
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Diagnostic, prognostic și tratament în carcinomul hepatocelular

Doctorand: **Tudor Ioan Mocan**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Zeno Adrian Spârchez**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Epidemiologie și diagnostic în carcinomul hepatocelular	17
1.1. Epidemiologia carcinomului hepatocelular	17
1.2. Screening în carcinomul hepatocelular	19
1.3. Diagnosticul carcinomului hepatocelular	21
2. Prognosticul carcinomului hepatocelular	25
2.1. Introducere	25
2.2. Importanța căii de semnalizare PD-1/PD-L1	26
2.3. PD-L1 tisular – un factor de prognostic la pacienții cu CHC rezecabil	29
2.4. PD-L1 circulant – un factor de prognostic la pacienții cu CHC inoperabil	30
3. Tratament în carcinomul hepatocelular	32
3.1. Stadializarea carcinomului hepatocelular	32
3.2. Opțiuni terapeutice în carcinomul hepatocelular	34
3.2.1. Tratamente curative în carcinomul hepatocelular	34
3.2.2. Tratamente paliative în carcinomul hepatocelular	37
3.2.3. Particularități în tratamentul carcinomului hepatocelular la pacienții cu ciroză hepatică virală C	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective	41
2. Studiul 1. Acizi biliari fetali plasmatici: Acidul 7-α-hidroxi-3-oxocolol-4-en-24-oic și acidul 3-oxachola-4,6-dien-24-oic indică severitatea cirozei hepatice	43
2.1. Introducere	43
2.2. Obiectivele studiului	47
2.3. Material și metodă	45
2.4. Rezultate	52
2.5. Discuții	62
2.6. Concluzii	64

3. Studiul 2. Nivelurile serice ale ligandului 1 solubil cu rol în controlul morții celulare programate (sPD-L1): Un posibil biomarker în predicția supraviețuirii după tratamentul curativ al pacienților cu carcinom hepatocelular precoce	65
3.1. Introducere	65
3.2. Obiective	66
3.3. Material și metodă	66
3.4. Rezultate	70
3.5. Discuții	77
3.6. Concluzii	79
4. Studiul 3. Ablația percutanată prin radiofrecvență augmentată prin nanoparticule de aur acoperite cu PEG ghidată ecografic în ficat de porc	81
4.1. Introducere	81
4.2. Obiective	82
4.3. Material și metodă	83
4.4. Rezultate	86
4.5. Discuții	95
4.6. Concluzii	98
5. Concluzii generale	99
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	101
REFERINȚE	103

Cuvinte cheie: carcinom hepatocelular, PD-1, PD-L1, acizi biliari fetali, nanoparticule de aur

Introducere

La nivel global carcinomul hepatocelular (CHC) este cea mai frecventă tumoră primară a ficatului. Aproximativ 75% dintre toate cancerurile hepatice sunt datorate CHC. În intervalul 1978-2012 incidența CHC a crescut în majoritatea țărilor europene. Mai mult, comparativ cu anul 2005, se estimează o creștere cu 35% a numărului de cazuri noi per an până la finele anului 2030. O incidență în creștere și un prognostic rezervat fac din CHC una dintre cele mai letale entități oncologice la nivel mondial. Aceste predicții sumbre privind evoluția CHC în anii care urmează scot în evidență:

(1) necesitatea unei metode de diagnostic rapidă, acurată, ieftină și cu aplicabilitate largă;

(2) importanța unor factori de prognostic care să permită identificarea precoce a pacienților cu CHC care nu răspund la tratamentul inițial;

(3) identificarea unor noi metode de tratament cu scopul de a ameliora supraviețuirea.

