
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Biomarkeri în patologia malignă de căi biliare

Doctorand **Lavinia-Patricia Trică**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1. Tumorile maligne de tract biliar – noțiuni generale	21
1.1. Localizare anatomică	21
1.2. Incidență, factori de risc și leziuni precursoare	22
1.3. Aspecte clinice	23
1.4. Aspecte anatomo-patologice	23
1.4.1. Macroscopie	23
1.4.2. Microscopie	24
1.4.2.1. Aspecte citologice	25
1.4.3. Diagnostic diferențial	25
1.5. Metode de tratament	25
1.5.1. Imunoterapia în carcinoamele de tract biliar	26
1.6. Prognostic	27
2. Biomarkeri în tumorile maligne ale tractului biliar	29
2.1. Proteine	30
2.2. Metaboliți	31
2.3. Vezicule extracelulare	34
2.4. Celule tumorale circulante	35
3. Concluzie	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	39
1. Obiective	41
2. Metodologie generală	43
3. Studiul 1. Celule tumorale circulante ca biomarkeri de diagnostic – rolul citoblocurilor în diagnosticul tumorilor maligne de căi biliare	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	46
3.3. Material și metodă	47
3.4. Rezultate	46
3.4.1. Rezultate generale	46
3.4.2. Rezultate cu privire la citoblocuri și anatomia-patologică de tip non-citobloc	50
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	60
4. Studiul 2. Expresia imunohistochimică pozitivă a PD-L1 în celulele imune intratumorale reprezintă un factor de prognostic favorabil în colangiocarcinomul intrahepatic	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru	63
4.3. Material și metodă	63
4.3.1. Designul de cercetare	63

4.3.2. Imunomarcajul PD-L1	66
4.3.3. Analiza statistică	66
4.4. Rezultate	67
4.4.1. Date generale	67
4.4.2. Date referitoare la imunomarcajul PD-L1	69
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	80
5. Studiul 3. Valoarea diagnostică și prognostică a colorațiilor imunohistochimice de rutină în colangiocarcinomul intrahepatic	81
5.1. Introducere	81
5.2. Obiective	83
5.3. Material și metodă	83
5.3.1. Designul studiului și realizarea loturilor	83
5.3.1.1. Colectarea datelor clinice și imagistice	83
5.3.1.2. Colectarea datelor anatomo-patologice	84
5.3.2. Analiza statistică	84
5.4. Rezultate	85
5.4.1. Rezultate generale	85
5.4.2. Marcaje imunohistochimice cu potențial rol diagnostic	87
5.4.2.1. Cohortele A și B (tumori hepatice maligne primare)	87
5.4.2.2. Cohorta C (tumori hepatice secundare)	88
5.4.3. Biomarkeri cu rol prognostic în colangiocarcinomul intrahepatic	89
5.5. Discuții	92
5.5.1. Biomarkeri de diagnostic	92
5.5.1.1. Tumori hepatice maligne primare: distingerea între colangiocarcinomul intrahepatic și carcinomul hepatocelular	93
5.5.1.2. Distingerea între colangiocarcinomul intrahepatic și metastazele hepatice	95
5.5.2. Biomarkeri de prognostic	96
5.6. Concluzii	98
6. Discuții generale	99
7. Concluzii generale	103
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

Cuvinte cheie:

Tumori de tract biliar, carcinom al veziculei biliare, colangiocarcinom, biomarkeri, diagnostic, prognostic, citobloc, PD-1/PD-L1, PD-L1, imunohistochimie, supraviețuire

Rezumat

Stadiul actual al cunoașterii

Cei mai întâlniți reprezentanți ai tumorilor maligne de tract biliar sunt carcinomul de veziculă biliară și colangiocarcinomul. Acesta din urmă poate fi grupat, în funcție de localizarea anatomică în colangiocarcinom intrahepatic și colangiocarcinom extrahepatic, subîmpărțit în colangiocarcinom perihilar și colangiocarcinom distal. Clasificarea tumorilor digestive, publicată sub egida Organizației Mondiale a Sănătății insistă asupra analizării în loturi diferite a entităților enumerate mai sus, din cauza discrepanțelor observate în epidemiologia, patofiziologia, etiologia, trăsăturilor clinice, imagistice, managementului și factorilor de prognostic.

