

---

REZUMATTEZĂ DE DOCTORAT

# Rolul ecografiei intraoperatorii în chirurgia hepato-bilio-pancreatică

---

Doctorand **Ioana Iancu**

---

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

---



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

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>15</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>19</b>
<b>1. Ecografia intraoperatorie</b>	<b>21</b>
1.1. Scurt istoric	21
1.2. Aspecte generale	21
<b>2. Ecografia intraoperatorie hepatică diagnostică</b>	<b>23</b>
2.1. Echipament	23
2.2. Tehnica de examinare	24
2.3 Diagnosticul patologiei benigne hepatice	24
2.3.1 Hemangiomul	24
2.3.2 Hiperplazia focală nodulară	24
2.3.3 Adenomul hepatic	25
2.3.4 Chistul hepatic simplu/chistul biliar	25
2.3.5 Chistul hepatic hidatic	25
2.4 Diagnosticul patologiei maligne hepatice	26
2.4.1 Hepatocarcinomul	26
2.4.2 Metastazele hepatice colo-rectale (CRLM)	29
2.5 Elastografia hepatică	31
<b>3. Ecografia intraoperatorie hepatică intervențională</b>	<b>33</b>
3.1. Ghidarea rezecțiilor hepatice	33
3.2 Ghidarea tehnicilor ablativă	35
<b>4. Ecografia intraoperatorie pancreatică</b>	<b>37</b>
4.1. Generalități	37
4.2. Echipament și tehnica de examinare	38
4.3 Diagnosticul patologiei benigne pancreatice	38
4.3.1. Tumori neuroendocrine (insulinomul)	39
4.3.2. Leziunile chistice pancreatice	40
4.3.3. Neoplasmul mucinos intraductal papilar (IPMN)	40
4.3.4. Pancreatitele acute și cronice	41
4.4. Diagnosticul patologiei maligne pancreatice	42
4.4.1. Adenocarcinomul pancreatic	42
4.5. Ecografia intraoperatorie cu substanță de contrast (CE-IOUS) în patologia pancreatică	44
4.6. Elastografia pancreatică	45
4.7. Ghidarea rezecțiilor pancreatice în chirurgia minim-invazivă	46
4.8. Ghidarea tehnicilor ablativă în tumorile pancreatice	46
<b>5. Perspective</b>	<b>49</b>
5.1. Îmbunătățirea substanțelor de contrast	49
5.2. Nanotehnologia și agenții de contrast	50
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>51</b>

<b>1. Ipoteza de lucru. Obiective generale și specifice</b>	<b>53</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>55</b>
<b>3. Studiu 1. Impactul IOUS asupra actului operator</b>	<b>57</b>
3.1. Introducere. Raționament	57
3.2. Material și metodă	58
3.3. Rezultate	68
3.4. Discuții	76
3.5. Concluzii	77
<b>4. Studiu 2. Ablaja cu radiofrecvență, ecoghidată intraoperatorie a tumorilor pancreatice nerezecabile nemetastatice. Studiu pilot</b>	<b>79</b>
4.1. Introducere. Raționament	79
4.2. Material și metode	79
4.4. Rezultate	86
4.4. Discuții	94
4.5. Concluzii	96
<b>5. Studiu 3. Lipozomi funcționalizați cu Sorafenib: studiu <i>in vitro</i></b>	<b>97</b>
5.1. Introducere. Raționament	97
5.2. Material și metodă	98
5.2.1. Materiale:	98
5.2.2. Metode:	98
5.3. Rezultate	99
5.3.1. Caracterizarea lipozomilor	99
5.3.2. Studiul efectului de citotoxicitate al formulării Lipo_SOR pe două linii celulare hepatice	105
5.4. Discuții	108
5.5. Concluzii	109
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>111</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>113</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>115</b>

**Cuvinte cheie:** ecografie intraoperatorie, ecografie cu substanță de contrast, metastaze hepatice, hepatocarcinom, adenocarcinom pancreatic, ablație cu radiofrecvență ghidată ecografic, nanomedicină, lipozomi funcționalizați, condiții *in vitro*

## **Introducere. Obiective generale.**

Chirurgia hepato-bilio-pancreatică reprezintă o ramură complexă a chirurgiei abdominale, mai ales atunci când discutăm de diagnosticul și tratamentul tumorilor. Cu toate că progresele din domeniu au făcut ca tehnicile imagistice preoperatorii să stabilească cu o mare acuratețe prezența acestor patologii și raporturile cu structurile învecinate, ecografia intraoperatorie, conform literaturii de specialitate, trebuie să fie utilizată ca și standard în blocul operator, de către chirurgul hepato-bilio-pancreatic. Progresele tehnologice au făcut ca dispozitivele ecografice și transductorii de înaltă frecvență, dedicați spațiului intraabdominal să confere chirurgului o examinare de mare precizie, ce poate ajuta la detectarea de noi leziuni, nedetectate de examinările preoperatorii, la diagnosticul diferențial al tumorilor parenchimoase și, foarte important, la

ghidarea procedurilor terapeutice, actului chirurgical. Deși aceste principii și tehnici sunt indicate clar în literatura de specialitate, numărul relativ scăzut de publicații în acest sens și o lipsă a standardizării și pregătirii în ecografie face ca ecografia intraoperatorie să nu fie folosită de rutină, omogen, cu excepția centrelor de excelență în domeniu.

Astfel, am efectuat un studiu prospectiv (studiul 1) ce a presupus utilizarea de rutină a ecografiei intraoperatorii la pacienții operați cu tumori hepatice primare sau secundare colo-rectale, în încercarea de a verifica avantajele pe care ecografia le poate aduce în chirurgia tumorilor ficatului, prin intermediul unei tehnici standardizate, realizate de o singură echipă chirurgicală, ce ar trebui să înlăture în primul rând bias-ul dat de o experiență inomogenă în ecografia generală și intraoperatorie.

Ecografia cu substanță de contrast (CEUS) are un rol bine stabilit în diagnosticul tumorilor hepatice, bazându-se pe principiul caracterizării vascularizației tumorale. Pentru aceasta se utilizează o substanță de contrast intravasculară: SonoVue® (hexaclorură de sulf, sub formă de microbule), substanță cu rol pur diagnostic. Plecând de la limitele pe care chimioterapia sistemică le are încă în tratamentul hepatocarcinoamelor, coroborat cu capacitatea de penetrare în vascularizația anarhică tumorală a moleculelor de SonoVue® și de progresele realizate în nanotehnologie, am plecat de la dezideratul realizării unui nano-bio-conjugat teranostic care să prezinte și un efect terapeutic țintit, pe lângă cel diagnostic.

