TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Factori predictivi ai terapiilor în hepatocarcinom

Doctorand **Iuliana Nenu**

Conducător de doctorat Prof. dr. **Gabriela Adriana Filip**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

CUVINTE CHEIE

hepatocarcinom, markeri de diagnostic, metabolomică, probiotic, microbiom intestinal, inflamaţie intestinală, insuficienţă hepatică post-hepatectomie, hipertensiune portală clinic semnificativă, recidivă

INTRODUCERE

Hepatocarcinomul, cunoscut şi sub denumirea de carcinom hepatocelular (HCC), reprezintă cea mai frecventă formă de cancer primar al ficatului. Este o afecţiune malignă care se dezvoltă în celulele hepatice, fiind asociată în mod frecvent cu factori precum ciroza hepatică şi infecţiile hepatitice cronice, în special hepatita B şi C. Diagnosticul hepatocarcinomului implică adesea o combinaţie între imagistica medicală (ecografie cu contrast, CT sau IRM), determinarea de markeri tumorali (cum ar fi alfa-fetoproteina) şi biopsia hepatică. Modalităţile terapeutice includ intervenţii chirurgicale, transplantul hepatic, terapie sistemică sau imunoterapie, acestea fiind adaptate în funcţie de stadiul specific al bolii şi de statusul general al pacientului.

Problematica şi incertitudinea se manifestă în contextul variabilităţii răspunsurilor individuale la diverse terapii, impunând necesitatea evaluării multiplilor factori de prognostic pentru a obţine o apreciere mai precisă a eficacităţii tratamentului. Cuvântul "prognostic" poartă cu el greutatea aşteptărilor şi a realităţilor nedezvăluite din lumea pacienţilor. Este un bilet de călătorie pe care pacienţii îl primesc, dar care nu dezvăluie întotdeauna toate secretele călătoriei lor. Ştiinţa şi viaţa se întâlnesc în acest loc al incertitudinii. Statisticile oferă un cadru, dar realitatea pacienţilor adaugă culori şi nuanţe. În umbrele prognosticului, doctorii şi pacienţii devin artişti ai propriei lor vieţi, pictând cu curaj şi vulnerabilitate pe pânza terapiei oncologice.

Scopul prezentei lucrări constă în identificarea unor noi factori de prognostic, în afara celor consacraţi şi binecunoscuţi, precum stadiul bolii hepatice, avansarea tumorii sau caracteristicile histologice.

În lumea terapiilor oncologice, luminile sunt adesea atât de orbitoare încât umbrele incertitudinii sunt uitate. Prognosticul devine un partener de călătorie, o oglindă ce reflectă nu doar stadiul unei boli, ci şi fragilitatea existenţei umane. În mijlocul acestui labirint al incertitudinii, pacienţii oncologici se regăsesc, navigând cu speranţă şi temeri într-un peisaj medical. Astfel, în primul studiu am navigat printre diverşi metaboliţi cu scopul de a identifica noi biomarkeri pentru diagnosticarea carcinomului hepatocelular şi pentru identificarea pacienţilor cu un risc crescut de recidivă tumorală, decompensare sau chiar de deces în legătură cu cancerul. Studiul nostru evidenţiază că lipidele joacă un rol crucial în distingerea între ciroza compensată şi carcinomul hepatocelular incipient şi ar putea reprezenta markeri de supravieţuire şi prognostic în cadrul medicinei personalizate şi minim invazive. Printre acestea enumerăm creşterea expresiei de 1,25-diidroxicolină, palmitatul miristil, acidul 12-ceto deoxicolic, lizofosfatidil colina (21:4) şi lizofosfatidil etanol amina (22:2) ca markeri independenţi ai supravieţuirii. Acidul arahidonic a fost singurul metabolit asociat cu decompensarea bolii.

