory studies conducted in:

1. Departments of Gastroenterology and General Surgery of "Octavian Fodor" Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology and of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Romania.
2. Tumor Cell Biology Laboratory of the "Ion Chiricuță" Institute of Oncology and "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania.
3. Department of Pathological Anatomy and Molecular Analysis of the Humanitas Clinical Institute and the State University of Milan, Italy.
4. Department of Hepato-Gastroenterology and Digestive Oncology of Saint André Hospital and Bordeaux University, France.
5. Department of Pathology, Yonsei University of Medicine, Seoul, South Korea.
6. Department of Pathology, Washington University, Seattle, United States.

The studies were conducted between 2009-2016.

The first study, which includes the analysis of hepatocellular-cholangiocarcinoma and the synchronous detection of hepatic metastases of a colon cancer through the "tumor-in-tumor" biological effect, is a single-center study conducted at the Humanitas Clinical Institute of Milan, Italy. The second one, a validation study for a predictive marker of hepatocellular carcinoma prognosis in HCV chronic infection is a multicenter European (Milan-Italy, Bordeaux-France), American (Seattle, USA) and Asian (Seoul, South Korea) study. The third study is a single-center study conducted in collaboration with researchers of the Research Center associated to "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

Clinical methods:

- clinical evaluation and monitoring of the patients under study; their post-operative follow-up in order to identify possible tumor relapses and to quantify recurrence-free survival time (RFS);

- gathering, sorting and analyzing the data from the medical records of patients included in the study; the analysis of imaging data (abdominal ultrasound, CT scan, MRI scan with contrast) and of therapeutic protocols after liver surgery;
- discussing medical results within the multidisciplinary team composed of gastroenterologists, radiologists and liver cancer surgeons;
- comparing the data obtained with those in the existing literature.

Laboratory methods:

1. Biochemical Analysis Laboratory:

- the dosing of haematological and biochemical samples and of tumor markers taken from patients who have fasted for at least 12 hours and which were performed on automated analyzers for framing in the diagnosis.

2. Pathological Anatomy Laboratory:

- liver resection pieces of HCC/CC tumor lesions processed through fixation with 10% formaldehyde solution, macroscopically analyzed and liver samples from the tumor and from the liver adjacent to the tumor were embedded in paraffin for histological analysis;
- liver biopsies of the tumor lesions and of liver tissue samples adjacent to the hepatocellular carcinoma;
- Hematoxylin and Eosin (H&E) standard staining of the pieces; Immunohistochemical stainings for cytochrome P₄₅₀1A2, HepPar1, MOC31, GPC3, HSP70, GS, CDX-2, CK19, EpCAM were also performed according to protocols.

3. Molecular Medicine and Cell Culture Laboratory:

- in the first study it was conducted a genomic analysis of β -catenin gene and k-ras mutations through the PCR standardized method; in the third study, the collected tumor fragment was processed for removing the blood, then fragmented and cultured in specific culture media (enriched DMEM/F12); the liver cancer stem cells colony formation, clonal expansion and tumor spheres formation were monitored; in order to confirm the origin of the cultured stem cells, the extraction and analysis of CXCR4 and Oct3/4 genes RNA through the RT-PCR method and the highlighting of CD133+ and CD90+ cells through the immunocytochemical method were performed;
- in order to assess the resistance to the usual chemotherapeutic agents of cultured CSCs, the exclusion test with Rhodamine-123 and an *in vitro* testing of cells sensitivity to doxorubicin and carboplatin were performed and the relative number of viable cells was quantified through MTT standardized assay.

Standards of medical ethics:

All studies were performed after obtaining the informed patient consent and its complied with all medical ethics standards.

Study 1. The role of biomarkers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and mixed hepatobiliary tumors. Multiple primary neoplasms related to hepatocellular carcinoma

Results

The clinical characterization

The case of a 59-year-old man who presented to the hospital with the symptoms of a neoplastic spread (asthenia-fatigue, significant weight loss, lack of appetite) is further described. His personal pathological history includes alcoholic liver cirrhosis and the detection of an adenocarcinoma of the transverse colon with increased carcinoembryonic antigen (CEA) which was surgically-resected (pT₃N₀M₀) 6 months ago.

