

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

Rezumatul tezei de doctorat

Ficatul gras nonalcoolic, componenta a sindromului metabolic și factor de risc pentru litiaza biliară și hepatocarcinom. Studiu prospectiv

Doctorand **Ofelia Elena Moșteanu**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

Introducere	2
Contribuția personală.....	2
Studiul I Evaluarea ecografică a motilității veziculei biliare la pacienții cu ficat gras non-alcoolic (FGNA)	2
Studiul II Asocierea dintre FGNA și SM: rolul adipokinelor	4
Studiul III Influența sindromului de rezistență la insulină asupra angiogenezei în carcinomul hepatocelular	5
Studiul IV Ablația fototermică a carcinomului hepatocelular utilizând nanoparticule de aur funcționalizate.....	6
Concluzii finale	7
Contribuții personale și direcții de dezvoltare ulterioară	8

Cuvinte cheie: Ficat gras non-alcoolic, rezistența la insulină, carcinomul hepatocelular, nanotehnologie

Introducere

Teza de doctorat își propune evaluarea volumetrică a veziculei biliare și a golirii veziculare la pacienții cu FGNA și SM, și stabilirea profilului factorilor biologici (citokine), implicați în producerea tulburărilor de motilitate în aceste afecțiuni.

Un alt obiectiv important este investigarea legăturii dintre adipokine și agresivitatea HCC. Vom cuantifica valoarea factorului de creștere vasculo-endotelial (VEGF), densitatea microvascularizației intratumorale (MVD), leptina și insulina la pacienți cirofici fără HCC și pacienți cirofici cu HCC. Obiectivul specific este să determinăm legătura dintre valoarea serică a VEGF, MVD în mostrele tumorale cu componentele sindromului de rezistență la insulină și adipokinele. Studiul nostru coroborează efectele angiogenezei și inflamației, două procese despre care se crede că împărtășesc mecanisme comune moleculare, și anume neoangiogeneza.

Ultima parte a tezei cuprinde dezvoltarea unui nano-biosistem terapeutic destinat cancerului de ficat bazat pe necroza termică selectivă tumorală post-iradiere laser a unor produși nanocompoziți.

Contribuția personală

Studiul I Evaluarea ecografică a motilității veziculei biliare la pacienții cu ficat gras non-alcoolic (FGNA)

Ipoteza de lucru: Există motive să credem că pacienții cu FGNA prezintă anumite modificări la nivelul unor mecanisme patogenetice care determină litogeneza.

Scop: Deși componenta metabolică intervine cu certitudine în patogeneză, este dismotilitatea o verigă esențială în patogeneza litiazei biliare colesterolice la pacienții cu FGNA? Scopul studiului nostru a fost evaluarea motilității veziculei biliare la pacienții cu FGNA și investigarea factorilor asociați LB la pacienții cu FGNA.

Material și metodă: Un total de 234 subiecți au fost incluși în acest studiu. Ei au fost împărțiți în 3 loturi după cum urmează: SHNA (lot 3 n=56), SH (lot 2 n=76), și martori (lot 0 n=102). Nu au existat diferențe semnificative statistice între lotul martor și lotul de FGNA în ceea ce privește vârsta medie și distribuția pe sexe.

S-a utilizat US ca procedură de recoltare a informației (Catedra de Imagistică Medicală/Departamentul de Ecografie IRGH “Prof.dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca, coordonat de Prof.dr. Radu Badea). Protocolul US pentru evaluarea motilității veziculei biliare a fost standardizat.

Rezultate

Lotul SHNA a prezentat cele mai mari valori serice ale insulinei a jeun comparativ cu lotul martor (17,4 mU/l vs. 9,35 mU/l, $p=0,044$), respectiv, comparativ cu lotul SH (17,4 mU/l vs. 10,99 mU/l, $p=0,210$) (Fig. 1). Rezistența la insulină (indicele HOMA) a fost semnificativ crescută la lotul SHNA comparativ cu lotul martor ($p=0,045$); diferența cu lotul SH a fost nesemnificativă statistic ($p=0,182$).

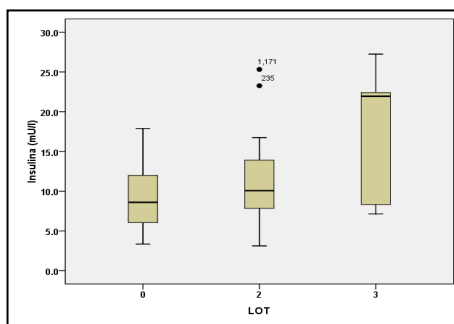


Fig. 1. Nivelul seric al insulinei la cele 3 loturi de studiu

Atât pacienții cu SHNA, cât și cei cu steatoză hepatică au avut un volum mediu bazal semnificativ crescut comparativ cu lotul martor. De asemenea, volumul rezidual a fost semnificativ mai mare la pacienții cu SHNA și la cei cu steatoză față de martori. Frația de ejeție a veziculei biliare a fost redusă semnificativ la pacienții cu SHNA comparativ cu lotul martor. Evacuarea VB a fost semnificativ mai lentă la pacienții cu SHNA față de lotul SH

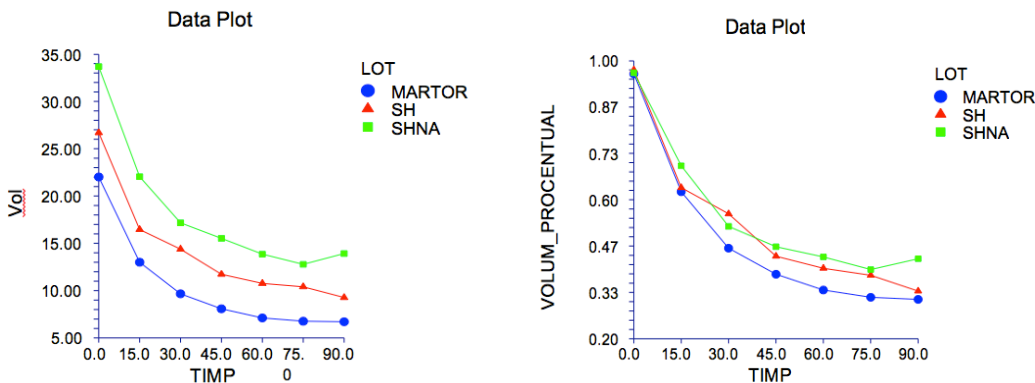


Fig. 2. Curbele de golire ale VB la pacienții cu SHNA vs. SH vs. martor exprimate ca ml (A) sau volum procentual (B).

