

Rezumatul tezei de doctorat

Titlul tezei de doctorat:

Analiza celulelor Ito în hepatita cronică virală și în tumori hepatice

Doctorand **Rada-Teodora Suflețel**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Carmen Mihaela Mihu**

CUPRINS

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCERE | 13 |
| STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | 15 |
| 1. Celulele Ito - aspecte generale | 17 |
| 1.1. Istoric | 17 |
| 1.2. Caracteristici morfologice și ultrastructurale | 17 |
| 1.3. Originea embriologică | 18 |
| 1.4. Principalii markeri exprimați de celulele Ito | 18 |
| 2. Funcțiile celulelor Ito în ficatul normal | 20 |
| 2.1. Susținerea peretelui și reglarea fluxului sinusoid | 21 |
| 2.2. Homeostazia vitaminei A | 21 |
| 2.3. Sinteza lipoproteinelor, factorilor de creștere și citokinelor | 22 |
| 2.4. Metabolismul xenobiotic, echilibrarea pH-ului și răspunsul la stresul oxidativ | 24 |
| 2.5. Răspunsul imun hepatic | 24 |
| 3. Rolul celulelor stelate în dezvoltarea și regenerarea hepatică | 25 |
| 4. Activitatea celulelor Ito în patologia hepatică | 27 |
| 4.1. Fibroza hepatică și activarea celulelor Ito | 27 |
| 4.2. Celulele Ito în hepatitele virale B și C | 29 |
| 4.3. Rolul celulelor Ito în carcinomul hepatocelular și în colangiocarcinomul intrahepatic | 30 |
| CONTRIBUȚIA PERSONALĂ | 35 |
| 1. Ipoteza de lucru. Obiective | 37 |
| 2. Metodologie generală | 39 |
| 3. Studiul 1. Evaluarea valorii potențial prognostice a celulelor Ito activate în hepatita cronică virală C - studiu pilot | 41 |
| 3.1. Introducere | 41 |
| 3.2. Ipoteza de lucru | 42 |
| 3.3. Material și metodă | 42 |
| 3.4. Rezultate | 44 |
| 3.5. Discuții | 59 |
| 3.6. Concluzii | 63 |
| 4. Studiul 2. Evaluarea rolului potențial prognostic al celulelor Ito în carcinomul hepatocelular și în colangiocarcinomul intrahepatic- studiu pilot | 65 |
| 4.1. Introducere | 65 |
| 4.2. Ipoteza de lucru | 67 |
| 4.3. Material și metodă | 67 |
| 4.4. Rezultate | 69 |
| 4.5. Discuții | 79 |
| 4.6. Concluzii | 81 |
| 5. Studiul 3. Analiza prin microscopie hiperspectrală a celulelor Ito imunomarcate α-SMA de la nivelul carcinomul hepatocelular și colangiocarcinomului intrahepatic - studiu pilot | 83 |
| 5.1. Introducere | 83 |
| 5.2. Ipoteza de lucru | 85 |
| 5.3. Material și metodă | 85 |
| 5.4. Rezultate | 87 |
| 5.5. Discuții | 93 |
| 5.6. Concluzii | 95 |
| 6. Concluzii generale | 97 |
| 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei | 99 |

Cuvinte cheie: celule Ito, VHB, VHC, carcinom hepatocelular, colangiocarcinom intrahepatic, microscopie hiperspectrală, imunomarcaj, α -SMA, GFAP, Vinculină

INTRODUCERE

Celula Ito, sau celula stelată hepatică (CSH), s-a dovedit a fi de-a lungul timpului o remarcabilă celulă mezenchimală, vitală funcției hepatocelulare și răspunsului hepatic la injuria celulară, fiind elementul cheie al fibrogenezei hepatice ¹. Pe lângă rolul bine cunoscut în fibroza hepatică, aceste celule au implicații esențiale în homeostazia hepatică, în repararea și regenerarea hepatică, metabolismul xenobioticelor, metabolismul intermediar și reglarea răspunsului imun. De asemenea, au contribuții majore în amplificarea și diferențierea celulelor progenitoare hepatice ^{1,2}. Aceste caracteristici fundamentale fac din CSH o țintă terapeutică puternică pentru patologia ficatului.

Microscopia hiperspectrală combină informațiile spectrale și spațiale, realizând o imagine 3D a obiectului examinat. Asigură identificarea, caracterizarea morfologică și biochimică a celulelor și țesuturilor pe seama spectrelor emise de acestea. De asemenea, permite constituirea de biblioteci spectrale atribuind spectrele înregistrate componentelor specifice, evidențiind simultan, calitatea și cantitatea în eșantion ³.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CSH reprezintă celule rezidente non-parenchimotoase, pericitele care stochează lipide, localizate în spațiul subendotelial Disse, între suprafața bazolaterală a hepatocitelor și partea antiluminală a celulelor endoteliale sinusoidale. În ficatul normal, ele ocupă 1/3 din celulele non-parenchimotoase și 10-15% din totalitatea celulelor rezidente hepatice ¹⁻⁴. Transmiterea mediatorilor solubili și citokinelor este favorizată de contactul intim dintre CSH, hepatocite, celule Kupffer și celulele endoteliale sinusoidale. Datorită poziției apropiate de terminațiile nervoase autonome, celulele Ito reacționează la stimularea α -adrenergică ^{2,5}.

Actualmente, cele mai multe cercetări susțin originea embriologică duală, atât endodermică (prin expresia de citokeratine), cât și mezenchimală din septul transvers [prin expresia factorului de transcripție mezodermică forkhead box f1 (Foxf1) și vimentinei] ^{2,6}. Celulele Ito exprimă pe suprafața lor numeroși markeri, unii cu origine neuroectodermică (GFAP, nestină, neurotrofine și receptorii acestora, factor neurotrofic derivat din creier (BDNF), SYN și N-CAM), alții cu origine mezodermică (vimentină, desmină, alfa actina mușchiului neted (α -SMA), markeri hematopoietici și lecitin retinol aciltransferaza (LRAT) ^{4,7}.

Principalele roluri ale CSH sunt: 1) de susținere a peretelui și reglare a fluxului sinusoid; 2) în homeostazia vitaminei A; 3) în secreția lipoproteinelor, factorilor de creștere și citokinelor; 4) în metabolismul xenobiotic, echilibrul pH-ului și răspunsul la stresul oxidativ; 5) în imunologia hepatică; 6) în injuria și repararea hepatică. Există o legătură între conținutul ridicat de vacuole lipidice și eliberarea unui număr crescut de citokine proinflamatorii ⁸. Celulele Ito secretă o serie de proteine cu rol autocrin și paracrin: lipoproteine, factori de creștere și citokine ¹; conțin enzime care intervin în metabolismul intermediar, în catabolismul alcoolului etilic și xenobioticelor ^{1,2}; secretă mai mulți factori imuni, reacționează la numeroși stimuli imunologici și transduc semnale prin căi și mediatori localizați în celulele imune – astfel încât, în condiții normale, CSH susțin anumite răspunsuri imunosupresoare. În caz de injurie hepatică, CSH detectează țesutul afectat și promovează activarea celulelor imune înnăscute ⁹.

Celulele Ito au un rol crucial în regenerarea ficatului, fiind elemente ale nișei celulelor progenitoare hepatice ¹. Numărul, morfologia și starea citokinelor din CSH de repaus și activate din ficat sunt modificate în diverse stadii ale leziunii hepatice ^{1,4}. Celulele principale implicate în fibrogeneza hepatică sunt CSH, care devin activate ca reacție la injuria hepatică și se transformă din celulele dormante bogate în vitamina A, în celule asemănătoare miofibroblastelor cu proprietăți proliferative, contractile, migratoare și fibrogenice ^{1,8,10}.

În hepatitele virale B (HVB) și C (HVC), afecțiuni hepatice care pot evolua cu ciroză, insuficiență hepatică și CHC ¹¹, HVB și HVC pot promova fibroza hepatică prin stimularea proliferării CSH și prin amplificarea expresiei TGF- β 1 și alți factori profibrotici moleculelor asociate fibrozei ^{11,12}.

În carcinomul hepatocelular (CHC) și în colangiocarcinomul intrahepatic (CCIH), tipurile principale de tumori hepatice primare ¹³, CSH activate reprezintă principalele componente ale micromediului tumoral și au un rol cheie în progresia tumorală, care este reglată de micromediul hepatic, prin sinteza de factori de creștere, citokine, matrice extracelulară ¹³⁻¹⁵.

Pe măsură ce se descifrează mecanismele prin care CSH intervin în homeostazia și patologia ficatului, implementarea unor scheme terapeutice curative bazate pe intervenția asupra CSH va deveni promițătoare în viitorul apropiat.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru. Obiective

Ipoteza care a inițiat realizarea acestei teze de doctorat a avut la bază două idei: 1) versatilitatea celulelor Ito prin rolurile lor remarcabile atât în ficatul normal, cât și în cel patologic; 2) faptul că în pofida studiului exhaustiv al acestor celule, prezintă în continuare un imens potențial neelucidat.

