

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Factori implicați în evoluția bolii hepatice induse de alcool și a ficatului gras non- alcoolic

Doctorand **Ioana Opriș (Rusu)**

Conducător de doctorat Prof.Dr.**Nadim Al Hajjar**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	19
<b>1. Boala hepatică indusă de alcool</b>	21
1.1. Definiție	21
1.2. Factori de risc	21
1.3. Modificări histopatologice	23
1.4. Sisteme de gradare și stadializare	25
<b>2. Factori implicați în evoluția bolii hepatice alcoolice</b>	27
2.1. Factori clinici	27
2.2. Factori biologici	27
2.3. Factori histologici	29
<b>3. Boala ficatului gras non-alcoolic</b>	31
3.1. Definiție	32
3.2. Factori de risc	32
3.3. Modificări histopatologice	35
3.4. Sisteme de gradare și stadializare	35
<b>4. Factori implicați în evoluția ficatului gras non-alcoolic</b>	37
4.1. Factori clinici	37
4.2. Factori biologici	38
4.3. Factori histologici	40
4.4. Evoluția bolii hepatice non-alcoolice spre HCC	41
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	47
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	49
<b>2. Metodologie generală</b>	51
<b>3. Studiul 1 – Caracterizarea clinică, biologică și morfologică a pacienților cu hepatită alcoolică severă</b>	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	57
3.3. Material și metodă	57

3.4. Rezultate	60
3.5. Discuții	73
3.6. Concluzii	75
<b>4. Studiul 2 – Caracterizarea clinică, biologică, morfologică și imunohistochimică a NAFLD în stadiu non-cirotic asociat cu HCC</b>	77
4.1. Introducere	77
4.2. Ipoteza de lucru	79
4.3. Material și metodă	79
4.4. Rezultate	83
4.5. Discuții	91
4.6. Concluzii	93
<b>5. Studiul 3 – Caracterizarea profilului molecular a NAFLD non-cirotic asociat cu HCC</b>	95
5.1. Introducere	95
5.2. Ipoteza de lucru	97
5.3. Material și metodă	98
5.4. Rezultate	103
5.5. Discuții	108
5.6. Concluzii	111
<b>6. Concluzii generale</b>	113
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	115
<b>REFERINȚE</b>	117

**Cuvinte cheie:** hepatita alcoolică, steatohepatita non-alcoolică, carcinom hepatocelular, microARN-uri, SALVE, biomarkeri, imunohistochimie, prognostic.

## INTRODUCERE

Boala hepatică indusă de alcool (ALD) și boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD) sunt probleme grave de sănătate la nivel mondial. Aceste două entități au spectre histopatologice similare, variind de la steatoză hepatică simplă, la steatohepatită, ciroză hepatică, cu posibilitatea evoluării spre carcinom hepatocelular (HCC). Deși majoritatea subiecților cu consum excesiv de alcool sau obiceiuri alimentare nesănătoase experimentează steatoză hepatică simplă, un procent de indivizi vor dezvolta steatohepatită alcoolică, respectiv steatohepatită non-alcoolică, boală hepatică progresivă, unele cazuri evoluând spre HCC sau deces. Evoluția și supraviețuirea pacienților cu ALD și NAFLD depind de mai mulți factori.

Consumul de alcool este o problemă importantă de sănătate la nivel mondial, deoarece evoluează frecvent spre boală hepatică cronică cu fibroză progresivă, ciroză sau HCC [1]. Hepatita alcoolică se dezvoltă la pacienții cu boală hepatică de fond indusă de alcool și consumul unei cantități crescute de alcool [2]. Diagnosticul de hepatită alcoolică (AH) este clinic, pus pe baza unui istoric de consum excesiv de alcool, paraclinic sau prin puncție biopsie hepatică. Formele severe de AH au un prognostic pe termen

scurt și mediu nefavorabil, cu o mortalitate pe termen scurt (la 28 zile) de 50%, cel mai probabil ca urmare a unei caracterizări inadecvate a pacientului și a necesității existenței unei terapii țintite [3]. Tratamentul cu corticosteroizi și un management bun al complicațiilor infecțioase, au dus la o ușoară îmbunătățire a prognosticului pe termen scurt [4]. Pe de altă parte strategia terapeutică pe termen lung este încă dezbătută, prognosticul depinzând de stadiul și tipul fibrozei în momentul diagnosticului. Supraviețuirea pe termen lung a pacienților cu AH este de 58% și de 35% la pacienții cu AH suprapusă pe o ciroză hepatică [5].

Boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD) a devenit o cauză frecventă de boală hepatică cronică. Această entitate afectează 24% din populația globală, fiind frecvent asociată cu obezitatea și T2D [6] și este principală cauză a dezvoltării HCC în bolile hepatice non-cirotice [7], estimându-se că incidența anuală a HCC în rândul pacienților cu NAFLD non-cirolici este de aproximativ 0,1-1,3 la 1000 de pacienți/an [8]. Având în vedere creșterea din ultimii ani a cazurilor de HCC dezvoltate pe fond de NAFLD în stadiu non-cirotic, este nevoie de studii suplimentare pentru identificarea precoce a pacienților cu NAFLD non-cirotic cu risc de a dezvolta carcinom hepatocelular, respectiv pentru o înțelegere mai bună a istoriei naturale a NAFLD non-cirotic.

O înțelegere cuprinzătoare a mecanismelor și factorilor implicați în evoluția ALD și NAFLD este esențială pentru un management optim al acestor afecțiuni.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii aduce în prim plan informații relevante referitoare la patologia selectată, precum factori de risc, modificări histopatologice, sisteme de gradare și stadializare, unele recent propuse precum sistemul SALVE, cât și informații actualizate despre evoluția ficatului gras non-alcoolic spre carcinom hepatocelular. În stadiul actual al cunoașterii a fost subliniat rolul microARN-urilor în modularea comunicării intercelulare și modul în care aceste molecule de ARN pot fi utilizate pentru a înțelege mai bine mecanismele de progresie a NAFLD non-cirotic spre HCC.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Contribuția personală a fost structurată în trei studii care au avut drept scop caracterizarea cât mai cuprinzătoare a hepatitelor alcoolice severe și a ficatului gras non-alcoolic cu ajutorul tehnicilor histologice clasice, imunohistochimice și moleculare cantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

**Studiul 1. Caracterizarea clinică, biologică și morfologică a pacienților cu AH severă.** În acest studiu s-a urmărit identificarea factorilor clinici, biologici sau histologici asociați cu supraviețuirea la pacienții diagnosticați cu hepatită alcoolică severă, cât și evaluarea răspunsului la tratament, cu accent pe modificările histologice întâlnite în hepatita etanolică și pe noul sistem de scoring SALVE, dezvoltat în 2021 de un grup de anatomopatologi specializați în patologia ficatului din Europa. În acest studiu retrospectiv au fost incluși 94 pacienți cu hepatită alcoolică severă, internați în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca, diagnostic confirmat prin biopsie hepatică transjugulară. Pacienții au fost urmăriți pe o perioadă medie de 21 luni (0-78 luni). Pentru fiecare pacient am efectuat caracterizarea clinică, biologică și analiza morfologică detaliată, utilizând sistemul de gradare și stadializare SALVE. Am remarcat faptul că scorul Lille în ziua 7 și infecțiile nozocomiale reprezintă factori de prognostic în supraviețuirea pe termen scurt și mediu. De asemenea am observat că aplicarea scorului SALVE în hepatita etanolică aduce beneficii evidente prin prisma faptului că acesta conține o cuantificare mai bună a fibrozei pericelulare. În concluziile acestui

studiu sunt prezentate avantajele și dezavantajele utilizării acestui nou sistem de scoring, cu valoare practică pentru centrele care tratează hepatitele alcoolice.