Microbiomul intestinal, subiect de cercetare din ce în ce mai intens în ultima perioadă, pare să influenţeze şi prognosticul răspunsului la terapiile sistemice, indicând că o microbiotă favorabilă este asociată cu un răspuns pozitiv. Al doilea studiu se concentrează pe influenţa administrării probioticului Lactobacillus rhamnosus în asociere cu inhibitorul multikinazic Regorafenib într-un model murin de hepatocarcinom şi hepatopatie avansată. Rezultatele demonstrează că administrarea probioticului, în combinaţie cu terapia oncologică, ameliorează inflamaţia intestinală şi interferează cu cea cronică, potenţând astfel terapia antitumorală.

De asemenea, în evaluarea factorilor predictivi, sunt relevante modelele matematice pentru prezicerea progresiei bolii oncologice şi a decompensării funcţiei hepatice de bază. Cel de-al treilea studiu se concentrează pe evaluarea unor scoruri non-invazive şi pe dezvoltarea unui model matematic utilizând metode de inteligenţă artificială pentru a identifica decompensarea post-hepatectomie şi riscul de recidivă la pacienţii cu rezecţie hepatică pentru hepatocarcinom.

Prognosticul nu poate captura întreaga poveste. În spatele cifrelor şi a diagramelor, există inimile care bat şi minţile care se întreabă. În medicina personalizată, fiecare individ devine o poveste medicală unică, iar tratamentul devine o artă a interpretării, unde fiecare detaliu şi fiecare particularitate sunt chei esenţiale pentru a deschide porţile vindecării individului.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Primul capitol furnizează o analiză detaliată a caracteristicilor comune ale celulelor tumorale, explorând tendințele actuale și problemele emergente în domeniu. Al doilea capitol se concentrează pe tratamentele disponibile și pe noile orizonturi de cercetare în managementul hepatocarcinomului, cu un accent deosebit pe terapiile aplicabile în stadiile incipiente ale bolii. Al treilea capitol discută abordările terapeutice combinate utilizate în stadiile intermediare ale hepatocarcinomului, iar al patrulea capitol aduce în discuție abordări combinate, alternative chemoembolizării transarteriale. Capitolul cinci abordează complexitatea tratamentelor în stadiile avansate ale bolii, cu accent pe strategiile actuale în imunoterapia și imunologia hepatică. Al șaselea capitol investighează noile direcții de cercetare legate de rolul microbiomului intestinal în hepatocarcinom. În final, capitolul șapte examinează importanța și rolul prognostic al moleculelor cheie, cum ar fi interleukina-6 (IL-6), în contextul hepatocarcinomului.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea a doua a tezei de doctorat este meticulos structurată în șapte capitole distincte, dintre care trei sunt dedicate prezentării studiilor originale. Aceste studii reflectă aplicarea directă a cunoștințelor teoretice în practică și contribuie la avansarea domeniului prin descoperiri noi. Restul de patru capitole sunt esențiale pentru cadrul conceptual și analitic al tezei, cuprinzând ipoteza de lucru și obiectivele tezei, discuțiile generale, concluziile generale, precum și descrierea detaliată a aspectelor de originalitate și inovație ale lucrării.

Studiu 1. Labirintul metabolismului lipidic: markeri de diagnostic și prognostic ai carcinomului hepatocelular și ai cirozei hepatice compensate

În primul studiu al tezei, obiectivul principal a fost identificarea de biomarkeri noi pentru diagnosticul precoce al hepatocarcinomului (HCC) și evaluarea riscului de recidivă sau deces. Studiul a implicat analiza metabolomică netargetată realizată pe un eșantion de 69 de pacienți, dintre care 32 aveau ciroză compensată fără HCC și 37 prezentau HCC incipient și urmau tratamente curative. Rezultatele studiului au indicat că nivelele de alfa-fetoproteină (AFP) nu prezintă diferențe semnificative între pacienții cu HCC și cei cu ciroză, sugerând că AFP nu este un biomarker eficient pentru monitorizarea HCC. Utilizând cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă, s-au identificat noi biomarkeri serici capabili să diferențieze între pacienții cu HCC și cei cu ciroză. Acești biomarkeri includ molecule lipidice implicate în metabolismul acizilor grași, glicerofosfolipidelor, sfingolipidelor și acilglicerolului, demonstrând valori AUC (aria de sub curba caracteristicii de operare a receptorului) superioare de 0.900. Printre markerii esențiali ai prognosticului – riscului de deces, se numără acidul arahidonic și miristil-palmitatul, precum și membri ai familiei fosfatidil-colinei. Aceste molecule pot servi drept biomarkeri prognostici valoroși pentru o abordare medicală personalizată și minim invazivă în managementul HCC.

