
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Moleculele de adeziune celulară și metaloproteinazele matriceale în infecțiile cronice hepatice virale B și C

Doctorand: **Irena Nedelea**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Hepatitele virale B și C	5
1.1. Date epidemiologice	5
1.2. Istoria naturală	6
1.3. Răspunsul imun antiviral	8
1.3.1. Rezistența imună nespecifică	8
1.3.2. Răspunsul imun adaptativ	10
1.4. Fibrogena hepatică indusă viral – mecanisme celulare și moleculare	11
2. Moleculile de adeziune celulară – definiție, clasificare și funcții	15
3. Metaloproteinazele matriceale – definiție, clasificare și funcții	21
4. Moleculile de adeziune celulară și metaloproteinazele matriceale – rol în hepatopatiile virale	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	29
1. Ipoteza de lucru/obiective	31
2. Metodologie generală	32
3. Studiul 1 - Moleculile de adeziune celulară – rol și impact în infecțiile cronice hepatice virale B și C	35
3.1. Introducere	35
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	35
3.3. Material și metodă	36
3.4. Rezultate	37
3.5. Discuții	42
3.6. Concluzii	43
4. Studiul 2 - Metaloproteinazele matriceale – rol și impact în infecțiile cronice hepatice virale B și C	45
4.1. Introducere	45
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	45
4.3. Material și metodă	46
4.4. Rezultate	48

4.5. Discuții	57
4.6. Concluzii	64
5. Studiul 3 - Studiu pilot de conturare a semnăturii genetice a țesutului tumoral hepatocelular	65
5.1. Introducere	65
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
5.3. Material și metodă	66
5.4. Rezultate	73
5.5. Discuții	87
5.6. Concluzii	91
6. Concluzii generale	93
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	97
REFERINȚE	99

Cuvinte cheie:

răspuns imun, molecule de adeziune celulară, metaloproteinaze matriceale, fibrogeneza hepatică indusă viral

Introducere

Hepatitele cronice de etiologie virală sunt o reală problemă de sănătate publică în întreaga lume. Morbiditatea și mortalitatea secundare afectării cronice hepatice cresc exponențial odată cu instalarea fibrozei avansate. Sub aspect molecular, fibrogeneza hepatică este un proces profund dinamic, iar modificările continue de la nivelul matricei extracelulare devin ireversibile pe măsura trecerii timpului.

Ultimul deceniu a înregistrat un interes crescut în ce privește studiul moleculelor cu rol predictiv asupra progresiei și severității fibrozei hepatice. În ciuda îmbunătățirii nivelului de cunoaștere al interacțiunilor dintre sistemul imun și hepatocitele infectate viral, tiparul molecular al răspunsului imun în afectarea hepatică de etiologie virală reprezintă o piesă importantă a unui puzzle ce încă nu a fost rezolvat.

Lucrarea de față pornește de la cercetări privind comportamentul imunologic al organismului în boala cronică de ficat, prin analiza unor molecule de adeziune celulară și metaloproteinaze matriceale, în diferite stadii de severitate ale infecției cu virusurile hepatice B și C. Totodată, ne-am propus conturarea semnăturii genetice a țesutului tumoral hepatocelular, din perspectiva nivelului de exprimare a unor gene implicate în hepatocarcinogeneză.

Ipoteza de lucru/obiective

Nediagnosticate și netratate, infecțiile hepatice de etiologie virală evoluează către ciroză și/sau hepatocarcinom. Progresia bolii de ficat comportă un risc semnificativ de morbiditate și mortalitate. Diagnosticul și aprecierea severității fibrozei sunt elemente importante pentru conduita terapeutică eficientă a pacienților cu infecții cronice hepatice de etiologie virală. Puncția biopsie hepatică este considerată "standardul de aur" în stadializarea fibrozei hepatice și, implicit, în confirmarea diagnosticului de ciroză. Biopsia hepatică este însă o metodă invazivă și imperfectă, care oferă o perspectivă limitată asupra țesutului hepatic și care poate conduce către complicații severe. În acest context, este perfect justificată încercarea de identificare a unor noi factori de apreciere a severității fibrozei hepatice.

Scopul studiului este de a contura profilul imunologic al afectării hepatice din cursul infecțiilor cu virusurile cu tropism hepatic B și C și vizează identificarea unor

factori care să reflecte procesul de fibrogeneză hepatică și progresia acestuia. Un alt deziderat al lucrării de față este acela de a realiza o mai bună înțelegere a interacțiunilor complexe dintre hepatocitele infectate viral și mediatorii răspunsului imun.

Elucidarea mecanismelor care conduc la remodelarea matricei extracelulare hepatice și a factorilor cu rol reglator implicați în acest proces pot constitui premisele elaborării de noi strategii terapeutice țintite în afecțiunile cu substrat fibrogen induse de infecțiile cu virusuri cu tropism hepatic.

Studiul 1. Nivelul de exprimare al VCAM-1 în infecțiile cronice hepatice B și C

Ipoteza de lucru

VCAM-1 a atras inițial atenția prin rolul său de receptor al aderării leucocitare la endoteliul vascular, ca urmare a interacțiunilor cu integrinele. Astfel, exprimarea VCAM-1 este sinonimă cu amorsarea mecanismelor celulare de apărare din cursul proceselor inflamatorii. Ultimii ani aduc un interes sporit în direcția investigării rolului VCAM-1 în tumorigeneză și metastazare.