Stadiul actual al cunoașterii

„Stadiul actual al cunoașterii” este prima parte a acestei teze și aduce în prim plan cele mai importante date adunate din literatură în ceea ce privește modalitățile actuale de diagnostic, prognostic și tratament al CHC. De asemenea sunt discutate și două aspecte particulare ale CHC: (1) rolul căii de semnalizare intra- și inter- celulare proteina 1 a morții celulare programate/ligandul 1 al morții celulare programate (PD-1/PD-L1) precum și potențialul rol ca biomarker de prognostic al PD-L1 solubil; (2) tratamentul CHC la pacienții cu hepatită cronică virală C în era potențelor tratamente anti-virale directe.

Contribuția personală

Primul studiu a fost realizat pentru a testa dacă doi acizi biliari fetali prezenți în mod normal în timpul vieții fetale pot fi utilizați ca markeri de diagnostic al carcinomului hepatocelular. Este un studiu observațional prospectiv. S-a realizat printr-o colaborare multicentrică. Sinteza acizilor biliari fetali a fost efectuată în Departamentul de Științe Farmaceutice și Tehnologice din Coreea de Sud, iar cuantificarea acestora în serul pacienților s-a efectuat de către corporația Waters din Regatul Unit. Cel de-al doilea studiu se referă la identificarea PD-L1 seric ca și factor de prognostic negativ la pacienții cu CHC. Este o analiză retrospectivă a unei baze de date culeasă prospectiv. Acesta s-a realizat printr-o colaborare între Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie

Prof. Dr. Octavian Fodor și Centrul de Cercetare în Medicină Avansată „MedFuture” din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România. Cel de-al treilea studiu a comparat eficacitatea ablației cu radiofrecvență versus ablația cu radiofrecvență plus nanoparticule de aur învelite în PDG pe un model experimental de CHC. Este un studiu prospectiv de tip observațional care s-a efectuat cu ajutorul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, România.

Studiul 1. Acizi biliari fetali plasmatici: Acidul 7- α -hidroxi-3-oxoclo-4-en-24-oic și acidul 3-oxachola-4,6-dien-24-oic indică severitatea cirozei hepatice

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost de a stabili dacă acizii biliari fetali: Acidul 7- α -hidroxi-3-oxoclo-4-en-24-oic (1) și acidul 3-oxachola-4,6-dien-24-oic (2) au valori mai ridicate la pacienții cu ciroză hepatică și hepatocarcinom comparativ cu pacienții cu ciroză hepatică fără hepatocarcinom.

Material și metodă

Sinteza acizilor biliari 1 și 2 s-a efectuat pornind de la acidul chenodeoxicolic printr-o serie etapizată de reacții chimice. Ulterior, cunatificarea acizilor biliari din plasmă s-a efectuat prin cromatografie lichidă ultraperformantă cuplată cu spectrometrie de masă triplu cuadripolară (UPLC-TQMS). În plus, am cuantificat în plasmă 15 acizi biliari primari și secundari folosind tot UPLC-TQMS. Pacienții au fost recrutați de la Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca, România. În total am inclus 25 de pacienți dintre care 15 cu ciroză hepatică fără CHC și 10 cu ciroză hepatică și CHC. Au fost excluși pacienții cu: (1) Cancer anterior sau concomitent; (2) Infecții active, altele decât hepatita cronică B sau virusul hepatitei C; (3) Antecedente de alogrefă de organ; (4) Sarcină sau alăptare (5) Refuzul de a semna consimțământul informat.

Rezultate

Concentrațiile plasmatice de 1 și 2 au fost investigate la 25 pacienți adulți cu diferite grade de ciroză hepatică, cu și fără carcinom hepatocelular (CHC). S-au constatat corelații semnificative din punct de vedere statistic ($P < 0,0001$) între gravitatea cirozei hepatice, determinată prin scorurile Child-Pugh și MELD, cu concentrațiile plasmatice 1 și 2, atât singure, cât și în asociere. Prezența CHC nu a influențat aceste corelații. Acizii colici plasmatice, chenodeoxicolici, deoxicolici, litocolici sau ursodeoxicolici, liberi și sub formă de conjugați cu glicină sau taurină, nu s-au corelat cu scorul Child-Pugh sau cu scorul MELD atunci când au fost corecți pentru comparații multiple.