Teza a urmărit: 1) Evaluarea rolului potențial prognostic al celulelor Ito activate în hepatita cronică virală C; 2) Determinarea valorii potențial prognostice a celulelor stelate hepatice în carcinomul hepatocelular și în

colangiocarcinomul intrahepatic; 3) Evaluarea aportului analizei celulelor Ito prin microscopie hiperspectrală în carcinomul hepatocelular și în colangiocarcinomul intrahepatic.

Metodologie generală

Am elaborat trei studii pilot, retrospective, observaționale. Cazuistica a fost colectată din cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca. Au fost selectați un număr total de 91 de pacienți, dintre care 27 cu hepatită cronică virală C, 39 cu carcinom hepatocelular și 11 cu colangiocarcinom diagnosticate prin examen clinic și examinări paraclinice (examinări de laborator, imagistice și examen histopatologic). Dintre cei 91 de pacienți înrolați în studiu, 14 au fost cazuri control, fiind diagnosticați cu tumori hepatice benigne pe fondul unui ficat normal. Am întocmit o bază de date, care a inclus date demografice, clinice, de laborator, morfopatologice și imunohistochimice.

Studiile au constatat în analiza morfologică a celulelor stelate hepatice pe biopsii hepatice și piese de rezecție hepatică, recoltate de la pacienți cu hepatită cronică virală C, carcinom hepatocelular și colangiocarcinom. Pentru caracterizarea celulelor Ito au fost utilizate metode imunohistochimice, microscopie hiperspectrală cu software specializat de analiză de imagine și teste statistice.

Secțiunile histologice au fost examinate utilizând microscopul Leica DM1000 LED și pentru analiza hiperspectrală microscopul Olympus BX53 CytoViva.

Analiza statistică a datelor, Pentru variabilele calitative am calculat frecvențele absolute și relative ale categoriilor formate. Pentru a descrie relațiile dintre variabilele calitative am folosit testele Hi-pătrat sau testul exact al lui Fisher și indicatorii Cramer V și rata șansei (OR- Odds-Ratio) cu coeficientul phi și interval de încredere CI 95%, iar coeficientul de corelație rho (ρ) a lui Spearman a fost folosit pentru a măsura corelația dintre datele ordinale. Pentru a compara variabile cantitative pe grupuri independente, cu variabila de grupare dicotomială, am folosit testul neparametric Mann-Whitney (MW). Datele numerice cu distribuție normală au fost prezentate ca medie \pm abatere standard, pe când datele cu distribuție non-normală au fost raportate cu mediana și cvartilele 27 și 75. Datele calitative au fost prezentate ca procente (%). Am prezentat valorile p generate de aceste teste, precum și mediile deviațiilor standard \pm DS ale grupurilor și diferența mediilor cu interval de încredere CI 95% asociat. Pentru a studia relațiile dintre variabilele cantitative am folosit coeficientul de corelație Spearman (ρ), cu valoarea p asociată.

Am folosit Microsoft Excel 2016 pentru managementul bazei de date. Pentru majoritatea analizelor statistice și graficelor ulterioare am folosit programul R 4.1.1. și R 4.3.0. Am considerat $p < 0,05$ ca fiind semnificativ statistic.

Studiul 1. Evaluarea valorii potențial prognostice a celulelor Ito activate în hepatita cronică virală C - studiu pilot

Introducere. Celulele Ito apar sub două aspecte în funcție de statusul hepatic: CSH inactive, dormante în condiții de homeostazie hepatică și CSH activate în injuria hepatică, cu importante diferențe morfologice și funcționale⁴. CSH activate, caracterizate prin imunoexpresia α -SMA, GFAP și vinculină, au fost crescute ca număr la pacienții cu hepatita cronică virală C (CVHC), comparativ cu subiecții sănătoși¹⁶.

Ipo-teza de lucru. Scopul studiului curent a fost identificarea unei posibile asocieri între numărul de celule stelate hepatice activate, fibroza hepatică, rigiditatea hepatică, încărcătura virală și activitatea necrotico-inflamatorie în hepatita cronică virală C.

Material și metodă. Au fost incluse în studiu 31 biopsii hepatice, dintre care 27 au fost recoltate de la pacienți cu HCVC înainte de tratamentul antiviral și 4 au constituit cazurile control, recoltate de la pacienți cu tumori hepatice benigne, precum adenomul hepatocelular și hemangiomul cavernos, dezvoltate pe fondul unui ficat indemn. Au fost incluși în studiu pacienți ce s-au încadrat condițiilor tratamentului antiviral și anume: VHC-ARN și anticorpi anti VHC detectabili în sânge, nivele crescute de alaninaminotransferază (ALAT) peste 6 luni și prezența hepatitei cronice cu un scor Metavir necrotico-inflamator (A) ≥ 1 și fibroză (F) ≥ 1 . De asemenea, pentru pacienții cu HCVC au fost colectate din baza de date a Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. Dr. Octavian Fodor" următoarele date clinice: demografice, timpul scurs de la diagnosticul HCVC, viremia și rigiditatea hepatică măsurată prin Fibroscan în kilopascali (kPa) înainte de tratamentul antiviral. Au fost excluși din studiu pacienți infectați concomitent cu VHB, cu virusul imunodeficienței dobândite (HIV), pacienți sub, sau după tratament antiviral și pacienți cu orice altă patologie hepatică asociată.

Rezultate. Din cei 31 pacienți înrolați în studiu, 27 (87%) au fost în grupul cu HCVC, iar 4 (13%) au fost în grupul de control. Repartizarea pe sexe în cele două loturi, a fost similară, predominând sexul feminin (77.4%). Vârsta medie \pm deviația standard a fost de 52.29 ± 11.9 ani, cu intervalul de vârstă 31-73 de ani. Pacienții au fost diagnosticați cu HCVC în medie în urmă cu 9 ani, cu un interval între 5 și 18 ani. Valoarea medie a viremiei a fost de 733231 UI/ml, cu un interval între 3556- 19832490 UI/ml. Valoarea medie a rigidității hepatice a fost de 7,6 kPa, cu un interval între 3.3-13.8 kPa.

În ceea ce privește scorul Metavir, din cei 27 pacienți cu HCVC, 21 au avut un scor ridicat, iar 6 un scor redus. Majoritatea pacienților au prezentat gradul necrotico-inflamator 2 (66.7%) și stadiul fibrozei 1 (48.1%). Cuantificarea celulelor Ito imunomarcate cu α -SMA, GFAP și vinculină în zonele lobulului hepatic s-a efectuat printr-o metodă semicantitativă. S-a identificat o corelație semnificativ statistică pozitivă între numărul de celule α -SMA-pozitive și stadiul de fibroză ($\rho = 0,391$, $p = 0,044$) în regiunea perivenulară a lobulului hepatic, însă nu s-a observat nicio asocieră între intensitatea imunoexpresiei α -SMA și fibroză. De asemenea, celulele stelate imunoreactive din zona I s-au corelat pozitiv cu viremia ($R = 0,442$, $p = 0,021$) și rigiditatea hepatică ($\rho = 0,425$, $p = 0,027$). Nu s-a evidențiat nicio corelație statistică între gradul activității necro-inflamatorii și numărul de celule Ito α -SMA reactive în niciuna dintre ariile lobulului hepatic.

CSH GFAP-pozitive au fost ușor mai numeroase în grupul cu HCVC, însă fără semnificație statistică. Au fost identificate celule Ito GFAP reactive doar în zonele periportală și perisinusoidală. S-a remarcat o corelație negativă între intensitatea imunoexpresiei GFAP ($\rho = -0,475$, $p=0,012$), numărul de celule GFAP-pozitive ($\rho = -0,540$, $p=0,004$) din zona perisinusoidală, stadiul fibrozei și rigiditatea hepatică ($\rho = -0,422$, $p=0,029$). De asemenea, CSH GFAP reactive din zona 1 s-au corelat negativ cu nivelele de ARN-VHC ($\rho = -0,517$, $p=0,006$). Totodată, s-a constatat o corelație semnificativ statistică pozitivă între numărul de celule GFAP-pozitive din zona perisinusoidală și activitatea necrotico-inflamatorie ($V=0,40$, $p=0,038$). Nu a fost identificată nicio asociere între imunoexpresia α -SMA și imunoexpresia GFAP în CSH.

S-a înregistrat un număr mai mare de CSH vinculină pozitive în lotul cu HCVC, decât în cel control în regiunile periportală ($V=0,79$, $p<0,001$) și intermediară ale lobulului hepatic ($V=0,44$, $p=0,049$). Intensitatea imunoexpresiei a fost semnificativ mai marcată la cei cu HCVC, spre deosebire de subiecții sănătoși ($V=0,47$, $p=0,031$), în regiunea centrolobulară. Nu s-a remarcat nicio corelație semnificativ statistică între intensitatea expresiei, gradul necrotico-inflamator sau stadiul de fibroză. Totuși a fost identificată o asociere semnificativ statistică pozitivă între numărul de celule Ito reactive pentru vinculină și stadiul fibrozei în zona periportală ($\rho = 0,423$, $p=0,028$). CSH vinculină reactive din zona 1 s-au corelat pozitiv cu rigiditatea hepatică ($\rho = 0,564$, $p=0,002$) și încărcătura virală ($\rho = 0,522$, $p=0,006$). Nu am evidențiat nicio asociere între CSH vinculină pozitive și activitatea necrotico-inflamatorie. În plus, nu am găsit nicio corelație între imunoexpresia vinculinei, imunoexpresia α -SMA și imunoexpresia GFAP în CSH.