Clinical, paraclinical and biological exams indicated the presence of a 55 mm heterogenous tumor, located in the VI-VII liver segments, without dilated bile ducts, with a rapid peripheral capture in the "ring" in the arterial phase and a capture in the central area in the late phase, an increased Alpha-fetoprotein (AFP) and normal levels of CEA and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9).

Given to the recent neoplastic history of the patient, it was considered that the tumor could be a liver metastasis of the colon cancer, but the presence of CEA value within normal range, the increased values of AFP, the imaging features (abdominal CT with contrast) and the presence of liver cirrhosis pointed out towards a primary hepatic tumor. A fine needle aspiration biopsy of the liver (FNA) was proposed to the patient and he agreed and this showed malignant cells not related to a hepatocellular carcinoma.

The patient being with a Child-Pugh A liver cirrhosis, surgery was performed and the liver tumor was resected. Postoperative recovery was achieved without major complications. He died four months later due to liver function decompensation caused by cirrhosis and to the appearance of pulmonary metastases.

The anatomopathological analysis

Macroscopically, the liver resection sample presented a non-encapsulated, heterogeneous 64x56x55 mm tumor, with a background of micronodular cirrhosis, and in its close proximity, at sub-millimeter distances, 5 nodular lesions between 5 and 10 mm in diameter. The resection margins were free of tumor.

Microscopically, the main tumor and 4 of the 5 satellite nodules had a heterogeneous appearance with different cellular structures merging into each other and composing a hepatocellular-cholangiocarcinoma.

The hepatocellular carcinoma areas were positive for hepatocyte-parafrin 1 (HepPar1) and for immunohistochemical markers panel: glypican-3 (GPC3), heat shock

protein 70 (HSP70) and glutamine synthetase (GS) – 3 putative markers of hepatocellular malignancy, while the cholangiocarcinoma areas were positive for immunohistochemical stainings with MOC31.

In contrast, one of the satellite nodules presented well-differentiated glandular structures with positive tumor cells for CK 20 and CDX-2 staining immunomarkers, leading to the diagnosis of liver metastasis of the colon cancer.

The genomic analysis

The primary tumor presented immunoreactivity for β -catenin staining, so a genomic analysis of CTNNB1/ β -catenin mutations of a microdissection fragment collected from the main tumor and from a satellite nodule was performed. At the same time, K-ras gene mutation analysis was performed using the same method.

A careful analysis of the tumor lesion correlated with immunohistochemical stainings indicated at the interface between the two types of tumor, HCC and CC, cellular areas with intermediate morphology between the biliary and hepatocyte components, with phenotype of positive stem/progenitor cells for epithelial cell adhesion molecule (EpCAM).

Based on the clinical, anatomopathological and molecular data obtained, the diagnosis of multiple primary neoplasms (MPN) was sustained, consisting of a mixed hepatobiliary tumor, with subtype of stem cell characteristics, stage IVA, pT_{3a}N₁M₀, with synchronous identification of a liver metastasis of colon cancer developed on a Child-Pugh A alcoholic liver cirrhosis through a biological "tumor-to-tumor" mechanism.

Based on the obtained data and on existing studies, the paper also proposed an algorithm for positive and differential diagnosis of primary liver cancers.

Study 2 - The role of biomarkers in predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma. Cytochrome P₄₅₀1A2 as marker of prognosis for oxidative stress and the recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV chronic infection

Results

The clinical and pathological analysis of cases included in the study

Most of the tumor resection pieces were obtained from male subjects (76.7%) with an average age of 60.6 years (\pm 10.9) and cirrhosis (57.2%). Most patients presented a single HCC nodule (139, 77.2%) with a mean tumor size of 4.5 cm (\pm 3.5), with a moderate to poorly degree of tumor differentiation in the Edmonson-Steiner grading system (G2-3) in 87,2% of the cases, while the microscopic vascular invasion was

observed in 43.9% of the patients included in the study, most of them being related of viral etiology (especially HBV chronic infection).

Depending on the BCLC stage, the cases were approximately equally distributed between stage A and B, with only 5 cases of stage C (2.8%), all these presenting HCC nodules developed in the context of NAFLD/NASH.