Concluzii

Aceste constatări demonstrează că nivelurile plasmatice ale acizilor biliari fetali acidul 3-oxachola-4,6-dien-24-oic și acidul 7- α -hidroxi-3-oxoclo-4-en-24-oic și deteriorarea probabilă a activității AKR1D1 indică severitatea cirozei hepatice măsurată prin scorurile Child-Pugh și MELD.

Studiul 2. Nivelurile serice ale ligandului 1 solubil cu rol în controlul morții celulare programate (sPD-L1): Un posibil biomarker în predicția supraviețuirii după tratamentul curativ al pacienților cu carcinom hepatocelular precoce

Obiective

Ne-am propus să investigăm dacă nivelurile serice ale ligandului 1 al morții celulare programate (sPD-L1) măsurate înainte de tratamentul curativ reprezintă un biomarker de predicție al supraviețuirii la pacienții cu CHC.

Material și metodă

Au fost selectați pacienți cu carcinom hepatocelular din registrul regional de tumori hepatice din cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca, România (o bază de date colectată prospectiv) și au fost determinate nivelurile serice ale sPD-L1 folosind tehnica ELISA. A fost evaluată asocierea dintre nivelurile serice ale PD-L1 cu supraviețuirea globală (SG) și supraviețuirea fără semne de boală (SFB). În plus, pe un lot de 38 de pacienți am măsurat sPD-L1 atât înainte cât și la 6 săptămâni de la tratament. De asemenea, am evaluat expresia PD-L1 în țesutul tumoral prin analiză imunohistochimică.

Rezultate

Au fost incluși o sută douăzeci și unu de pacienți cu CHC. Cea mai bună valoare-limită a sPD-L1 atât pentru SFB, cât și pentru SG a fost de 96 pg/ml. Pacienții cu o valoare crescută a sPD-L1 (>96 pg/ml) au avut o supraviețuire fără semne de boală și SG mai scurtă (rata de risc 5,42, intervalul de încredere 95% 2,28-12,91, $p < 0,001$ și rata de risc 9,67, intervalul de încredere 95% 4,33-21,59, $p < 0,001$). Nivelurile crescute de sPD-L1 au fost asociate cu mortalitatea independent de alți predictorii de supraviețuire cunoscuți. Am constatat o corelație pozitivă între expresia sPD-L1 și PD-L1 în celulele canceroase ($p = 0,01$). La 16 din 38 pacienți, nivelurile sPD-L1 au scăzut față de valoarea inițială în săptămâna 6 după tratament, iar la 22 din 38 pacienți, nivelurile sPD-L1 au crescut față de valoarea inițială. Cu toate acestea, fluctuațiile în timp ale sPD-L1 nu au avut nicio influență asupra supraviețuirii ($p = 0,148$).

Concluzii

Concluzionăm că un nivel ridicat de sPD-L1 este un biomarker de prognostic nefavorabil la pacienții cu CHC. O scădere sau o creștere a sPD-L1 în săptămâna 6 de la tratament nu poate să prezică răspunsul la tratament. Valoarea predictivă a nivelurilor sPD-L1 pentru o terapie anti-PD1/PD-L1 de succes ar trebui investigată în viitor.

Studiul 3. Ablația percutanată prin radiofrecvență augmentată prin nanoparticule de aur acoperite cu PEG ghidată ecografic în ficat de porc

Obiective

Analiza efectelor nanoparticulelor de aur acoperite cu PEG asupra volumelor zonelor de necroză după ablația in vivo prin radiofrecvență a ficatului de porc.