Conform datelor disponibile actual în literatura de specialitate, nivelul de exprimare celulară a VCAM-1 se corelează cu eliberarea izoformei solubile (sVCAM), care poate fi detectată și cuantificată în sângele periferic. Aceasta îndeplinește rol de mediator molecular de tip citokinic atunci când se leagă de receptorii săi sub formă solubilă. S-a constatat că aceste forme solubile exprimă un nivel plasmatic semnificativ crescut în bolile inflamatorii ale ficatului, comparativ cu subiecții sănătoși.

Încă nu s-a stabilit în ce măsură nivelul MAC poate fi raportat la gradul de afectare hepatică. În același timp, literatura oferă insuficiente date referitoare la dinamica diferitelor clase de molecule de adeziune celulară în funcție de gradul și severitatea afectării hepatice induse viral.

Pornind de la ipoteza implicării VCAM-1 în inflamație și cancerizare, ne propunem investigarea relevanței acestei molecule în procesele patologice din cursul infecțiilor cronice cu virusurile cu tropism hepatic B și C.

Material și metodă

Studiul de față a inclus 176 de pacienți cunoscuți cu infecție cronică virală B și C: 88 de pacienți cu infecție VHB și 88 de pacienți cu infecție VHC, care s-au adresat Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Profesor Doctor Octavian Fodor, Cluj-Napoca, în perioada ianuarie 2014-octombrie 2015. La aceștia, am evaluat, cu ajutorul metodei ELISA, nivelul de exprimare serică al VCAM-1. Rezultatele obținute au fost raportate la valorile obținute ca urmare a utilizării aceleiași tehnici la 88 de indivizi fără infecție virală B sau C, care au constituit lotul martor.

Rezultate

Două sute șaizeci și patru de subiecți cu vârste cuprinse între 19 și 90 ani, 88 cu VHB, 88 cu VHC și 88 martori au fost incluși în studiu. Valorile VCAM-1 au variat între 0,007 și 3,201 cu mediana egală cu 0,561 și $Q1=0,3858$, respectiv $Q3=0,7855$.

Valorile VCAM-1 s-au dovedit semnificativ statistic mai mari la subiecții cu VHB comparativ cu grupul martor (testul Mann-Whitney: statistica $Z=7,40$, $p<0,0001$). De asemenea, valorile VCAM-1 au fost semnificativ statistic mai mari la grupul cu VHC comparativ cu grupul martor (testul Mann-Whitney: statistica $Z=7,34$, $p<0,0001$).

Conform datelor obținute, VCAM-1 este supraexprimat la subiecții infectați VHB și VHC, comparativ cu indivizii sănătoși, ceea ce pledează pentru o potențială implicare a acestei molecule de adeziune celulară în injuria hepatică indusă viral și confirmă datele disponibile actual.

Studiul nostru aduce argumente în favoarea supraexprimării serice a VCAM-1 în stadiile incipiente ale afectării hepatice de etiologie virală, comparativ cu stadiile cu fibroză avansată. Astfel, valorile VCAM-1 s-au dovedit semnificativ mai mici la subiecții cu ciroză în comparație cu subiecții fără ciroză în grupul subiecților infectați cu VHB, în timp ce pacienții cu hepatită cronică virală C asociază un nivel înalt al exprimării serice a VCAM-1. Valori semnificative mai mici la un prag de semnificație de 5% au fost de asemenea documentate la subiecții cu HCC comparativ cu pacienții fără HCC la grupul cu infecție cronică cu VHB. Astfel, VCAM-1 ar putea fi implicat în procesul inflamator din cursul injuriei hepatice induse de virusul hepatitic B.

Variabilitatea exprimării VCAM-1 în raport cu severitatea afectării hepatice nu a fost identificată însă în rândul pacienților cu infecție cronică VHC, ceea ce ridică problema unor interacțiuni diferite între molecula de adeziune intercelulară-1 și mecanismele patologice induse viral, B sau C.

Studiul 2. Metaloproteinazele matriceale în infecțiile cronice hepatice B și C

Ipoteza de lucru

În infecțiile VHB și VHC, paradigma fibrogenezei hepatice are drept coordonate injuria indusă viral și răspunsul de reparare a țesutului lezat. La nivelul ficatului fibrotic și cirotic sunt alterate distribuția, cantitatea și proporțiile dintre proteinele și constituenții matricei extracelulare. Toate acestea conduc la anomalii ale fenotipului hepatocitar, semnalizare celulară defectuoasă, precum și la reorganizări arhitecturale parenchimotoase și vasculare ce dobândesc în timp un caracter ireversibil.

Pornind de la funcțiile metaloproteinazelor matriceale, molecule indispensabile proceselor de reparare, remodelare și restructurare a arhitecturii tisulare și de la ipoteza implicării lor în cancerizare și metastazare, ne-am propus investigarea relevanței acestora în răspunsul funcțional anormal al matricei extracelulare hepatice din cursul injuriei induse viral. Astfel, am evaluat, în serul pacienților cu diferite stadii

de afectare hepatică de etiologie virală B, B+D și C, nivelul de exprimare al următoarelor MMP: -1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12 și -13.

Material și metodă

În studiul de față am inclus un număr de 76 de pacienți consecutivi, cunoscuți cu infecție cronică virală B sau C și care s-au adresat Institutului de Gastroenterologie și Hepatologie, Cluj-Napoca, în perioada noiembrie 2014 – august 2015. Am evaluat și raportat la severitatea afectării hepatice și în funcție de virusul contractat, nivelul seric al metaloproteinazelor matriceale, prin intermediul testului imunologic multiplex.