It is remarkable the very low proportion of HCC developed in a cirrhotic liver on the field of NAFLD/NASH (14.3%): in these cases even the tumor size was much higher than in the viral related-HCC cases (8.9 cm on average, twice the size of tumor lesions in viral infections), and the microvascular invasion was reduced (22,9%). Surgery was performed with curative intention, in 89.4% of cases the resection margins being negative. During the postoperative follow-up period, recurrence was recorded in about half the cases (51.7%), most of them in HCC associated with hepatitis C virus infection (63%), where also the cases with negative resection margins was lower.

The extratumoral liver of patients with HCC associated with chronic HCV infection and NAFLD/NASH in most cases presented a low expression of CYP1A2 at immunohistochemistry, whereas CYP1A2 hyperexpression was largely a feature of nontumoral liver associated with chronic HBV infection.

By comparing the characteristics of the subjects included in the three groups, it has been observed that a number of clinicopathological features such as subjects' age and gender, the multicentricity and size of HCC, the presence of cirrhosis, the degree of tumor recurrence and the extra-tumoral expression of CYP1A2 recorded statistically significant differences.

Survival after liver resection

The association between clinicopathological factors and recurrence-free survival curves of patients included in the study and divided by etiological groups was first analyzed. The median time of recurrence-free survival (RFS) was 31 months for the entire study group and 23, 43.7 and 48 months for the HCV, HBV and NAFLD/NASH groups, respectively considered separately. In the whole group of subjects, univariate analysis showed that advanced age and cirrhosis were statistically significant associated with shorter RFS.

The survival analysis was subsequently differentiated on the three groups with different etiology, given to the clinical biology and heterogeneity of the groups.

In the HCV patients, univariate analysis showed that cirrhosis (HR 2,144, CI 1,034-4,322, $p=0,040$) and low immunohistochemical expression of CYP1A2 (HR 3,311, 95% CI 1,545-7,097, $p=0,002$) were statistically significant associated with low RFS. Consequently, these two variables were introduced into a multivariate analysis, the tumor grade being considered the correction factor. The multivariate analysis indicated that only the low expression of the CYP1A2 marker was statistically significant associated with RFS (HR 2.814, CI 1.300-6.093, $p=0.009$). It was noted that in this group of patients with chronic HCV infection and HCC, low expression of CYP1A2 in the peritumoral liver

tissue was associated with postoperative recurrence within a maximum of 24 months in most of the evaluated cases (22/34 cases, 65%).

In the HBV patients series, univariate analysis showed that only the presence of cirrhosis was significantly associated with shorter RFS (HR 4.294, 9.5% CI 1.698-10.856, $p=0.002$). Therefore, multivariate analysis has not been performed.

In the group of patients with NAFLD/NASH, only early stage HCC (BCLC staging system) was significantly associated with shorter RFS (HR 4.331, CI 95% CI 1086-17277, $p=0.038$). Thus, due to sample size and results, we decided not to perform a multivariate analysis.

CYP1A2 immunoreactivity in "paired" cases of liver biopsy - liver tumor resection samples

The low expression of CYP1A2 in HCC surgical resection samples for HCV infected patients indicates a negative prognosis and the possibility of HCC recurrence within the first 24 months of oncological monitoring. The current study also intended to extend and verify the applicability of this immunomarker at the level of liver biopsies performed for the diagnosis of HCC. Therefore, we evaluated the performance of the immunohistochemical test in "paired" samples collected from the same patient before and after surgical tumor resection. The analyses were performed in 23 cases that presented both preoperative hepatic biopsy and liver resection specimen collected at the latest 3 months after diagnosis. There were no significant differences between the two paired samples in terms of percentage of immunoreactively stained cells. Consistency was achieved in the majority of cases (20/23 cases, 87%). In the analysis, none of the cases classified as having low CYP1A2 expression in liver biopsy was classified as having increased CYP1A2 expression in the surgical specimen (NPV = 100%, PPV = 81.25%). Cohen's kappa coefficient was 0.72, indicating a substantial correlation between the biopsies and their equivalent in the surgical specimen.