Odată cu efectuarea tot mai frecventă a intervențiilor de colecistectomie, incidența carcinomului de veziculă biliară a scăzut în ultimele decenii, multe cazuri fiind diagnosticate incidental, în stadiu incipient sau chiar ca leziuni displazice. Incidența colangiocarcinoamelor este însă în continuă creștere în majoritatea ariilor geografice, înregistrând augmentări de la 20% pentru colangiocarcinoamele extrahepatice, la până la 350% pentru localizarea intrahepatică.

În colangiocarcinoamele extrahepatice, situate la nivelul ductelor hepatice stâng și drept, canalului hepatic comun sau coledocului, sindromul icteric instalat relativ precoce este cel mai frecvent motiv de prezentare în serviciile medicale. În cazul localizării intrahepatice însă, tabloul clinic este subtil atât în stadiile inițiale ale bolii, cât și în stadii avansate, fiind dominat de simptomatologie nespecifică. Din acest motiv, diagnosticul este stabilit tardiv.

Singurul tratament cu tentă curativă este rezecția chirurgicală cu margini libere de elemente tumorale (R0). Această opțiune se poate aplica la o minoritate din cazuri, restul tumorilor fiind considerate inoperabile în momentul diagnosticului, din cauza extensiei locale, interesarea vaselor mari din hilul hepatic, a altor structuri vitale sau diseminării la distanță. Terapia sistemică, bazată pe chimioterapie duce spre o supraviețuire globală limitată, cu medii între 6 și 8 luni. În regiunile dezvoltate, fragmentele tisulare tumorale obținute prin biopsii permit efectuarea de teste moleculare, în vederea instituirii tratamentelor personalizate. Speranța de viață la 5 ani este estimată la 0 - 30%. În plus, chiar și în cazurile care se pretează la rezecția chirurgicală, ratele de recidivă sunt mari, iar recurențele survin precoce.

În acest scenariu, al unei boli agresive, diagnosticate tardiv în evoluție, cu o paucitate de opțiuni terapeutice eficiente și prognostic sumbru, considerăm că este utilă identificarea și validarea unor biomarkeri specifici de diagnostic și prognostic, care să faciliteze managementul carcinoamelor de tract biliar.

Contribuția personală

Studiul 1. Celule tumorale circulante ca biomarkeri de diagnostic – rolul citoblocurilor în diagnosticul tumorilor maligne de căi biliare

În contextul unui spectru de tumori cu diagnostic stabilit tardiv, cu evoluție agresivă și prognostic sumbru, identificarea unor noi metode de diagnostic este anticipată cu entuziasm. Actualmente, pentru cazurile unde tumora urmează să fie rezecată chirurgical, ghidurile societăților oncologice nu impun certificarea anatomo-patologică a diagnosticului, însă pentru cazurile avansate, care nu se mai pretează tratamentului chirurgical, inițierea terapiei sistemice este condiționată de afirmarea anatomo-patologică a diagnosticului. Până în acest moment sunt disponibile relativ puține studii care să evalueze acuratețea diagnostică a examenului anatomo-patologic în carcinoamele de tract biliar. Un articol de tip review ce vizează diagnosticul colangiocarcinomului a raportat că materialul obținut prin biopsiere cu forceps, precum și citologie prin periaj asigură diagnosticul malignității în doar aproximativ 50% din pacienți. Luând în considerare două aspecte: 1) tehnica biopsierii presupune expunerea pacienților la proceduri invazive, care nu trebuie neglijate în context oncologic și 2) condiționarea acordării terapiei sistemice de certificarea histopatologică a diagnosticului malign, procentul menționat mai sus este problematic.

Citoblocurile, instrumente relativ noi, hibride între frotiurile clasice și blocurile de parafină obținute din fragmente tisulare recoltate convențional (de exemplu biopsii percutanate, biopsii incizionale, specimene de rezecție chirurgicală) oferă avantaje ale ambelor tehnici: recoltarea materialului biologic este relativ facilă, protocolul tehnic de obținere a blocurilor de parafină și lamelor histopatologice poate fi respectat în majoritatea laboratoarelor, iar materialul permite obținerea secțiunilor suplimentare din grosimea blocului, care pot fi colorate uzual, histochemic, precum și imunohistochemic. Mai mult, materialul obținut permite efectuarea de teste moleculare în unități ce dispun de astfel de servicii.