Studiu 2. Tratamentul cu probiotic Lactobacillus rhamnosus modulează căile inflamatorii intestinale și hepatice într-un model murin de carcinom hepatocelular

Studiul al doilea al tezei se concentrează pe evaluarea efectului probioticului Lactobacillus rhamnosus, în ameliorarea efectelor secundare gastro-intestinale provocate de Regorafenib, un tratament comun pentru carcinomul hepatocelular avansat, utilizând un model murin de ciroză și carcinom hepatocelular. Rezultatele studiului au arătat o reducere semnificativă a efectelor gastro-intestinale și o diminuare a inflamației intestinale la șoarecii care au primit L. rhamnosus comparativ cu grupul de control. Această ameliorare pare să fie mediată

prin scăderea inflamației intestinale, contribuind astfel la menținerea integrității barierei epiteliale intestinale. Aceste constatări sugerează că probioticele pot juca un rol crucial în atenuarea colitei induse de chimioterapie, oferind o strategie terapeutică complementară pentru managementul efectelor adverse ale tratamentelor oncologice. Aceste descoperiri ar putea deschide noi perspective pentru integrarea terapiilor cu probiotice în protocoalele de tratament oncologic, contribuind la îmbunătățirea calității vieții pacienților.

Studiu 3. Algoritmi non-invazivi în prezicerea insuficienței hepatice post-hepatectomie și a recidivei tumorale la pacienții cu carcinom hepatocelular

În cel de-al treilea studiu al tezei de doctorat, s-au elaborat și validat două modele matematice inovatoare pentru predicția insuficienței hepatice severe post-hepatectomie (PHLF) și pentru recidiva bolii în rândul pacienților diagnosticați cu carcinom hepatocelular eligibili pentru intervenție chirurgicală. Aceste modele au arătat o capacitate predictivă remarcabilă, depășind performanțele instrumentelor diagnostice tradiționale și ale sistemelor de scor utilizate în practica clinică obișnuită. Metodologia adoptată în cadrul studiului a inclus evaluarea comparativă a măsurătorii gradientului de presiune venoasă hepatică (HVPG) și a altor markeri non-invazivi, cum ar fi scorurile Model for End-Stage Liver Disease (MELD), Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI), Fibrosis-4 (FIB-4), Albumin-Bilirubin (ALBI), Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) și enhanced Liver Fibrosis Test (eLIFT), precum și elastografia tranzitorie. Acești biomarkeri și metode de evaluare au fost integrați în protocolul de evaluare preoperatorie a pacienților candidați pentru rezecție hepatică. Astfel, modelele dezvoltate contribuie semnificativ la optimizarea deciziilor clinice, permitând identificarea precisă a pacienților cu risc crescut de complicații postoperatorii, și furnizează o bază solidă pentru personalizarea abordărilor terapeutice în tratamentul carcinomului hepatocelular. Aceasta aduce o îmbunătățire substanțială în managementul pacienților, crescând siguranța procedurilor chirurgicale și potențialul de succes al tratamentului.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

În cadrul acestei cercetări, se pot evidenția elemente inovatoare și originale în direcțiile principale abordate în această teză dedicată diagnosticului precoce și monitorizării recăderii în cancerul hepatic.