Concluzii

Prezentul studiu, a constatat reducerea semnificativă a motilității veziculare la acești pacienți față de martori, și de asemenea la cei cu steatoză față de martori. Faptul că parametrii funcției motorii ai VB au fost semnificativ diferiți în SHNA și steatoză sugerează o contribuție importantă a factorului inflamator, pe lângă cel metabolic în reducerea motilității veziculare. Aceasta ar putea fi un factor contributiv la procesul de litogeneză.

Studiul II Asocierea dintre FGNA și SM: rolul adipokinelor

Ipoteza de lucru: Prevalența obezității crește dramatic în țările vestice, preluând caracterul unei epidemii. Obezitatea la rândul ei crește prevalența DZ tip 2, a dislipidemiei, HTA și în final a SM. FGNA reprezintă cea mai frecventă etiologie a hepatopatiilor cronice în țările vestice și include un spectru larg al injuriei hepatice de la steatoză la steatohepatita non-alcoolică (SHNA) și ciroza hepatică.

Scop

Studiul nostru a urmărit:

- (1) stabilirea prevalenței Sindromului Metabolic într-o mostră de populație generală la vârsta activă;
- (2) extinderea descrierii fenotipice a SM la alți parametri metabolici și nemetabolici biochimici;
- (3) ne-am pus problema dacă parametrii antropometrici, în speță circumferința taliei (PT) și raportul talie-sold (RTS) indică mai bine decât IMC prezența SM, a FGNA și a LB?

Material și metodă: 651 subiecți au fost incluși (98 bărbați și 553 femei; vârsta medie $46,12 \pm 8,9$ ani) între anii 2005-2009. Studiul a fost prospectiv, cross sectional, observațional, pe o populație de muncitori de la Întreprinderea Flacăra, Cluj-Napoca. Nu a existat o procedură de selecție a subiecților, o scrisoare de invitație fiind transmisă întregului personal prin intermediul medicului de întreprindere.

Rezultate: Cea mai bună sensibilitate pentru SM a indicilor antropometrici au avut-o, în ordine, perimetrul taliei, RTS și abia apoi IMC (81,2% (95%CI 73.5 - 87.5), 71,9% (95%CI 62.4 - 78.8) și, respectiv, 61,79% (95%CI 52.6 - 70.4)) la valori cut-off de >88 cm, $>0,84$, și respectiv, $>29,5$ ($p < 0,0001$) (Fig. 3). Specificitatea cea mai mare pentru SM la valorile de cut-off a avut-o însă IMC (82,04%).

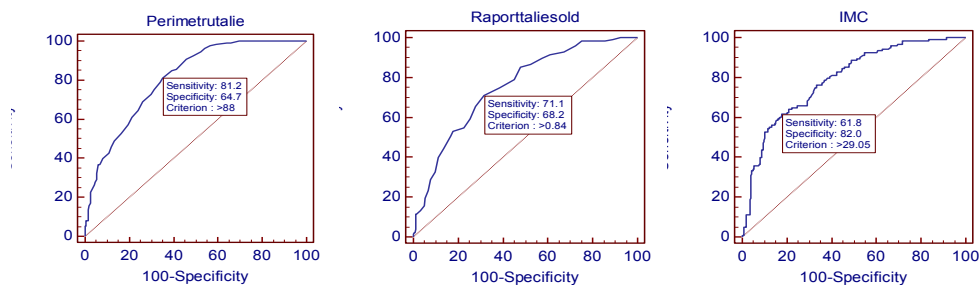


Fig. 3. Curbele ROC pentru PT, RTS și IMC – predictorii ai SM

În ceea ce privește LB, cea mai mare sensibilitate a avut-o PT, urmată de IMC, și respectiv RTS ($p < 0,0001$) (Fig. 4).

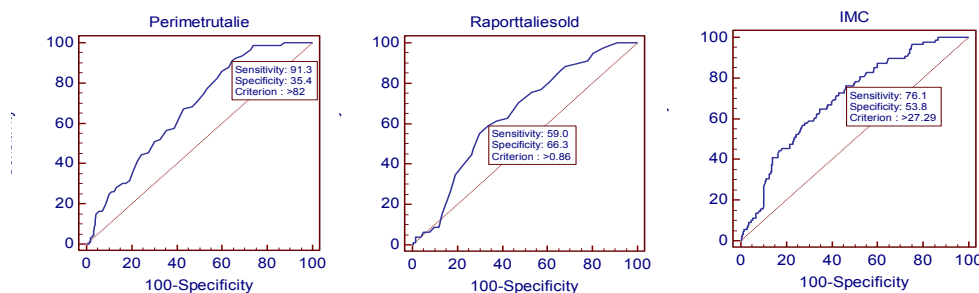


Fig. 4. Curbele ROC pentru PT, RTS și IMC – predictorii ai LB

Relația dintre nivelul adipokinelor și sindromul metabolic a fost explorată folosind analiza ROC pentru determinarea valorii predictive a nivelului seric al adipokinelor pentru sindromul metabolic. Cea mai bună sensibilitate pentru SM a adipokinelor au avut-o, în ordine, leptina, adiponectina și abia apoi insulina (90,48% (95%CI 69.6 - 98.8), 72,73% (95%CI 49.8 - 89.3) și, respectiv, 66,67% (95%CI 43.0 - 85.4)) la valori cut-off de >10,05ng/ml (p=0,08), <37,96pg/ml (p=0,0008), și respectiv, >12,11mU/l ((p<0,0001)). Incidența SM a crescut semnificativ odată cu creșterea nivelului seric al leptinei (Fig 5). Specificitatea cea mai mare pentru SM la valorile de cut-off a avut-o însă insulina (80%).

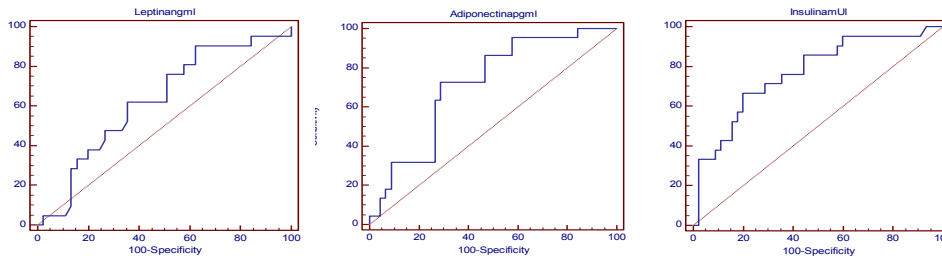


Fig. 5. Curbele ROC pentru leptină, adiponectină și insulină – predictori pentru SM

Concluzii: Conform datelor noastre, coexistența unor dezechilibre metabolice multiple la un singur individ, condiție denumită Sindrom Metabolic, apare frecvent în populația generală. Sindromul se asociază cu steatoza hepatică, litiaza biliară și rezistența la leptină. Factorii asociați cu LB și FGNA în populația generală sunt similari: obezitatea centrală, hiperleptinemia și rezistența la insulină.