**Studiul 2. Caracterizarea clinică, biologică, morfologică și imunohistochimică a ficatului gras non-alcoolic în stadiu non-cirotic asociat cu HCC.** Scopul acestui studiu a fost realizarea unei caracterizări comparative, clinice, biologice, histologice și imunohistochimice, a două grupuri de pacienți: un grup cu NAFLD în stadiu non-cirotic care au dezvoltat carcinom hepatocelular, respectiv un grup (martor) de pacienți cu NAFLD în stadiu non-cirotic fără carcinom hepatocelular asociat, cu scopul de a identifica factorii de risc asociați cu progresia NAFLD în stadiu non-cirotic spre HCC și identificarea precoce a pacienților cu NAFLD în stadiu non-cirotic cu risc de a dezvolta HCC. În cadrul acestui studiu am inclus 14 pacienți diagnosticați histopatologic cu NAFLD în stadiu non-cirotic care au dezvoltat HCC (grup NAFLD-HCC) și un grup de 41 pacienți diagnosticați cu NAFLD non-cirotic care nu au asociat HCC (grup NAFLD-non-HCC), diagnosticați în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca. Pentru toate cazurile incluse în studiu am efectuat caracterizarea morfologică și imunohistochimică atât în țesutul NAFLD-non-HCC, țesutul NAFLD adiacent tumorii (ANT) cât și în țesutul HCC, completată de analiza datelor clinice și biologice. Am observat o diferență semnificativă între vârsta medie la diagnostic între cele două grupuri, cu o diferență de 18 ani în favoarea cazurilor de HCC asociat cu NAFLD. De asemenea s-au constatat diferențe semnificative în expresia  $\beta$ -cateninei între cohortele de studiu, sugerând că  $\beta$ -catenina ar putea oferi informații importante despre un posibil efect de cancerizare în NAFLD, putând identifica pacienții cu risc de dezvoltare ulterioară a HCC.

**Studiul 3. Caracterizarea profilului molecular al NAFLD non-cirotic asociat cu HCC.** Obiectivele acestui studiu au fost identificarea factorilor asociați cu progresia NAFLD spre HCC, respectiv stratificarea riscului de HCC la pacienții cu NAFLD non-cirotic. În acest studiu s-a pus accentul pe caracterizarea profilului molecular al pacienților cu ficat gras non-alcoolic în stadiu non-cirotic care au dezvoltat carcinom hepatocelular, utilizând tehnici de extragere a acizilor nucleici din blocurile de parafină și cuantificarea expresiei microARN-urilor de interes prin qRT-PCR. Am realizat o analiză informatică pornind de la o serie de gene frecvent alterate în HCC și o serie de miARN-uri implicate în progresia spre HCC și tumorigeneză. În baza rezultatelor obținute am selectat un panel de patru miARN-uri: miR-21-5p, miR-34a-5p, miR-130a-3p și miR-155-3p. Expresiile acestor patru miARN-uri au fost evaluate diferențiat în țesutul NAFLD non-cirotic fără HCC asociat (NAFLD-non-HCC), în țesutul NAFLD adiacent HCC (ANT) și în țesutul tumoral (HCC). În cadrul acestui studiu am inclus 14 pacienți diagnosticați histopatologic cu NAFLD în stadiu non-cirotic care au dezvoltat HCC (grup NAFLD-HCC) și un grup de 41 pacienți diagnosticați cu NAFLD non-cirotic care nu au asociat HCC (grup NAFLD-non-HCC), diagnosticați în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca. Analiza moleculară a fost completată de o caracterizare morfologică și clinică detaliată a probelor de studiu pentru a înțelege mai bine rolurile acestor miARN-uri în progresia tumorală în NAFLD și pentru a evalua dacă acest panel de miARN-uri ar putea fi utilizat pentru evaluarea riscului de progresie spre HCC la pacienții cu NAFLD în stadiu non-cirotic. Am evidențiat o expresie crescută, semnificativă statistic și progresivă, a miR-21-5p și miR-34a-5p pornind de la nivel bazal în probele de NAFLD și crescând progresiv în țesuturile peritumorale (ANT) și în țesutul tumoral (HCC), aspect menținut și între ANT și HCC susținând existența unui proces de suprareglare a acestor 2 miARN-uri în procesul de tumorigeneză hepatică. miR-130a-3p a fost supraexprimat în probele ANT în comparație cu țesuturile NAFLD și HCC, indicând prezența unui micromediu peritumoral cancerizat unde există modificări moleculare ce nu pot fi evaluate prin colorație clasică în hematoxilină-eozină.