O abordare originală și inovatoare în cercetarea cancerului hepatic constă în identificarea și caracterizarea biomarkerilor serici, cu accent pe cei lipidici. Utilizând tehnici avansate de cromatografie lichidă, am explorat labirintul metabolismului lipidic si am identificat noi biomarkeri care pot oferi informații cruciale în diagnosticul precoce și prognosticul hepatocarcinomului. Această abordare deschide noi perspective în dezvoltarea unor strategii personalizate de diagnostic și tratament, având potențialul de a îmbunătăți rezultatele clinice și de a reduce morbiditatea și mortalitatea asociată carcinomului hepatocelular.

O altă inovație remarcabilă în cercetarea cancerului hepatic este investigarea terapiei combinate, în special a combinației dintre probiotice și agenți terapeutici standard, precum regorafenib. Această abordare terapeutică neconvențională se bazează pe conceptul de interacțiune dintre microbiomul intestinal și sistemul imunitar al gazdei, având potențialul de a îmbunătăți răspunsul terapeutic și de a reduce efectele secundare ale tratamentului chimioterapic.

Pe lângă identificarea biomarkerilor și explorarea terapiei combinate, cercetarea în cancerul hepatic se remarcă și prin inovația în metodele de diagnostic și prognostic. Utilizând tehnici avansate de analiză a datelor și modelare matematică, am dezvoltat și validat modele predictive pentru identificarea pacienților cu risc crescut de recidivă tumorală și de decompensare post-hepatectomie Aceste modele integrate, bazate pe combinația de markeri serici, pe evaluarea rigidității hepatice și pe algoritmi de învățare automată, reprezintă o abordare holistică și inovatoare în gestionarea prognosticului intervenției chirurgicale la pacienții cu hepatocarcinom.

Originalitatea şi inovaţia în cercetarea cancerului hepatic sunt cruciale în avansarea cunoştinţelor şi în îmbunătăţirea rezultatelor clinice pentru pacienţii afectaţi de această boală. Prin explorarea de noi frontiere în identificarea biomarkerilor, a terapilor combinate şi a modelelor predictive, am încercat să identificăm noi căi pentru diagnosticul precoce, prognosticul precis şi tratamentul personalizat al hepatocarcinomului. Într-o lume marcată de complexitate şi incertitudine, originalitatea şi inovaţia în cercetarea cancerului hepatic reprezintă lumina care ne ghidează către un viitor mai bun pentru pacienţii afectaţi de această boală.

CONCLUZII GENERALE

1. Studiul metabolomic efectuat prin spectrometrie de masă dezvăluie componente cheie ale complexităţii metabolismului lipidic, care servesc nu doar la distingerea între ciroza compensată şi fazele incipiente ale carcinomului hepatocelular, ci şi la identificarea acelor pacienţi expuşi unui risc semnificativ crescut de a dezvolta hepatocarcinom.

2. S-a demonstrat că acidul arahidonic, miristil-palmitatul împreună cu diferiţi membri ai familiei fosfatidil-colinei, sunt markeri esenţiali ai supravieţuirii şi pot reprezenta biomarkeri de prognostic valoroşi pentru o abordare medicală personalizată şi minim invazivă în această patologie.

3. S-a demonstrat că există o corelaţie între creşterea metaboliţilor sfinganina C16 şi fosfatul de sfingozină-1 şi creşterea presiunii portale clinic semnificative ceea ce sugerează că aceşti metaboliţi sunt legaţi de recidiva şi de insuficienţa hepatică post-hepatectomie, putand avea rol în prezicerea evoluţiei bolii hepatice.

4. S-au identicat două tipuri de fosfocoline, PC(30:2) şi PC(30:1), cu valori AUROC semnificative în HCC incipient dar care scad odată cu avansarea bolii, subliniind dinamica lor diferită în progresia tumorii.

5. Administrarea probioticului Lactobacillus rhamnosus împreună cu terapia multikinazică cu Regorafenib are capacitatea nu doar de a amplifica eficienţa tratamentului antitumoral, ci poate reduce considerabil efectele secundare gastrointestinale apărute.