Rezultate

Șaptezeci și șase pacienți, 46 cu hepatită cronică B și 30 cu hepatită cronică C, au fost incluși în studiu. Pacienții incluși în studiu au avut vârsta cuprinsă între 27 și 81 ani, cu o medie de 56.79 ± 11.38 ani. 64.47% din pacienții incluși în studiu au prezentat hepatită (IC95% [52.65–74.98]). 35.53% din pacienții incluși în studiu au prezentat ciroză (IC95% [25.02–47.35]). 10.53% din pacienții incluși în studiu au prezentat hepatocarcinom (IC95% [3.97–19.72]).

La pacienții incluși în studiu, am comparat nivelul de exprimare al metaloproteinazelor matriceale analizate, în raport cu stadiul afectării hepatice. Datele obținute ne-au permis identificarea unui nivel statistic semnificativ mai înalt al exprimării serice al MMP-8 și al MMP-9 în rândul pacienților cu hepatită cronică față de cei cu hepatocarcinom sau ciroză hepatică. În același timp, MMP-7 s-a dovedit a fi statistic semnificativ mai exprimată la pacienții cu stadii avansate ale fibrozei hepatice induse viral.

Pornind de la aceste informații, am investigat relevanța celor trei metaloproteinaze matriceale care au exprimat valori statistic semnificativ modificate în raport cu severitatea afectării hepatice, în raport cu virusul hepatitic contractat.

Nivelul MMP-7, care s-a dovedit anterior supraexprimat în stadiile avansate de fibroză hepatică, nu a variat semnificativ în funcție de tipul infecției virale, B sau C.

În ce privește nivelele serice ale MMP-8 și MMP-9, care s-au dovedit anterior supraexprimate la pacienții cu hepatită cronică, acestea au fost statistic semnificativ mai exprimate în grupul pacienților cu hepatită cronică virală B față de grupul pacienților cu hepatită cronică virală C.

În ce privește nivelul seric al metaloproteinazelor studiate în funcție de prezența sau absența cirozei, MMP-7, -8 și -9 au adus următoarele rezultate: MMP-7 este statistic semnificativ mai exprimată în grupul pacienților cu ciroză hepatică, în timp ce MMP-8 și MMP-9 sunt supraexprimate în rândul pacienților cu hepatită cronică. Pe baza acestor date, am investigat variabilitatea exprimării metaloproteinazelor -7, -8 și -9 în funcție de tipul infecției virale. Astfel, nivelul seric al niciuneia din metaloproteinazele anterior menționate nu variază semnificativ în raport cu virusul hepatitic contractat, B sau C.

Am analizat, de asemenea, exprimarea serică a metaloproteinazelor -1, -2, -3, -7, -8, -9, -10 și -12 în funcție de prezența sau absența hepatocarcinomului. Din rezultatele

obținute remarcăm un nivel statistic semnificativ mai înalt al MMP-7, comparativ cu indivizii cu hepatită cronică și ciroză hepatică B sau C.

5. Studiul 3. Studiu pilot de conturare a semnăturii genetice a țesutului tumoral hepatocelular

Ipoteza de lucru

Carcinomul hepatocelular se încadrează în lista celor mai comune tumori la nivel mondial, fiind de cele mai multe ori o consecință a infecției cu virusul hepatitic B și/sau virusul hepatitic C, dar și a expunerii la alți factori toxici, precum alcoolul, sau ca urmare a unor boli metabolice.

Datorită poziției centrale a ficatului în ceea ce privește reglarea răspunsurilor sistemice și inflamatorii, progresul acestui tip de tumoră este mediat de o serie de interacțiuni complexe a căilor de semnalizare moleculare, căi mediate de un număr de modificări ale expresiei unor gene specifice, modificări ce se concretizează prin malignizarea celulelor hepatice.

Pornind de la această premisă, am evaluat, în cadrul unui studiu pilot, nivelul de exprimare genică a unor molecule de adeziune celulară, metaloproteinaze matriceale, precum și a unor citokine în țesutul neoplazic hepatic versus țesut sănătos, în încercarea de a contura semnătura moleculară tisulară hepatocarcinogenică.

Material și metode

Prelucrarea probelor biologice a respectat protocoalele standardizate și utilizate în mod curent la Centrul de Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină Translațională, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca. Toți pacienții incluși în studiu și-au dat acordul în scris cu privire la prelevarea probelor biologice. Astfel, ca urmare a semnării consimțământului informat, fiecărui pacient inclus în studiu i-a fost atribuit un cod de identificare, în vederea respectării confidențialității.

Rezultate

În încercarea de a înțelege mecanismele multilaterale implicate în această patologie, am evaluat nivelul de exprimare al unor gene cheie (MMP-1, MMP 7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP-14, MMP16, FAS, TRAF, FADD, TNF, VCAM, ICAM1), în vederea dezvoltării de noi strategii terapeutice.

O clasă de interes este reprezentată de enzimele proteolitice MMP, studiate ca mediatori cheie în degradarea matricei extracelulare, context în care este promovat un microclimat biologic favorabil pentru dezvoltarea și invazia celulelor tumorale.

O parte din studiile actuale referitoare la hepatocarcinom au identificat o supraexprimare a transcripților MMP-9 față de controalele netumorale, identificare generalizată majorității probelor tumorale și regăsită și în studiul nostru. Astfel,

În ceea ce privește exprimarea genelor MMP-1, aceasta este mai pronunțată în celulele canceroase timpurii, însă bine diferențiate, în vederea sintetizării de proteine capabile să distrugă țesutul fibros, ceea ce favorizează invazia și progresia tumorală. Cantitatea de ARNm scade odată cu avansarea patologiei. Acest transcript a fost identificat și în studiul nostru, cu o supraexprimare de 3.50.