Acest prim studiu și-a propus să evalueze dacă diagnosticul pozitiv al tumorilor maligne de tract biliar poate fi obținut prin analiza anatomo-patologică a citoblocurilor realizate din bilă. În acest sens, s-au adunat în manieră prospectivă probe de bilă de la pacienți cu suspiciune înaltă sau diagnostic stabilit anatomo-patologic de carcinom de tract biliar. Recoltarea bilei a avut loc în momentul drenajului biliar, efectuat percutanat (drenaj biliar extern) sau în timpul colangiopancreatografiei endoscopice retrograde (ERCP). Pentru lotul control s-a recoltat bilă de la pacienți cu litiază coledociană în timpul procedurii de ERCP, efectuată în scop terapeutic, de extracție a calculilor. Lamele histopatologice obținute din procesarea citoblocurilor au fost evaluate, iar concluzia lor a fost raportată la concluzia imagistică, concluzia anatomo-patologică de tip non-citobloc, acolo unde acestea au fost disponibile, precum și la concluzia clinică finală.

Au rezultat 5 loturi de pacienți: Lot 1, care a inclus 10 cazuri de colangiocarcinom intrahepatic; lot 2: 36 cazuri colangiocarcinom perihilar; lot 3: 3 cazuri colangiocarcinom distal; lot 4: 14 cazuri carcinom al veziculei biliare și lot 5 (lot control): 15 cazuri cu litiază

coledociană. Citoblocurile au putut confirma diagnosticul malign în 57,14% din cazurile tumorale, cu următoarele procentaje pentru fiecare lot: 70% pentru colangiocarcinomul intrahepatic; 55,56% - colangiocarcinomul perihilar; 66,67% - colangiocarcinomul distal și 50% - carcinomul veziculei biliare. Concluziile tuturor citoblocurilor examinate în lotul control au fost de tip benign. Concordanța dintre examinarea citoblocului și diagnosticul final (care a inclus urmărirea în evoluție a pacienților, coroborând datele imagistice și examinări anatomo-patologice de tip non-citobloc) a fost de 65,38%.

Având în vedere rata mare a rezultatelor fals negative a diagnosticelor anatomo-patologice, considerăm că evaluarea citoblocurilor poate servi drept metodă auxiliară examinării anatomo-patologice a fragmentelor obținute în manieră convențională (rezeție chirurgicală, biopsii excizionale, incizionale, percutanate sau aspirate) în vederea certificării malignității la pacienții cu tumori ale tractului biliar.

Studiul 2. Expresia imunohistochimică pozitivă a PD-L1 în celulele imune intratumorale reprezintă un factor de prognostic favorabil în colangiocarcinomul intrahepatic

Axa moleculară PD-1/PD-L1 a ocupat în ultimele decenii un rol central în contextul imunoterapiei, în numeroase patologii tumorale, de exemplu carcinom pulmonar cu celule mici sau melanom. Pentru tumorile avansate de tract biliar, durvalumab (un inhibitor PD-L1) a fost recent adăugat regimului chimioterapic clasic alcătuit anterior din gemcitabină și cisplatină. Actualmente, asocierea celor trei agenți terapeutici constituie regimul de categorie 1, de primă intenție pentru cazurile non-rezecabile de tumori de tract biliar. Cu toate acestea, datele din literatură referitoare la raportul dintre activarea axei PD-1/PD-L1 în micromediul tumoral, inhibarea acesteia și supraviețuirea pacienților sunt conflictuale. Posibile explicații pentru discordanțele rezultatelor anterioare sunt puse pe seama eterogenității biologiei carcinomului de veziculă biliară și subtipurilor de colangiocarcinom, precum și pe lipsa uniformității interpretării marcajului imunohistochimic al anticorpilor asociați căii PD-1/PD-L1.

Acest studiu a avut ca obiectiv principal evaluarea corelării dintre imunomarcajul PD-L1 în fragmente tisulare de colangiocarcinom intrahepatic uman și supraviețuirea generală a pacienților din loturile studiate.

Fișele pacienților cu diagnostic confirmat anatomo-patologic de colangiocarcinom intrahepatic au fost evaluate retrospectiv în vederea includerii în studiu. Au rezultat două cohorte: cohorta A, alcătuită din 49 cazuri de colangiocarcinom rezecat chirurgical și Cohorta B, alcătuită din 87 cazuri de colangiocarcinom intrahepatic diagnosticat prin analiza anatomo-patologică a puncției biopsii hepatice (PBH). Lamele histopatologice reprezentative au fost colorate imunohistochimic cu anticorp împotriva PD-L1, a cărui expresie a fost interpretată ulterior în patru regiuni: celule tumorale propriu-zise, celule imune intratumorale, celule epiteliale non-maligne din frontul tumoral și celule imune din frontul tumoral. Alți parametri incluși în baza de date au fost: caracteristici generale ale pacienților (vârstă, sex, mediu proveniență, patologii asociate, valori de laborator), caracteristici ale tumorii (diametrul maxim, număr, diferențiere morfologică, statusul marginii de rezeție,

prezența invaziei vasculare, a infiltrării perineurale, interesarea capsulei hepatice, stadiul AJCC, respectiv aprecierea semi-cantitativă a infiltratului inflamator intratumoral).