6. Tratamanetul combinat folosit pentru prima dată determină atenuarea inflamaţiei sistemice şi intestinale şi astfel poate induce diminuarea rezistenţei tumorale şi a reacţiilor adverse legate de utilizarea inhibitorilor multikinazici. Rezultatele obţinute susţin ideea integrării regorafenibului cu probioticul Lactobacillus rhamnosus într-o abordare inovatoare şi plină de speranţă pentru tratamentul hepatocarcinomului avansat

7. Analiza noastră a arătat scăderea expresiei TLR-4 în tumorile hepatice şi reducerea valorilor LPS în tratamentul combinat regorafenib - probiotic L. rhamnosus, sugerâand menţinerea integrităţii barierei epiteliale intestinale de către tratamentul aplicat.

8. S-a înregistrat o diminuare a inflamaţiei intestinale la nivel microscopic şi o reducere a nivelului LPS în tratamentul combinat cu L. Rhamnosus şi regorafenib, spre deosebire de tratamentul exclusiv cu regorafenib, evidenţiind efectele benefice ale tratamentului combinat asupra toxicităţii digestive induse de terapia oncologică.

9. Studiul nostru a demonstrat că asocierea regorafenibului cu un probiotic reduce semnificativ secretia intestinalăa a IL-6 faţă de tratamentul exclusiv oncologic, propunând o nouă strategie pentru ameliorarea efectelor secundare ale terapiei oncologice.

10. Testele non-invazive de măsurare a fibrozei hepatice – APRI, FIB-4, ALBI. eLIFT prezic riscul de hipertensiune portală clinic semnificativă şi pot fi folosite în centre unde măsurătoarea gradientului porto-sistemic nu este fezabilă.

11. Modelul matematic dezvoltat prezice cu acurateţe riscul dezvoltării insuficienţei hepatice post-hepatectomie, dar și probabilitatea dezvoltării recidivei tumorale la pacientul operat.

PHD THESIS - ABSTRACT

Predictive factors of therapies in hepatocellular carcinoma

PhD student **Iuliana Nenu**

PhD supervisor Prof. dr. **Gabriela Adriana Filip**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE IULIU HAȚIEGANU CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENT

KEYWORDS

hepatocellular carcinoma, diagnostic markers, metabolomics, probiotic, intestinal microbiome, intestinal inflammation, post-hepatectomy liver failure, clinically significant portal hypertension, tumor recurrence

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common form of primary liver cancer. Hepatocellular carcinoma (HCC), also known as hepatocellular carcinoma, is the predominant form of primary liver cancer. This malignancy arises from liver cells, often linked to risk factors such as liver cirrhosis and chronic infections with hepatitis B and C. Diagnosing HCC typically involves medical imaging techniques (contrast ultrasound, CT, or MRI), tumor marker assessment (such as alpha-fetoprotein), and liver biopsy. Therapeutic options include surgery, liver transplantation, systemic therapy, and immunotherapy, tailored based on the disease stage and patient's overall health.

The variability in individual responses to these treatments highlights the need to consider multiple prognostic factors for a more precise evaluation of therapeutic efficacy. The term "prognosis" embodies both expectations and unspoken realities for patients, symbolizing a journey with undisclosed challenges. In this realm of uncertainty where science intersects with patient experiences, statistics offer a structure, while the personal realities of patients introduce unique hues. In the realm of prognosis, physicians and patients collaboratively navigate the complexities of oncological treatment, crafting their paths with resilience and sensitivity.

The aim of this paper is to identify new predictive factors, in addition to the established and well-known ones, such as the stage of liver disease, tumor progression or histological characteristics.