Study 3 - The role of cancer stem cells in hepatocarcinogenesis. Characterization of the risk of hepatocellular carcinoma recurrence

Results

Clinical evaluation, tumor sampling and patient monitoring

The bioptic material used for the isolation of liver CSCs originated from a 47-year-old patient with a history of chronic hepatitis B, treated with antiviral therapy that presented to the Department of Gastroenterology of 3rd Medical Clinic, Cluj-Napoca with symptoms of neoplastic spread (asthenia-fatigue, significant weight loss).

The performed examinations led to the diagnosis of cirrhosis of viral etiology B and a uninodular hepatocellular carcinoma of 20 mm located in the VI liver segment, without imaging signs of macroscopic locoregional or vascular invasion, BCLC A.

Three months after surgery, the patient returned for a follow-up visit and had performed an MRI scan and AFP dosing that did not indicate tumor recurrence, but two years after surgery, during re-evaluation, a new HCC nodule was detected.

The anatomopathological characterization of the case

The surgical resection sample was analyzed in the Pathological Anatomy Laboratory of 3rd Medical Clinic and it was observed that there was a proliferation of HCC G2 malignant cells, surrounded by a fibrous pseudocapsula which was not invaded, without imaging of microscopic vascular invasion.

The performed immunohistochemical diagnostic included the following markers: HepPar1, AFP, β -HCG, and the tumor proliferation index, Ki67 which showed increased values - 20%.

The highlighting of liver CSCs growth and the tumor spheres formation in culture medium

During surgery, a tumor fragment was collected and processed in Tumor Cell Biology Laboratory of the "Ion Chiricuță" Institute of Oncology Cluj-Napoca.

Approximately 12-14 days after the laboratory processing of liver biopsy and cultivating the fragments in the appropriate culture medium, a monolayer of adherent fibroblast-like cells was observed at the microscope around the tumor explants.

When they reached 70-80% subconfluence, a passage was performed for the cells which continued to develop, so that in 24 days tumor cells with stem/progenitors features have been isolated with clonal expansion capacity and increased proliferative potential, some of them forming tumor spheres of 15-20 aggregated stem cells.

Liver CSCs express stem/progenitor cell genes

The expression of the stem/progenitor cells specific genes was followed. Therefore, the RNA obtained from the adherent cell monolayer was analyzed through the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to identify the CXCR4 and Oct-3/4 genes characteristic of these cells. In the next phase, through immunocytochemical staining and immunofluorescence, liver CSCs with specific markers of universal cancer stem cells CD133+ and CD90+ were obtained.

CSCs in the form of tumor spheres are resistant to conventional chemotherapy

The current study indirectly proved the presence of the efflux pump (transmembrane protein transporter ABCG2) from the liver CSCs membrane using the Rhodamine-123 fluorescent dye exclusion test. Since Rhodamine uses the same membrane efflux pathways as those used in chemotherapy treatment, it could determine whether the tumor spheres obtained from culture expressed the responsible protein for multidrug resistance. Thus, it was observed that hepatic CSCs showed a two to three times higher direct efflux of Rhodamine-123 dye than ovarian differentiated tumor cells (MLS) or pulmonary fibroblasts (HFL), taken as control variables, thus confirming the multi-resistance to conventional chemotherapies.

To examine whether hepatic CSCs exhibit the multiple chemo-resistance phenotypes encountered in stem/progenitor cells, the cellular sensitivity to carboplatin and doxorubicin under stem cell conditions was tested. It was observed that both at 24 hours and at 48 hours after cultivation under the conditions described above and by adding the chemotherapy therapeutic doses, liver CSCs were at least twice as resistant to cytotoxic agents as compared to normal and tumor cell lines included in the study.

The results highlight the role of CSCs in tumor resistance to chemotherapy and the possibility of tumor recurrence.

General conclusions

1. The conducted studies have proved that hepatocellular carcinoma is a heterogeneous phenotype liver tumor.
2. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (cHCC-CC) is a rare primary liver tumor, presenting clinical, biological and imaging features difficult to assess preoperative, the diagnosis being in most of the cases established at anatomopathological analysis of the surgical resection piece through immunohistochemical analysis and, occasionally, by gene mutations analysis.
3. Liver metastases of colon cancer, although common in a healthy liver, they are rare in liver cirrhosis. The clinician has the obligation to analyze the possibility of a focal liver lesion presence in a patient with a history of colorectal adenocarcinoma and cirrhosis and to consider a possible secondary diagnosis.
4. The synchronous discovery of a hepatocellular-cholangiocarcinoma and of a hepatic adenocarcinoma metastasis through the biological "tumor-to-tumor" phenomenon is an accidental, but possible, biological event.