Din aceeași clasă de transcripți face parte și MMP-14, regăsit sub forma unei supraexprimări semnificative, fapt confirmat și de studiile actuale în ceea ce privește analiza markerilor asociați carcinomului hepatocelular. Nivelul de exprimare al genei în cauză este corelat cu o șansă de supraviețuire scăzută, fiind asociat cu stadiile avansate ale acestui tip de patologie tumorală.

Dacă supraexprimarea indicilor prezentați mai sus poate fi relaționată direct cu hepatocarcinomul, atunci când se amintește de transcriptul MMP-7, acesta nu reprezintă un marker de mare interes în această patologie, fiind studiat în special în cazurile de carcinom gastrointestinal. Cu toate acestea s-a observat o supraexprimare a acestei gene, eveniment relatat și de alte studii în cauză, însă fără posibilitatea folosirii singulare a acestui transcript ca și indice al cancerului hepatic.

De asemenea, nici în cazul transcriptului MMP-8 nu s-a putut găsi o corelare directă cu patologia studiată, eventualele creșteri ale exprimării genice datorându-se unor evenimente comune majorității tipurilor de malignități, nefiind posibilă asocierea directă și specifică cu hepatocarcinomul.

La polul opus se află transcriptul MMP-10, a cărui supraexprimare contribuie la dezvoltarea de cancer hepatic, participă în angiogeneza tumorală, creștere și diseminare. Acest tip de marker tumoral este relativ nou, rolul lui în patologiiile maligne hepatice fiind încă incomplet cunoscut, însă studiile recente realizate pe mamifere de laborator arată o implicare activă a acestui transcript în dezvoltarea cancerului hepatic, supraexprimare regăsită și în studiul nostru.

În ceea ce privește interesul asupra transcriptului MMP-16 în cadrul cercetării cancerului hepatic, putem spune că acesta este amintit într-un număr relativ mic de articole de specialitate, fără o atribuire importantă din punct de vedere al diagnosticului și al unui eventual tratament.

Spre deosebire de majoritatea transcripților din clasa MMP ce exercită un efect pozitiv în ceea ce privește proliferarea tumorală în cadrul carcinomului hepatocelular, genele FAS (Fas Cell Surface Death Receptor) codifică receptori capabili de activare de căi apoptotice în urma cuplării cu ligandul corespunzător, numiți și receptori ai morții, sau membri ai super-familiei de receptori TNF (NCBI Gene). Cu toate acestea, există studii care arată o supraexprimare a transcriptului FAS în probele de cancer hepatic, la fel ca și în cazul studiului nostru, fapt ce ar pleda pentru o eventuală alterare a căii de inducere a apoptozei prin supraexprimarea simultană a unor proteine anti-apoptotice sau prin achiziționarea de mutații în secvența corespunzătoare genei FAS.

De asemenea, există posibilitatea subexprimării proteice a genei FAS, în ciuda nivelului ridicat de transcripți. Asociat carcinomului hepatic s-a observat un nivel

ridicat de FAS, nivel ce scade semnificativ după îndepărtarea chirurgicală a formațiunilor maligne, observații ce sugerează un posibil parametru clinic pentru cancerul hepatic.

Tot în apoptoză intervin și proteinele codificate de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), având rolul unor molecule tip adaptor ce interacționează cu numeroși receptori aflați pe suprafața celulelor și contribuind astfel la declanșarea unor cascade apoptotice. Astfel, o pierdere a gradului de expresie a genelor în cauză exercită un efect pozitiv asupra carcinogenezei în ceea ce privește tumorile hepatice, iar o supraexprimare a acestora, caz regăsit și în studiul nostru, semnalează eventuala prezență de celule apoptotice în acest tip de carcinom. Cu toate acestea, o exprimare pozitivă în probele tumorale față de cele normale nu se asociază strict cu moartea celulară datorită abilității de contracarare a unor proteine anti-apoptotice sau a lipsei exprimării acestor gene sub formă de proteine active.

TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) codifică un tip de citokine proinflamatorii implicate în reglarea unui spectru larg de procese biologice printre care se numără proliferarea celulară, diferențierea, dar și apoptoza (GeneCards). În cazul hepatocarcinomului, produsul acestei gene deține o potențială activitate antitumorală, fapt demonstrat de un studiu in vivo concentrat pe administrarea de TNF- α via transfer genic.

Ultimele cercetări au evidențiat rolul duplicitar al produsului acestei gene, ce acționează ca factor anti-tumoral, dar și ca promotor al patologiilor maligne. S-a observat că dozele mari de TNF- α exercită un efect negativ asupra tumorilor hepatice, însă cu efecte adverse semnificative. În același timp, inhibarea producției TNF-alpha coincide cu o scădere a incidenței acestui tip de carcinom.

Studiul nostru a înregistrat o creștere de 2.99 ori față de țesutul normal în ceea ce privește gradul de exprimare a TNF- α , valoare ce nu poate fi privită singular, tocmai datorită polimorfismului acestui parametru în ceea ce privește potențiala sa activitate terapeutică.

Un marker important asociat cancerului hepatic este reprezentat de gena ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) și nivelul ei de expresie, aceasta fiind direct implicată în procesul de metastazare. Astfel, studiile recente investighează posibila corelare între nivelul de exprimare al acestei gene și stadiul carcinomului hepatic, observându-se o creștere semnificativă a nivelului de transcripti odată cu avansarea patologiei spre metastazare, ceea ce plasează acest parametru în lista potențialilor biomarkeri ce reflectă gradul de avansare a bolii, dar și drept potențială țintă terapeutică.

În studiul nostru s-a investigat gradul de expresie al transcriptiilor ICAM-1, observându-se de asemenea o creștere semnificativă în țesutul tumoral față de control, fapt ce confirmă concluziile studiilor anterioare.