In the realm of cancer therapy, the brilliance of medical advancements often overshadows the uncertainties that linger. Prognosis serves not merely as an indicator of disease progression, but also as a reflection of human vulnerability. Amidst this complex landscape of uncertainty, cancer patients traverse a path marked by hope and apprehension. In the inaugural study of our series, we delved into an array of metabolites aiming to unveil new biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) and to identify patients at heightened risk for tumor recurrence, decompensation, or cancer-induced mortality. Our findings underscore the pivotal role of lipids in differentiating between compensated cirrhosis and emerging HCC, suggesting their potential as markers for survival and prognostic evaluation in the context of personalized and minimally invasive medicine. Notable among these are the elevated levels of 1,25-dihydroxycholine, myristic palmitate, 12-keto deoxycholic acid, lysophosphatidyl choline (21:4), and lysophosphatidyl ethanolamine (22:2), which emerged as independent markers of survival. Arachidonic acid was singularly linked with disease decompensation, highlighting its significance in the clinical assessment of HCC progression.

Recent research has intensified focus on the gut microbiome, revealing its potential impact on the prognosis of responses to systemic therapies. It appears that a favorable microbiota composition is correlated with better outcomes in systemic treatment regimens. The second study in our series examines the effects of administering the probiotic Lactobacillus rhamnosus alongside the multikinase inhibitor Regorafenib within a murine model of hepatocellular carcinoma and advanced liver disease. The findings from this study indicate that co-administration of the probiotic with oncological treatment not only alleviates intestinal inflammation but also mitigates chronic inflammation systemically, thereby potentiating the efficacy of the antitumor therapy. This interaction suggests that modifying the gut microbiome could play a crucial role in enhancing the therapeutic landscape for cancer treatment, particularly by augmenting the effectiveness of systemic therapies.

Moreover, in the quest to refine the prediction of oncological disease progression and liver function decompensation, mathematical models play an integral role. The third study in our series concentrates on the application of non-invasive scoring systems alongside the development of a mathematical model that employs artificial intelligence techniques. This model aims to predict post-hepatectomy liver decompensation and the risk of recurrence in patients undergoing liver resection for hepatocellular carcinoma.

However, prognosis alone does not encapsulate the full narrative. Beyond the statistics and graphical representations lie the real experiences of patients—their hopes and fears, each heartbeat, and every contemplative moment. In the realm of personalized medicine, each patient's journey is distinct, transforming

treatment into an interpretive art. Here, every nuance and specific detail becomes a crucial element, unlocking the potential for tailored therapeutic approaches that cater uniquely to the individual's needs. This perspective underscores the importance of integrating both quantitative data and qualitative understanding in medical practice.

CURRENT STATE OF THE ART

The initial chapter of the thesis presents an exhaustive analysis of the fundamental characteristics of tumor cells, delving into current trends and addressing emerging challenges in oncology. The second chapter narrows its focus to the available treatments and new frontiers in research for hepatocellular carcinoma, particularly emphasizing therapeutic options viable in the early stages of the disease. The third chapter evaluates the use of combined therapeutic strategies in the intermediate stages of hepatocellular carcinoma, while the fourth chapter expands on alternative strategies to transarterial chemoembolization, exploring other combined approaches. In chapter five, the discussion shifts to the complexities of managing advanced-stage hepatocellular carcinoma, highlighting contemporary strategies in immunotherapy and liver immunology. The sixth chapter explores burgeoning research areas, specifically the influence of the gut microbiome on hepatocellular carcinoma progression. The final chapter, chapter seven, assesses the significance and prognostic implications of key molecular indicators, with a specific focus on interleukin-6 (IL-6), within the scope of hepatocellular carcinoma. Each chapter collectively contributes to a comprehensive understanding of the disease's dynamics and potential therapeutic avenues.

PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the doctoral thesis is methodically organized into seven distinct chapters, three of which are devoted to presenting original research conducted by the candidate. These studies exemplify the practical application of theoretical knowledge and significantly contribute to the advancement of the field by introducing novel findings. The remaining four chapters form the core conceptual and analytical structure of the thesis. They include a detailed articulation of the working hypothesis and objectives, provide expansive general discussions that integrate the study findings within the broader scientific context, and offer comprehensive general conclusions. Additionally, these chapters thoroughly delineate the original and innovative aspects of the thesis, underscoring its contribution to the academic and scientific community.