Valoarea mediană a supraviețuirii generale a fost de 20,96 luni în Cohorta A, formată din cazuri diagnosticate în stadiu incipient, care s-au pretat tratamentului chirurgical și de 9,45 luni în Cohorta B, alcătuită din cazuri cu tumori avansate. Supraviețuirea generală a pacienților a fost semnificativ mai bună la pacienții cu expresie pozitivă a PD-L1 în celulele tumorale, în celulele imune intratumorale, precum și în cazurile cu infiltrat inflamator intratumoral abundent. Ulterior s-a realizat un model de regresie multivariată, ajustat în funcție de vârstă, numărul de tumori, dimensiunea și gradul de diferențiere al tumorii, în urma căruia expresia pozitivă a PD-L1 în celulele imune intratumorale s-a menținut ca factor de prognostic favorabil la pacienții cu diagnostic de colangiocarcinom intrahepatic.

Acestea sunt primele rezultate care raportează că imunoexpresia pozitivă a PD-L1 în celulele imune intratumorale poate constitui un puternic predictor independent pentru o evoluție favorabilă a colangiocarcinomului intrahepatic, indiferent de stadiul tumoral în momentul diagnosticului.

Studiul 3. Valoarea diagnostică și prognostică a colorațiilor imunohistochimice de rutină în colangiocarcinomul intrahepatic

Cel de-al treilea studiu a avut ca scop corelarea expresiei colorațiilor imunohistochimice cu puterea de diagnostic și prognostic, în tumorile hepatice maligne. Pentru a evalua valențele diagnostice s-au analizat retrospectiv fișele electronice, precum și lamele anatomo-patologice ale pacienților confirmați anatomo-patologic cu tumori hepatice epiteliale maligne, în piese de puncție biopsie hepatică. Colorațiile imunohistochimice au fost solicitate de către medicii anatomo-patologi în momentul examinării inițiale a fiecărui caz, în scop diagnostic. Expresia imunomarcajelor a fost notată în mod semi-cantitativ (colorație negativă, colorație pozitivă cu intensitate redusă, colorație pozitivă cu intensitate moderată sau colorație pozitivă cu intensitate marcată).

Au rezultat trei loturi, alcătuite din pacienți diagnosticați cu metastaze hepatice, carcinom hepatocelular și colangiocarcinom intrahepatic. În cazul lotului de colangiocarcinoame intrahepatice, cele mai mari sensibilități au fost obținute de anticorpii împotriva CK19 (100%), CA19-9(100%), CK7(93,7%) și ACE (82,6%). Pentru carcinomul hepatocelular, cele mai mari sensibilități au fost înregistrate de glypican 3 (100%), CD34 cu model sinusoidal (100%) și HepPar 1 (98,2%). Metastazele hepatice au provenit, în ordine descrescătoare a frecvenței din adenocarcinoame colorectale, carcinoame neuroendocrine, adenocarcinoame ductale pancreatice, carcinoame mamare și adenocarcinoame gastrice. Cele mai solicitate colorații imunohistochimice pentru stabilirea diagnosticului în lotul de tumori metastatice au fost CDX2, CK7, CK20 și CK AE1/AE3. În acest lot, solicitarea colorațiilor imunohistochimice a fost direcționată de tipul tumorii primare, acolo unde aceasta era cunoscută.

Cazurile de colangiocarcinom intrahepatic au avut o supraviețuire semnificativ redusă față de cea a carcinomului hepatocelular. În ceea ce privește prognosticul colangiocarcinomului intrahepatic, singura colorație imunohistochimică care a fost corelată

cu supraviețuirea generală a pacienților a fost CK7. Expresia pozitivă moderată sau intensă a CK7 în celulele tumorale s-a încadrat ca factor de prognostic pozitiv în regresia Cox multivariată, ajustată în funcție de vârstă, numărul tumorilor, diferențierea tumorii, cantitatea infiltratului inflamator intratumoral și asocierea cirozei hepatice.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Având în vedere eterogenitatea biologiei tumorilor de tract biliar, studiile originale conduse riguros în cadrul acestei teze de doctorat au respectat directivele societăților de oncologie digestivă și hepato-biliară, de a analiza separat subtipurile tumorilor biliare. În acest sens, primul studiu a încadrat în loturi diferite colangiocarcinomul intrahepatic, perihilar și distal, precum și carcinomul de veziculă biliară, în timp ce studiile 2 și 3 au inclus strict cazuri de colangiocarcinom intrahepatic.