Luând în considerare că la ora actuală nu există încă un nano-chimioterapic aprobat, am considerat de reală importanță încercarea de funcționalizare a unui chimioterapic sistemic țintit (Sorafenib), utilizat pe larg în tratamentul hepatocarcinoamelor, cu molecule de lipozomi, nanoparticule ce ar putea fi mediate de substanța de contrast, pentru a obține și o potențială încărcătură citostatică la nivelul hepatocarcinoamelor. Realizarea unei astfel de nano-bio-conjugat complex, ce ar avea în componența sa un chimioterapic, un agent de contrast și un anticorp tumoral țintit, alături de efectul de sonopermeație și de distrugere prin ultrasunete a bulelor substanței de contrast, ar putea să ducă la o creștere a concentrației de agent citostatic în țesutul tumoral, inclusiv la pacienții cu tumori rezecabile (ca și pregătire preoperatorie) sau tratabile prin ablație termică (ca și adjuvant în zona de necroză). Astfel, Studiul 3 al cercetării doctorale, a vizat inițierea proiectului propus, printr-un studiu preliminar de realizare și testare pe linii celulare de hepatocarcinom a nanolipozomilor funcționalizați cu Sorafenib.

Adenocarcinomul pancreatic reprezintă o altă patologie importantă, cu impact major asupra supraviețuirii și a calității vieții. Cu toate progresele înregistrate în domeniul medical, singurul tratament care oferă o șansă semnificativă de creștere a supraviețuirii pacienților diagnosticați cu această boală este reprezentat de chirurgia radicală, dar din păcate, la nivel global doar aproximativ 20% din pacienți sunt operabili radical în momentul diagnosticului. Principalele motive de inoperabilitate sunt reprezentate de prezența metastazelor viscerale sau peritoneale și/ sau de invaziile vasculare de vecinătate. Pentru cazurile inoperabile, avansate local dar nemetastatice, la ora actuală, ghidurile de conduită internaționale indică chimioterapia sistemică ca și singură variantă terapeutică paliativă. Totuși, literatura de specialitate indică faptul că tehnicile ablative tumorale ale acestor tumori nerezecabile nemetastatice ar putea fi însoțite de o creștere a supraviețuirii la acești pacienți. Absența acestui tratament din managementul standard paliativ al acestor pacienți ar putea să fie cauzat de lipsa unei standardizări și de morbiditatea relativ crescută a acestor proceduri. Astfel, am inițiat un studiu pilot în care, după centralizarea datelor din literatură, să aplicăm o tehnică ablativă intraoperatorie standardizată a tumorilor pancreatice nerezecabile nemetastatice, cu evaluarea rezultatelor imediate și la distanță, toate cu rolul de a confirma sau infirma fezabilitatea acestei tehnici paliative, ce asociată cu chimioterapia sistemică să ducă la prelungirea supraviețuirii și a calității vieții acestor pacienți.

## **Stadiul actual al cunoașterii**

Prima parte a tezei de doctorat reprezintă o scurtă trecere în revistă a literaturii de specialitate cu privire la subiectul cercetării propus mai sus: ecografia intraoperatorie hepatică și pancreatică atât cu rol diagnostic, cât și intervențional (ghidarea tehnicilor chirurgicale), progresele în domeniul ecografiei intraoperatorii dat de asocierea substanței de contrast și de utilizarea elastografiei intraoperatorii. În ultimul capitol al părții generale se face o introducere în domeniul nanomedicinii prin îmbunătățirea substanțelor de contrast cu

ajutorul nanomaterialelor, în vederea dezvoltării unor structuri teranostice, cu aplicații în diagnosticul, tratamentul și monitorizarea la distanță a pacienților cu neoplazii în stadii avansate.

## Contribuția personală

A doua parte a tezei este compusă din 3 studii:

### 1. Studiul 1: Impactul IOUS asupra actului operator

**Introducere.** În chirurgia hepatică, a tumorilor hepatice, IOUS reprezintă standardul de aur, atât în stabilirea diagnosticului, cât și în definirea planului chirurgical și al ghidării coduitei terapeutice optime. IOUS permite detectarea metastazelor hepatice nepalpabile intraoperator, sau decelarea de noi leziuni care nu au fost evidențiate la imagistica preoperatorie, ducând la modificarea planului de tratament propus inițial. Posibilitatea efectuării ecografiei intraoperatorii cu substanță de contrast, poate aduce informații noi esențiale la pacienții cu status post-chimioterapie, tratament care poate să modifice ecogenitatea leziunilor hepatice, nevizualizate la imagistica preoperatorie, care altfel s-ar fi interpretat ca răspuns fals pozitiv, complet la tratamentul oncologic.

Tratamentul standard al formațiunilor hepatice maligne este reprezentat de rezecțiile hepatice, cu scopul obținerii marginilor de rezecție negative (R0), în limite oncologice. O atenție aparte trebuie acordată prezervării a cât mai mult parenchim hepatic sănătos, factor de prognostic important în evoluția postoperatorie imediată. Prin ghidarea rezecției hepatice sub ghidaj ecografic, se minimalizează riscurile apariției de insuficiență hepatică dată de un volum hepatic restant redus, și în același timp se respectă limitele de rezecție oncologică. IOUS permite practicarea unei chirurgii cu viză radicală, dar concomitent o chirurgie conservatoare. Scopul studiului nostru a fost de a analiza în mod obiectiv impactul pe care îl are IOUS în chirurgia hepatică la o serie de pacienți cărora li s-a făcut de rutină IOUS, asupra diagnosticului intraoperator și asupra intervenției chirurgicale, în cadrul aceleiași echipe chirurgicale, cu scopul standardizării acestei metode.