Concluzii. CSH imunomarcate cu cei 3 markeri α -SMA, GFAP și vinculină au fost mai numeroase în grupul cu HCVC, spre deosebire de cel control. Acestea au fost dispuse în principal la nivelul regiunilor 1 și 2 ale lobulului hepatic. A fost identificată o asociere semnificativ statistică pozitivă între celulele Ito α -SMA și vinculină pozitive, stadiul fibrotic, rigiditatea hepatică și viremie.

Celulele stelate GFAP reactive s-au corelat invers cu stadiul fibrozei hepatice, rigiditatea hepatică și încărcătura virală, reprezentând un marker mai sensibil al CSH în faza de activare timpurie decât α -SMA, indicând începutul procesului fibrotic. În acest sens, GFAP poate fi utilizat ca marker biologic în alegerea pacienților cu HCVC în vederea unei terapii antivirale personalizate.

Toate aceste aspecte susțin faptul că numărul de celule Ito activate ar putea constitui un potențial marker prognostic valoros în evaluarea progresiei HCVC și fibrogenzei hepatice.

Studiul 2. Evaluarea rolului potențial prognostic al celulelor Ito în carcinomul hepatocelular și în colangiocarcinomul intrahepatic- studiu pilot

Introducere. Carcinomul hepatocelular (CHC) și colangiocarcinomul intrahepatic (CCIH) reprezintă formele cele mai frecvente de tumori hepatice primare maligne ¹⁷. Majoritatea neoplaziilor hepatice se dezvoltă pe fondul unor procese inflamatorii cronice, asociate cu fibroză hepatică sau ciroză, în care CSH activate au un rol patognomonic ^{18,19}. S-a constatat că celulele Ito dormante sau slab activate, ce exprimau HGF au inhibat expansiunea tumorală și celulele complet activate în stadii avansate tumorale, ce exprimau collagen I au stimulat creșterea tumorală. Totodată, s-a observat că în timpul evoluției procesului neoplazic se produce o creștere a dezechilibrului dintre aceste subpopulații de CSH, promovând hepatocarcinogeneza ²⁰. Multiple alte aspecte susțin rolul primordial al acestor celule în hepatocarcinogeneză și colangiocarcinogeneză.

Ipoteza de lucru. Scopul studiului actual a fost de a arăta potențialul prognostic al CSH în CHC și CCIH. În acest sens, obiectivele acestui studiu au fost: 1) caracterizarea celulelor Ito imunomarcate prin SMA, GFAP și vinculină în CHC, CCIH de la nivelul capsulei tumorale/peritumoral, stromei tumorale și parenchimului hepatic adiacent și compararea lor cu cele de la nivelul tumorilor hepatice benigne; 2) determinarea asocierii dintre numărul de CSH imunoreactive, dimensiunea tumorii, gradul de diferențiere tumoral, necroza tumorală, invazia vasculară, infiltratul inflamator, stadiul tumoral și indicii de proliferare tumorală Ki67 din cadrul CHC și CCIH.

Material și metodă. Această cercetare pilot, retrospectivă și observațională a fost efectuată în cadrul laboratorului de Anatomie Patologică al Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca, pe piese de rezecție hepatică recoltate în perioada 2015-2020 și stocate în arhiva laboratorului. Au fost incluse în studiu piese de rezecție recoltate de la pacienți cu carcinoame hepatocelulare și colangiocarcinoame intrahepatice confirmate prin examen histopatologic, fără alte tumori hepatice asociate. Au fost excluși pacienții cu suspiciune clinică și imagistică de carcinom hepatocelular sau colangiocarcinom intrahepatic, dar infirmat histopatologic, precum și pacienții cu alte tumori hepatice asociate. Grupul control a fost reprezentat de piese de rezecție hepatică de la pacienți cu tumori hepatice benigne (angiomiolipom, hemangiom cavernos și limfhemangiom), dezvoltate pe fondul unui ficat normal.

Am apreciat gradul necrotic astfel: 0- necroză absentă, 1- < 10% - necroză redusă, 2-10-30% necroză moderată, 3- > 30% necroză extensivă. Am clasificat infiltratul inflamator peritumoral în funcție de densitatea sa astfel: redus, moderat și abundent. Invazia vasculară a fost evaluată în funcție de prezența sau absența embolilor tumorali în lumenul vascular. Încadrarea stadiului tumoral s-a realizat conform stadializării TNM din ultima ediție a AJCC, Cancer Staging Manual, 2017 ²¹.

Rezultate. Au fost incluși în studiu 60 de pacienți dintre aceștia, 39 au prezentat CHC, 11 CCIH și 10 au fost cazurile control, cu tumori hepatice benigne (angiomiolipom, hemangiom cavernos și limfhemangiom). Distribuția pe sexe în loturile cu CHC și CCIH, a fost similară, predominând sexul masculin (69,2%, 63,6%). În grupul control, incidența maximă a fost a sexului feminin (70%). În ceea ce privește vârsta pacienților, au existat diferențe semnificativ statistice între grupul CHC și grupul control <0.001,

respectiv grupul CCIH și grupul control 0.001). Vârsta medie în grupul HCC a fost de 65 ani (cu un interval între 61- 72), în lotul CCIH a fost de 68 ani (cu un interval între 61-72), iar în grupul control de 44 ani (cu un interval între 35.5- 51.2).

Referitor la dimensiunea formațiunii tumorale, nu au existat diferențe semnificativ statistice între cele 3 loturi. În lotul CHC dimensiunea medie a fost de 3.5 cm (cu un interval între 3-5.5cm), în grupul CCIH 5.5 cm (cu un interval între 4.5-9 cm) și în grupul control 6.2 cm (cu un interval între 3-9.2 cm). Legat de gradul de diferențiere tumorală în loturile CHC și CCIH, majoritatea au fost bine (G1) și moderat diferențiate (G2) (61.5%, respectiv 63.6%). Majoritatea CHC și CCIH au prezentat necroză. Nu s-au identificat diferențe semnificativ statistice între aceste două loturi (0.07) referitor la acest parametru. În lotul CHC a predominat necroza redusă (23.1%), iar în CCIH necroza moderată (54.5%). În ambele loturi de tumori maligne a predominat un infiltrat inflamator limfocitar redus (53.8%, 72.7%). Cea mai mare parte din tumorile maligne au prezentat invazie vasculară tumorală (53.8%, 72.7%). Majoritatea tumorilor hepatice maligne au fost în stadii tumorale incipiente I și II (79.5% și 54.5%).

În CHC și CCIH a predominat un indice de proliferare Ki67 ridicat (69.2%) și (72.7%). În lotul control indicele de proliferare Ki67 a fost redus. S-au înregistrat diferențe semnificativ statistice în ceea ce privește acest parametru, între loturile CHC și control (<0.001), respectiv între loturile CCIH și control (0.001). În ceea ce privește CSH SMA, Vinculină și GFAP pozitive, acestea au fost mai numeroase în loturile CHC și CCIH, comparativ cu lotul control. În ambele loturi de tumori maligne, CSH SMA și Vinculină reactive au fost localizate în capsulă/peritumoral, în stroma tumorală și în parenchimul hepatic adiacent, predominând în stroma tumorală. În lotul CHC CSH GFAP pozitive au fost distribuite doar în zonele capsulă/peritumoral și în parenchimul hepatic adiacent. În lotul CCIH celulele Ito GFAP pozitive au fost localizate în principal capsular/peritumoral și în parenchimul hepatic adiacent, raportându-se prezența lor intratumorală doar într-un caz izolat.

Numărul de celule Ito SMA pozitive capsulare/peritumorale și din stroma tumorală de la nivelul CHC și CCIH s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu gradul de diferențiere tumorală ($p=0.01$, $p<0.001$), cu gradul necrotic ($p=0.01$, $p=0.01$), invazia vasculară tumorală ($p=0.01$, $p=0.01$) și indicele de proliferare Ki67 ($p=0.001$, $p=0.001$), însă nu s-a identificat nicio asociere semnificativ statistică între acestea, dimensiunea tumorii, infiltratul limfocitar peritumoral și stadiul tumoral. Nu s-a remarcat nicio asociere semnificativ statistică între celulele Ito GFAP pozitive capsulare/peritumorale, intratumorale și din parenchimul hepatic adiacent și caracteristicile tumorale. S-a evidențiat o corelație pozitivă, semnificativ statistică între celulele stelate vinculină reactive capsulare/peritumorale și intratumorale și gradul de diferențiere tumorală ($p=0.001$, $p<0.001$), gradul de necroză ($p=0.02$, $p=0.004$), invazia vasculară tumorală ($p=0.003$, $p=0.001$) și indicele de proliferare Ki67 ($p=0.001$, $p<0.001$), însă nu s-a observat nicio legătură semnificativ statistică între acestea, dimensiunea tumorii, infiltratul limfocitar peritumoral și stadiul tumoral. Celulele stelate SMA pozitive din parenchimul hepatic adiacent nu s-au corelat semnificativ statistic cu niciunul dintre parametrii tumorali descriși. S-a constatat o asociere pozitivă semnificativ statistică între celulele Ito vinculină pozitive din parenchimul hepatic adiacent și gradul de diferențiere tumorală ($p=0.03$), însă nicio legătură semnificativ statistică între acestea și celelalte variabile tumorale (dimensiunea tumorii, gradul necrotic, invazia vasculară tumorală, stadiul tumoral și indicele de proliferare Ki67).