Studiul III Influența sindromului de rezistență la insulină asupra angiogenezei în carcinomul hepatocelular

Ipoteza de lucru: Este important să înțelegem mecanismele producerii inflamației cronice și felul cum aceasta duce la dezvoltarea HCC, căutând concomitent căi de îmbunătățire a terapiei existente.

Scop: Scopul studiului nostru a fost evaluarea influenței diabetului și obezității asupra supraviețuirii la pacienții cu HCC. Pornind de la ipoteza că obezitatea determină modificări secundare apariției sindromului de rezistență la insulină care pot încuraja dezvoltarea cancerului, am urmărit corelația dintre insulină și adipokine (leptină, adiponectină) cu VEGF ca marker al angiogenezei la pacienții cu HCC. Au fost determinate corelațiile între nivelul seric al VEGF, exprimarea VEGF la pacienții cu HCC și adipokinele serice.

Material și metodă: 120 de pacienți cu hepatocarcinom dezvoltat pe ciroză (72 bărbați și 48 femei; vârsta medie 62±8,8 ani) internați în Clinica Medicală III, și 50 pacienți cirofici (35 bărbați și 15 femei; vârsta medie 60±7,8 ani) fără leziuni focale hepatice au fost incluși în lotul de studiu HCC, respectiv, lotul de studiu ciroză hepatică (CH), între anii 2006-2009. Diagnosticul de HCC a fost stabilit conform ghidurilor în vigoare în momentul studiului, folosind în funcție de mărimea nodulului 1-2 tehnici imagistice cu contrast (CEUS, CT sau MRI cu contrast).

Rezultate: Perioada de urmărire medie a fost de 26,7 luni (1–45 luni) la lotul cu pacienți obezi cu HCC și 28,3 luni (1–48 luni) la lotul fără obezitate. Ratele de supraviețuire globală estimate la 1 și 3 ani au fost 30,3% și 12,9% la lotul cu obezitate și 28,8%, respectiv, 11,2%, la lotul fără obezitate (p = 0,83, Fig 6). Ratele de supraviețuire globală estimate la 1 și 3 ani au fost 24,8% și 10,9% la lotul cu DZ tip 2 și 23,6% și, respectiv, 9,2%, la lotul fără DZ tip 2 (p = 0,73, Fig 7).

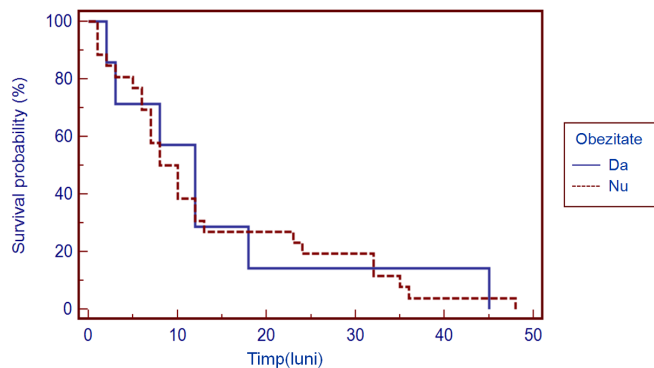


Fig. 6. Supraviețuirea globală la pacienții cu HCC cu și fără obezitate

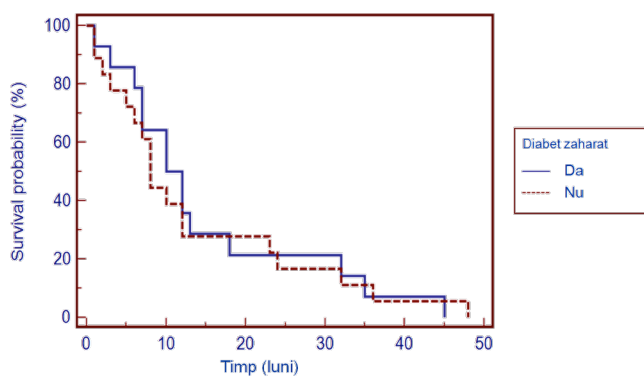


Fig.7. Rata de supraviețuire la pacienții cu HCC și diabet zaharat tip 2

Nivelul seric al insulinei și indicele HOMA RI au fost semnificativ crescute la pacienții cu HCC. La lotul HCC nivelul seric al VEGF s-a corelat invers proporțional, intensitatea corelației fiind moderată și semnificativă statistic, cu nivelul seric al insulinei ($r=-0,3$, $p=0,004$) și a leptinei ($r=-0,23$, $p=0,015$). Nivelul seric al leptinei a prezentat o corelație mare, indirectă, semnificativă cu numărul de pediculi vasculari ai formațiunii tumorale.

Concluzii: În studiul nostru obezitatea și diabetul zaharat tip 2 nu au contribuit la creșterea mortalității pacienților cu HCC. Nivelul seric al leptinei nu s-a asociat cu creșterea MVD intratumoral sugerând că implicarea acestuia în procesul de neoangiogeneză este probabil mediată de micromediul peritumoral, sau dimpotrivă joacă un rol de antagonist al factorilor pro-angiogenici.

Studiul IV Ablația fototermică a carcinomului hepatocelular utilizând nanoparticule de aur funcționalizate

Ipoteza de lucru: Cancerul hepatic determină un număr tot mai mare de victime pe plan global, cu o incidență și prevalență în creștere. În prezent ne lipsește imaginea epidemiologică a incidenței HCC care grevează FGNA, dar datele existente ne permit să întrezărim impactul viitor al acestei patologii.

Scop: În această cercetare am inițiat crearea unui bio-nano-sistem pe bază de Alb-GNPs pentru direcționarea selectivă a receptorilor de albondină (Gp60) și necroza mediată laser a celulelor de cancer hepatic, cu efecte nocive minime asupra celulelor normale. Conform cunoștințelor noastre, aceasta este prima demonstrație de țintire selectivă

prin intermediul receptorilor Gp60 (de pe membrana celulelor de cancer hepatic) folosind un conjugat de Alb și GNPs.

Material și metodă: Studiul s-a efectuat între anii 2013-2014 la Departamentul de Nanomedicină al Catedrei Chirurgie III, din cadrul IRGH “Prof.Dr.Octavian Fodor”, condus de Prof.Dr.Cornel Iancu.

Rezultate: Nanoparticulele de aur stabilizate cu albumină au fost supuse mai multor măsurători: UV-Vis, difuzia dinamică a luminii (DLS), ATR-FT-IR și microscopia de forță atomică (AFM).