**Material și metodă.** Studiul de față a fost unul de tip prospectiv și a vizat pacienții operați cu formațiuni tumorale hepatice (tumori primare sau secundare colo-rectale) în Clinica Chirurgie III și spitalul Medicover Cluj, în perioada 2018-2023, la care s-a efectuat de rutină ecografie intraoperatorie hepatică. Ecografia a fost efectuată în toate cazurile de către același chirurg, medicul operator principal, cu experiență în chirurgia hepato-bilio-pancreatică și cu certificat care atestă competența în ecografia convențională și intraoperatorie. În perioada 2018-2023, în Clinica Chirurgie III și Spitalul Medicover au fost operați 177 de pacienți cu patologie tumorală hepatică, care au beneficiat toți de ecografia intraoperatorie hepatică. Toți pacienții ce s-au adresat echipei noastre au fost evaluați clinic și imagistic preoperator, prin CT toraco-abdominal-pelvin cu substanță de contrast intravenoasă, RMN abdominal cu substanță de contrast, PET-CT sau ecografie convențională cu substanță de contrast, în urma cărora chirurgul a stabilit indicația operatorie și planul chirurgical, investigații care nu au fost efectuate cu mai mult de 2 săptămâni înainte de intervenția chirurgicală, respectiv IOUS. Intervenția chirurgicală este una standardizată. După pătrunderea în cavitatea abdominală, timpul de explorare a presupus mobilizarea ficatului prin secționarea ligamentelor suspensoare, palparea întregii suprafețe hepatice și explorarea întregii cavități abdominale. Ulterior, s-a efectuat ecografia intraoperatorie, folosind de fiecare dată aceeași tehnică de scanare a parenchimului hepatic. În cazul chirurgiei minim-invazive, atât cea laparoscopică, cât și cea robotică, s-au respectat aceleași principii de scanare ecografică, folosind transductorul dedicat.

În urma efectuării IOUS, în anumite cazuri, în funcție de diagnosticul stabilit prin imagistica preoperatorie și în funcție de aspectul ecografic intraoperator s-a decis completarea diagnosticului intraoperator, cu ecografie cu substanță de contrast, pentru a confirma un diagnostic preoperator sau cu scopul de realiza un diagnostic diferențial cu o leziune benignă/ malignă.

După finalizarea ecografiei, s-a decis tehnica chirurgicală optimă, tehnică ghidată ulterior cu ajutorul ecografiei, fie rezecție hepatică/fie tehnică ablativă. În cazul ablației, zona de necroză a fost evaluată de rutină cu ajutorul ecografiei cu substanță de contrast.

Principalii parametri urmăriți în studiul nostru au fost, evaluarea intraoperatorie vs cea preoperatorie (acuratețea descrierii raporturilor anatomice, dimensiunile tumorii), leziunile noi decelate intraoperator (nevizualizate de imagistica preoperatorie), evaluarea CE-IOUS (dacă a dus elemente noi față de imagistica preoperatorie), rolul în ghidarea rezecțiilor hepatice, tehnicile ghidate intraoperator, schimbarea conduitei față de operația propusă pe imagistica preoperatorie, marginile de rezecție.

**Rezultate.** În perioada 2018-2023, am evaluat 176 de pacienți care au fost referați pentru chirurgie hepatică cu diagnosticul de hepatocarcinom, metastaze hepatice sau alte tipuri de leziuni (colangiocarcinom, leziuni benigne). La majoritatea cazurilor diagnosticul preoperator a fost stabilit prin CT abdominal cu substanță de contrast, completat și de RMN abdominal cu substanță de contrast în unele cazuri sau prin alte investigații (PET-CT sau ecografie convențională cu substanță de contrast) și la unii pacienți doar prin RMN abdominal cu substanță de contrast. În ceea ce privește tipul de operație, la majoritatea pacienților s-a practicat rezecție hepatică, la o parte din cazuri s-a efectuat ablație cu radiofrecvență sau cu microunde și la unele cazuri s-a practicat tehnica combinată (rezecție hepatică + ablație), existând și o parte din pacienți la care intervenția chirurgicală s-a rezumat la laparotomie sau laparoscopie exploratorie. Rezecțiile hepatice au implicat următoarele tehnici chirurgicale: metastazectomie, rezecție hepatică atipică, segmentectomie, lobectomie și hepatectomie majore (dreaptă, stângă, centrală). Rezecțiile hepatice majore s-au practicat la 19 pacienți, cu schimbarea conduitei chirurgicale propusă inițial preoperator la 7 din ei, în urma efectuării IOUS. La 96 de cazuri din cele 177 s-au obținut specimene chirurgicale care a fost trimise la departamentul de anatomie patologică pentru obținerea rezultatului histopatologic. Din cele 96 de cazuri, la 85 din cazuri (88.5%) s-a obținut margine de rezecție liberă de elemente tumorale (R0) și la 11 din ele (11.5%) marginea de rezecție a venit în contact focal la sub 1 mm de formațiunea tumorală. Analiza statistică a arătat o șansă mai scăzută de a obține margini R1 la pacienții la care IOUS a influențat conduita/ tactica intraoperatorie.

**Concluzii.** Utilizarea de rutină a IOUS la pacienții cu tumori hepatice propuși pentru tratament chirurgical poate să crească rata de detecție a leziunilor nedecelate la investigațiile preoperatorii, cu influențarea conduitei ulterioare. În ceea ce privește asocierea ecografiei cu substanță de contrast, în scop diagnostic, este necesară continuarea studiului, cu utilizarea de rutină a acestei investigații, pentru a concluziona aportul său intraoperator. Avantajul maxim este adus la pacienții operați pentru metastaze hepatice, la care rezecțiile atipice/ minore sunt mai frecvent indicate și șansa de a obține margini de rezecție R1 este mai redusă atunci când se utilizează de rutină IOUS. Completarea studiului cu analiza supraviețuirii acestor pacienți, ce implicit au beneficiat de IOUS, reprezintă un pas important de validare a rezultatelor noastre, alături de analiza rezultatelor obținute la pacienții ce nu au beneficiat de IOUS (lot control).

## **2. Studiul 2: Ablatia cu radiofrecvență, ecoghidată intraoperatorie a tumorilor pancreatice nerezecabile nemetastatice. Studiu pilot**

**Introducere.** Adenocarcinomul ductal pancreatic, este considerată cea mai frecventă neoplazie care afectează pancreasul, cu opțiuni limitate de tratament și cu un prognostic rezervat. În ciuda, dezvoltării tehnicilor imagistice și chirurgicale, aproximativ 40% din pacienți sunt diagnosticați cu boală avansată locală. Tehnicile ablativă au devenit un nou adjuvant în managementul acestui tip de cancer, cu efect citoreductiv cercetat în numeroase studii, completat de radioterapie și radio-chimioterapie. Ținând seama de numeroasele studii care au raportat efectele citoreductive și imunomodulatoare, împreună cu supraviețuirea aparent îmbunătățită, a fost subliniată necesitatea realizării unor studii randomizate pentru validarea acestor constatări. În același timp, lipsa protocoalelor standardizate și rata relativ mare de apariție a complicațiilor perioperatorii fac ca această tehnică să nu fie utilizată de rutină în centrele specializate. Astfel, ținând cont de informațiile din literatura de specialitate și de rata mare a cazurilor diagnosticate în serviciul nostru cu tumori pancreatice nerezecabile, am considerat important să încercăm implementarea unui program standardizat de selecție a pacienților cu adenocarcinom pancreatic ductal, avansat loco-regional nemetastatic la care să se preteze tehnica termică ablativă.