Concluzii. În acest studiu pilot CSH imunomarcate au predominat în carcinoame, comparativ cu tumorile benigne, fiind distribuite în principal în stroma tumorală și capsular/peritumoral.

CSH capsulare/peritumorale și intratumorale SMA și vinculină reactive s-au asociat cu gradul de diferențiere tumorală, necroza, invazia vasculară și indicele Ki 67.

CSH vinculină reactive din parenchimul hepatic adiacent s-au corelat cu gradul tumoral, însă nu a existat nicio asociere între acestea și restul parametrilor tumorali.

CSH GFAP pozitive din toate cele 3 zone examinate și CSH SMA reactive din parenchimul hepatic adiacent nu s-au asociat cu niciuna dintre caracteristicile tumorale.

Existența unor subpopulații de CSH cu rol dublu în carcinogeneză, atât antitumoral, cât și protumoral deschide calea unor noi abordări terapeutice țintite și personalizate în CHC și CCIH.

Toate aceste aspecte înclină spre faptul că celulele Ito ar putea avea potențial prognostic în evaluarea agresivității și progresiei CHC și CCIH.

Studiul 3. Analiza prin microscopie hiperspectrală a celulelor Ito imunomarcate α - SMA de la nivelul carcinomul hepatocelular și colangiocarcinomului intrahepatic – studiu pilot

Introducere. În domeniul medical, imagistica hiperspectrală (Hyperspectral imaging, HSI) furnizează informații suplimentare, care pot fi exploatate în diferite moduri pentru un diagnostic mai exact și rapid. HSI poate oferi imagini aproape în timp real ale biomarkerilor tisulari. Beneficiul cheie este reprezentat de abilitatea de a diferenția tipurile de țesut, pe baza caracteristicilor și culorilor lor spectrale; anumite lungimi de undă pot fi interpretate automat de către sistem, astfel încât HSI poate ajuta inclusiv la diferențierea între țesutul normal și cel malign. În acest fel, medicii ar putea distinge chiar și cele mai mici zone reziduale de țesut malign și, totodată, ar putea evalua proprietățile lor funcționale ²².

De asemenea, prin HSI este posibilă detectarea automată a unor patologii. Au fost descrise numeroase aplicații ale acestei tehnologii imagistice, de exemplu, rata de acuratețe a detectării tumorii limbii cu HSI asistată de computer a fost de 96,5% ²².

Ipoteza de lucru. Caracterizarea prin microscopie hiperspectrală a celulelor stelate hepatice activate, imunomarcate cu anticorpii anti α - SMA, de la nivelul carcinomului hepatocelular și colangiocarcinomului intrahepatic, precum și de la nivelul tumorilor benigne, cu scopul de a evidenția prezența unor posibile diferențe spectrale între celulele

Ito de la nivelul CHC, CCIH și cele de la nivelul tumorilor benigne, arătând aportul acestei metode în diagnosticul diferențial al tumorilor hepatice.

Material și metodă. Acest studiu pilot, retrospectiv și observațional s-a desfășurat în cadrul Centrului de Cercetări pentru Medicina Avansată – MedFuture, a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca.

Am inclus în studiu aceleași preparate microscopice cu CHC, CCIH și tumori hepatice benigne (lotul control) utilizate în studiul 2. Probele au fost imunomarcate cu anticorpii anti α -SMA, 4,5 mg, clona asm-1 Novocastra™ de la Leica Biosystems Inc, conform metotologiei generale.

Preparatele microscopice au fost examinate utilizând microscopul Olympus BX53 CytoViva, prevăzut cu opțiunea de examinare în câmp întunecat, echipat cu o sursă de lumină cu halogen de 150 W, un spectrofotometru capabil să înregistreze intervalele de lungimi de undă vizibile în infraroșu apropiat (VNIR 400-1000 nm) și software de analiză a imaginilor hiperspectrale ENVI.

Rezultate. În studiul diferențelor spectrale ale CSH între cele 3 zone specifice la nivelul celor 3 loturi, testul Wilcoxon a arătat diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) în distribuțiile spectrelor între zonele intratumorale și adiacente, precum și între zonele peritumorale și adiacente, în timp ce comparația dintre zonele intratumorale și peritumorale a fost semnificativă statistic cu $p=0.01$. Pentru grupul CHC, s-au identificat diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) în distribuțiile spectrelor între zonele intratumorale și adiacente, precum și o diferență semnificativă ($p = 0.002$) între zonele peritumorale și adiacente, în timp ce comparația dintre zonele intratumorale și peritumorale nu a fost semnificativă ($p = 0.211$). Pentru lotul CCIH, același test Wilcoxon nu a arătat diferențe semnificative ($p > 0.999$) în distribuțiile spectrelor între nicio zonă. Pentru grupul de control, s-au evidențiat diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) în distribuțiile spectrelor între toate zonele.

În studiul diferențelor spectrale ale CSH între cele 3 loturi, în parenchimul hepatic adiacent s-au relevat diferențe spectrale semnificative ($p = 0.03$) între CHC și CCIH, precum și diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) între CHC și control și între CCIH și control. În zona intratumorală, am observat diferențe spectrale semnificative ($p = 0.014$) între CHC și CCIH, diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) între CHC și control și diferențe semnificative ($p = 0.005$) între CCIH și control. În zona peritumorală, nu s-au identificat diferențe semnificative ($p = 0.5$) între CHC și CCIH. Cu toate acestea, s-au evidențiat diferențe extrem de semnificative ($p < 0.001$) între CHC și control, precum și între CCIH și control.

Concluzii. Acest studiu a arătat că CSH prezintă aspecte spectrale distincte în funcție de tipul tumoral și de regiunea examinată la nivel tumoral, permițând diferențierea acestora. Astfel, analiza CSH prin microscopie hiperspectrală ar putea fi o metodă promițătoare în conduita diagnostică și terapeutică personalizată a tumorilor hepatice. Pentru validarea aplicabilității acestei metode în practica paraclinică curentă sunt necesare studii viitoare de tip prospectiv și perfecționarea tehnicii de prelucrare a țesutului hepatic în faza preanalitică.

Concluzii generale

CSH au predominat la pacienții cu HCVC, comparativ cu lotul mator, fiind distribuite preponderent în regiunile portale și perisinusoidale ale lobulului hepatic.

Celulele Ito SMA și vinculină reactive s-au corelat pozitiv cu stadiul fibrozei, încărcătura virală și rigiditatea hepatică, însă s-a remarcat o asociere negativă între aceste variabile și CSH GFAP pozitive, sugerând existența unor supopulații diferite de CSH.

CSH ar putea avea valoare potențial prognostică în aprecierea severității HCVC, precum și în selecția pacienților pentru o terapie personalizată, în funcție de subtipul de CSH prezentate.

În CHC și CCIH, celulele Ito au fost mai numeroase comparativ cu cele din lotul martor, fiind distribuite în cea mai mare parte în stroma tumorală și peritumoral/capsular.

La nivelul CHC și CCIH, CSH SMA și vinculină reactive capsulare/peritumorale și intratumorale s-au asociat pozitiv cu gradul tumoral, prezența invaziei vasculare și indicele de proliferare Ki67, în schimb nu s-a observat nicio corelație între acești parametri tumorali, CSH SMA din parenchimul hepatic adiacent și cele GFAP pozitive din toate zonele.

CSH ar putea reprezenta un potențial marker prognostic nefavorabil în CHC și CCIH.

Caracterizarea CSH prin microscopie hiperspectrală contribuie în diagnosticul diferențial între CHC, CCIH și tumorile benigne din lotul control.

Profilul imunohistochimic și spectral heterogen al celulelor Ito în funcție de zona examinată la nivel hepatic și tipul tumoral, susțin prezența unor subpopulații celulare, cu rol antagonist în hepatocarcinogenază: unele favorizând expansiunea tumorală, altele inhibând-o.