Am evaluat mai departe afinitatea nanobiosistemului Alb-GNPs față de celulele de cancer hepatic cu ajutorul microscopiei în câmp întunecat. După cum se vede în Fig 8, încorporarea GNPs de către celulele HepG2 a fost semnificativ mai mare în celulele de cancer hepatic cu nanostructuri punctate, refringente răspândit peste tot în citoplasmă, cu colocalizare cu fluorescență roșie, sugerând puternic direcționarea selectivă a receptorilor marcați cu Cy3. O activare mai slabă a receptorilor Gp60 a fost observată pentru celulele de control, observație confirmată prin microscopie în câmp întunecat .

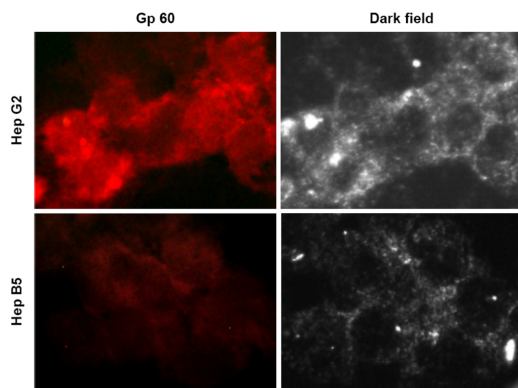


Fig.8. Mecanismul de endocitoză *in vitro* prin intermediul Alb-GNPs în celulele umane de cancer de ficat.

Concluzii

1. Administrarea de nanoparticule de aur funcționalizate cu albumină duce la creșterea absorbției intracelulare în celulele de cancer hepatic prin direcționarea selectivă a receptorilor Gp60 situați pe membrana celulară.
2. Aceste rezultate pot reprezenta un prim pas în procesul unei noi metode de tratament *in vivo* a celulelor de cancer hepatic cu ajutorul ablației termice nanolocalizate prin încălzire cu laser.

Concluzii finale

1. Studiul nostru a constatat reducerea semnificativă a motilității veziculare la pacienții cu SHNA față de martori, și de asemenea la cei cu steatoză față de martori. Faptul că parametrii funcției motorii ai VB au fost semnificativ diferiți în SHNA și steatoză sugerează o contribuție importantă a factorului inflamator, pe lângă cel metabolic în realizarea hipomotilității veziculare.
2. Motilitatea VB s-a asociat la pacienții cu FGNA cu:
 - a. obezitatea s-a asociat cu alterarea motilității VB;
 - b. diabetul zaharat a afectat funcția motorie a VB, dar nu este singurul determinant al motilității alterate a VB la pacienții cu SHNA;
 - c. evacuarea VB a fost alterată la pacienții cu nivelul trigliceridemieii;

3. Pacienții cu FGNA au prezentat numeroși factori de risc comuni cu litiaza biliară colesterolică, cum ar fi rezistența la insulină, diabetul zaharat tip 2, obezitatea centrală, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia și sindromul metabolic. Acești factori patogenetici comuni sunt probabil responsabili pentru prevalența crescută a LB colesterolice la pacienții cu FGNA;
4. Subiecții cu SM prezintă o serie de trăsături metabolice comune, asociate cu obezitatea centrală, rezistența la insulină, hiperleptinemia și hipoadiponectinemia;
5. Incidența SM a crescut proporțional cu creșterea nivelului seric al leptinei. Specificitatea cea mai mare pentru diagnosticul de SM la valorile de cut-off ($>12,11\text{mU/l}$) a avut-o însă insulina (80%);
6. Hiperinsulinemia și HOMA, markeri surogat al RI, reprezintă factori de risc atât pentru LB, cât și pentru FGNA, posibil ca parte a modificărilor metabolice generale caracterizate prin acumulare ectopică de grăsime și secreție anormală de adipokine de către țesutul adipos disfuncțional;
7. O valoare scăzută a adiponectinei este predictor pentru obezitate, LB și SM. De asemenea, hipoAD s-a corelat statistic semnificativ cu trăsăturile sindromului de rezistență la insulină, independent de IMC, posibil datorită proprietății AD de a crește sensibilitatea la insulină;
8. În studiul nostru nu am constatat că obezitatea și diabetul zaharat tip 2 contribuie la creșterea mortalității pacienților cu HCC (perioada de urmărire medie a fost de 26,7 luni la lotul de pacienți obezi cu HCC). Asocierea dintre cancerul hepatic și obezitate se poate datora convergenței unor căi de semnalizare care implică adipokine, procesul de inflamație și rezistența la insulină.
9. Nivelul seric al leptinei nu s-a asociat cu creșterea MVD intratumoral sugerând că implicarea acesteia în procesul de neoangiogeneza probabil este mediată de micromediul peritumoral, sau dimpotrivă joacă un rol de antagonist al factorilor pro-angiogenici. Rolul leptinei în tumorigeneză este în continuare necunoscut, fiind necesare studii ulterioare pentru a evalua rolul leptinei în hepatocarcinogeneza.
10. Nivelul seric crescut de insulină s-a asociat cu prezența HCC; există probabil un dialog între căile de semnalizare proangiogenice și RI, anomaliile metabolice, mai degrabă decât ciroza hepatică subiacentă, promovând hepatocarcinogeneza. Există cu siguranță căi de comunicare între angiogeneza și metabolism; în HCC sunt necesare studii care să analizeze impactul coroborării acestor 2 procese asupra dezvoltării și progresiunii HCC.
11. Administrarea de nanoparticule de aur funcționalizate cu albumină duce la creșterea absorbției intracelulare în celulele de cancer hepatic prin direcționarea selectivă a receptorilor Gp60 situați pe membrana celulară. În urma iradierii cu laser, fotoexcitarea nanoparticulelor de aur duce la creșterea de evenimente apoptotice inițiate de dezintegrarea AG-RE, cu activarea ulterioară a caspazei 3 apoptotice.
12. Din punct de vedere chirurgical, identificarea ultrasonografică a tumorii și condițiile de alimentare vasculară, administrarea intra-arterială a GNPs funcționalizate, precum și iradierea laser externă, ar putea fi realizate în siguranță la pacienți cu ajutorul chirurgiei minim invazive, cu beneficii majore pentru pacient (de exemplu, abordarea laparoscopica sau percutanată sub ghidaj ecografic/CT).

Contribuții personale și direcții de dezvoltare ulterioară

Rezultatele obținute în activitatea de cercetare derulată pentru realizarea tezei la parametrii propuși ne permit și susțin formularea următoarelor contribuții personale:

1. **Studiu privind relația motilitate veziculară și ficatul gras.** S-a constatat de către noi, date încă nepublicate în extenso, existența unei reduceri semnificative a motilității veziculare la pacienții cu steatohepatită față

de martori, dar și la cei cu steatoză hepatică față de martori. Mai mult, parametrii de motilitate sunt semnificativ alterați la steatohepatită față de steatoză, fapt ce sugerează implicarea factorului inflamator în modificarea motilității veziculare. Rezultatele noastre sprijină ipoteza ca diminuarea contractilității VB ar putea fi un factor contributiv la procesul de litogeneză la pacienții cu SHNA.