5. For a proper clinical management, if a liver tumor with complex imagistic and biological aspect is revealed, and the tumor is unresectable due to the patient functional status, multiple lesion biopsies from different tumor areas should be performed for proper diagnosis.

6. In order to understand the synchronous development of primary tumors with different carcinogenesis mechanisms, it will be necessary to extend the research of these types of tumors through complex molecular and genetic analysis.

7. The liver cytochrome P₄₅₀ 1A2 expression, a marker of oxidative stress, varies at tissular level according to the mechanisms of carcinogenesis involved in the development of hepatocellular carcinoma. Thus, significant immunohistochemical expression variations were observed in various liver microenvironments - chronic HCV/HBV infections and in the context of liver dysmetabolic damage - hepatic steatosis/non-alcoholic steatohepatitis.

8. Cytochrome P₄₅₀1A2, confirmed as an early HCC recurrence predictive marker regardless of the chronic liver etiology, in the current study proved to be a predictive marker of all evolutionary forms of HCC recurrence with aggressive phenotype associated with HCV chronic liver infection.

9. Cytochrome P₄₅₀1A2 has been validated as a predictor of HCC recurrence associated with HCV chronic liver infection within the liver biopsies performed for diagnosis.

10. The isolation study of CD133+ and CD90+ liver cancer cells collected from a HCC explains the major role of these cells in the liver carcinogenesis process. Although, initially was thought that HCC was predominantly developed through mutational transformation of differentiated hepatocytes, the identification and characterization of cancer stem cells markers confirm the multistage and evolutionary progress of hepatocellular carcinoma from the stem cells.

11. The presence of liver cancer stem cells surface markers with aggressive and tumorigenic potential and the correlation between their presence and the rapid recurrence of HCC after surgical resection confirmed CD133+ and CD90+ status of rapid recurrence tumor markers.

12. The isolated cancer stem cells from HCC have multi-resistance to common chemotherapies compared to other differentiated or normal stem cell lines. The mechanism involves adapting the HCC oncology management by identifying new therapeutic targets represented by surface protein structures of cancer stem cells.

Originality and innovative contributions of the thesis

The thesis focused on aspects related to the involvement of hepatocellular carcinoma risk factors in the liver carcinogenesis process and also on possible methods of assessing the evolution of HCC (diagnosis, progression, risk of recurrence).

The hepatocellular carcinoma, being a primary tumor originated from the liver stem cells that have the potential for bi-directional differentiation on the hepatocyte and colangiocytic line, mixed forms of primary hepatic tumors were also analyzed.

The current study also confirmed the important role of immunohistochemical markers in establishing the diagnosis of a malignant process.

Another important personal contribution consisted in the analysis of liver oxidative stress and its implications in liver carcinogenesis process.

The originality of the thesis consists of:

- is the first study in the literature that characterizes the synchronous association of a mixed hepatic tumor (hepatocellular-cholangiocarcinoma) with a secondary determination of colon cancer; the clinical, biological and anatomopathological stages to confirm the "tumor-in-tumor" diagnosis and a differential diagnosis algorithm for hepatocellular- cholangiocarcinoma with other types of tumors (primary or secondary) were established.
- is the first study in the literature in which the role of cytochrome P₄₅₀1A2 as a predictive marker for hepatocellular carcinoma recurrence with aggressive phenotype in chronic hepatitis C virus infection was evaluated and established; this was validated at the level of hepatic parenchyma adjacent to surgically resected hepatocellular carcinomas as well as in liver biopsies, thus representing a valuable tool for establishing prognosis of HCC prior to interventional surgery.
- the collaboration on the first standardized study conducted in Romania to isolate and characterize populations of liver cancer stem cells isolated from a hepatocellular carcinoma. Based on the presence of surface markers of these tumor cells, the HCC risk of recurrence was characterized, particularly in tumors associated with chronic HBV infection, was characterized; at the same time, the study indicated the optimization of oncologic drug therapy based on therapeutic targets represented by liver cancer stem cells.