Material si metodă

Acest studiu prospectiv a fost efectuat după obținerea aprobării comitetului instituțional pentru îngrijirea și protecția animalelor. Ablațiile prin radiofrecvență au fost efectuate în ficatul a zece porci *Sus scrofa domesticus*. În timpul fiecărei ablații, 10 ml de nanoparticule de aur acoperite cu PEG în două concentrații diferite (0,5 mg/ml (N1) și 0,01 mg/ml (N2)) au fost injectate prin canalul cateterului în zona țintă. Pentru grupul de control, s-a utilizat 10 ml de ser fiziologic. După cinci - zece minute de la fiecare ablație, s-a efectuat o ecografie cu substanță de contrast (CEUS) pentru a evalua volumul zonei de coagulare. În ziua a cincea am efectuat o altă CEUS și animalele au fost sacrificate. Țesuturile tratate au fost explantate pentru cuantificarea volumelor zonelor de ablație. De asemenea, s-a efectuat colorația cu hematoxilină și eozină (H&E) pentru analiza histologică.

Rezultate

Un total de 30 de ablații au fost efectuate în ficat. Volumul mediu al zonei de coagulare măsurat prin CEUS în ziua 5 după ARF a fost: $21,69 \pm 3,39 \text{ cm}^3$, $19,22 \pm 5,77 \text{ cm}^3$ și $8,80 \pm 3,33 \text{ cm}^3$ pentru N1, N2 și, respectiv, SF. Volumul zonei de coagulare după tratamentele cu N1 și N2 a fost semnificativ mai mare în comparație cu tratamentul cu SF ($p < 0,001$ și, respectiv, $p = 0,025$). Nu a existat nicio diferență între tratamentele N1 și N2 ($p = 0,60$).

Concluzii

În cadrul studiului nostru pilot de demonstrare a conceptului am arătat pentru prima dată că atunci când sunt injectate direct în țesutul țintă în timpul ARF, nanoparticulele de aur pot crește substanțial zona de coagulare.

Concluzii generale

1. Acizii biliari fetali nu se pot utiliza cu scop diagnostic în carcinomul hepatocelular.
2. Acizii biliari primari și secundari nu prezintă valori mai mari la pacienții cu CHC comparativ cu pacienții cu ciroză fără CHC și nu au valențe diagnostice.
3. Acizi biliari fetali prezintă însă un potențial prognostic la pacienții cu ciroză cu sau fără carcinom hepatocelular. Pe măsură ce boala hepatică cronică avansează spre stadiul terminal valoarea acestor acizi biliari fetali a crescut proporțional cu aceasta.
4. Nivelul seric al PD-L1 circulant este un factor de prognostic negativ la pacienții cu CHC.

5. Pacienții cu CHC cu o valoare a sPD-L1 sub 96 pg/mL nu au prezentat recidive locale sau la distanță în primele 24 luni de la tratament.
6. O scădere sau o creștere a sPD-L1 la 6 săptămâni de la tratament comparativ cu valoarea inițială nu influențează răspunsul acestora la tratamentele curative.
7. Tratamentul combinat: ablație cu radiofrecvență și injectare de nanoparticule de Aur învelite în PEG ar putea reprezenta o nouă metodă de tratament al CHC. Această combinație crește semnificativ volumul zonelor de necroză comparativ cu tratamentul standard.
8. Ablația cu ARF și nanoparticule de Aur învelite în PEG a crescut zona de necroză cu cel puțin 0.5-1 cm în toate cele 3 axe (lungime, lățime, înălțime) comparativ cu tratamentul standard.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza a studiat aspecte legate de diagnosticul, prognosticul și tratamentul carcinomului hepatocelular. Carcinomul hepatocelular este cea mai frecventă tumoră malignă hepatică, cu o incidență în creștere și o supraviețuire globală prea puțin ameliorată în ultimii ani. Aceasta se datorează într-o oarecare măsură lipsei unor markeri non-invazivi de diagnostic. O altă explicație este dată de lipsa unor molecule cu rol prognostic care să ajute clinicianul în depistarea precoce a celor care nu vor răspunde la un anumit tratament. Nu în ultimul rând, tratamentul carcinomului hepatocelular a rămas într-o mare măsură neschimbat în ultima decadă. Același arsenal terapeutic existent acum 10-15 ani este valabil și în zilele noastre. Dezvoltarea unor noi metode de tratament este necesară iar un exemplu de tratament inovativ este exemplificat în această teză de doctorat.