În lista genelor din studiul actual se regăsește și gena TRAF (TNF Receptor Associated Factor), membru al unei familii de proteine implicate în reglarea inflamației, răspunsului antiviral și apoptoză¹⁹⁵. Studiul de față investighează gradul de exprimare al membrului 4 al acestei familii, TRAF-4.

Am documentat astfel o creștere a exprimării genice în țesuturile tumorale față de cele control, însă fără posibilitatea asocierii singulare a acestui parametru cu malignitățile hepatice, datorită incidenței crescute a acestui transcript în rândul a numeroase carcinoame de origini diferite, fiind mai intens studiat în cazul cancerului de sân.

Studiul nostru a identificat douăsprezece astfel de gene, a căror exprimare este semnificativă din punct de vedere statistic, unele din ele fiind asociate în mod direct cu patologia în cauză, ceea ce subliniază posibilitatea utilizării lor drept markeri de diagnostic și rolul acestora de potențiale ținte terapeutice.

Concluzii generale

VCAM-1 exprimă valori semnificativ statistic mai mari la indivizii infectați cu virus hepatitic B și C, comparativ cu indivizii neinfecțiați.

Nivelul de exprimare al VCAM-1 variază în raport cu stadiul afectării hepatice de etiologie virală B. Acesta este supraexprimat în stadiile incipiente ale infecției virale B și descrește pe măsură ce fibroza progresează.

Variabilitatea exprimării VCAM-1 nu a fost documentată la pacienții cu infecție cronică VHC, indiferent de stadiul afectării hepatice.

Metaloproteinaza matriceală-7 se corelează cu stadiul afectării hepatice induse viral B sau C. MMP-7 este supraexprimat la pacienții cu hepatocarcinom, comparativ cu stadiile de ciroză hepatică și hepatită cronică și mai puțin exprimat în ciroză față de hepatita cronică. Toate aceste argumente pledează pentru un potențial rol al MMP-7 în progresia fibrogenezei induse viral, precum și în cancerizare.

MMP-8 și -9 sunt supraexprimate în hepatitele cronice, comparativ cu stadiul cirozei hepatice, ceea ce se aliniază ipotezei conform căreia, în etapele incipiente ale fibrogenezei hepatice induse viral, metaloproteinazele sunt reacționate și contribuie la evoluția afecțiunii.

Genele care codifică metaloproteinazele-9, 11, -14 și -16 sunt supraexprimate în țesutul tumoral hepatocelular. Identificarea profilului de expresie genică oferă o listă de potențiali markeri moleculari ce pot fi folosiți pentru un diagnostic timpuriu al carcinomului hepatocelular, precum și ca potențiale ținte moleculare terapeutice.

În cazul hepatocarcinomului sunt implicate mai multe căi metabolice și este modificat nivelul de expresie pentru mai multe gene. Devine evident faptul că un singur medicament nu va putea ținti un număr mare de molecule. Mai mult decât atât, fiecare pacient răspunde diferit la aceeași terapie, ceea ce poate fi explicat prin nivelul diferit de exprimare a genelor, ca urmare a heterogenității tumorale intense. Ținând cont de argumentele de mai sus, dezvoltarea unor terapii individualizate este unul din dezideratele imunologiei moderne.

PHD THESIS SUMMARY

Cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in hepatitis B and C chronic viral infections.

PhD student: **Irena Nedelea**

PhD supervisor: **Prof. Dr. Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION	1
CURRENT LITERATURE	3
1. B and C viral hepatitis	5
1.1. Epidemiological data	5
1.2. Natural history	6
1.3. Antiviral immune response	8
1.3.1. Non-specific immune resistance	8
1.3.2. Adaptive immune response	10
1.4. Viral-induced liver fibrogenesis - cellular and molecular mechanisms	11
2. Cell adhesion molecules - definition, classification and functions	15
3. Matrix metalloproteinases - definition, classification and functions	21
4. Cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases - role in viral hepatic diseases	25
PERSONAL CONTRIBUTIONS	29
1. The working hypothesis / objectives	31
2. General methodology	32
3. Study 1 - Cell adhesion molecules - role and impact in hepatitis B and C chronic viral infections	35
3.1. Introduction	35
3.2. The working hypothesis / objectives	35
3.3. Material and method	36
3.4. Results	37
3.5. Discussions	42
3.6. Conclusions	43
4. Study 2 - Matrix metalloproteinases - role and impact in hepatitis B and C chronic viral infections	45
4.1. Introduction	45
4.2. The working hypothesis / objectives	45
4.3. Material and method	46

4.4. Results	48
4.5. Discussions	57
4.6. Conclusions	64
5. Stage 3 - Pilot study to outline the genetic signature of hepatocellular tumor tissue	65
5.1. Introduction	65
5.2. The working hypothesis / objectives	66
5.3. Material and method	66
5.4. Results	73
5.5. Discussions	87
5.6. Conclusions	91
6. General conclusions (synthesis)	93
7. The originality and innovative contributions of the thesis	97
REFERENCES	99

Keywords:

immune response, cell adhesion molecules, matrix metalloproteinases, viral induced liver fibrogenesis

Introduction

Worldwide, chronic hepatitis of viral aetiology are a real public health problem. Morbidity and secondary mortality to chronic hepatic impairment increase exponentially with the installation of advanced fibrosis. In molecular terms, hepatic fibrogenesis is a profoundly dynamic process and continuous changes in the extracellular matrix become irreversible as time goes on.