**Materiale și metode.** În acest studiu prospectiv, am înrolat pacienți diagnosticați cu adenocarcinom pancreatic ductal, avansat loco-regional, nemetastatic, internați la Clinica Chirurgie III din cadrul Institutului

de Gastroenterologie și Hepatologie, Cluj-Napoca, referați pentru ablație tumorală intraoperatorie. Datele au fost culese prospectiv și analizate retrospectiv.

Pacienții au fost informați în detaliu cu privire la procedura, la rezultatele comunicate în literatura de specialitate și la riscurile pe care acest tratament le presupune. Pentru aceasta, în colaborare cu medicul oncolog și medicul anesteziat am elaborat un consimțământ informat specific pentru această procedură, pe care pacientul l-a semnat înainte de procedură. Studiul a inclus pacienții diagnosticați cu adenocarcinom pancreatic cefalic sau corporeal, confirmat prin biopsie, fără indicație pentru rezecție chirurgicală radicală (invazie arterială, invazie venă mezenterică superioară sau venă portă fără posibilitate de reconstrucție vasculară). Prezența metastazelor hepatice, peritoneale, ganglionare, prezența stenturilor metalice în calea biliară principală, ascita, tulburările severe de coagulare și nesemnarea consimțământului informat, au reprezentat o contraindicație pentru procedură. Toți pacienții au fost investigați/ stadializați preoperator imagic, prin tomografia computerizată toraco-abdomino-pelvină (CT TAP), ecoendoscopia și în unele cazuri, când CT-TAP nu a fost concludentă, rezonanța magnetică nucleară abdomino-pelvină (RMN). La toți pacienții s-a recoltat preoperator markerul tumoral CA19-9. Toți pacienții au efectuat preoperator chimioterapie de tip neoadjuvant, conform protocolului standard internațional.

Ablația intraoperatorie s-a practicat în anestezie generală pentru toți pacienții, abordul fiind prin laparotomie. Procedura a fost una standardizată. Pe lângă explorarea chirurgicală, s-a efectuat de rutină și ecografie intraoperatorie hepatică pentru excluderea prezenței unor metastaze hepatice care nu au fost decelate preoperator prin CT sau RMN. Următorul timp chirurgical a fost expunerea pancreasului, pătrunderea în bursa omentală. În cazurile în care rezultatul histopatologic de malignitate nu a fost stabilit preoperator, următorul pas a fost practicarea unei biopsii echidate cu Tru-cut, cu examen extemporaneu histopatologic.

Pentru realizarea procedurii de ablație s-a utilizat sonda de ablație UniBlate conectată la generatorul 1500X (AngioDynamics®), sondă ce a fost răcită constant pe interior cu ser fiziologic, cu ajutorul pompei pe care dispozitivul o are în dotare. În toate cazurile, ecografia intraoperatorie a stabilit relația tumorii față de structurile vasculare din vecinătate și cu ductul pancreatic principal. Inserția acului de ablație s-a realizat sub ghidaj ecografic. Setarea timpului de ablație s-a realizat în funcție de dimensiunea tumorii (5-15 minute), cu intenția producerii unei ablații subtotale, în centrul tumorii, cu excluderea periferiei tumorii, pentru protejarea structurilor vasculare și digestive din vecinătate. La toți pacienții s-a verificat zona de necroză post-ablație prin ecografie intraoperatorie cu substanță de contrast.

Postoperatori, toți pacienții au fost supravegheați în primele 24 h pe secția de terapie intensivă, după care au fost transferați pe secția de chirurgie. La 24 h postoperator, s-au recoltat analize de laborator, acestea fiind repetate la nevoie. În prima zi postoperator, s-a efectuat ecografie abdominală de control pentru evaluarea posibilelor colecții abdominale patologice. Pentru verificarea zonei de ablație și excluderea unor posibile complicații postoperatorii (hematom, tromboză de venă portă), s-a efectuat de rutină CT abdominal cu substanță de contrast, la 24 h postprocedural și ulterior urmărire, la 1 lună postoperator. Succesul terapeutic imediat a fost definit ca prezența ablației tumorale subtotale (prezența unei arii intens hipodensă în interiorul tumorii).

**Rezultate.** În studiu au fost incluși 10 pacienți consecutivi, diagnosticați cu adenocarcinom pancreatic local-avansat nemetastatic. Din cei 10 pacienți, la 5 pacienți tumora a fost localizată la nivel cefalo-pancreatic și la restul de 5, la nivelul istmului sau corpului pancreatic. Clinic, toți pacienții au prezentat sindrom algic neoplazic, dat de invazia plexului solar. Criteriile de nerezecabilitate au fost stabilite preoperator, la toți pacienții, prin evaluarea CT sau ecoendoscopică: invazie arterială la 7 pacienți și invazie venoasă fără posibilitate de reconstrucție venoasă la 3 pacienți. La 3 pacienți, diagnosticul de malignitate a fost confirmat intraoperator prin examenul extemporaneu.

Ecografia intraoperatorie cu substanță de contrast, s-a efectuat cu scop diagnostic la 2 pacienți, în cazul cărora ecografia intraoperatorie în modul B și palparea au ridicat suspiciunea unei neoplazii multicentrice; în ambele cazuri, această suspiciune a fost infirmată de examinarea ecografică cu substanță de contrast. Verificarea zonei de ablație s-a efectuat la toți pacienții prin ecografie intraoperatorie cu substanță de contrast.