În primul studiu am dorit să demonstrăm că acizii biliari fetali sunt un potențial marker de diagnostic în CHC, lucru care nu s-a reușit. Cu toate acestea, acest studiu are foarte multe elemente de originalitate. În primul rând, am reușit pentru prima dată să sintetizăm acizi biliari fetali 1 și 2 (aceștia nu sunt disponibili în comerț). Am detaliat sinteza acestora, care poate să fie utilă altor investitori în studiile viitoare. În al doilea rând, am reușit în premieră să cuantificăm acești acizi biliari fetali la pacienții adulți cu ciroză hepatică. Până în prezent se credea că acești acizi biliari fetali sunt prezenți doar în viața fetală sau la copiii cu erori înnăscute de metabolism. Și în al 3-lea rând am arătat că acești acizi biliari cresc pe măsură ce boala hepatică cronică avansată evoluează spre stadiul terminal. Este posibil ca, pacientul cu ciroză în stadiu terminal să evolueze spre un fenotip fetal.

În al doilea studiu am arătat că sPD-L1 este un biomarker de prognostic negativ la pacienții cu CHC. Poate și mai important este faptul că pacienții cu un nivel al sPD-L1 sub 96 pg/mL nu au prezentat recidive în primii 2 ani de la tratament. Nu este primul studiu la nivel global, dar până la data publicării acestui articol nivelul seric al sPD-L1 a fost studiat doar la pacienții cu CHC pe fond de ciroză hepatică virală B. În schimb, este

primul studiu care a determinat nivelul seric al PD-L1 înainte și după tratamentul curativ al CHC. Am arătat că o creștere sau o scădere a sPD-L1 comparativ cu valoarea de bază nu influențează răspunsul la tratament.

În studiul al treilea am investigat o nouă metodă de tratament pe un model tumoral experimental. Astfel am injectat nanoparticule de Aur învelite în PEG direct în zona de interes în timpul ablației cu radiofrecvență. Abordarea noastră este cu totul și cu totul inovativă din mai multe considerente: (a) este primul studiu care arată că nanoparticulele de Aur învelite în PEG, dacă sunt expuse la curenți de radiofrecvență facilitează transmisia acestora; (b) este primul studiu care demonstrează că administrarea nanoparticulelor direct în zona de interes în timpul ablației cu radiofrecvență crește considerabil zona de necroză; și (c) designul studiului a fost unul original, dar în același timp similar cu practica clinică curentă (ghidare ultrasounografică, ecografie cu contrast pentru a evalua zona de necroză, urmărirea complicațiilor post-tratament).

PhD thesis summary

Diagnosis, prognosis and treatment of hepatocellular carcinoma

PhD student: **Tudor Ioan Mocan**

PhD supervisor: **Prof. Dr. Zeno Adrian Spârchez**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Epidemiology and diagnosis of hepatocellular carcinoma	17
1.1. Epidemiology of hepatocellular carcinoma	17
1.2. Screening of hepatocellular carcinoma	19
1.3. Diagnosis of hepatocellular carcinoma	21
2. Prognosis of hepatocellular carcinoma	25
2.1. Introduction	25
2.2. The importance of the PD-1/PD-L1 signaling pathway	26
2.3. Tissue PD-L1 – prognostic factor for patients with surgically resectable hepatocellular carcinoma	29
2.4. Soluble PD-L1 – prognostic factor for patients with inoperable hepatocellular carcinoma	30
3. Treatment of hepatocellular carcinoma	32
3.1. Staging of hepatocellular carcinoma	32
3.2. Therapeutic options in hepatocellular carcinoma	34
3.2.1. Curative care in hepatocellular carcinoma	34
3.2.2. Palliative care in hepatocellular carcinoma	37
3.2.3. Treatment particularities of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to hepatitis C	38
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Aims	41
2. First study. Plasma fetal bile acids 7α-hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic acid and 3-oxachola-4,6-dien-24-oic acid indicate severity of liver cirrhosis	43
2.1. Introduction	43
2.2. Aims	47
2.3. Material and methods	45
2.4. Results	52
2.5. Discussion	62
2.6. Conclusions	64