În ciuda faptului că diagnosticul pozitiv al colangiocarcinomului, în special al subtipului perihilar este în mod notoriu dificil de stabilit, nu am identificat studii care să evalueze acuratețea diagnostică a citoblocurilor realizate din bilă în tumorile maligne de tract biliar. Primul studiu expus a demonstrat că citoblocurile pot servi drept metodă complementară biopsiilor convenționale în diagnosticul anatomo-patologic al acestor malignități.

Deși este un studiu monocentric, studiul 2 a oferit interpretarea expresiei PD-L1 în cel mai mare lot alcătuit din cazuri de colangiocarcinom intrahepatic uman survenit la rasa caucaziană. De asemenea, din cunoștințele noastre, este cel mai amplu studiu care a evaluat expresia PD-L1 pe specimene tisulare preterapeutice. S-a demonstrat că supraexpresia PD-L1 în celulele imune intratumorale, însă nu și în celulele tumorale propriu-zise este asociată cu un prognostic mai bun al pacienților confirmați cu colangiocarcinom intrahepatic, indiferent de stadiul tumoral. Acest fapt poate reprezenta un criteriu de selectare a subgrupurilor de pacienți în vederea acordării terapiei personalizate.

În ceea ce privește diagnosticul diferențial al tumorilor hepatice epiteliale maligne, nu am mai identificat niciun studiu care să evalueze utilitatea markerilor imunohistochimici utilizați în mod uzual în serviciile de anatomie-patologică, asupra cărora personalul medical a avut deja timp să se familiarizeze. Acest studiu, care a tratat simultan cele mai frecvente trei tipuri de malignități hepatice epiteliale a analizat marcajele imunohistochimice vis-a-vis de diagnostic, alcătuiindu-se de asemenea un algoritm de selecție a colorațiilor în practica de zi cu zi.

Cele trei studii descrise sunt adânc ancorate în cerințele clinice actuale, servind drept puncte de plecare pentru cercetări viitoare, multi-instituționale.

Summary of the PhD Thesis

Biomarkers in malignant biliary tract tumors

PhD Student **Lavinia-Patricia Trică**

PhD Supervisor Prof. dr. **Carmen Mihaela Mihu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	19
1. Malignant tumors of the biliary tract – general information	21
1.1. Anatomical location	21
1.2. Incidence, risk factors and precursor lesions	22
1.3. Clinical aspects	23
1.4. Pathological aspects	23
1.4.1. Macroscopy	23
1.4.2. Microscopy	24
1.4.2.1. Cytology	25
1.4.3. Differential diagnosis	25
1.5. Treatment options	25
1.5.1. Immunotherapy in biliary tract carcinomas	26
1.6. Prognosis	27
2. Biomarkers in malignant tumors of the biliary tract	29
2.1. Proteins	30
2.2. Metabolites	31
2.3. Extracellular vesicles	34
2.4. Circulating tumor cells	35
3. Conclusion	37
PERSONAL CONTRIBUTION	39
1. Objectives	41
2. General methodology	43
3. First study. Circulating tumor cells as diagnostic biomarkers – the role of cell blocks in the diagnosis of malignant biliary tract tumors	45
3.1. Introduction	45
3.2. Hypothesis	46
3.3. Material and methods	47
3.4. Results	46
3.4.1. General results	46
3.4.2. Cell block and non-cell block pathology results	50
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	60
4. Second study. Positive immunohistochemical expression of PD-L1 in intratumoral immune cells represents a favourable prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma	61
4.1. Introduction	61
4.2. Hypothesis	63
4.3. Material and methods	63
4.3.1. Study design	63
4.3.2. PD-L1 immunoexpression	66