Complicațiile postoperatorii au inclus: 1 hemoragie digestivă inferioară, 1 tromboză de venă portă, 1 icter obstructiv, 1 hemoperitoneu, aceste complicații fiind practic prezente grupat la 2 pacienți. Pentru cazul cu hemoperitoneu, a fost necesară reintervenție în regim de urgență, celelalte complicații postoperatorii fiind rezolvate prin tratament conservator, tratament anticoagulant în doză terapeutică, respectiv prin stentare biliară. Recoltarea markerului tumoral CA19-9 atât preoperator cât și postoperator nu ne-a indicat diferențe semnificative între valorile serice. Controlul imagistic CT postoperator, a indicat în toate cazurile aria de necroză tumorală (subtotală), conform protocolului terapeutic. La controlul CT de 1 lună, un pacient a fost diagnosticat cu abces intrabdominal (confirmat și clinic), care a fost tratat prin drenaj percutan ecoghidat. La controlul de 3 luni postoperator, un pacient a fost diagnosticat cu 3 leziuni hipodense hepatice, suspecte de metastaze hepatice, fiind interpretat ca boală sistemică în evoluție. La 6 luni postoperator, 1 pacient a prezentat regresie imagistică a neoplaziei pancreatice (la examinarea CT și ecografia cu fuziune în timp real RVS), cu descrierea unei arii de necroză completă. Toți pacienții introduși în studiu au avut sindromul algic descris preoperator controlat prin antialgice minore, non-opioid, pe perioada urmăririi. Mediana de supraviețuire a fost de 7.5 luni (min 4,5- max 10 luni; IQR=5.5), cu o rată de supraviețuire la 3 luni de 80%, la 6 luni de 10% și la 12 luni de 10%.

**Concluzii.** Rezultatele studiului nostru pilot indică fezabilitatea introducerii tehnicilor ablativă tumorale într-un protocol terapeutic paliativ al cancerelor pancreatice nerezecabile non-metastatice, fapt subliniat de lipsa deceselor sau a complicațiilor majore postoperatorii și cu avantajul adus de ameliorarea sindromului algic și posibilitatea asocierii altor intervenții chirurgicale cu viză paliativă. În ciuda faptului că ecografia intraoperatorie este esențială în ghidarea acestei tehnici, efectuarea ecografiei cu substanță de contrast, nu este necesară. Faptul că am obținut o rată de supraviețuire non-inferioară față de cea asociată cu chimioterapia sistemică indică doar necesitatea continuării acestui studiu pe un lot mai mare de pacienți și dezvoltării unui algoritm de selecție a pacienților și alegerii celui mai bun tip de abord. Mai mult, realizarea unui studiu comparativ, randomizat, cu pacienți ce beneficiază doar de tratamentul standard, va fi esențială pentru a trage concluzii pertinente legate de eventualele avantaje asupra supraviețuirii pacienților ce beneficiază de tehnici ablativă tumorale.

### **3. Studiu 3: Lipozomi funcționalizați cu Sorafenib: studiu *in vitro*.**

**Introducere. Raționament.** Tratamentul hepatocarcinomului presupune în funcție de stadiul bolii mai multe variante: în stadiu incipient, tehnici cu viză curativă (rezecția, transplantul hepatic sau ablațiile locale); în stadiile intermediare, chemoembolizarea. Din păcate, pentru hepatocarcinomul în stadiu avansat, singura opțiune rămâne chimioterapia sistemică. Dintre terapiile țintite, Sorafenibul este primul chimioterapic care și-a demonstrat eficacitatea în tumorile avansate. Totuși eficiența acestor chimioterapice este frecvent limitată de funcția hepatică alterată (cum este în cazul cirozei) apărând astfel necesitatea cercetării unor posibile terapii țintite combinate, cum ar fi tehnica ablativă ghidată ecografic combinată cu terapie țintită asupra celulelor tumorale, care ar putea îmbunătăți efectele chimioterapicelor în hepatocarcinoamele avansate local. Acest abord este posibil prin utilizarea nanotehnologiei, care permite targetarea, îmbunătățirea proprietăților farmacologice și combinarea mai multor substanțe chimioterapice. Totuși, în ciuda caracteristicilor promițătoare teoretic, efectul terapeutic este limitat datorită transportului inadecvat dat de permeabilitatea sporită heterogenă, efectului de retenție, matricea extracelulară densă și presiunea ridicată a lichidului interstițial a tumorilor. Unul din efectele fizice ale ecografiei, denumită sonopermeație ar putea crește permeabilitatea matricei extracelulare, care ar duce la acumularea sporită și la distribuția țintită a nanoparticulelor și substanțelor chimioterapicelor în țesuturile tumorale. Lipozomii sunt nanoparticule care ar putea fi eficiente în tratamentul hepatocarcinomului, ținând seama de capacitatea acestora de a încapsula substanțele chimioterapice și de potențialul de livrare mediat de ecografie. La ora actuală, nanomedicina bazată pe lipozomi este utilizată în managementul mai multor cancere, dar pentru HCC nu există încă un nano-chimioterapic aprobat. Astfel, ne-am propus sintetizarea lipozomilor funcționalizați cu Sorafenib, caracterizarea lor și studierea efectului terapeutic al acestora pe studii *in vitro* (pe culturi celulare de hepatocarcinom).

**Materiale și metode.** În capitolul de materiale și metode, s-a descris procesul de sintetizare și funcționalizare a lipozomilor cu Sorafenib, ulterior s-a caracterizat lipozomii prin spectroscopie Raman, care a urmărit evidențierea organizării moleculelor lipidice în structura lipozomilor, respectiv identificarea datelor experimentale care să confirme funcționalizarea cu sorafenib la nivelul bistratului lipidic. S-au măsurat trei tipuri de probe: lipozomi blanc, lipozomi cu Sorafenib, respectiv Sorafenib pur. Pentru realizarea măsurătorilor s-a folosit linia laserului 785 nm, măsurătorile fiind efectuate în intervalul spectral 200-3200  $\text{cm}^{-1}$

A urmat determinarea concentrației, dimensiunii și potențialului zeta al lipozomilor și analiza prin microscopie electronică prin transmisie (TEM). În final am efectuat studii experimentale de citotoxicitate pe culturi celulare. Studiile experimentale *in vitro* s-au realizat pe două linii celulare hepatice: o linie normală – LX2 – celule hepatice stelate, și o linie tumorală – SK-HEP-1 – celule epiteliale de adenocarcinom hepatic. Studiile de citotoxicitate la sorafenib, respectiv la nanoparticulele sintetizate, în vederea determinării concentrației IC<sub>50</sub>, s-au realizat la 24 și 48 h. După 24 ore de la însămânțarea plăcilor, s-a adăugat tratamentul (SOR / Lipo\_SOR) în concentrații 2.5-20  $\mu\text{M}$ . La 24 și 48 h de la tratament s-a realizat testul MTT cu o etapa de incubare pentru 3h la 37°C. În continuare, s-a măsurat absorbanta cu ajutorul cititorului de microplăci Tecan Spark 10M, iar rezultatele s-au analizat prin intermediul softului GraphPad Prism 6.