3. Second study. Serum levels of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1): A possible biomarker in predicting post-treatment outcomes in patients with early hepatocellular carcinoma	65
3.1. Introduction	65
3.2. Aims	66
3.3. Material and methods	66
3.4. Results	70
3.5. Discussion	77
3.6. Conclusions	79
4. Third study. Percutaneous ultrasound guided PEG-coated gold nanoparticles enhanced radiofrequency ablation in liver	81
4.1. Introduction	81
4.2. Aims	82
4.3. Material and methods	83
4.4. Results	86
4.5. Discussion	95
4.6. Conclusions	98
5. General conclusions	99
6. Originality and innovative contributions of the thesis	101
REFERENCES	103

Key words: hepatocellular carcinoma, PD-1, PD-L1, fetal bile acids, gold nanoparticles

Introduction

Globally, hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver tumor. Approximately 75% of all primary liver cancers are due to HCC. Between 1978 and 2012, the incidence of HCC increased in most European countries. Moreover, compared to 2005, the number of new cases per year is expected to increase by 35% by the end of 2030. Its growing incidence and poor prognosis make HCC one of the deadliest cancers. In the context of these grim predictions, several critical needs are emerging:

- (1) A fast, accurate, cheap, and widely applicable diagnostic method;
- (2) Predictive factors for early detection of treatment non-responders;
- (3) Identification of new therapeutic methods to improve survival.

Current state of knowledge

The "Current state of knowledge" is the first part of this thesis and brings forward the most impactful data gathered from the literature regarding the current ways of diagnosis, prognosis, and treatment of HCC. This part highlights two particular aspects of HCC: (1) the role of the intra- and intercellular signaling pathway *programmed cell death protein 1/programmed death-ligand 1* (PD-1/PD-L1) and the potential role as a prognostic biomarker for soluble PD-L1; (2) HCC treatment in patients with chronic viral hepatitis C in the era of potent direct anti-viral treatments.

Personal contribution

The first study aimed to test whether two fetal bile acids typically present during fetal life can be used as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. It was a prospective observational study conducted through a multicentric collaboration. The fetal bile acids were synthesized in the Korean Department of Pharmaceutical and Technological Sciences, and the Waters Corporation performed their quantification in patients' serum in the United Kingdom. The second study was designed to evaluate the role of serum PD-L1 as a negative prognostic factor in patients with HCC. It was a retrospective analysis of a prospectively collected database. The research was conducted by collaborating with the "Prof. Dr. Octavian Fodor" Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology and the "MedFuture" Center for Advanced Medical Research, within the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca. The third study compared the efficacy of radiofrequency ablation versus radiofrequency ablation with PEG-coated nanoparticles on an experimental model of

First study. Plasma fetal bile acids 7 α -hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic acid and 3-oxachola-4,6-dien-24-oic acid indicate severity of liver cirrhosis