### **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Cercetarea de față deschide noi perspective pentru aprofundarea nivelului de înțelegere a carcinogenezei în cazul pacienților cu ficat gras non-alcoolic prin raportare la evenimentele tisulare și moleculare care pot anticipa apariția HCC.

Originalitatea și aspectele inovative ale acestei teze de cercetare doctorală sunt reprezentate de realizarea unei abordări translaționale în studiul NAFLD, subiectul progresiei NAFLD non-cirotic spre HCC fiind puțin explorat. Această abordare integrată, combinând aspectele morfologice, imunohistochimice cu profilul molecular și analiza bioinformatică, a permis identificarea unor asocieri moleculare noi între markeri imunohistochimici, genetici și moleculari.

Un rezultat inovator al acestei teze este legat de expresia miR-130a-3p, a cărei supraexpresie în țesutul NAFLD adiacent HCC indică prezența unui micromediu peritumoral cancerizat unde există modificări moleculare ce nu pot fi evaluate prin colorația clasică hematoxilină-eozină. Această supraexpresie a miR-130a-3p în țesutul NAFLD adiacent HCC este pentru prima dată descrisă și merită o analiză atentă, putând fi utilizat pe viitor ca potențial biomarker în combinație cu alte miARN-uri.

Diferențele semnificative observate în expresia imunohistochimică a  $\beta$ -cateninei între cohortele de studiu, sugerează că, cuantificarea în viitor a expresiei  $\beta$ -cateninei în țesutul NAFLD ar putea fi folosită ca și instrument de prognostic al dezvoltării HCC.

În ceea ce privește hepatita alcoolică, prin aplicarea noului sistem de scoring SALVE pe lotul studiat, am confirmat importanța cuantificării fibrozei pericelulare la pacienții cu AH severă, aceasta cuantificare putând fi utilizată standardizat în buletinele histopatologice de specialitate în viitorul apropiat.

### **Bibliografie selectivă**

1. Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol.* 2006; 23: 149–160.
2. Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, et al. Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation. *Gut.* 2016; 65: 1535–1545.
3. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2758–2769.
4. Singal AK, Walia I, Singal A, et al. Corticosteroids and pentoxifylline for the treatment of alcoholic hepatitis: Current status. *World J Hepatol.* 2011; 3: 205–210.
5. Bargalló Gracia A, Serra Matamala I, Marin Fernández I, et al. [Prognostic factors associated with mortality in patients with severe alcoholic hepatitis]. *Rev Esp enfermedades Dig.* 2013; 105: 513–520.
6. Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022; 7: 851–861.
7. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021; 18: 223–238.
8. Michelotti A, de Scordilli M, Palmero L, et al. NAFLD-related hepatocarcinoma: The malignant side of metabolic syndrome. *Cells.* 2021; 10: 1–15.

PHD THESIS SUMMARY

# Factors involved in the development of alcohol-induced liver disease and non-alcoholic fatty liver disease

PhD student **Ioana Opreș (Rusu)**

Scientific supervisor **Prof.Dr.Nadim Al Hajjar**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## Table of contents