2. Studiu privind baza biologică a creșterii prevalenței LB la pacienții cu FGNA. Există motive să credem că la pacienții cu FGNA intervin factori adiționali de influențare a litogenezei biliare. Pacienții cu FGNA au prezentat mulți factori de risc comuni cu litiaza biliară colesterolică, cum ar fi rezistența la insulină, diabetul zaharat tip 2, obezitatea centrală, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia și sindromul metabolic. Unul dintre cei mai provocatori factori de risc neconvenționali pentru LB, demonstrat și în studiul nostru, este hiperleptinemia. LB a fost singurul factorul predictor independent pentru modelul de regresie al leptinei.

3. Studiu privind prevalența litiazei biliare și a relației cu elementele sindromului metabolic. Rezultatele noastre sugerează că coexistența acestor multiple variabile dismetabolice determină alterarea în grad ridicat a funcției motorii a VB și mărește predispoziția pentru litiza colesterolică. În studiul nostru, o valoare scăzută a HDL colesterolului s-a corelat cu creșterea volumelor bazal și rezidual ale VB, date care sugerează o posibilă implicare și a HDL-colesterolului în alterarea motilității VB, fără ca acesta să reprezinte un factor de risc independent.

4. Studiu privind relația existentă între nivelul seric scăzut al AD, asociat de regulă cu un risc ridicat pentru multe condiții dismetabolice, în special bolile asociate obezității. Este posibil ca concentrația serică redusă a AD să joace un rol în LB și posibil să afecteze compoziția chimică a calculilor colesterolici direct sau indirect. În studiul nostru pacienții cu FGNA au prezentat în număr semnificativ crescut hiperinsulinemie și RI, și un nivel scăzut al AD (Moșteanu O., Gut 2009;56:A279), posibil ca parte a modificărilor metabolice generale caracterizate prin acumulare ectopică de grăsime și secreție anormală de adipokine de către țesutul adipos disfuncțional.

5. Studiu privind relația dintre angiogeneza tumorală și țesutul adipos disfuncțional la pacienți cu rezistență la insulină. În studiul nostru nivelul seric al insulinei s-a corelat direct proporțional, intensitatea corelației fiind mare, cu procentul de vase imature și intermediare, ceea ce sugerează că insulina și rezistența la insulină sunt implicate în fazele inițiale ale hepatocarcinogenezei. Spre deosebire de nivelul insulinei, în studiul nostru nivelul seric al adiponectinei s-a corelat invers proporțional cu MVD, neovasele tumorale și valoarea VEGF. Nivelul seric al leptinei nu s-a asociat cu creșterea MVD intratumoral sugerând că implicarea acesteia în procesul de neoangiogeneza probabil este mediată de micromediul peritumoral, sau dimpotrivă joacă un rol de antagonist al factorilor pro-angiogenici (Moșteanu O., Gut 2012; 61 A348).

6. Contribuții privind folosirea nanotehnologiei în terapia HCC. În studiul nostru am reușit crearea unui bio-nano-sistem pe bază de Alb-GNPs pentru direcționarea selectivă a receptorilor de albondină (Gp60) și necroza mediată laser a celulelor de cancer hepatic, cu efecte nocive minime asupra celulelor normale. Conform cunoștințelor noastre, aceasta este prima demonstrație de țintire selectivă prin intermediul receptorilor Gp60 (de pe membrana celulelor de cancer hepatic) folosind un conjugat de Alb și GNPs.

PhD Thesis Summary

Non-alcoholic fatty liver, part of the metabolic syndrome and risk factor for gallstones disease and hepatocellular carcinoma. A prospective study

PhD student: **Ofelia Elena Moșteanu**

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



Timetable

Introduction	11
Personal Contribution	11
Study I Ultrasonographic evaluation of gallbladder motility in patients with NASH.....	11
Study II The association between NASH and MS: the role of adipokines	12
Study III The influence of insulin resistance (IR) on HCC angiogenesis	14
Study IV Photothermic ablation of HCC using functionalised gold nanoparticles	15
Final conclusions	16
Personal contribution and follow-up	17

Key words: non-alcoholic fatty liver, insulin resistance, hepatocellular carcinoma, nanotechnology

Introduction

The present thesis aimed to evaluate the volume of the gallbladder and its emptying pattern in patients with Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH) and Metabolic Syndrome (MS), as well as establishing the profile of biological factors (cytokines) involved in the motility disturbances present in these conditions.

Another significant objective of this paper revolved around investigating the link between adipokines and the aggressivity of hepatocarcinoma (HCC). We quantified the vasculo-endothelial growth factor (VEGF), the density of intratumoral microvascularisation (MVD), leptine and insuline in cirrhotic patients both with HCC and without HCC. The specific goal is to find a link between serum VEGF levels, MVD in tumor samples and link these with insulin resistance and adipokines. Our study corroborates the effects of angiogenesis and inflammation, two processes which share common molecular mechanisms, namely neoangiogenesis.

The final section of this paper describes the development of a therapeutic nano-biosystem for HCC based on selective thermal necrosis of the tumor after laser irradiation of nanocomposite products.

Personal Contribution

Study I Ultrasonographic evaluation of gallbladder motility in patients with NASH

Hypothesis: We have reasons to believe that NASH patients exhibit some variations in pathogenetic mechanisms which lead to lithogenesis.

Aim: Although the metabolic component is clearly involved in pathogenesis, are motility alterations a key component in the pathogenesis of cholesterologic gallstones in NASH patients? The purpose of our study was to assess the motility of the gallbladder in NASH patients and to investigate the factors associated with gallstones (GS) in NASH patients.

Materials and methods: 234 subjects were included in this study. These patients were divided in 3 groups, as follows: NASH (group 3=56), SH (group 2=76) and controls (group 0=102). No statistically significant differences were found among these groups with regards to average age and gender distribution. Ultrasonography was used to obtain information regarding gallbladder motility, following a standardised protocol.

Results: The NASH group exhibited the highest jeun insulin levels compared to controls (17.4 mU/l vs. 9.35 mU/l, $p=0.044$), and compared with the SH group (17.4 mU/lvs. 10.99 mU/l, $p=0.210$) (Fig. 1). Insulin resistance (the HOMA value) was significantly elevated in NASH patients compared to controls ($p=0.045$); the comparison with the SH group did not yield statistically significant results ($p=0.182$).