4.3.3. Statistical analysis	66
4.4. Results	67
4.4.1. General results	67
4.4.2. Results regarding PD-L1 immunoexpression	69
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	80
5. Third study. Diagnostic and prognostic value of routine immunohistochemical staining in intrahepatic cholangiocarcinoma	81
5.1. Introduction	81
5.2. Objectives	83
5.3. Material and methods	83
5.3.1. Study design and group assignment	83
5.3.1.1. Recording of clinical and imaging data	83
5.3.1.2. Recording of pathological data	84
5.3.2. Statistical analysis	84
5.4. Results	85
5.4.1. General results	85
5.4.2. Immunohistochemical markers with potential diagnostic role	87
5.4.2.1. Cohorts A and B (primary malignant hepatic tumors)	87
5.4.2.2. Cohort C (secondary hepatic tumors)	88
5.4.3. Immunohistochemical markers with prognostic role in intrahepatic cholangiocarcinoma	89
5.5. Discussions	92
5.5.1. Diagnostic biomarkers	92
5.5.1.1. Primary malignant hepatic tumors: intrahepatic cholangiocarcinoma vs. hepatocellular carcinoma	93
5.5.1.2. Intrahepatic cholangiocarcinoma vs. hepatic secondary tumors	95
5.5.2. Prognostic biomarkers	96
5.6. Conclusions	98
6. General discussions	99
7. General conclusions	103
8. The originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107

Keywords:

Biliary tract tumors, gallbladder carcinoma, cholangiocarcinoma, biomarkers, diagnostic, prognostic, cell block, PD-1/PD-L1, PD-L1, immunohistochemistry, survival

Summary

Current state of knowledge

The most common representatives of malignant bile duct tumors are gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. The latter can be classified, based on anatomical location, into intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma, further subdivided into perihilar cholangiocarcinoma and distal cholangiocarcinoma. The classification of digestive tumors, published by the World Health Organization, emphasizes that the above mentioned entities should be treated in separate groups due to discrepancies concerning their epidemiology, pathophysiology, etiology, clinical features, imaging, management and prognostic factors.

Because of the frequent cholecystectomy procedures, the incidence of gallbladder carcinoma has decreased in recent decades, with many cases being diagnosed in early stages or even as dysplastic lesions. However, the incidence of cholangiocarcinomas is continuously rising in most geographical areas, with increases ranging from 20% for extrahepatic cholangiocarcinomas to as high as 350% for intrahepatic cases.

In extrahepatic cholangiocarcinomas, located in the left and right hepatic ducts, common hepatic duct, or common bile duct, the early onset of jaundice is the most important factor that leads patients to seek medical attention. However, in the case of intrahepatic localization, the clinical presentation is subtle in both early stage of the disease and in the advanced stage, with nonspecific symptoms and signs. This is the reason why diagnosis is delayed.

The only curative treatment option is surgical resection, but this applies to only a minority of cases. Most patients are considered inoperable at the time of diagnosis due to local extension, involvement of major vessels in the hepatic hilum, other vital structures, or distant metastases. Systemic therapy, primarily based on chemotherapy, leads to an overall survival with median values ranging from 6 to 8 months. In developed regions, tissue samples obtained by the use of biopsies allow molecular testing, that guide administration of personalized treatments. The 5-year survival rate is estimated to be between 0% and 30%. Furthermore, even for cases amenable to surgical resection, recurrence rates are high, and recurrences occur early.

In this scenario of an aggressive disease, diagnosed late in its course, with limited therapeutic options and a grim prognosis, we believe it is valuable to identify and validate specific diagnostic and prognostic biomarkers that could guide the management of bile duct carcinomas.

Personal contribution

First study: Circulating tumor cells as diagnostic biomarkers – the role of cell blocks in the diagnosis of malignant biliary tract tumors

In the context of tumors with delayed diagnosis, aggressive progression and grim prognosis, identification of new diagnostic methods is anticipated with enthusiasm. Currently, in tumors suited to undergo surgical resection, guidelines of the oncological societies do not require an pathological certification of the diagnosis. However, for advanced cases no longer amenable to surgical treatment, systemic therapy is dependent on pathological confirmation of the diagnosis. Until now, relatively few studies assessed the diagnostic accuracy of pathological examination in cases of biliary tract carcinomas. A review article on the topic of diagnosing cholangiocarcinoma reported that material obtained through forceps biopsies and brush cytology provides a malignant diagnosis in only approximately 50% of patients. Considering two aspects: 1) the biopsy technique involves subjecting patients to invasive procedures, which should not be overlooked in an oncological context, and 2) the initiation of systemic therapy is contingent on the pathological certification of malignancy, the above mentioned percentage represents a problem.