Pentru confirmarea rolului prognostic și diagnostic al acestor celule în HCVC, CHC și CCIH sunt necesare cercetări viitoare, prospective, pe eșantioane mai extinse de subiecți.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Toate cele trei studii cuprinse în aceasta teză de doctorat se remarcă prin originalitate și inovație prin prisma faptului că abordează noi strategii de caracterizarea a celulelor Ito cu impact fundamental în hepatita cronică virală C, carcinomul hepatocelular și colangiocarcinomul intrahepatic. Astfel, atât studiul 1, cât și studiul 2 reprezintă primele cercetări efectuate în România care au analizat CSH prin 3 markeri imunohistochimici diferiți (SMA, GFAP și vinculină), asocierea lor cu viremia și rigiditatea hepatică la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C, precum și cu gradul tumoral, invazia vasculară și indicele de

proliferare Ki67 în carcinomul hepatocelular și colangiocarcinom. Totodată, evaluarea legăturii dintre celulele Ito imunomarcate cu rigiditatea, viremia și parametrii tumorali descriși în aceste patologii nu a mai fost studiată până în prezent la nivel internațional.

Studiul 3 a examinat pentru prima dată la nivel mondial celulele Ito prin microscopie hiperspectrală în carcinomul hepatocelular și colangiocarcinom.

Rezultatele acestor studii relevă valoarea potențial diagnostică și prognostică a celulelor Ito în progresia hepatitei cronice virale C, carcinomului hepatocelular și colangiocarcinomului intrahepatic. Cu toate că sunt studii de tip pilot, retrospective, cu o cazuistică relativ restrânsă, examinările efectuate vor putea fi extinse în viitor pe eșantioane mai mari de pacienți, pentru validarea datelor obținute.

Bibliografie selectivă

1. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 2008, 88(1):125–172.
2. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(1):3–15.
3. Yoon J. Hyperspectral Imaging for Clinical Applications. *BioChip Journal*, 2022; 16:1–12.
4. Gupta G, Khadem F, Uzonna JE. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine*, 2019, 124:154542.
5. Grigoraș A, Giușcă SE, Avădănei ER, Amălinei C, Căruntu ID. Pointing at Ito cell, from structure to function (... or Cinderella story in liver histology). *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57(3): 915–923.
6. Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology*, 2011, 53(3):983–995.
7. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gastroenterol*, 2018, 53(1):6–17.
8. Khomich O, Ivanov AV, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Cells*, 2019, 9(1):24.
9. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3(6):344–363.
10. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1473–1492
11. Friedman A, Siewe N. Chronic hepatitis B virus and liver fibrosis: a mathematical model. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195037.
12. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis *in vivo*. *Hepatology*, 2006, 43(3):435–443.
13. Shiraha H, Iwamuro M, Okada H. Hepatic stellate cells in liver tumor. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1234:43–56.
14. Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15:63.
15. Tahmasebi Birgani M, Carloni V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):405.
16. Suflețel RT, Melincovici CS, Orășean OH, Zaharie T, Gheban BA, Istrate A, Constantin AM, Mișu CM. Activated Hepatic Stellate Cells (Ito Cells) - Marker of Advanced Fibrosis in Chronic Viral Hepatitis C: A Pilot Study. *J Gastrointest Liver Dis*, 2023; 32(2):1-12.
17. Lee YT, Wang JJ, Luu M, Noureddin M, Nissen NN, Patel TC, et al. Comparison of Clinical Features and Outcomes Between Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Hepatology*. 2021;74(5):2622-2632.
18. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:425-456.
19. Coulouarn C, Clément B. Stellate cells and the development of liver cancer: therapeutic potential of targeting the stroma. *J Hepatol*. 2014; 60(6):1306-1309.
20. Filliol A, Saito Y, Nair A, Dapito DH, Yu LX, Ravichandra A, et al. Opposing roles of hepatic stellate cell subpopulations in hepatocarcinogenesis. *Nature*. 2022;610(7931):356-365.
21. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017
22. Schneider A, Feussner H. Chapter 5 - Diagnostic Procedures. In: Schneider A, Feussner H (Eds.). *Biomedical Engineering in Gastrointestinal Surgery*. Academic Press, 2017, Pp. 87-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803230-5.00005-1>.

PhD Thesis Summary

PhD Thesis title:

Analysis of Ito cells in chronic viral hepatitis and liver tumors

PhD student: **Rada-Teodora Suflețel**

PhD coordinator: Prof. Dr. **Carmen Mihaela Mihu**

CONTENT

| | |
|---|-----|
| INTRODUCTION | 13 |
| CURRENT STATE OF KNOWLEDGE | 15 |
| 1. Ito cells - general characteristics | 17 |
| 1.1. History | 17 |
| 1.2. Morphological and ultrastructural characteristics | 17 |
| 1.3. Embryological origin | 18 |
| 1.4. The main markers expressed by Ito cells | 18 |
| 2. Functions of Ito cells in the normal liver | 20 |
| 2.1. Sinusoids' wall support and flow regulation | 21 |
| 2.2. Vitamin A's homeostasis | 21 |
| 2.3. Synthesis of lipoproteins, growth factors and cytokines | 22 |
| 2.4. Xenobiotic metabolism, pH balancing and the response to oxidative stress | 24 |
| 2.5. The hepatic immune response | 24 |
| 3. The role of stellate cells in liver's development and regeneration | 25 |
| 4. Ito cells' activity in liver pathology | 27 |
| 4.1. Liver fibrosis and Ito cell activation | 27 |
| 4.2. Ito cells in B and C viral hepatitis | 29 |
| 4.3. The role of Ito cells in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma | 30 |
| PERSONAL CONTRIBUTION | 35 |
| 1. Working hypothesis. Objectives | 37 |
| 2. General methodology | 39 |
| 3. Study 1. Evaluation of the potential prognostic value of activated Ito cells in chronic viral hepatitis C – a pilot study | 41 |
| 3.1. Introduction | 41 |
| 3.2. Working hypothesis | 42 |
| 3.3. Material and method | 42 |
| 3.4. Results | 44 |
| 3.5. Discussions | 59 |
| 3.6. Conclusions | 63 |
| 4. Study 2. Evaluation of the potential prognostic role of Ito cells in hepatocellular carcinoma and in intrahepatic cholangiocarcinoma – a pilot study | 65 |
| 4.1. Introduction | 65 |
| 4.2. Working hypothesis | 67 |
| 4.3. Material and method | 67 |
| 4.4. Results | 69 |
| 4.5. Discussions | 79 |
| 4.6. Conclusions | 81 |
| 5. Study 3. Hyperspectral microscopy analysis of α-SMA immunolabeled Ito cells from hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma – a pilot study | 83 |
| 5.1. Introduction | 83 |
| 5.2. Working hypothesis | 85 |
| 5.3. Material and method | 85 |
| 5.4. Results | 87 |
| 5.5. Discussions | 93 |
| 5.6. Conclusions | 95 |
| 6. General conclusions | 97 |
| 7. The originality and innovative contributions of the thesis | 99 |
| REFERENCES | 101 |

Keywords: Ito cells, VHB, VHC, hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma, hyperspectral microscopy, immunolabeling, α -SMA, GFAP, Vinculin

INTRODUCTION

The Ito cell, or hepatic stellate cell (HSC), has been shown over time to be a remarkable mesenchymal cell, vital to hepatocellular function and the hepatic response to cellular injury, being the key element of liver fibrogenesis¹. In addition to its well-known role in liver fibrosis, these cells have essential implications in liver homeostasis, in liver repair and regeneration, xenobiotic metabolism, intermediate metabolism and immune response regulation. They also have major contributions in the amplification and differentiation of liver progenitor cells^{1,2}. These fundamental characteristics make HSC a powerful therapeutic target for liver pathology.

Hyperspectral microscopy combines the spectral and the spatial informations, creating a 3D image of the examined object. It ensures the identification, morphological and biochemical characterization of cells and tissues on account of the spectra emitted by them. It also allows the creation of spectral libraries by assigning the recorded spectra to specific components, simultaneously highlighting the quality and quantity in the sample³.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

HSCs represent resident non-parenchymal cells, the lipid-storing pericytes, located in the subendothelial space of Disse, between the basolateral surface of hepatocytes and the antiluminal side of sinusoidal endothelial cells. In the normal liver, they occupy 1/3 of the non-parenchymal cells and 10-15% of the total resident liver cells¹⁻⁴. The transmission of soluble mediators and cytokines is favored by the intimate contact between HSCs, hepatocytes, Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells. Due to their close position to autonomic nerve endings, Ito cells react to α -adrenergic stimulation^{2,5}.

Currently research supports a dual embryological origin, both endodermal (through the expression of cytokeratins) and mesenchymal from the transverse septum [through the expression of the mesodermal transcription factor forkhead box f1 (Foxf1) and vimentin]^{2,6}. Ito cells express on their surface numerous markers, some of neuroectodermal origin (GFAP, nestin, neurotrophins and their receptors, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), SYN and N-CAM), others of mesodermal origin (vimentin, desmin, alpha smooth muscle actin (α -SMA), hematopoietic markers and lecithin retinol acyltransferase (LRAT))^{4,7}.