Study 1. Lipid metabolism maze: diagnostic and prognosis markers of hepatocellular carcinoma and compensated liver cirrhosis

In the first study of the thesis, the main objective was to identify new biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) and to assess the risk of recurrence or death. The study involved non-targeted metabolomic analysis performed on a sample of 69 patients, of whom 32 had compensated cirrhosis without HCC and 37 had incipient HCC and were undergoing curative treatments. The results of the study indicated that alpha-fetoprotein (AFP) levels did not show significant differences between HCC and cirrhosis patients, suggesting that AFP is not an effective biomarker for HCC monitoring. Using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, new serum biomarkers were identified capable of differentiating between HCC and cirrhosis patients. These biomarkers include lipid molecules involved in the metabolism of fatty acids, glycerophospholipids, sphingolipids, and acylglycerol, demonstrating AUC (area under the receptor operating characteristic curve) values above 0.900. Among the essential markers of prognosis – risk of death, there are arachidonic acid and myristil-palmitate, as well as members of the phosphatidyl-choline family. These molecules can serve as valuable prognostic biomarkers for a personalized and minimally invasive medical approach in HCC management.

Study 2. Lactobacillus rhamnosus probiotic treatment modulates intestinal and hepatic inflammatory pathways in a mouse model of hepatocellular carcinoma

The second study of the thesis focuses on the evaluation of the effect of the probiotic Lactobacillus rhamnosus, in the improvement of gastrointestinal side effects caused by Regorafenib, a common treatment for advanced hepatocellular carcinoma, using a murine model of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The results of the study showed a significant reduction in gastrointestinal effects and a decrease in intestinal inflammation in mice that received L. rhamnosus compared to the control group. This improvement appears to be mediated by decreased intestinal inflammation, thus helping to maintain the integrity of the intestinal epithelial barrier. These findings suggest that probiotics may play a crucial role in alleviating chemotherapy-induced colitis, providing a complementary therapeutic strategy for managing the adverse effects of oncology treatments. These findings could open up new perspectives for integrating probiotic therapies into cancer treatment protocols, helping to improve patients' quality of life.

Study 3. Non-invasive algorithms in the prediction of post-hepatectomy liver failure and tumor recurrence in patients with hepatocellular carcinoma

In the third study of the doctoral thesis, two innovative mathematical models were developed and validated for the prediction of severe post-hepatectomy (PHLF) liver failure and for disease recurrence among patients diagnosed with hepatocellular carcinoma eligible for surgery. These models showed remarkable predictive capacity, outperforming traditional diagnostic tools and scoring systems used in routine clinical practice. The methodology adopted in the study included comparative evaluation of the measurement of the hepatic venous pressure gradient (HVPG) and other non-invasive markers, such as the Model for End-Stage Liver Disease (MELD), Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI), Fibrosis-4 (FIB-4), Albumin-Bilirubin (ALBI), Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and enhanced Liver Fibrosis Test (eLIFT) scores, as well as transient elastography. These biomarkers and assessment methods have been integrated into the preoperative evaluation protocol of patients who are candidates for liver resection. Thus, the developed models contribute significantly to the optimization of clinical decisions, allowing the precise identification of patients at high risk of postoperative complications, and provide a solid basis for the personalization of therapeutic approaches in the treatment of hepatocellular carcinoma. This brings a substantial improvement in patient management, increasing the safety of surgical procedures and the potential for treatment success.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Within this research, the thesis introduces several innovative and original elements that significantly contribute to the field of liver cancer, particularly in the realms of early diagnosis and monitoring of disease relapse.

A novel aspect of this research in liver cancer is the identification and characterization of serum biomarkers, with a specific focus on lipid biomarkers. Employing sophisticated liquid chromatography techniques, we delved into the complexities of lipid metabolism to uncover new biomarkers. These biomarkers are pivotal for the early diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) and pave the way for the development of personalized diagnostic and therapeutic strategies. This approach holds the potential to enhance clinical outcomes and reduce the morbidity and mortality associated with HCC.