The last decade has seen an increased interest in the study of molecules predictive of progression and severity of liver fibrosis. Despite improvements in the knowledge of the interactions between the immune system and virally infected hepatocytes, the molecular pattern of the immune response to liver impairment of viral aetiology is an important piece of the puzzle still not been resolved.

This paper is based on research on the immunological behaviour of the organism in chronic liver disease and analyses cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in different stages of severity of infection with hepatitis B and C. Also, we attempt to outline the genetic signature of hepatocellular tumor tissue, in terms of the level of expression of genes involved in hepatocarcinogenesis.

The working hypothesis / objectives

Undiagnosed and untreated, hepatic infections of viral aetiology progress to liver cirrhosis aetiology and / or HCC. Liver disease progression involves a significant risk of morbidity and mortality. Diagnosis and assessment of severity of fibrosis are important elements for effective therapeutic conduct of patients with chronic liver infections of viral aetiology. Liver biopsy is considered the "gold standard" in the staging of liver fibrosis and, thus, in confirming the diagnosis of cirrhosis. However, liver biopsy is an invasive and imperfect method, which offers a limited perspective on liver tissue and can lead to severe complications. In this context, it is justifiable to attempt to identify new factors for assessing the severity of liver fibrosis.

The aim is to outline the immunological profile of liver damage in infections with hepatitis viruses B and C and attempts to identify factors that reflect hepatic fibrogenesis and its progression. Another goal of this paper is to achieve a better

understanding of the complex interactions between virus-infected hepatocytes and immune response mediators.

Elucidating the mechanisms that lead to the remodelling of liver extracellular matrix and regulatory factors involved in this process can be the prerequisites of developing new therapeutic strategies targeted to conditions of fibrinogen substrate induced by infections with hepatitis viruses.

Study 1. The level of expression of VCAM 1 in hepatitis B and C chronic infections

The working hypothesis

VCAM 1 initially attracted attention with its role as a receiver of leukocyte adhesion to vascular endothelium, as a result of interactions with integrins. Thus, the expression of VCAM-1 is synonymous to priming cellular defence mechanisms during inflammatory processes. Recent years brought an increased interest towards investigating the role of VCAM-1 in tumorigenesis and metastasis.

According to data currently available in scholarly literature, the level of cellular expression of VCAM-1 is correlated with the release of soluble isoform (sVCAM), which can be detected and quantified in peripheral blood. This fulfils the role of cytokinic type molecular mediator when it binds to its receptors in soluble form. It has been found that these soluble forms express significantly increased plasma levels in inflammatory liver diseases, compared with healthy subjects .

The extent to which the level of MAC may be related to the degree of hepatic impairment is not yet determined. At the same time, scholarly literature offers insufficient data on the dynamics of different classes of cell adhesion molecules depending on the degree and severity of viral-induced liver damage .

Based on the assumption that VCAM-1 is involved in inflammation and cancerization, we intend to investigate the relevance of this molecule in pathological processes during chronic infections with hepatitis B and C viruses.

Material and method

This study included 176 patients with known chronic viral B and C infection: 88 patients with HBV infection and 88 patients with HCV infection who were sent to the „Professor Doctor Octavian Fodor,, Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology in Cluj-Napoca from January 2014 to October 2015. For these patients, we assessed the level of expression of VCAM-1 using the ELISA test. The results were compared to those obtained as a result of using the same technique in 88 individuals without viral B or C infection, which constituted the control group.

Results

We included in the study two hundred and sixty-four subjects aged between 19 and 90 years, 88 with HBV infection, 88 with HCV infection, and 88 witnesses. VCAM-1

values ranged from 0.007 to 3.201 with a median equal to 0.561 and Q1 = 0.3858 and Q3 = 0.7855, respectively.

VCAM-1 values were statistically significantly higher in subjects with HBV compared to the control group (Mann-Whitney test: statistic $Z = 7.40$, $p < 0.0001$). In addition, VCAM-1 values were statistically significantly higher in the group with HCV as compared to the control group (Mann-Whitney test: statistic $Z = 7.34$, $p < 0.0001$).

According to data, VCAM-1 is over-expressed in HBV and HCV infected subjects compared with healthy individuals, which calls for a potential involvement of this cell adhesion molecule in viral-induced liver injury and confirms the currently available data.

Our study argues in favour of VCAM-1 serum overexpression in the early stages of liver disease of viral aetiology compared with advanced fibrosis stages. Thus, VCAM-1 values were significantly lower in subjects with cirrhosis compared to subjects without cirrhosis in the group of individuals infected with HBV, while patients with chronic hepatitis C presented a high levels of expression of serum VCAM-1. Significantly lower values at a materiality threshold of 5% have also been documented in subjects with HCC compared with patients without HCC in the chronic HBV infection group. Thus, VCAM-1 may be involved in the inflammatory process in the liver injury induced by hepatitis B.

VCAM-1 expression variability in relation to liver disease severity has not been identified among patients with chronic HCV infection, raising the problem of different interactions between intercellular adhesion molecule-1 and B or C viral-induced pathological mechanism..

Study no. 2. Matrix metalloproteinases in chronic hepatitis B and C infections

The working hypothesis

In HBV and HCV infections, the liver fibrogenesis paradigm has the viral induced injury and the repair of damaged tissue response as coordinates. Fibrotic and cirrhotic livers have altered distribution, quantity and proportions of proteins and extracellular matrix constituents. All these lead to abnormalities of the hepatocyte phenotype, faulty cell signalling, as well as vascular and parenchymal architectural reorganization that become irreversible.