**Rezultate.** În acest studiu am demonstrat potențialul efect terapeutic asupra hepatocarcinomului prin studii *in vitro* realizate pe linii celulare tumorale. După cum am subliniat, în studiul nostru, înglobarea sorafenibului în lipozomi, a permis acumularea agentului chimioterapeutic la nivelul celulelor tumorale (concentrația de SOR la 48 de h a avut o valoare de 8,845  $\mu\text{M}$ , care este de aproape 4.5 ori mai crescută decât în varinata neîncapsulată) și a îmbunătățit farmacocinetica chimioterapeuticului (doza de IC<sub>50</sub> la 48 h după tratamentul cu Lipo\_SOR - 1,968  $\mu\text{M}$ , a fost aproape jumătate din concentrația determinate la 24 de h- 4,361  $\mu\text{M}$ ). Funcționalizarea lipozomilor cu sorafenib s-a realizat cu succes, fapt confirmat de existența celor două peak-uri specific acestei molecule. Aceste peak-uri specifice care pot fi localizate la 375 și 1610  $\text{cm}^{-1}$ , au apărut numai în spectrul Raman al cristalidelor de sorafenib.

**Concluzii.** În cadrul studiului nostru, am sintetizat lipozomi funcționalizați cu SOR, care au fost riguros caracterizați în vederea evaluării efectelor terapeutice prin studii *in vitro* pe culturi celulare. În urma caracterizării acestora, am determinat următoarele proprietăți fizice: în cazul lipozomilor simpli am obținut o populație omogenă cu dimensiuni de până la 200 nm, iar în cazul celor funcționalizați cu sorafenib au predominat populații cu dimensiuni medii cuprinse între 100 și 300 nm. Mai mult, prin analiza TEM s-a observat o formă sferică și disponerea moleculelor de SOR în zona bistratului lipidic. Pentru experimentele pe culturi celulare am folosit dozele 2,5-20  $\mu\text{M}$  de SOR și Lipo\_SOR, iar efectul acestora l-am evaluat după 24 și 48h prin testul MTT. În cazul liniei celulare tumorale SK-HEP-1 se observă că doza IC<sub>50</sub> la 48h (1.968  $\mu\text{M}$ ) este aproape jumătate din concentrația determinată la 24h (4.361  $\mu\text{M}$ ). Mai mult, concentrația SOR la 48h pe aceste celule are o valoare de 8.845  $\mu\text{M}$ , care este de aproape 4.5x mai mare decât varianta nanoîncapsulată. Considerăm că o limită a studiului nostru este reprezentată de absența unui lot martor de linii celulare la care să fi analizat viabilitatea acestora atunci când sunt expuse doar la lipozomi, pentru a verifica și efectul nociv per se al acestora, fără asociere de Sorafenib. Un studiu ulterior va fi necesar pentru a întări concluziile.

### **Concluzii generale. Originalitate**

Utilizarea de rutină a IOUS la pacienții cu tumori hepatice poate să crească rata de detecție a leziunilor noi, nedecelate la investigațiile preoperatorii. Avantajul cel mai mare al utilizării ecografiei intraoperatorii este la pacienții cu metastaze hepatice, la care șansa de a obține margini de rezecție R1 este mai redusă prin acest protocol standardizat. Studii viitoare sunt necesare pentru a evalua și reconfirma rolul pe care ecografia cu substanță de contrast poate să îl dețină în protocolul intraoperator.

Ablația cu radiofrecvență a tumorilor pancreatice nerezecabile nemetastatice, prin abord chirurgical (laparotomie) este fezabilă, fără mortalitate și morbiditate postoperatorie semnificativă. Rezultatele studiului nostru inițial indică faptul că supraviețuirea consecutivă acestei tehnici ablativ-paliative este non-inferioară chimioterapiei sistemice, studii suplimentare, pe un lot mai mare fiind necesare pentru a evidenția eventualele avantaje asupra rezultatelor la distanță. Deoarece intenția studiului nostru pilot a fost de verificare a fezabilității tehnicii și a identificării eventualelor avantaje/dezavantaje, lipsa unui lot control (pacienți ce au beneficiat de tratamentul standard chimioterapic sistemic paliativ) reprezintă o limită importantă în ceea ce privește concluziile legate de supraviețuire, comparația rezultatelor la distanță din lotul nostru fiind făcută cu literatura de specialitate.

Realizarea lipozomilor funcționalizați cu Sorafenib este fezabilă și reproductibilă. Testarea lipozomilor funcționalizați cu Sorafenib pe linii celulare de HCC ne-a indicat un potențial citostatic superior față de utilizarea doar a Sorafenib. Plecând de la aceste concluzii, linia viitoare de cercetare va viza dezvoltarea unei nano-bioconjugate cu lipozomi funcționalizați cu Sorafenib, incluși în gazul potențialei substanțe de contrast ultrasonografic, împreună cu anticorpi specifici și, testarea acestuia în condiții *in vitro*, *in vivo* și *ex vivo*.

Studiile incluse în teză vizează analiza unor elemente importante din arsenalul diagnostic și terapeutic a patologiei neoplazice hepatice și pancreatice, cu potențial de îmbunătățire a rezultatelor oncologice imediate și la distanță.

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

# The role of the intraoperative ultrasound in hepato-bilio-pancreatic surgery

---

PhD student **Ioana Iancu**

---

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

---



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

# SUMMARY

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>19</b>
<b>1. Intraoperative ultrasound</b>	<b>21</b>
1.1. Short hystory	21
1.2. General aspects	21
<b>2. Diagnostic intraoperative ultrasound of the liver</b>	<b>23</b>
2. 1. Equipment	23
2. 2. Examination technique	24
2.3 The diagnosis of the benign hepatic tumors	24
2.3.1 Hemangioma	24
2.3.2 Focal nodular hyperplasia	24
2.3.3 Hepatic adenoma	25
2.3.4 Simple biliary cyst	25
2.3.5 Hepatic hydatid cyst	25
2.4 The diagnosis of the malignant hepatic tumors	26
2.4.1 Hepatocarcinoma	26
2.4.2 Colo-rectal liver metastasis (CRLM)	29
2.5 Liver elastography	31
<b>3. Interventional intraoperative ultrasound of the liver</b>	<b>33</b>
3.1. Guidance of the liver resections	33
3.2 Guidance of the ablative techniques	35
<b>4. Intraoperative ultrasound of the pancreas</b>	<b>37</b>
4.1. General aspects	37
4.2. Equipment and examination technique	38
4.3 The diagnosis of the benign pancreatic pathology	38
4.3.1. Neuroendocrine tumors (insulinoma)	39
4.3.2. Pancreatic cystic lesions	40
4.3.3. Intraductal papilar mucinous neoplasm (IPMN)	40
4.3.4. Acute and chronic pancreatitis	41
4.4. The diagnosis of the malignant pancreatic tumors	42
4.4.1. Pancreatic adenocarcinoma	42
4.5. Contrast-enhanced intraoperative ultrasound (CE-IOUS) in pancreatic pathology	44
4.6. Elastography of the pancreas	45
4.7. Guidance of pancreatic resections in minimally-invasive surgery	46
4.8. Guidance of ablative techniques in pancreatic tumors	46
<b>5. Perspectives</b>	<b>49</b>
5.1. Improving contrast agents	49
5.2. Nanotechnology and contrast agents	50
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>51</b>