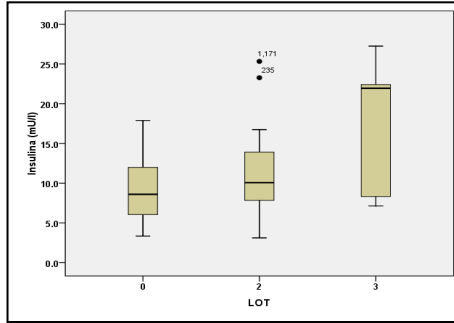


Fig. 5. Serum insulin levels in the 3 groups

Both NASH and SH patients had a significantly increased basal volume compared to the control group. Furthermore, the residual volume was significantly larger in patients with NASH and SH compared to controls. The ejection fraction of the gallbladder was significantly reduced in patients with NASH compared to controls. The emptying of the gallbladder was significantly slower in patients with NASH compared to patients with SH.

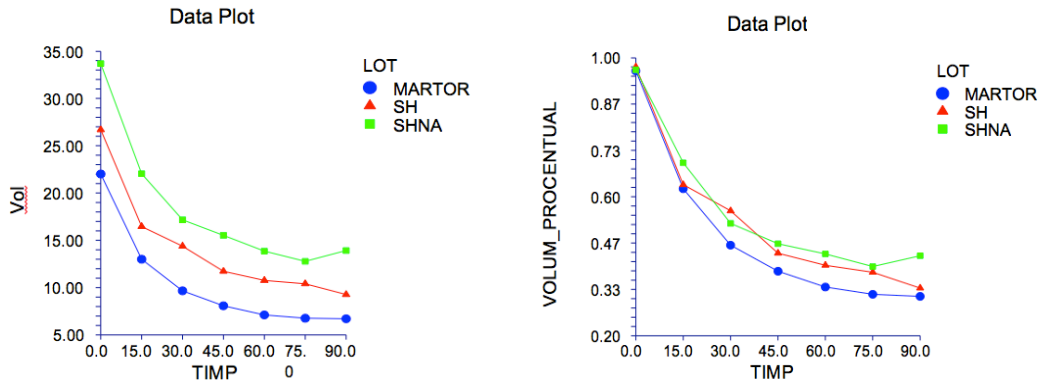


Fig. 6. Emptying plots of the gallbladder in patients with NASH vs SH vs control expressed in ml(A) or volume percentage(B).

Conclusions

The present paper highlighted a significant reduction in gallbladder motility in these patients compared to controls and in SH patients versus controls. These altered parameters suggest an important contribution of inflammation, alongside metabolic factors in the reduction of gallbladder motility. This could be a contributive factor in the lithogenesis process.

Study II The association between NASH and MS: the role of adipokines

Hypothesis: The prevalence of obesity is seeing a dramatic increase in western countries, similar to an epidemic. In itself, obesity is a contributing factor for diabetes mellitus type 2, dyslipidemia, arterial hypertension and MS.

NASH is the most common cause of chronic hepatopathies in the western world, including a broad spectrum of hepatic injury, ranging from steatosis to cirrhosis.

Aim

Our study followed:

- (1) Establishing the prevalence of MS in a general sample population of active age
- (2) Extending the phenotype description of MS to other biochemical parameters, both metabolic and non metabolic.
- (3) We questioned whether antropometric parameters such as waist circumference, waist to hip ratio are better indicators of MS, NASH or GS than BMI

Materials and methods: 651 subjects were included in this study (98 males and 553 females with an average age of 46.12±8.9 years) between 2005-2009. This study was prospective, cross sectional, observational, on a population of employees at Flacara company in Cluj Napoca. An invitation letter was forwarded to all employees via the attending physician-as such no subject selection procedure was employed.

Results: The best sensibility of anthropometric indices for MS was found to be waist perimeter, waist to hip ratio and then BMI, respectively (81.2% (95%CI 73.5 - 87.5), 71.9% (95%CI 62.4 - 78.8) and 61.79% (95%CI 52.6 - 70.4)) respectively at cut-off values of >88cm, >0.84 and, >29.5 (p<0.0001) (Fig. 3). The highest specificity of cut-off values was presented by BMI (82.04%).

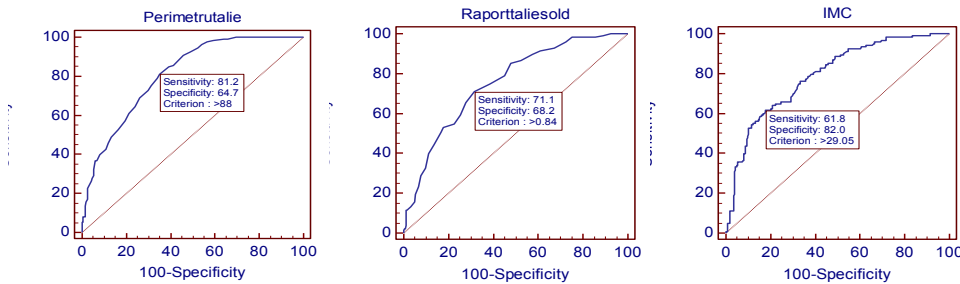


Fig. 7. ROC curves for waist perimeter, waist to hip ratio and BMI-predictors of MS

Regarding GS, the highest sensibility was registered by waist perimeter, followed by BMI and waist to hip (p<0.0001) (Fig. 4).

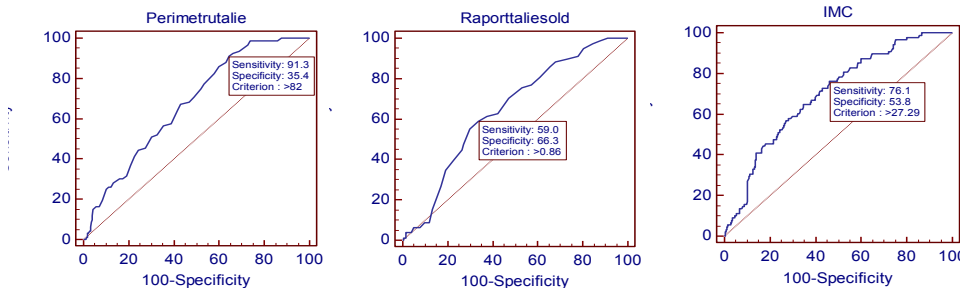


Fig. 8. ROC curves for waist perimeter, waist to hip ratio and BMI-predictors of GS

ROC analysis was used to determine the relationship between adipokine levels and MS-with serum adipokine levels being predictors for MS. The best sensitivity for MS of adipokines was registered by leptin, adiponectin and insulin (90.48% (95%CI 69.6 - 98.8), 72.73% (95%CI 49.8 - 89.3) and, 66.67% (95%CI 43.0 - 85.4)) at cut-off values of >10.05ng/ml (p=0.08), <37.96pg/ml (p=0.0008), and >12.11mU/l ((p<0.0001)). MS incidence was increasing simultaneously with serum leptin levels (Fig 5). The highest specificity for MS at cut-off values was presented by insulin (80%).