Based on the functions of matrix metalloproteinases, molecules that are essential for processes of repairing, remodelling and restructuring tissue architecture and on the assumption that they are involved in cancerization and metastasis, we set out to investigate their relevance in the functionally abnormal reply of the liver extracellular matrix during viral induced injury. Thus, we evaluated the level of expression of MMP -1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12 and -13 in the serum of patients with different stages of liver injury of viral aetiology (B, B + D, and C).

Material and method

In this study we included a total of 76 consecutive patients with known chronic viral B or C infection who were sent to the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology in Cluj-Napoca, between November 2014 and August 2015. We used the multiplex immunoassay to evaluate and report the serum levels of matrix metalloproteinases to the severity of liver injury and depending on the contracted virus.

Results

We included seventy-six patients, 46 with chronic hepatitis B and 30 with chronic hepatitis C in the study. Patients were aged between 27 and 81 years, with a mean of 56.79 ± 11.38 years. 64.47% of patients had hepatitis (CI95% [52.65-74.98]). 35.53% of patients had cirrhosis (CI95% [25.02-47.35]). 10.53% of patients had hepatocellular carcinoma (CI95% [3.97-19.72]).

For patients included in the study we compared the level of expression of matrix metalloproteinases in relation to the stage of liver disease. The data we obtained allowed us to identify a statistically significantly higher level of expression of serum MMP-8 and MMP-9 in patients with chronic hepatitis compared to those with cirrhosis or hepatocarcinoma. At the same time, MMP-7 was statistically significantly more expressed in patients with advanced stages of viral-induced liver fibrosis.

Based on this information, we investigated the relevance of the three matrix metalloproteinases who expressed values statistically significantly changed in relation to the severity of liver damage and type of contracted hepatitis virus.

The level of MMP-7, which had previously been overexpressed in advanced stages of liver fibrosis, has not varied significantly depending on the type of viral infection, B or C.

The serum levels of MMP-8 and MMP-9, which were previously shown as overexpressed in patients with chronic hepatitis, were statistically significantly more expressed in the group of patients with chronic hepatitis B compared to the group of patients with chronic viral hepatitis C.

With regards to the serum level of metalloproteinases depending on the presence or absence of cirrhosis, MMP-7, -8 and -9 generated the following results: MMP-7 was statistically significantly more expressed in the group of patients with liver cirrhosis, while MMP 8 and MMP-9 were overexpressed in patients with chronic hepatitis.

Based on these data, we investigated the variability of expression of metalloproteinases -7, -8 and -9 depending on the type of viral infection. Thus, the serum levels of none of the aforementioned metalloproteinases varied significantly in relation to the type of contracted hepatitis B or C. We also analyzed the seric expression of metalloproteinases -1, -2, -3, -7, -8, -9, -10 and -12 based on the presence or absence of HCC. Based on the results, we noted a statistically significantly higher level of MMP-7, compared to individuals with B or C chronic hepatitis and liver cirrhosis.

5. Study no. 3. Pilot study to outline the genetic signature of hepatocellular tumor tissue

The working hypothesis

Hepatocellular carcinoma falls within the list of the most common tumors worldwide, and is often a consequence of infection with hepatitis B and / or hepatitis C, but also of exposure to other toxic factors such as alcohol, or is due to metabolic diseases.

Because of the central role of the liver in the regulation of systemic inflammatory responses, the progress of this kind of tumor is mediated by a series of complex interactions of molecular signalling pathways that are mediated by a number of changes in the expression of specific gene, modifications that turn into liver cell malignancies.

Starting from this premise, we assessed in a pilot study the level of gene expression of cell adhesion molecules, matrix metalloproteinases and certain cytokines in neoplastic liver tissue versus healthy tissue, in an attempt to outline the molecular signature of hepatocarcinogenic tissue.

Material and method

The processing of biological samples complied with standardized protocols currently used at the Centre for Functional Genomics, Biomedical and Translational Medicine of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca. All patients included in the study gave their written consent for biological sampling. Thus, following the signing of an informed consent, we assigned an identification code to each patient included in the in order to respect confidentiality.

Results

In trying to understand the multilateral mechanisms involved in this pathology, we evaluated the level of expression of certain key genes (MMP-1, MMP 7 MMP8, MMP9, MMP10, MMP-14, MMP16, FAS, TRAF, FADD, TNF, VCAM , ICAM1) in order to develop new therapeutic strategies.

The MMP proteolytic enzymes, a category of interest, are studied as key mediators in extracellular matrix degradation, a context that promotes a biologically favorable microclimate for tumor cell development and invasion.

Some current studies on HCC identified an overexpression of MMP-9 transcripts compared to non-tumor controls, which was generalized for most tumor samples and is also found in our study.

Regarding the MMP-1 gene expression, this is more pronounced in early, well-differentiated cancer cells, in order to synthesize proteins that are capable of

destroying fibrous tissue, thus promoting invasion and tumor progression. The amount of mRNA decreases as the pathology advances. This transcript has also been identified in our study, with an overexpression of 3.50.

MMP4 is part of the same class of transcripts and is found in the form of significant overexpression, as confirmed by current studies regarding the analysis of markers associated with hepatocellular carcinoma. The level of expression of the gene in question is linked to a lower chance of survival and is associated with advanced stages of this type of tumor pathology.

The overexpression of indices listed above can be related directly to the hepatocarcinoma, but the MMP-7 transcript is not a marker of great interest in this pathology and it's mainly being studied in cases of gastrointestinal carcinoma. However, an overexpression of this gene has been observed, an event also reported by other studies in question, albeit without the possibility of using this singular transcript as an index of liver cancer.

Also, the MMP-8 transcript couldn't be directly correlated with the studied pathology, as any possible increases in gene expression were due to events that are common to most types of malignancies rendering the direct and specific association to hepatocarcinoma impossible.