Two 3-oxo- Δ^4 fetal bile acids, 3-oxachola-4,6-dien-24-oic acid (**1**) and 7 α -hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic acid (**2**), occur normally in the human fetus but remain elevated in neonates and children with severe cholestatic liver disease due to an autosomal recessive inborn error of metabolism affecting Δ^4 -3-oxo-steroid 5 β -reductase (AKR1D1). Relatively little is known about **1** and **2** in adult patients with liver disease. The chemical synthesis of **1** and **2** is therefore described and their quantitation in plasma was done by ultrarapid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Plasma concentrations of **1** and **2** were investigated in 25 adult patients with varying degrees of liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma (HCC). Highly statistically significant correlations ($P < 0.0001$) were found between severity of liver cirrhosis, determined by the Child–Pugh and MELD scores, with plasma **1** and **2** concentrations, both alone and combined. The presence of HCC did not influence these correlations. Plasma cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, lithocholic or ursodeoxycholic acids, free and as their glycine or taurine conjugates, did not correlate with Child–Pugh or MELD score when corrected for multiple comparisons. These findings demonstrate that plasma levels of fetal bile acids 3-oxachola-4,6-dien-24-oic acid and 7 α -hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic acid and likely deteriorating AKR1D1 activity indicate the severity of liver cirrhosis measured by the Child–Pugh and MELD scores.

Second study. Serum levels of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1): A possible biomarker in predicting post-treatment outcomes in patients with early hepatocellular carcinoma**Aim**

There have been great advances in hepatocellular carcinoma management over the last years. However, there are still no prognostic biomarkers that can identify patients who will benefit the most from curative treatments. We aimed to investigate whether sPD-L1 levels measured before curative treatment were a prognostic biomarker of survival in patients with HCC.

Material and methods

HCC patients from a prospectively collected database were selected and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) levels were determined. The association of sPD-L1 levels and overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) was assessed.

Results

One hundred twenty-one patients with HCC were included. The best cut-off value of sPD-L1 for both DFS and OS was 96 pg/mL. Patients with a high sPD-L1 value (>96 pg/mL) had a shorter disease free survival and OS (hazard ratio 5.42, 95% confidence interval 2.28–12.91, $p < 0.001$, and hazard ratio 9.67, 95% confidence interval 4.33–21.59, $p < 0.001$). High sPD-L1 levels were associated with mortality independently from other known survival predictors. We found a positive correlation between sPD-L1 and PD-L1 expression in cancer cells ($p = 0.01$). In 16 out of 38 patients, sPD-L1 levels decreased from baseline value on week 6 after treatment and in 22 out of 38 patients, sPD-L1 levels increased from the baseline value. However, fluctuations of sPD-L1 in time had no influence on survival ($p = 0.148$).

Conclusions

We conclude that a high sPD-L1 level is a biomarker for a poor outcome in HCC. The predictive value of sPD-L1 levels for a successful anti-PD1/PD-L1 therapy should be investigated in the future.

Third study. Percutaneous ultrasound guided PEG-coated gold nanoparticles enhanced radiofrequency ablation in liver

Aims

To investigate the effects of PEG-coated gold nanoparticles on ablation zone volumes following in vivo radiofrequency ablation of porcine liver.

Material and methods

This prospective study was performed following institutional animal care and committee approval was used. Radiofrequency ablations were performed in the livers of ten *Sus scrofa domestica* swines. During each ablation, 10 mL (mL) of Peg-coated gold nanoparticles at two different concentrations (0.5 mg/mL and 0.01 mg/mL) were injected through the electrode channel into the target zone. For the control group, 10 mL of physiological saline was used. Five to ten minutes after each ablation, contrast enhanced ultrasound (CEUS) was performed to evaluate the volume of the coagulation zone. On day five we performed another CEUS and the animals were sacrificed. Treated tissues were explanted for quantification of the ablation zones' volumes. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was also performed for histologic analysis.

Results A total of 30 ablations were performed in the livers. The mean coagulation zone volume as measured by CEUS on day 5 after RFA was: $21.69 \pm 3.39 \text{ cm}^3$, $19.22 \pm 5.77 \text{ cm}^3$, and $8.80 \pm 3.33 \text{ cm}^3$ for N1, N2 and PS respectively. The coagulation zone volume after N1 and N2 treatments was significantly higher compared to PS treatment ($p < 0.001$ and $p = 0.025$ respectively). There was no difference between N1 and N2 treatment ($p = 0.60$).