<b>1. The working hypothesis. General and specific objectives</b>	<b>53</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>55</b>
<b>3. 1st Study. The impact of IOUS on the surgical conduite</b>	<b>57</b>
3.1. Introduction. Reasoning	57
3.2. Material and method	58
3.3 Results	68
3.4. Discussions	76
3.5. Conclusions	77
<b>4. 2nd Study . Intraoperative ultrasound guided radiofrequency ablation of unresectable nonmetastatic pancreatic malignancies.</b>	
<b>A pilot observational study</b>	<b>79</b>
4.1. Introduction. Reasoning	79
4.2. Material and method	79
4.4. Results	86
4.4. Discussions	94
4.5. Conclusions	96
<b>5. 3rd Study. Sorafenib loaded nanoliposomas: <i>in vitro</i> study</b>	<b>97</b>
5.1. Introduction. Reasoning	98
5.2. Material and method	98
5.2.1 Materials:	98
5.2.2. Methods:	99
5.3. Results	99
5.3.1. Characterisation of liposomes	99
5.3.2. <i>In vitro</i> cytotoxicity studies on cell cultures	105
5.4. Discussions	108
5.5. Conclusions	109
<b>6. General conclusions</b>	<b>111</b>
<b>7. Original and innovative contributions of the thesis</b>	<b>113</b>
 <b>REFERENCES</b>	 <b>115</b>

**Keywords:** intraoperative ultrasound, contrast-enhanced ultrasound, liver metastases, hepatocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, ultrasound-guided radiofrequency ablation, nanomedicine, functionalized liposomes, *in vitro* conditions

## **Introduction. General objectives.**

Hepato-bilio-pancreatic surgery is a complex part of abdominal surgery, especially when discussing about the diagnosis and treatment of these tumors. Although advances in the field have made preoperative imaging techniques to establish with great accuracy the presence of these pathologies and the relationships with neighboring structures, intraoperative ultrasound, according to the specialized literature, must be used as a standard in the operating room by the hepato-bilio-pancreatic surgeon. Technological advances have made ultrasound devices and high-frequency transducers dedicated to the intra-abdominal space, to offer the surgeon a high-precision examination of the liver; helping to detect new lesions not detected by preoperative examinations, to establish the differential diagnosis of parenchymal tumors and, very importantly, to guide the therapeutic procedures, the surgical conduite. Although these principles and techniques are clearly indicated in the specialized literature, the relatively low number of publications in this regard and a lack of standardization and training in ultrasound means that intraoperative ultrasound is not used routinely, homogeneously, except in centers of excellence in the field .

Thus, we performed a prospective study (1st Study) that involved the routine use of intraoperative ultrasound in patients operated on with primary liver or secondary colorectal tumors, in an attempt to verify the advantages that ultrasound can bring in liver tumor surgery, by means of a standardized technique, performed by a single surgical team, which should primarily remove the bias given by an inhomogeneous experience in general and intraoperative ultrasound.

Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) has a well-established role in the diagnosis of liver tumors, based on the principle of characterizing tumor vasculature. For this, an intravascular contrast substance is used: SonoVue® (sulfur hexachloride, in the form of microbubbles), a substance with a purely diagnostic role. Starting from the limits that systemic chemotherapy still has in the treatment of hepatocarcinomas, corroborated with the ability to penetrate into the anarchic tumor vasculature of the SonoVue® molecules and the advances made in nanotechnology, we started from the point to create a theranostic nano-bio-conjugate that to present a targeted therapeutic effect, in addition to the diagnostic one.

Taking into account that currently there is still no approved nano-chemotherapeutic, we considered of real importance the attempt to functionalize a targeted systemic chemotherapeutic (Sorafenib), widely used in the treatment of hepatocarcinomas, with liposome molecules, nanoparticles that could be mediated by the contrast substance, to also obtain a potential cytostatic load at the level of hepatocarcinomas. The realization of such a complex nano-bio-conjugate, which would have in its composition a chemotherapeutic agent, a contrast agent and a targeted tumor antibody, together with the effect of sonopermeation and destruction by ultrasound of the bubbles of the contrast substance, could lead to an increase in the concentration of the cytostatic agent in the tumor tissue, including in patients with resectable tumors (as preoperative preparation) or treatable by thermal ablation (as adjuvant in the area of necrosis). Thus, 3rd Study of the doctoral research aimed at the initiation of the proposed project, through a preliminary study of realization and testing on hepatocarcinoma cell lines of Sorafenib loaded nanoliposomas.

Pancreatic adenocarcinoma is another important pathology, with a major impact on survival and quality of life. Despite all the progress made in the medical field, the only treatment that offers a significant chance of increasing the survival of patients diagnosed with this disease is represented by radical surgery, but unfortunately, globally only about 20% of patients are radically operable at the time of diagnosis. The main reasons for inoperability are represented by the presence of visceral or peritoneal metastases and/or neighboring vascular invasions. For inoperable, locally advanced but non-metastatic cases, at present, international guidelines indicate systemic chemotherapy as the only palliative therapeutic option. However, the literature indicates that tumor ablative techniques of these unresectable non-metastatic tumors could be accompanied by an increase in survival in these patients. The absence of this treatment from the standard palliative management of these patients could be due to the lack of standardization and the relatively high morbidity of these procedures. Thus, we initiated a pilot study in which, after centralizing data from the literature, to apply a standardized intraoperative ablative technique to unresectable non-metastatic pancreatic tumors, with the evaluation of immediate and long-term results, all with the role of confirming or denying the feasibility of this palliative technique, associated with systemic chemotherapy to prolong the survival and quality of life of these patients.