The MMP-10 transcript is at the opposite pole; its overexpression contributes to the development of liver cancer and participates in tumor angiogenesis, growth and dissemination. This type of tumor marker is relatively new, its role in malignant liver pathologies is not yet fully known, but recent studies on laboratory mammals show an active involvement of the transcript in the development of liver cancer, an overexpression also found in our study.

Regarding interest in the MMP-16 transcript in liver cancer research, we can note that it is mentioned in a relatively small number of articles, without significant importance in terms of diagnosis and a possible treatment.

Unlike most of the transcripts from the MMP class, which exert a positive effect in terms of tumor proliferation in hepatocellular carcinoma, FAS genes (FAS Cell Surface Death Receptor) encode the receptors that are capable of activating apoptotic pathways after coupling with the appropriate ligand, also called death receptors, or members of the TNF receptor super-family (NCBI Gene).

However, there are studies showing an overexpression of the FAS transcript in samples of liver cancer, which is our case as well, suggesting that it is possible to alter the apoptotic pathway by the simultaneous overexpression of anti-apoptotic proteins or by acquiring mutations in the sequence corresponding to the FAS gene.

There is also a possibility of proteic subexpression of the FAS gene, despite the high level of transcripts. High levels of FAS were observed in association with liver carcinoma, levels that reduced significantly after surgical removal of malignancies, suggesting a possible clinical parameter for liver cancer.

Proteins encoded by FADD (Fas Associated Death Domain with protein) are also involved in apoptosis as adapter molecules that interact with numerous receptors on the cell surface and thereby contribute to triggering apoptotic cascades. Thus, a loss in the degree of expression of these genes exerts a positive effect on carcinogenesis in

liver tumors, while their overexpression, also found in our study, indicates the possible presence of apoptotic cells in this type of carcinoma. However, a positive expression in tumor samples compared to normal ones is not strictly associated with cell death due to the ability of counteracting some anti-apoptotic proteins or the lack of expression of these genes in the form of active proteins.

TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) codes a type of pro-inflammatory cytokines involved in the regulation of a wide range of biological processes including cell proliferation, differentiation, and apoptosis (GeneCards). In HCC, the product of this gene performs a potential anti-tumor activity, as demonstrated by an in vivo study focused on the administration of TNF- α via gene transfer.

The latest research has revealed the duplicitous role of this gene's product, which acts as anti-tumor factor, but also as a promoter of malignancies. It has been observed that high doses of TNF- α exert an adverse effect on liver tumors, but with significant side effects. At the same time, inhibiting the production of TNF-alpha coincides with a decrease in the incidence of this type of carcinoma.

Our study showed a 2.99 times increase of the degree of expression of TNF- α compared to normal tissue, value that can not be seen as singular because of the polymorphism of this parameter in terms of its potential therapeutic activity.

The ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) and its level of expression are an important marker of liver cancer, and its level of expression is directly involved in metastasis. Thus, recent studies investigate the possible correlation between the level of expression of this gene and the stage of liver carcinoma, and a significant increase in the level of transcripts is observed as pathology progresses to metastasis, placing this parameter in the list of potential biomarkers that reflect the development of the disease, but also making it a potential therapeutic target.

In our study, we have investigated the degree of expression of ICAM-1 transcripts and also observed a significant increase in tumor tissue compared to controls, confirming the findings of previous studies.

The list of genes in the current study also includes the TRAF (TNF Receptor Associated Factor), a member of a family of proteins involved in regulating inflammation, antiviral response and apoptosis. The present study investigates the degree of expression of the fourth member of this family, TRAF-4.

We thus documented an increased gene expression in tumor tissues compared to control tissue, but without the possibility of involving singular of this parameter with malignancies liver, due to the high incidence of this transcript among many carcinomas of different origins, being widely studied in cancer breast.

Our study has identified twelve such genes whose expression is statistically significant, some of which are directly associated with the pathology in question, highlighting the possibility of using them use as diagnostic markers and their role as potential therapeutic targets .

General conclusions

VCAM-1 expresses statistically significantly higher values in individuals infected with hepatitis B and C compared with uninfected individuals.

The level of expression of VCAM-1 varies in relation to the stage liver disease of B viral aetiology. This is overexpressed in the early stages of B viral infection and decreases as fibrosis progresses.

The variability of the VCAM-1 expression has not been documented in patients with chronic HCV infection, regardless of the stage of liver disease.

MMP-7 correlates with the stage of the B or C viral-induced liver disease. MMP-7 is overexpressed in patients with HCC compared with liver cirrhosis and chronic hepatitis and less expressed in cirrhosis compared with chronic hepatitis. All these arguments plead for MMP-7's potential role in the progression of viral-induced fibrogenesis, as well as in cancerization.

MMP-8 and -9 are overexpressed in chronic hepatitis compared with liver cirrhosis, following the assumption that, in the early stages of viral-induced liver fibrogenesis, metalloproteinases are reacted and contribute to disease progression.

The genes that encode the metalloproteinases 9, 11, -14, and -16 are overexpressed in hepatocellular tumor tissue. Identifying the gene expression profile provides a list of possible molecular markers that may be used for early diagnosis of hepatocellular carcinoma, as well as potential molecular therapeutic targets.

Multiple metabolic pathways are involved in HCC and the expression level changes for several genes. It becomes obvious that a single drug cannot target such a large number of molecules. Moreover, each patient responds differently to the same therapy, which can be explained by the different levels of gene expression as a result of extensive tumor heterogeneity. Considering the above arguments, the development of individualized therapies is one of the desiderata of modern immunology.