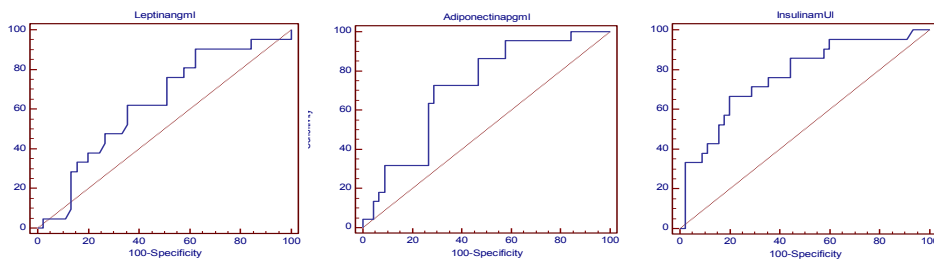


Fig. 5. ROC curves for leptin, adiponectin and insulin-MS predictors

Conclusions: According to our data, the coexistence of multiple metabolic disorders in one individual, namely MS, is frequent in the general population. The syndrome associates SH, GS and leptin resistance. The factors associated with GS and NASH in the general population are similar: central obesity, hyperleptinaemia, insulin resistance.

Study III The influence of insulin resistance (IR) on HCC angiogenesis

Hypothesis: Understanding the mechanisms of chronic inflammation and how this may lead to HCC is important for understanding the pathogenesis and elaborating new therapeutic targets in this pathology.

Purpose: The purpose of our study was to evaluate the influence of type 2 diabetes and obesity on the survival of patients with HCC. Assuming the hypothesis that obesity triggers secondary modifications leading to IR which may encourage neoplasia development, we followed the correlation between insulin and adipokines (leptin, adiponectin) using VEGF as an angiogenesis marker in patients with HCC. Correlations were found between the serum VEGF levels, the expression of VEGF in HCC patients and serum adipokines.

Materials and methods: 120 patients with HCC on cirrhosis (72 males and 48 females, average age 62 ± 8.8 years) admitted in Medical III Clinic and 50 cirrhotic patients (35 males and 15 females, average age 60 ± 7.8 years) presenting no focal lesions, were included in the study group for HCC and cirrhosis respectively, during 2006-2009. HCC diagnosis was established according to current guidelines at that time, using 1-2 contrast imaging techniques, according to the lesion size (CEUS, CT or contrast MRI).

Results: The follow-up period was 26.7 months (1–45 months) for the obese HCC patients and 28.3 months (1–48 months) in the non-obese group. The global survival rates estimated at 1 and 3 years were 30.3% and 12.9% for the obesity group and 28.8%, respectively, 11.2% in the non-obese group ($p = 0.83$, Fig 6). The global survival rates at 1 and 3 years were of 24.8% and 10.9%, respectively, in the type 2 diabetes group and 9.2% in the non diabetic group ($p = 0.73$, Fig 7).

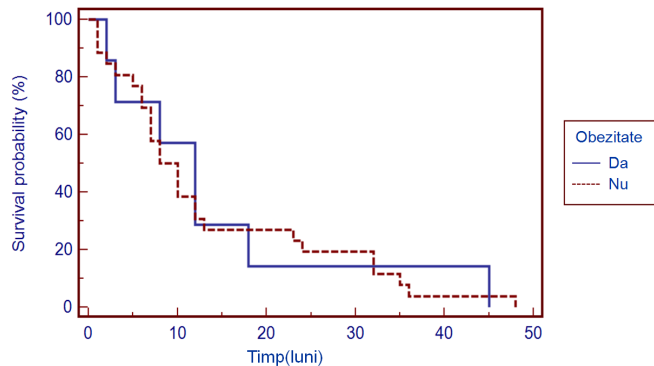


Fig. 6. Global survival in HCC patients-obese and non-obese group

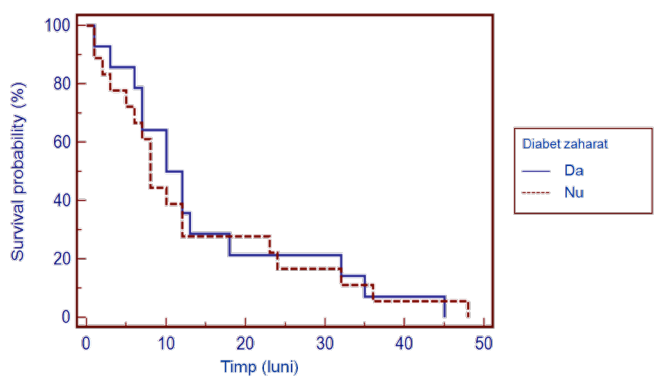


Fig.7. Global survival in HCC patients with type 2 diabetes

Serum insulin levels and HOMA RI index were significantly elevated in HCC patients. In the HCC group, serum VEGF was reversely correlated, the intensity of the correlation being moderated and significant statistically with serum insulin levels ($r=-0.3$, $p=0.004$) and leptin levels ($r=-0.23$, $p=0.15$). Serum leptin levels showed a significant, indirect correlation with the number of vascular pedicles of the tumor.

Conclusions: In our study, obesity and type 2 diabetes did not contribute to an increase in mortality in patients with HCC. The serum leptin levels were not associated with an increase in MVD, suggesting that its involvement in neoangiogenesis is possibly mediated by the peritumoral microenvironment, or-in a contrary fashion, being an antagonist of pro-angiogenesis factors.

Study IV Photothermic ablation of HCC using functionalised gold nanoparticles

Hypothesis : HCC is an increasingly common condition worldwide, with an increase in incidence and prevalence. As of now, an epidemiologic view of the incidence of HCC on NAFLD is still missing, but the existing data allow us to see a potential future impact of this condition.

Aim: In this research endeavour, we initiated the design of a bio-nanosystem based on Alb-GNPS for the selective directing of receptors for albondine (Gp60) and laser mediated necrosis of the HCC cells, with minimal damage on normal cells. According to our knowledge base, this is the first demonstration of targeted therapy via Gp60 receptors (on the membrane of HCC cells) using an Alb GNPs conjugate.

Materials and methods: The study was carried out during 2013-2014 at the Nanomedicine Department of IRGH “Prof.Dr.Octavian Fodor”, under the guidance of Prof.Cornel Iancu.

Results: The albumin stabilised nanoparticles were subjected to a number of determinations: UV-Vis, dynamic light diffusion, ATR-FT-IR and Atomic Force microscopy.