Conclusions

In our proof-of concept, pilot study we have shown for the first time that when injected directly into the target tissue during RFA, gold nanoparticles can substantially increase the coagulation zone.

General conclusions

1. Fetal bile acids cannot be used for diagnostic purposes in hepatocellular carcinoma.

2. Primary and secondary bile acids do not show higher values in patients with HCC than in patients with cirrhosis without HCC and have no diagnostic values.

3. However, fetal bile acids might have a potential prognostic role in patients with cirrhosis with or without HCC. As chronic liver disease progresses to the terminal stage, the fetal bile acids proportionally increase.

4. Serum circulating PD-L1 levels are a negative prognostic factor in patients with HCC.

5. Patients with HCC with an sPD-L1 value below 96 pg/mL did not experience local or distant recurrences within the first 24 months of treatment.

6. A variation in sPD-L1 levels at six weeks after treatment compared to baseline does not affect their response to curative therapies.

7. Combined treatment: radiofrequency ablation and injection of PEG-coated gold nanoparticles could be an improved method for local HCC treatment. This combination significantly increases the necrotic area volume compared to standard ablation.

8. Radiofrequency ablation using PEG-coated gold nanoparticles increased the necrosis area by at least 0.5-1 cm in all three axes (length, width, height) compared to standard therapy.

Originality and innovative contributions of the thesis

The current thesis covers aspects of HCC diagnosis, prognosis, and treatment. As previously mentioned, HCC is the most common primary liver malignancy, and recent evidence has shown an increased incidence without an evident improvement in survival. A likely explanation might be the lack of non-invasive diagnostic markers and a paucity of prognostic molecules to help the clinician in the early detection of treatment non-responders. Last but not least, the treatment of HCC has remained essentially unchanged over the past decade. The same therapeutic arsenal that existed 10-15 years ago is still

in use today, without substantial improvements. Therefore, developing new treatment methods is necessary, and an example of innovative treatment is provided in this doctoral thesis.

The first study aimed to prove that fetal bile acids are a potential diagnostic marker in HCC, which failed. However, this study had many elements of originality:

1. We were able to synthesize fetal bile acids 1 and 2 for the first time (they were not commercially available). We have describe their synthesis process, which might be helpful to other investigators in future studies.
2. We were able to quantify the fetal bile acids in adult patients with cirrhosis for the first time. Until now, it was believed that these fetal bile acids are only present in fetal life or in children with innate metabolic errors.
3. We have shown that these bile acids increase as the advanced chronic liver disease progresses to the terminal stage.

Consequently, it appears that the patient with end-stage cirrhosis may progress towards a fetal phenotype.

The second study showed that sPD-L1 is a potential biomarker of unfavorable prognosis in patients with HCC. Perhaps even more important is that patients with a level of sPD-L1 below 96 pg/mL did not have recurrences within the first two years after treatment. While it was not the first study published in this niche, sPD-L1 had only been studied in Asian HBV cirrhotic patients with HCC at the time of publication. Furthermore, it was the first study to determine the serum levels of PD-L1 before and after HCC treatment. We have shown that an increase or decrease in sPD-L1 compared to baseline does not influence therapy response.

The third study investigated a novel therapeutic method on an experimental tumor model. Thus, we injected PEG-coated gold nanoparticles directly into the area of interest during radiofrequency ablation. Our approach was entirely innovative for several reasons:

1. It is the first study to show that PEG-coated gold nanoparticles facilitate radiofrequency current transmission.
2. It is the first study to demonstrate that nanoparticle administration directly into the area of interest during radiofrequency ablation significantly increases the size of necrosis.
3. Although the study design was original, it had multiple similarities to current real-life clinical practice (ultrasound guidance, contrast ultrasound to assess the area of necrosis, follow-up of post-treatment complications), facilitating a potential translation to bedside.