Cell blocks, relatively new instruments, hybrids between classic smears and paraffin blocks obtained from conventionally collected tissue fragments (e.g., percutaneous biopsies, incisional biopsies, surgical resection specimens), offer advantages of both techniques: material collection is relatively straightforward, the technical protocol for obtaining paraffin blocks and histopathological slides can be followed in most laboratories, and the material allows performing ancillary studies, additional sections, obtained from the thickness of the paraffin block, which can be stained with routine Hematoxylin and Eosin, histochemically or immunohistochemically. Furthermore, the obtained material allows for molecular testing in units that offer such services.

This initial study aimed to assess whether the diagnosis of malignant biliary tract tumors could be obtained through the pathological analysis of cell blocks made from bile. In this regard, bile samples were prospectively collected from patients with a high suspicion or pathologically established diagnosis of biliary tract carcinoma, during biliary drainage performed percutaneously (external biliary drainage) or during endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). For the control group, bile was collected from patients with choledocholithiasis during ERCP procedures performed for therapeutic purpose (stone extraction). Histopathological slides obtained from the processing of cell blocks were evaluated, and their conclusions were reported in relation to the imaging conclusion, the non-cell block pathological conclusion, where available, as well as the final clinical conclusion.

Five patient groups resulted: Group 1, which included 10 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma; Group 2: 36 cases of perihilar cholangiocarcinoma; Group 3: 3 cases of distal cholangiocarcinoma; Group 4: 14 cases of gallbladder carcinoma, and Group 5 (control group): 15 cases with choledocholithiasis. Cell blocks were able to confirm the malignant diagnosis in 57.14% of malignant cases, with the following percentages for each group: 70%

for intrahepatic cholangiocarcinoma; 55.56% for perihilar cholangiocarcinoma; 66.67% for distal cholangiocarcinoma and 50% for gallbladder carcinoma. The conclusions of all cell blocks examined in the control group were benign. The concordance between the cell block examinations and the final diagnosis (which included patient follow-up, correlating imaging data, and non-cell block pathology) was 65.38%.

Given the high rate of false-negative results of pathological diagnoses, we believe that the evaluation of cell blocks can serve as an auxiliary method to the pathological examination of fragments obtained conventionally (surgical resection, excisional, incisional, percutaneous, or aspirate biopsies) for the certification of malignancy in patients with biliary tract tumors.

Second study: Positive immunohistochemical expression of PD-L1 in intratumoral immune cells represents a favourable prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma

In the last decades, the PD-1/PD-L1 molecular axis played a central role in the context of immunotherapy in various tumors, such as small-cell lung carcinoma or melanoma. For advanced biliary tract tumors, durvalumab (a PD-L1 inhibitor) has recently been added to the classic chemotherapy regimen, previously consisting of gemcitabine and cisplatin. Currently, these three therapeutic agents represent the category 1, first-line regimen for unresectable cases of biliary tract tumors. However, data regarding the relationship between the activation of the PD-1/PD-L1 axis in the tumor microenvironment, its inhibition and patient survival are conflicting. Possible explanations for the discrepancies observed in previous results are attributed to the heterogeneity of biliary carcinoma's biology and different subtypes of cholangiocarcinoma, as well as the lack of uniformity in the interpretation of the immunohistochemical staining associated with the PD-1/PD-L1 pathway.

The main objective of this study was to assess the correlation between PD-L1 immunostaining in human intrahepatic cholangiocarcinoma tissue fragments and the overall survival of patients in the studied cohorts.

Hospital records of patients pathologically diagnosed with intrahepatic cholangiocarcinoma were retrospectively evaluated for inclusion in the study. Two cohorts resulted: Cohort A, consisting of 49 cases of surgically resected cholangiocarcinoma and Cohort B, consisting of 87 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma diagnosed through pathological analysis of percutaneous liver biopsy. Representative histopathological slides were immunohistochemically stained with antibodies against PD-L1 and the expression was subsequently interpreted in four regions: malignant cells, intratumoral immune cells, non-malignant epithelial cells from the tumor front and immune cells from the tumor front. Other parameters included in the database were: patients' general characteristics (age, sex, place of origin, associated pathologies, laboratory values), tumor characteristics (maximum diameter, number, morphological differentiation, resection margin status, presence of vascular invasion, perineural invasion, involvement of the hepatic capsule, AJCC tumor stage and a semi-quantitative assessment of the intratumoral inflammatory infiltrate).