The main roles of the HSCs are: 1) supporting the wall and regulating the sinusoidal flow; 2) in vitamin A homeostasis; 3) in the secretion of lipoproteins, growth factors and cytokines; 4) in xenobiotic metabolism, pH balance and response to oxidative stress; 5) in liver immunology; 6) in liver injury and repair. There is a link between the high content of lipid vacuoles and the release of an increased number of pro-inflammatory cytokines⁸. Ito cells secrete a wide range of proteins with an autocrine and paracrine role: lipoproteins, growth factors and cytokines¹; contain enzymes involved in intermediate metabolism, in the catabolism of ethyl alcohol and xenobiotics^{1,2}; they secrete several immune factors, react to numerous immunological stimuli and transduce signals through pathways and mediators located in immune cells – so that under normal conditions, HSCs support certain immunosuppressive responses. In case of liver injury, HSC detects the damaged tissue and promotes the activation of innate immune cells⁹.

Ito cells have a crucial role in liver regeneration, being elements of the liver progenitor cell niche¹. The number, morphology and cytokine status of resting and activated HSC in the liver are altered in various stages of liver injury^{1,4}. The main cells involved in fibrogenesis are Ito cells, which become activated in response to liver injury and transform from dormant cells rich in vitamin A into myofibroblast-like cells with proliferative, contractile, migratory and fibrogenic properties^{1,8,10}.

In viral hepatitis B (VHB) and C (VHC), liver diseases that can progress to cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma (HCC)¹¹, VHB and VHC can promote liver fibrosis by stimulating the proliferation of HSC and by amplifying the expression of TGF- β 1 and other profibrotic factors molecules associated with fibrosis^{11,12}.

In HCC and intrahepatic cholangiocarcinoma, the main types of primary liver tumors¹³, activated HSCs are the main components of the tumor microenvironment and have a key role in tumor progression, which is regulated by the liver microenvironment, through the synthesis of factors of growth, cytokines, extracellular matrix¹³⁻¹⁵.

As the mechanisms by which HSC intervene in liver homeostasis and pathology are deciphered, the implementation of curative therapeutic regimens based on intervention on HSC will become promising in the near future.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis. Objectives

The hypothesis that initiated the realization of this doctoral thesis was based on two ideas: 1) the versatility of Ito cells through their remarkable roles both in the normal and in the pathological liver; 2) the fact that despite the exhaustive study of these cells, they still present a huge unexplained potential.

The thesis aimed at: 1) Evaluation of the potential prognostic role of activated Ito cells in chronic viral hepatitis C; 2) Determination of the potential prognostic value of hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma and in intrahepatic cholangiocarcinoma; 3) Evaluation of the contribution of Ito cell analysis by hyperspectral microscopy in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma.

General methodology

I developed three pilot, retrospective, observational studies. The cases were collected from the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca. A total number of 91 patients were selected, of which 27 with chronic viral hepatitis C, 39 with hepatocellular carcinoma and 11 with cholangiocarcinoma diagnosed by clinical examination and paraclinical examinations (laboratory examinations, imaging and histopathological examination). Among the 91 patients enrolled in the study, 14 were control cases, being diagnosed with benign liver tumors on the background of a normal liver. I compiled a database, which included demographic, clinical, laboratory, morphopathological and immunohistochemical data.

The studies consisted of the morphological analysis of hepatic stellate cells on liver biopsies and liver resection specimens, collected from patients with chronic viral hepatitis C, hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma.

Immunohistochemical methods, hyperspectral microscopy with specialized image analysis software and statistical tests were used to characterize Ito cells.

Histological sections were examined using the Leica DM1000 LED microscope and for hyperspectral analysis the Olympus BX53 CytoViva microscope.

Statistical analysis: For the qualitative variables, we calculated the absolute and relative frequencies of the formed categories. To describe the relationships between the qualitative variables we used the Chi-square tests or Fisher's exact test and the Cramer V indicators and the odds ratio (OR) with the phi coefficient and CI 95% confidence interval, and the correlation coefficient rho (Spearman's ρ) was used to measure correlation between ordinal data. To compare quantitative variables on independent groups, with the dichotomous grouping variable, we used the non-parametric Mann-Whitney (MW) test. Numerical data with normal distribution were presented as mean \pm standard deviation, while data with non-normal distribution were reported with median and quartiles 27 and 75. Qualitative data were presented as percentages (%). We have presented the p-values generated by these tests, as well as the means \pm SD of the groups and the difference of the means with the associated 95% CI confidence interval. To study the relationships between the quantitative variables we used the Spearman correlation coefficient (ρ), with the associated p-value.

We used Microsoft Excel 2016 for database management. For most statistical analyzes and subsequent graphs we used the R 4.1.1 program. and R 4.3.0. We considered $p < 0.05$ to be statistically significant.

Study 1. Evaluation of the potential prognostic value of activated Ito cells in chronic viral hepatitis C - pilot study

Introduction. Ito cells appear under two aspects depending on the liver status: inactive HSCs, dormant in conditions of liver homeostasis and HSCs activated in liver injury, with important morphological and functional differences⁴. Activated HSCs, characterized by the immunoexpression of α -SMA, GFAP and vinculin, were increased in number in patients with chronic viral hepatitis C (CVHC) compared to healthy subjects¹⁶.

Working hypothesis. The aim of the current study was to identify a possible association between the number of activated hepatic stellate cells, liver fibrosis, liver stiffness, viral load and necrotic-inflammatory activity in chronic viral hepatitis C.

Material and method. 31 liver biopsies were included in the study, of which 27 were collected from patients with chronic viral hepatitis C before antiviral treatment and 4 were the control cases, collected from patients with benign liver tumors, such as hepatocellular adenoma and cavernous hemangioma, developed on the background of a healthy liver. Patients who met the conditions of antiviral treatment were included in the study, namely: VHC-RNA and anti-VHC antibodies detectable in the blood, elevated levels of alanine aminotransferase (ALT) over 6 months and the presence of chronic hepatitis with a Metavir necrotic-inflammatory score (A) ≥ 1 and fibrosis (F) ≥ 1 . Also, for patients with VHC were collected from the database of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor" the following clinical data: demographics, time elapsed since CVHC diagnosis, viremia and liver stiffness measured by Fibroscan in kilopascals (kPa) before antiviral treatment. Patients co-infected with VHB, with the acquired immunodeficiency virus (HIV), patients under or after antiviral treatment and patients with any other associated liver pathology were excluded from the study.

Results. Of the 31 patients enrolled in the study, 27 (87%) were in the CVHC group, and 4 (13%) were in the control group. The gender distribution in the two groups was similar, the female gender predominating (77.4%). The mean age \pm standard deviation was 52.29 ± 11.9 years, with an age range of 31-73 years. Patients were diagnosed with CVHC an average of 9 years ago, with a range between 5 and 18 years. The mean value of viremia was 733231 IU/ml, with a range between 3556-19832490 IU/ml. The mean value of liver stiffness was 7.6 kPa, with a range between 3.3-13.8 kPa.

Regarding the Metavir score, out of the 27 patients with CVHC, 21 had a high score and 6 a low score. Most patients presented necrotic-inflammatory grade 2 (66.7%) and fibrosis stage 1 (48.1%). The quantification of Ito cells immunolabeled with α -SMA, GFAP and vinculin in the areas of the liver lobule was performed by a semi-quantitative method. A statistically significant positive correlation was identified between the number of α -SMA-positive cells and the stage of fibrosis ($\rho = 0.391$, $p = 0.044$) in the perivenular region of the liver lobule, but no association was observed between the intensity of α -SMA immunoexpression and fibrosis. Also, immunoreactive stellate cells in zone I correlated positively with viremia ($\rho = 0.442$, $p = 0.021$) and liver stiffness ($\rho = 0.425$, $p = 0.027$). No statistical correlation between the degree of necro-inflammatory activity and the number of Ito α -SMA reactive cells in any of the areas of the liver lobule was revealed.

GFAP-positive HSCs were slightly more numerous in the CVHC group, but without statistical significance. GFAP-reactive Ito cells were identified only in the periportal and perisinusoidal areas. A negative correlation was noted between the intensity of GFAP immunoexpression ($\rho = -0.475$, $p = 0.012$), the number of GFAP-positive cells ($\rho = -0.540$, $p = 0.004$) in the perisinusoidal area, the stage of fibrosis and liver stiffness ($\rho = -0.422$, $p = 0.029$). Also, HSCs GFAP reactive in zone 1 correlated negatively with VHC-RNA levels ($\rho = -0.517$, $p = 0.006$). At the same time, a statistically significant positive correlation was found between the number of GFAP-positive cells in the perisinusoidal area and the necrotic-inflammatory activity ($V = 0.40$, $p = 0.038$). No association was identified between α -SMA immunoexpression and GFAP immunoexpression in HSC.