Another significant innovation is the exploration of combination therapy, particularly the integration of probiotics with conventional therapeutic agents like regorafenib. This unique therapeutic strategy is based on leveraging the interactions between the gut microbiome and the host's immune system, aiming to enhance the therapeutic response and alleviate the side effects associated with chemotherapy.

Furthermore, the thesis distinguishes itself through its advancements in diagnostic and prognostic methodologies. By utilizing advanced data analysis techniques and mathematical modeling, we have developed and validated predictive models that identify patients at high risk of tumor recurrence and post-hepatectomy decompensation. These models, which integrate serum markers, liver stiffness assessments, and machine learning algorithms, offer a comprehensive and innovative approach to managing prognosis in surgical patients with hepatocellular carcinoma.

The originality and innovation embedded in this liver cancer research are vital for advancing knowledge and improving clinical outcomes for patients afflicted by this disease. By charting new territories in the identification of biomarkers, combination therapies, and predictive models, our efforts aim to forge new paths for early diagnosis, precise prognosis, and personalized treatment of hepatocellular carcinoma. In a domain marked by complexity and uncertainty, these innovative contributions shine as a beacon, guiding us towards a more promising future for patients battling liver cancer.

GENERAL CONCLUSIONS

1. The metabolomic study performed by mass spectrometry reveals key components of the complexity of lipid metabolism, which serve not only to distinguish between compensated cirrhosis and the early stages of hepatocellular carcinoma, but also to identify those patients at significantly increased risk of developing hepatocellular carcinoma.

2. Arachidonic acid, myristil-palmitate together with various members of the phosphatidyl-choline family, have been shown to be essential markers of survival and can represent valuable prognostic biomarkers for a personalized and minimally invasive medical approach in this pathology.

3. An increase in the metabolites of sphinganin C16 and sphingosine-1 phosphate has been shown to be correlated with clinically significant increases in portal pressure, suggesting that these metabolites are related to post-hepatectomy relapse and liver failure and may play a role in predicting liver disease progression.

4. Two types of phosphatidyl-cholines, PC(30:2) and PC(30:1), were identified, with significant AUROC values in early HCC but decreasing with disease progression, emphasizing their different dynamics in tumor progression.

5. The administration of the probiotic Lactobacillus rhamnosus together with multikinase therapy with regorafenib has the ability not only to amplify the effectiveness of antitumor treatment, but can considerably reduce the gastrointestinal side effects that occur.

6. The combination treatment used for the first time reduces systemic and intestinal inflammation and thus can induce a decrease in tumor resistance and adverse reactions related to the use of multikinase inhibitors. The results obtained support the idea of integrating regorafenib with the probiotic Lactobacillus rhamnosus in an innovative and hopeful approach for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma

7. Our analysis showed a decrease in TLR-4 expression in liver tumors and a reduction in LPS values in the combined treatment regorafenib - probiotic L. rhamnosus, suggesting that the integrity of the intestinal epithelial barrier was maintained by the applied treatment.

8. There was a decrease in intestinal inflammation at the microscopic level and a reduction in LPS levels in the combination treatment with L. Rhamnosus and regorafenib, as opposed to the exclusive

treatment with regorafenib, highlighting the beneficial effects of the combination treatment on the digestive toxicity induced by oncological therapy.

9. Our study demonstrated that the combination of regorafenib with a probiotic significantly reduces the intestinal secretion of IL-6 compared to oncological treatment alone, proposing a new strategy to improve the side effects of kinase inhibitors.

10. Non-invasive liver fibrosis tests – APRI, FIB-4, ALBI. eLIFTs predict the risk of clinically significant portal hypertension and can be used in centers where measurement of the portosystemic gradient is not feasible.

11. The mathematical model developed accurately predicts the risk of developing post-hepatectomy liver failure, but also the probability of developing tumor recurrence in the operated patient.