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>STATE OF THE ART</b>	19
<b>1. Alcohol-induced liver disease</b>	21
1.1. Definition	21
1.2. Risk factors	21
1.3. Histopathological changes	23
1.4. Grading and staging systems	25
<b>2. Factors involved in the development of alcoholic liver disease</b>	27
2.1. Clinical factors	27
2.2. Biological factors	27
2.3. Histological factors	29
<b>3. Non-alcoholic fatty liver disease</b>	31
3.1. Definition	32
3.2. Risk factors	32
3.3. Histopathological changes	35
3.4. Grading and staging systems	35
<b>4. Factors involved in the development of non-alcoholic fatty liver</b>	37
4.1. Clinical factors	37
4.2. Biological factors	38
4.3. Histological factors	40
4.4. Evolution of non-alcoholic liver disease to HCC	41
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	47
<b>1. Working hypothesis</b>	49
<b>2. General methodology</b>	51
<b>3. Study 1 – Clinical, biological and morphological characterization of patients with severe alcoholic hepatitis</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Working hypothesis	57
3.3. Materials and methods	57
3.4. Results	60
3.5. Discussions	73
3.6. Conclusions	75



<b>4. Study 2 - Clinical, biological, morphological and immunohistochemical characterization of non-cirrhotic NAFLD associated with HCC</b>	77
4.1. Introduction	77
4.2. Working hypothesis	79
4.3. Materials and methods	79
4.4. Results	83
4.5. Discussions	91
4.6. ConCluSIonS	93
<b>5. Study 3 - Characterization of the molecular profile of non-cirrhotic NAFLD associated with HCC</b>	95
5.1. Introduction	95
5.2. Working hypothesis	97
5.3. Materials and methods	98
5.4. Results	103
5.5. Discussions	108
5.6. Conclusions	111
<b>6. General conclusions</b>	113
<b>7. The originality and innovative contributions of the thesis</b>	115
<b>References</b>	117

**Key words:** alcoholic hepatitis, non-alcoholic steatohepatitis, hepatocellular carcinoma, microRNAs, SALVE, biomarkers, immunohistochemistry, prognosis.

## INTRODUCTION

Alcohol-induced liver disease (ALD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are serious health problems worldwide. These two entities have similar histopathological spectrum, ranging from simple hepatic steatosis, to steatohepatitis, liver cirrhosis, with the possibility of progression to hepatocellular carcinoma (HCC). Although most subjects with excessive alcohol consumption or unhealthy eating habits, experience simple hepatic steatosis, a percentage of individuals will develop alcoholic steatohepatitis, respectively non-alcoholic steatohepatitis, progressive liver disease, with some cases progressing to HCC or death. The evolution and survival of patients with ALD and NAFLD depend on several factors.

Alcohol consumption is an important health problem worldwide because it frequently progresses to chronic liver disease with progressive fibrosis, cirrhosis or HCC [1]. Alcoholic hepatitis develops in patients with underlying alcohol-induced liver disease and the consumption of an increased amount of alcohol [2]. The diagnosis of alcoholic hepatitis (AH) is clinical, based on a history of excessive alcohol consumption, paraclinical or by liver biopsy. Severe forms of AH have a poor short and medium-term prognosis, with a short-term mortality (at 28 days) of 50%, most likely as a result of inadequate patient characterization and the need for targeted therapy [3]. Corticosteroid treatment and good management of infectious complications have led to a slight improvement in short-term prognosis [4]. On the other

hand, the long-term therapeutic strategy is still debated, the prognosis depending on the stage and type of fibrosis at the time of diagnosis. The long-term survival of patients with AH is 58% and 35% in patients with AH superimposed on liver cirrhosis [5].

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a common cause of chronic liver disease. This entity affects 24% of the global population, being frequently associated with obesity and T2D [6] and is the main cause of the development of HCC in non-cirrhotic liver diseases [7], with the annual incidence of HCC among non-NAFLD patients estimated to cirrhotics is approximately 0.1-1.3 per 1000 patients/year [8]. Considering the increase in recent years of HCC cases developed on the background of non-cirrhotic NAFLD, further studies are needed for the early identification of patients with non-cirrhotic NAFLD at risk of developing hepatocellular carcinoma, respectively for a better understanding of the natural history of non-cirrhotic NAFLD.