There was a higher number of vinculin-positive HSCs in the CVHC group than in the control group in the periportal ($V = 0.79$, $p < 0.001$) and intermediate regions of the liver lobule ($V = 0.44$, $p = 0.049$). The intensity of immunoexpression was significantly more marked in those with CVHC, in contrast to healthy subjects ($V = 0.47$, $p = 0.031$), in the centrolobular region. No statistically significant correlation was noted between the expression intensity, the necrotic-inflammatory degree or the fibrosis stage. However, a statistically significant positive association was identified between the number of Ito cells reactive for vinculin and the stage of fibrosis in the periportal area ($\rho = 0.423$, $p = 0.028$). HSCs vinculin reactive in zone 1 were positively correlated with liver stiffness ($\rho = 0.564$, $p = 0.002$) and viral load ($\rho = 0.522$, $p = 0.006$). We did not highlight any association between vinculin-positive HSCs and necrotic-inflammatory activity. Furthermore, we found no correlation between vinculin immunoexpression, α -SMA immunoexpression and GFAP immunoexpression in HSCs.

Conclusions. HSCs immunolabeled with the 3 markers α -SMA, GFAP and vinculin were more numerous in the group with CVHC, unlike the control group. They were arranged mainly at the level of regions 1 and 2 of the hepatic lobule. A

statistically significant positive association was identified between α -SMA and vinculin positive Ito cells, fibrotic stage, liver stiffness and viremia.

GFAP-reactive stellate cells were inversely correlated with the stage of liver fibrosis, liver stiffness and viral load, representing a more sensitive marker of HSCs in the early activation phase than α -SMA, indicating the beginning of the fibrotic process. In this sense, GFAP can be used as a biological marker in the selection of CVHC patients for personalized antiviral therapy.

All these aspects support the fact that the number of activated Ito cells could constitute a potentially valuable prognostic marker in the evaluation of CVHC progression and liver fibrogenesis.

Study 2. Evaluation of the potential prognostic role of Ito cells in hepatocellular carcinoma and in intrahepatic cholangiocarcinoma – a pilot study

Introduction. Hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (IHCC) represent the most common forms of primary malignant liver tumors¹⁷. Most liver neoplasias develop on the background of chronic inflammatory processes, associated with liver fibrosis or cirrhosis, in which activated HSCs play a pathognomonic role^{18,19}. It was found that dormant or weakly activated Ito cells expressing HGF inhibited tumor expansion and fully activated cells in advanced tumor stages expressing collagen I stimulated tumor growth. At the same time, it has been observed that during the evolution of the neoplastic process there is an increase in the imbalance between these HSCs subpopulations, promoting hepatocarcinogenesis²⁰. Many other aspects support the primary role of these cells in hepatocarcinogenesis and cholangiocarcinogenesis.

Working hypothesis. The aim of the current study was to show the prognostic potential of HSCs in HCC and IHCC. In this sense, the objectives of this study were: 1) the characterization of Ito cells immunolabeled by SMA, GFAP and vinculin in HCC, IHCC from the tumoral capsule/peritumoral hepatic tissue, tumoral stroma and adjacent liver parenchyma and their comparison with those from benign liver tumors; 2) determination of the association between the number of immunoreactive HSCs, tumor size, degree of tumor differentiation, tumor necrosis, vascular invasion, inflammatory infiltrate, tumor stage and Ki67 tumor proliferation index within HCC and IHCC.

Material and method. This pilot, retrospective and observational research was carried out in the Pathological Anatomy laboratory of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca, on liver resection specimens collected during 2015-2020 and stored in the laboratory archive. Resection pieces collected from patients with hepatocellular carcinomas and intrahepatic cholangiocarcinomas confirmed by histopathological examination, without other associated liver tumors, were included in the study. Patients with clinical and imaging suspicion of hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma, but without histopathological confirmation, were excluded, as well as patients with other associated liver tumors. The control group was represented by pieces of liver resection from patients with benign liver tumors (angiomyolipoma, cavernous hemangioma and lymphhemangioma), developed on the background of a normal liver.

We assessed the necrotic degree as follows: 0- absent necrosis, 1- < 10% - mild necrosis, 2-10-30% moderate necrosis, 3- > 30% extensive necrosis. We classified the peritumoral inflammatory infiltrate according to its density as follows: mild, moderate and abundant. Vascular invasion was evaluated according to the presence or absence of tumor emboli in the vascular lumen. The classification of the tumor stage was carried out according to the TNM staging from the latest edition of the AJCC, Cancer Staging Manual, 2017²¹.

Results. Among the 60 patients included in the study, 39 presented HCC, 11 presented IHCC and 10 were control cases, with benign liver tumors (angiomyolipoma, cavernous hemangioma and lymphhemangioma). The gender distribution in the HCC and IHCC groups was similar, the male gender predominating (69.2%, 63.6%). In the control group, the maximum incidence was female (70%). Regarding the age of the patients, there were significant statistical differences between the HCC group and the control group (<0.001, respectively the IHCC group and the control group 0.001). The average age in the HCC group was 65 years (with an interval between 61-72), in the IHCC group it was 68 years (with an interval between 61-72), and in the control group 44 years (with an interval between 35.5- 51.2).

Regarding the size of the tumor formation, there were no statistically significant differences between the 3 groups. In the HCC group the average size was 3.5 cm (with an interval between 3-5.5 cm), in the IHCC group 5.5 cm (with an interval between 4.5-9 cm) and in the control group 6.2 cm (with an interval between 3-9.2 cm). Regarding the degree of tumor differentiation in the HCC and IHCC groups, most were well (G1) and moderately differentiated (G2) (61.5%, 63.6%, respectively). Most HCC and IHCC cases showed necrosis. No significant statistical differences were identified between these two groups (0.07) regarding this parameter. In the HCC group, mild necrosis predominated (23.1%), and in IHCC moderate necrosis (54.5%). In both groups of malignant tumors, a reduced lymphocytic inflammatory infiltrate predominated (53.8%, 72.7%). Most of the malignant tumors showed tumor vascular invasion (53.8%, 72.7%). The majority of malignant liver tumors were in early tumor stages I and II (79.5% and 54.5%).

In HCC and IHCC a high Ki67 proliferation index prevailed (69.2%) and (72.7%). In the control group, the Ki67 proliferation index was reduced. Statistically significant differences were recorded regarding this parameter, between the HCC and control groups (<0.001), respectively between the IHCC and control groups (0.001). Regarding HSCs SMA, vinculin and GFAP positive, they were more numerous in the HCC and IHCC groups, compared to the control group. In both groups of malignant tumors, HSCs SMA and vinculin reactive were located in the capsule/peritumoral, in the tumor stroma and in the adjacent liver parenchyma, predominating in the tumoral stroma. In the HCC group, GFAP-positive HSCs were distributed only in the capsule/peritumoral areas and in the adjacent liver parenchyma. In the IHCC group, GFAP-positive Ito cells were located mainly capsular/peritumoral and in the adjacent liver parenchyma, their intratumoral presence being reported only in an isolated case.

The number of positive capsular/peritumoral Ito SMA cells and from the tumor stroma at the level of HCC and IHCC was statistically significantly positively correlated with the degree of tumor differentiation ($p=0.01$, $p<0.001$), with the necrotic degree ($p=0.01$, $p=0.01$), tumor vascular invasion ($p=0.01$, $p=0.01$) and Ki67 proliferation index ($p=0.001$, $p=0.001$), but no

statistically significant association was identified between them, tumor size, peritumoral lymphocytic infiltrate and tumor stage. No statistically significant association was noted between capsular/peritumoral, intratumoral and adjacent liver parenchymal Ito GFAP-positive cells and tumor characteristics. A positive, statistically significant correlation was noticed between capsular/peritumoral and intratumoral reactive vinculin stellate cells and the degree of tumor differentiation ($p=0.001$, $p<0.001$), the degree of necrosis ($p=0.02$, $p=0.004$), tumor vascular invasion ($p=0.003$, $p=0.001$) and the Ki67 proliferation index ($p=0.001$, $p<0.001$), but no statistically significant relationship was observed between them, tumor size, peritumoral lymphocytic infiltrate and tumor stage. SMA-positive stellate cells in the adjacent liver parenchyma did not correlate statistically significantly with any of the described tumor parameters. A statistically significant positive association was found between Ito vinculin positive cells in the adjacent liver parenchyma and the degree of tumor differentiation ($p=0.03$), but no statistically significant relationship between them and the other tumor variables (tumor size, necrotic degree, tumor vascular invasion, stage tumor and proliferation index Ki67).

Conclusions. In this pilot study, immunolabeled HSCs predominated in carcinomas, compared to benign tumors, being distributed mainly in the tumoral and capsular/peritumoral stroma.

Capsular/peritumoral and intratumoral HSCs SMA and vinculin reactive were associated with the degree of tumor differentiation, necrosis, vascular invasion and Ki 67 index.

Vinculin-reactive HSCs from the adjacent liver parenchyma correlated with the tumor grade, but there was no association between them and the rest of the tumor parameters.

GFAP-positive HSCs from all 3 examined areas and SMA-reactive HSCs from the adjacent liver parenchyma were not associated with any of the tumor characteristics.

The existence of HSCs subpopulations with a dual role in carcinogenesis, both antitumor and protumoral, paves the way for new targeted and personalized therapeutic approaches in HCC and IHCC.