We further evaluated the affinity of our Alb-GNPs nanosystem towards HCC cells with dark field microscopy . As illustrated in Fig 8, GNPs incorporation in HepG2 cells was significantly larger in HCC cells with pointed nanostructures, refringencies throughout the entire cytoplasm, co-localised with red fluorescein, suggesting a strong selective directing of the Cy3 marked receptors. A weaker activation of Gp60 receptors was noted for the control cells, confirmed by dark field microscopy.

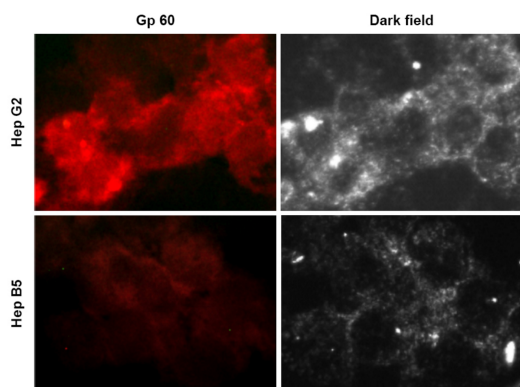


Fig.8. In vitro endocytosis mechanism via Alb-GNPs in human liver cells.

Conclusions

1. Administering albumin-functionalised gold nanoparticles increases the intracellular absorption in cancer cells by selectively directing Gp60 receptors on the cell membrane.
2. These results are a first step in elaborating a new in vivo technique of treatment of HCC using thermal laser nanolocalised ablation.

Final conclusions

1. Our study noticed the significant reduction of gallbladder motility in patients with NASH and SH versus controls. These altered parameters suggest that hypomotility is caused both by inflammatory factors as well as metabolic factors.
2. Gallbladder motility in NASH patients was associated with:
 - a. obesity was associated with altered gallbladder motility;
 - b. type 2 diabetes affected the motility of the gallbladder but is not the sole determinant of altered gallbladder motility in patients with NASH;
 - c. gallbladder evacuation was altered in patients with elevated triglyceride levels;
3. NASH patients presented a plethora of common risk factors associated with GS, such as insulin resistance, type 2 diabetes, central obesity, hypertriglyceridaemia, hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia, hypoadiponectinaemia

and MS. These common pathogenetic factors are probably responsible for the increased prevalence of GS in NASH patients.

4. Patients with MS present a series of common metabolic traits associated with central obesity, insulin resistance, hyperleptinaemia, hypoadiponectinaemia.
5. MS incidence was increased proportionately with leptin levels. The highest specificity of MS diagnosis at cut-off levels was presented by insulin: ($>12.11\text{mU/l}$; 80%).
6. Hyperinsulinaemia and HOMA, surrogate markers of insulin resistance are risk factors for GS and NASH, possibly as a part of complex metabolic disorders featuring ectopic adipose tissue accumulation and abnormal adipokine secretion by the dysfunctional adipose tissue.
7. A decrease in adiponectin is a predictor for obesity, GS and MS. HypoAD was statistically correlated with insulin resistance, independent from BMI, possibly due to AD's properties of increasing insulin sensitivity.
8. In our study, obesity and DM type 2 were not contributors to increasing mortality in HCC (follow up 26.7 months in obese HCC patients). The association of HCC and obesity may be due to the convergence of signaling pathways which involve adipokines, inflammation and insulin resistance.
9. Serum leptin levels were not associated with an increase in MVD suggesting that its involvement in neoangiogenesis is related to peritumoral microenvironment or as an antagonist of pro-angiogenic factors. The role of leptin in tumorigenesis is unknown, further studies being needed.
10. Increase in serum insulin was associated with HCC. There is a potential dialogue in proangiogenic signaling pathways and IR, underlying anomalies rather than the cirrhosis producing HCC genesis. Metabolic and angiogenesis communication pathways surely exist, further studies being necessary to analyse the link and impact of these factors.
11. Gold-albumin nanoparticles increases the intracellular absorption in HCC cells through selectively directing Gp60 receptors on the membrane. Following laser irradiation, the gold nanoparticles increase apoptosis initiated by AG-RE, with ulterior activation of caspase 3.
12. Surgically, ultrasonographic identification of the tumor and its vascularisation, administering functionalised GNPs intraarterially and external laser irradiation may be carried out safely using minimally invasive surgery with major patient benefits (for instance laparoscopic or percutaneous approach under US/CT guidance).

Personal contribution and follow-up

The results obtained through this thesis' research activity allow us to support the following personal contributions:

1. Study regarding the **association of gallbladder motility and fatty liver**. Our yet unpublished data has confirmed a significant reduction in gallbladder motility in SH patients compared to controls, as well as in steatohepatitis versus controls. Furthermore, motility parameters are significantly altered in NASH versus SH, suggesting the involvement of inflammation in alterations in gallbladder motility. Our results support the hypothesis that the diminished contractility of the gallbladder is contributive in NASH patients lithogenesis.

2. Study with regards to the **increase of GS in NASH patients**. We have reason to believe that NASH patients exhibit other risk factors for lithogenesis as well. NASH patients presented similar risk factors for GS such as IR, DM type 2, central obesity, hyperTG, hyperIns, Hyperleptin, hypoADP and MS. One of the most startling risk factors cited by our study is hyperleptinaemia. GS were the only independent predictive factor for the leptin

regression model.

3. **Study with regards to the decrease in AD, usually associated with a number of dysmetabolic conditions, especially obesity-related conditions.** It is possible that a decrease in serum AD plays a role in GS and may affect the chemical composition of the calculus. In our study, NASH patients presented a significant proportion of hyperinsulinaemia and insulin resistance, and usually a decrease in AD (Moşteanu O., Gut 2009;56:A279), possibly as a component in the metabolic alterations featuring an ectopic accumulation of fatty cells and a subsequent abnormal adiponectin secretion.

4. **Study regarding tumor angiogenesis and dysfunctional adipose tissue** in patients with insulin resistance. In our study insulin levels were directly correlated with immature or intermediate blood vessels, suggesting that insulin and IR are involved in the initial stages of HCC genesis. Serum adiponectine was reversely correlated with MVD, tumor neoangiogenesis and VEGF. Serum leptin was not associated with intratumoral MVD suggesting that this component is possibly mediated by peritumoral microenvironment or as an antagonist in pro-angiogenetic factors. Moşteanu O., Gut 2012; 61 A348).

5. Contributions regarding **nanotechnology in HCC**. In our study we designed a bionanosystem based on Alb-GNPs for the selective directioning of albondine receptors(Gp60) and laser mediated necrosis of HCC cells, with minimal damage towards normal cells. This is the first demonstration of targeted Gp60 receptor selectivity using Alb and GNPs.