A comprehensive understanding of the mechanisms and factors involved in the development of ALD and NAFLD is essential for optimal management of these conditions.

### **CURRENT STATE OF KNOWLEDGE**

The current state of knowledge brings to the fore relevant information related to the selected pathology, such as risk factors, histopathological changes, grading and staging systems, some recently proposed such as the SALVE system, as well as updated information on the evolution of non-alcoholic fatty liver to hepatocellular carcinoma. The current state of knowledge has highlighted the role of microRNAs in modulating intercellular communication and how these RNA molecules can be used to better understand the mechanisms of progression of non-cirrhotic NAFLD to HCC.

### **PERSONAL CONTRIBUTION**

The personal contribution was structured in three studies aimed at the most comprehensive characterization of severe alcoholic hepatitis and non-alcoholic fatty liver with the help of classic histological, immunohistochemical and molecular quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) techniques.

**Study 1. Clinical, biological and morphological characterization of patients with severe AH.** This study aimed to identify the clinical, biological or histological factors associated with survival in patients diagnosed with severe alcoholic hepatitis, as well as the evaluation of the response to treatment, with an emphasis on the histological changes found in ethanolic hepatitis and on the new SALVE scoring system, developed in 2021 by a group of pathologists specializing in liver pathology in Europe. In this retrospective study, 94 patients with severe alcoholic hepatitis, admitted to the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor", Cluj-Napoca, diagnosis confirmed by transjugular liver biopsy. Patients were followed for a median period of 21 months (0-78 months). For each patient we performed clinical, biological characterization and detailed morphological analysis, using the SALVE grading and staging system. We noted that Lille score on day 7 and nosocomial infections are prognostic factors in short- and medium-term survival. We also observed that the application of the SALVE score in alcoholic hepatitis brings obvious benefits through the fact that it contains a better quantification of pericellular fibrosis. The conclusions of this study present the advantages and disadvantages of using this new scoring system, with practical value for centers that treat alcoholic hepatitis.

**Study 2. Clinical, biological, morphological and immunohistochemical characterization of non-cirrhotic NAFLD associated with HCC.** The aim of this study was to perform a comparative clinical,

biological, histological and immunohistochemical characterization of two groups of patients: a group with NAFLD in non-cirrhotic stage who developed hepatocellular carcinoma, respectively a group (control) of patients with NAFLD in non-cirrhotic stage without associated hepatocellular carcinoma, with the aim of identifying the risk factors associated with the progression of NAFLD in non-cirrhotic stage to HCC and the early identification of patients with NAFLD in non-cirrhotic stage at risk of developing HCC. In this study we included 14 patients histopathologically diagnosed with NAFLD in non-cirrhotic stage who developed HCC (NAFLD-HCC group) and a group of 41 patients diagnosed with non-cirrhotic NAFLD who did not have associated HCC (NAFLD-non-HCC), diagnosed within the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca. For all the cases included in the study, we performed morphological and immunohistochemical characterization both in NAFLD-non-HCC tissue, NAFLD tissue adjacent to the tumor (ANT) and in HCC tissue, completed by the analysis of clinical and biological data. We observed a significant difference in mean age at diagnosis between the two groups, with a difference of 18 years in favor of cases of HCC associated with NAFLD. Significant differences in  $\beta$ -catenin expression between study cohorts were also found, suggesting that  $\beta$ -catenin could provide important information about a possible carcinogenic effect in NAFLD, being able to identify patients at risk of subsequent HCC development.