All these aspects point to the fact that Ito cells could have prognostic potential in evaluating the aggressiveness and progression of HCC and IHCC.

Study 3. Hyperspectral microscopy analysis of α -SMA immunolabeled Ito cells from hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma – a pilot study

Introduction. In the medical field, hyperspectral imaging (HSI) provides additional information, which can be exploited in various ways for a more accurate and rapid diagnosis. HSI can provide near real-time imaging of tissue biomarkers. The key benefit is the ability to differentiate tissue types based on their spectral characteristics and colors; certain wavelengths can be automatically interpreted by the system, so HSI can also help differentiate between normal and malignant tissue. In this way, doctors could distinguish even the smallest residual areas of malignant tissue and, at the same time, evaluate their functional properties ²².

Also, automatic detection of some pathologies is possible through HSI. Numerous applications of this imaging technology have been described, for example, the accuracy rate of tongue tumor detection with computer-assisted HSI was 96.5% ²².

Working hypothesis. Characterization by hyperspectral microscopy of activated hepatic stellate cells, immunolabeled with the anti- α -SMA antibody, from hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma, as well as from benign tumors, with the aim of highlighting the presence of possible spectral differences between Ito cells from the level of HCC, IHCC and those at the level of benign tumors, showing the contribution of this method in the differential diagnosis of liver tumors.

Material and method. This pilot, retrospective and observational study was carried out within the Research Center for Advanced Medicine - MedFuture, of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca.

We included in the study the same microscopic preparations with HCC, IHCC and benign liver tumors (control group) used in study 2. The samples were immunolabeled with anti- α -SMA antibody, 4.5 mg, clone asm-1 Novocastra™ from Leica Biosystems Inc, according to the general methodology chapter.

Microscopic preparations were examined using an Olympus BX53 CytoViva microscope, equipped with a dark-field examination option, a 150 W halogen light source, a spectrophotometer capable of recording the visible to near-infrared wavelength ranges (VNIR 400- 1000 nm) and ENVI hyperspectral image analysis software.

Results. In the study of the spectral differences of HSCs between the 3 specific areas at the level of the 3 groups, the Wilcoxon test showed highly significant differences ($p < 0.001$) in the distributions of the spectra between the intratumoral and adjacent areas, as well as between the peritumoral and adjacent areas, while the comparison between intratumoral and peritumoral areas was statistically significant with $p=0.01$. For the HCC group, highly significant differences ($p < 0.001$) were identified in the distributions of spectra between intratumoral and adjacent areas, as well as a significant difference ($p = 0.002$) between peritumoral and adjacent areas, while the comparison between intratumoral areas and peritumoral was not significant ($p = 0.211$). For the IHCC group, the same Wilcoxon test showed no significant differences ($p > 0.999$) in the spectrum distributions between any areas. For the control group, highly significant differences ($p < 0.001$) were revealed in the spectrum distributions between all areas.

In the study of the spectral differences of HSCs between the 3 groups, significant spectral differences ($p = 0.03$) between HCC and IHCC, as well as highly significant differences ($p < 0.001$) between HCC and control and between IHCC were revealed in the adjacent liver parenchyma and control. In the intratumoral area, we observed significant spectral differences ($p = 0.014$) between HCC and IHCC, highly significant differences ($p < 0.001$) between HCC and control, and significant differences ($p = 0.005$) between IHCC and control. In the peritumoral area, no significant differences ($p = 0.5$) were identified between HCC and IHCC. However, there were highly significant differences ($p < 0.001$) between HCC and control, as well as between IHCC and control.

Conclusions. This study showed that HSCs present distinct spectral aspects depending on the tumor type and the region examined at the tumor level, allowing their differentiation. Thus, HSCs analysis by hyperspectral microscopy could be a

promising method in the personalized diagnostic and therapeutic conduct of liver tumors. To validate the applicability of this method in current paraclinical practice, future prospective studies and the improvement of the liver tissue processing technique in the pre-analytical phase are necessary.

General conclusions

HSCs predominated in patients with CVHC, compared to the control group, being predominantly distributed in the portal and perisinusoidal regions of the liver lobule.

Ito SMA and vinculin-reactive cells were positively correlated with fibrosis stage, viral load and liver stiffness, but a negative association was noted between these variables and GFAP-positive HSCs, suggesting the existence of different HSCs subpopulations.

HSCs could have a potential prognostic value in assessing the severity of CVHC, as well as in the selection of patients for a personalized therapy, depending on the subtype of HSC presented.

In HCC and IHCC, Ito cells were more numerous compared to those in the control group, being mostly distributed in the tumoral and peritumoral/capsular stroma.

At the level of HCC and IHCC, the capsular/peritumoral and intratumoral HSCs SMA and vinculin reactive were positively associated with tumor grade, the presence of vascular invasion and Ki67 proliferation index, instead no correlation was observed between these tumor parameters, HSCs SMA positive from the adjacent liver parenchyma and the GFAP positive ones from all areas.

HSCs could represent a potential unfavorable prognostic marker in HCC and IHCC.

The characterization of HSCs by hyperspectral microscopy contributes to the differential diagnosis between HCC, IHCC and benign tumors.

The heterogeneous immunohistochemical and spectral profile of Ito cells depending on the area examined at the liver level and the tumor type, support the presence of some cell subpopulations with an antagonistic role in hepatocarcinogenesis: some favoring tumor expansion, others inhibiting it.

To confirm the prognostic and diagnostic role of these cells in CVHC, HCC and IHCC, future, prospective research is needed on more extensive samples of subjects.

The originality and innovative contributions of the thesis

All three studies included in this PHD thesis stand out for their originality and innovation in view of the fact that they approach new strategies for the characterization of Ito cells with fundamental impact in chronic viral hepatitis C, hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Thus, both study 1 and study 2 represent the first research carried out in Romania that analyzed HSCs through 3 different immunohistochemical markers (SMA, GFAP and vinculin), their association with viremia and liver stiffness in patients diagnosed with chronic viral hepatitis C, such as and with tumor grade, vascular invasion and Ki67 proliferation index in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. At the same time, the evaluation of the link between immunolabeled Ito cells with stiffness, viremia and tumor parameters described in these pathologies has not been studied at an international level until now.

Study 3 examined Ito cells for the first time worldwide by hyperspectral microscopy in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma.

The results of these studies reveal the diagnostic and prognostic potential value of Ito cells in the progression of chronic viral hepatitis C, hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Although they are pilot and retrospective studies, with a relatively limited case history, the examinations carried out may be extended in the future to larger samples of patients, to validate the data obtained.

Selective References

1. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 2008, 88(1):125–172.
2. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(1):3–15.
3. Yoon J. Hyperspectral Imaging for Clinical Applications. *BioChip Journal*, 2022; 16:1–12.
4. Gupta G, Khadem F, Uzonon JE. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine*, 2019, 124:154542.
5. Grigoraș A, Giușcă SE, Avădănei ER, Amălinei C, Căruntu ID. Pointing at Ito cell, from structure to function (... or Cinderella story in liver histology). *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57(3): 915–923.
6. Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology*, 2011, 53(3):983–995.
7. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gastroenterol*, 2018, 53(1):6–17.
8. Khomich O, Ivanov AV, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Cells*, 2019, 9(1):24.
9. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3(6):344–363.
10. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1473–1492
11. Friedman A, Siewe N. Chronic hepatitis B virus and liver fibrosis: a mathematical model. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195037.
12. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis *in vivo*. *Hepatology*, 2006, 43(3):435–443.
13. Shiraha H, Iwamura M, Okada H. Hepatic stellate cells in liver tumor. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1234:43–56.
14. Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15:63.
15. Tahmasebi Birgani M, Carloni V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):405.
16. Suflețel RT, Melincovici CS, Orășean OH, Zaharie T, Gheban BA, Istrate A, Constantin AM, Mișu CM. Activated Hepatic Stellate Cells (Ito Cells) - Marker of Advanced Fibrosis in Chronic Viral Hepatitis C: A Pilot Study. *J Gastrointest Liver Dis*, 2023; 32(2):1-12.

17. Lee YT, Wang JJ, Luu M, Nouredin M, Nissen NN, Patel TC, et al. Comparison of Clinical Features and Outcomes Between Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Hepatology*. 2021;74(5):2622-2632.
18. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:425-456.
19. Couluarn C, Clément B. Stellate cells and the development of liver cancer: therapeutic potential of targeting the stroma. *J Hepatol*. 2014; 60(6):1306-1309.
20. Filliol A, Saito Y, Nair A, Dapito DH, Yu LX, Ravichandra A, et al. Opposing roles of hepatic stellate cell subpopulations in hepatocarcinogenesis. *Nature*. 2022;610(7931):356-365.
21. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017
22. Schneider A, Feussner H. Chapter 5 - Diagnostic Procedures. In: Schneider A, Feussner H (Eds.). *Biomedical Engineering in Gastrointestinal Surgery*. Academic Press, 2017, Pp. 87-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803230-5.00005-1>.