The median overall survival was 20.96 months in Cohort A, which consisted of cases diagnosed in an early stage, amenable to surgical treatment and 9.45 months in Cohort B,

comprising cases with advanced tumors. Overall survival was significantly better in patients with positive PD-L1 expression in tumor cells, intratumoral immune cells, as well as in cases with abundant intratumoral inflammatory infiltrate. Subsequently, a multivariate regression model adjusted for age, number of tumors, tumor size, and tumor differentiation revealed that positive PD-L1 expression in intratumoral immune cells remained a favourable prognostic factor in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma.

These are the first results to report that positive PD-L1 immunostaining in intratumoral immune cells may constitute a strong independent predictor for a favourable outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma, regardless of the tumoral stage at the time of diagnosis.

Third study: Diagnostic and prognostic value of routine immunohistochemical staining in intrahepatic cholangiocarcinoma

The aim of the third study was to correlate the expression of immunohistochemical stains with their diagnostic and prognostic potential in malignant liver tumors. To assess the diagnostic value, electronic records, as well as histopathological slides of patients confirmed with malignant epithelial liver tumors in hepatic biopsy specimens were retrospectively analysed. The immunohistochemical stains were requested by pathologists at the initial examination of each case, for diagnostic purposes. The expression of the immunohistochemical markers was registered in a semi-quantitative fashion: negative staining, positive staining with low intensity, positive staining with moderate intensity, or positive staining with high intensity.

Three groups emerged, consisting of patients with hepatic metastases, hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. In the intrahepatic cholangiocarcinoma group, the highest sensitivities were achieved with antibodies against CK19 (100%), CA19-9 (100%), CK7 (93.7%) and CEA (82.6%). For hepatocellular carcinoma, the highest sensitivities were achieved by glypican 3 (100%), CD34 with a sinusoidal pattern (100%), and HepPar 1 (98.2%). Hepatic metastases originated, in decreasing order of frequency, from colorectal adenocarcinomas, neuroendocrine carcinomas, pancreatic ductal adenocarcinomas, breast carcinomas, and gastric adenocarcinomas. The most important immunohistochemical stains in the metastatic tumor group were CDX2, CK7, CK20 and CK AE1/AE3. In this group, the selection of immunohistochemical stains was directed by the type of the primary tumor, where this information was available.

Intrahepatic cholangiocarcinoma cases had significantly reduced overall survival compared to hepatocellular carcinoma cases. Regarding the prognostic aspects of intrahepatic cholangiocarcinoma, the only immunohistochemical stain that was correlated with patients' overall survival was CK7. CK7 moderate or intense positivity in the malignant cells was a positive prognostic factor in the multivariate Cox regression model adjusted for age, number of tumors, tumor differentiation, quantity of intratumoral inflammatory infiltrate, and the presence of liver cirrhosis.

These findings represent the first results indicating that positive CK7 immunostaining in tumor cells can serve as a strong independent prognostic factor for a favourable outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma.

The Originality and Innovative Contributions of the Thesis

Given the heterogeneity of biliary tract tumors, the rigorously conducted original studies within this doctoral thesis adhered to the guidelines of digestive and hepatobiliary oncology societies, to separately analyse the subtypes of these entities. In this regard, the first study categorized gallbladder carcinoma, intrahepatic, perihilar, and distal cholangiocarcinoma into different groups, while the second and third studies included only cases of intrahepatic cholangiocarcinoma.

Despite the unquestioned difficulty in establishing a positive diagnosis of cholangiocarcinoma, especially the perihilar subtype, we did not identify studies evaluating the diagnostic accuracy of cell blocks made from bile in malignant biliary tract tumors. The first study demonstrated that cell blocks can serve as a complementary method to conventional biopsies in the pathological diagnosis of these malignancies.

Although a single centre experience, the second study provided the interpretation of PD-L1 expression in the largest human intrahepatic cholangiocarcinoma cohort occurring in the Caucasian population. Moreover, to our knowledge, it is the most extensive study that evaluated PD-L1 expression in pre-therapeutic tissue specimens. We demonstrated that overexpression of PD-L1 in intratumoral immune cells, but not in the actual malignant cells is associated with better prognosis in confirmed intrahepatic cholangiocarcinoma patients, regardless of tumor stage. This could represent a criterion for subgroup selection for personalized therapy.

Regarding the differential diagnosis of malignant epithelial liver tumors, we did not identify studies that assessed the utility of routine immunohistochemical markers, which the medical staff has already had time to become familiar with. This study, which simultaneously addressed the three most common types of malignant epithelial liver malignancies, analysed immunohistochemical markers for diagnostic purposes and also developed an algorithm for selecting stains for daily practice.

All three studies are anchored in current clinical requirements, serving as starting points for future multi-institutional research subjects.