**Study 3. Characterization of the molecular profile of non-cirrhotic NAFLD associated with HCC.** The objectives of this study were to identify the factors associated with the progression of NAFLD to HCC, respectively to stratify the risk of HCC in patients with non-cirrhotic NAFLD. This study focused on characterizing the molecular profile of patients with non-alcoholic fatty liver in non-cirrhotic stage who developed hepatocellular carcinoma, using nucleic acid extraction techniques from paraffin blocks and quantifying the expression of microRNAs of interest by qRT - PCR. We performed an informatics analysis starting from a series of genes frequently altered in HCC and a series of miRNAs involved in the progression to HCC and tumorigenesis. Based on the results obtained, we selected a panel of four miRNAs: miR-21-5p, miR-34a-5p, miR-130a-3p and miR-155-3p. The expressions of these four miRNAs were differentially evaluated in non-cirrhotic NAFLD tissue without associated HCC (NAFLD-non-HCC), HCC-adjacent NAFLD tissue (ANT), and tumor tissue (HCC). In this study we included 14 patients histopathologically diagnosed with NAFLD in non-cirrhotic stage who developed HCC (NAFLD-HCC group) and a group of 41 patients diagnosed with non-cirrhotic NAFLD who did not have associated HCC (NAFLD- non- HCC), diagnosed within the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca. The molecular analysis was complemented by a detailed morphological and clinical characterization of the study samples to better understand the roles of these miRNAs in tumor progression in NAFLD and to assess whether this panel of miRNAs could be used for risk assessment of progression to HCC in patients with non-cirrhotic NAFLD. We showed statistically significant and progressive increased expression of miR-21-5p and miR-34a-5p starting from basal level in NAFLD samples and increasing progressively in peritumoral tissues (ANT) and tumor tissue (HCC), aspect also maintained between ANT and HCC supporting the existence of an upregulation process of these 2 miRNAs in the process of liver tumorigenesis. miR-130a-3p was overexpressed in ANT samples compared to NAFLD and HCC tissues, indicating the presence of a cancerous peritumoral microenvironment where there are molecular changes that cannot be evaluated by classical hematoxylin-eosin staining.

### **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The present research opens new perspectives for deepening the level of understanding of carcinogenesis in patients with non-alcoholic fatty liver disease by reporting on the tissue and molecular events that may predict the occurrence of HCC.

The originality and innovative aspects of this doctoral research thesis are represented by the realization of a translational approach in the study of NAFLD, the subject of the progression of non-

cirrhotic NAFLD to HCC being little explored. This integrated approach, combining the morphological, immunohistochemical aspects with the molecular profile and bioinformatic analysis, allowed the identification of new molecular associations between histochemical, genetic and molecular markers.

An innovative result of this thesis is related to the expression of miR-130a-3p, whose overexpression in NAFLD tissue adjacent to HCC indicates the presence of a cancerous peritumoral microenvironment where there are molecular changes that cannot be evaluated by classical hematoxylin-eosin staining. This overexpression of miR-130a-3p in NAFLD tissue adjacent to HCC is for the first time described and deserves careful analysis, which may be used as a potential biomarker in the future in combination with other miRNAs.

The significant differences observed in the immunohistochemical expression of  $\beta$ -catenin between study cohorts suggest that future quantification of  $\beta$ -catenin expression in NAFLD tissue could be used as a prognostic tool for the development of HCC.

Regarding alcoholic hepatitis, by applying the new SALVE scoring system to the studied group, we confirmed the importance of quantifying pericellular fibrosis in patients with severe AH, this quantification being able to be used standardized in specialized histopathological bulletins in the near future.

### **Selective references**

1. Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol.* 2006; 23: 149–160.
2. Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, et al. Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation. *Gut.* 2016; 65: 1535–1545.
3. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2758–2769.
4. Singal AK, Walia I, Singal A, et al. Corticosteroids and pentoxifylline for the treatment of alcoholic hepatitis: Current status. *World J Hepatol.* 2011; 3: 205–210.
5. Bargalló Gracia A, Serra Matamala I, Marin Fernández I, et al. [Prognostic factors associated with mortality in patients with severe alcoholic hepatitis]. *Rev Esp enfermedades Dig.* 2013; 105: 513–520.
6. Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022; 7: 851–861.
7. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021; 18: 223–238.
8. Michelotti A, de Scordilli M, Palmero L, et al. NAFLD-related hepatocarcinoma: The malignant side of metabolic syndrome. *Cells.* 2021; 10: 1–15.