## **Current state of knowledge**

The first part of the doctoral thesis represents a brief review of the specialized literature regarding the research topic proposed above: intraoperative hepatic and pancreatic ultrasound with both a diagnostic and interventional role (guiding surgical techniques), advances in the field of intraoperative ultrasound given by the association of the contrast substance and the use of intraoperative elastography. In the last chapter of the general part, an introduction is made to the field of nanomedicine by improving contrast substances with the help of nanomaterials, in order to develop some theranostic structures, with applications in the diagnosis, treatment and remote monitoring of patients with neoplasia in advanced stages.

## **Personal contribution**

The second part of the thesis is composed of 3 studies:

### **1. Study 1: The impact of IOUS on the operative act**

**Introduction.** In liver surgery, of hepatic tumors, IOUS represents the gold standard, both in establishing the diagnosis and in defining the surgical conduite and guiding the optimal therapeutic plan . IOUS allows

the detection of non-palpable liver metastases intraoperatively, or the detection of new lesions that were not identified on preoperative imaging, leading to the modification of the initially proposed surgical treatment. The possibility of performing intraoperative ultrasound with contrast agent can bring essential new information to patients with post-chemotherapy status, treatment that can modify the echogenicity of liver lesions, not visualized on preoperative imaging, which would otherwise have been interpreted as a false positive response, complete to oncological treatment.

The standard treatment of malignant liver tumors is represented by liver resections, with the aim of obtaining negative resection margins (R0), within oncological limits. Special attention must be paid to preserving as much healthy liver parenchyma as possible, an important prognostic factor in the immediate postoperative evolution. By guiding the liver resection under ultrasound guidance, the risks of liver failure due to a reduced remaining liver volume are minimized, and at the same time the limits of oncological resection are respected. IOUS allows the performance of radical surgery, but at the same time a conservative surgery. The aim of our study was to objectively analyze the impact of IOUS in liver surgery in a series of patients routinely undergoing IOUS, on intraoperative diagnosis and on surgery, within the same surgical team, with the aim of standardization this method.

**Material and method.** The present study was a prospective one and focused on patients with liver tumors (primary or secondary colorectal tumors) referred for hepatic surgery in the Surgery Department III and the Medicover Cluj Hospital, during the period 2018-2023, in which intraoperative ultrasound was routinely performed hepatic. Ultrasound was performed in all cases by the same surgeon, the main operator, experienced in hepato-bilio-pancreatic surgery and certified in conventional and intraoperative ultrasound.

In the period 2018-2023, 177 patients with liver tumor pathology were operated on in Surgical Department III and the Medicover Hospital, all of whom benefited from intraoperative liver ultrasound. All patients were evaluated clinically and imaging preoperatively, by thoraco-abdominal-pelvic CT scan with intravenous contrast agent, abdominal MRI with contrast agent, PET-CT or conventional ultrasound with contrast agent, following for which the surgeon established the operative indication and the surgical conduit, investigations that were not performed more than 2 weeks before the surgical intervention, respectively IOUS. The surgical intervention is a standardized one. After entering the abdominal cavity, the exploration time involved mobilizing the liver by sectioning the suspensory ligaments, palpating the entire liver surface, and exploring the entire abdominal cavity. Later, intraoperative ultrasound was performed, using the same technique for scanning the liver parenchyma each time. In the case of minimally invasive surgery, both laparoscopic and robotic, the same ultrasound scanning principles were followed, using the dedicated transducer.

After performing IOUS, in certain cases, depending on the diagnosis established by preoperative imaging and depending on the intraoperative ultrasound aspect, it was decided to complete the intraoperative diagnosis, with ultrasound with contrast agent, to confirm a preoperative diagnosis or with the aim of making a diagnosis differential with a benign/malignant lesion.

After the ultrasound was completed, the optimal surgical technique was decided, followed by ultrasound-guided technique, either liver resection/ablative technique. In the case of ablation, the area of necrosis was routinely assessed using contrast-enhanced ultrasound.

The main parameters monitored in our study were intraoperative vs. preoperative evaluation (accuracy of description of anatomical relationships, tumor sizes), new lesions detected intraoperatively (not visualized by preoperative imaging), CE-IIOUS evaluation (if it brought new elements compared to preoperative imaging), the role in the guidance of liver resections, intraoperative guided techniques, the change of surgical conduit compared to the proposed operation on the preoperative imaging, the resection margins.

**Results.** During the period 2018-2023, we evaluated 176 patients who were referred for liver surgery with the diagnosis of hepatocarcinoma, liver metastases or other types of lesions (cholangiocarcinoma, benign lesions). In most cases, the preoperative diagnosis was established by abdominal CT scan with contrast agent, complemented by abdominal MRI with contrast agent in some cases or by other investigations (PET-CT or conventional ultrasound with contrast substance) and in some patients only by abdominal MRI with contrast agent. Regarding the type of operation, liver resection was performed in most patients, radiofrequency or microwave ablation was performed in some cases and the combined technique (hepatic resection + ablation) was performed in some cases, with some patients in which the surgical intervention was limited to laparotomy or exploratory laparoscopy Liver resections involved the following surgical techniques: metastasectomies, atypical liver resection, segmentectomies, lobectomies and major hepatectomies (right, left, central). Major liver resections were performed in 19 patients, with the change of surgical conduit initially proposed preoperatively in 7 of them, following IOUS. In 96 cases out of the 177, surgical specimens were obtained which were sent to the department of pathological anatomy to obtain the histopathological result. Of the 96 cases, in 85 cases (88.5%) a resection margin free of tumor

elements (R0) was obtained and in 11 of them (11.5%) the resection margin came into focal contact less than 1 mm from the tumor formation. Statistical analysis showed a lower chance of achieving R1 margins in patients in whom IOUS influenced intraoperative conduct/tactics.

**Conclusions.** The routine use of IOUS in patients with liver tumors proposed for surgical treatment may increase the detection rate of undetected lesions in preoperative investigations, influencing subsequent planning. Regarding the association of ultrasound with contrast agent, for diagnostic purposes, it is necessary to continue the study, with the routine use of this investigation, to conclude its intraoperative benefits. The maximum benefit is obtained in patients operated for liver metastases, in whom atypical/minor resections are more commonly indicated and the chance of obtaining R1 resection margins is lower when IOUS is used routinely. Completing the study with the survival analysis of these patients, who implicitly benefited from IOUS, represents an important step in validating our results, alongside the analysis of the results obtained in patients who did not benefit from IOUS (control group).

## **2nd Study . Intraoperative ultrasound guided radiofrequency ablation of unresectable nonmetastatic pancreatic malignancies. A pilot observational study**

**Introduction.** Pancreatic ductal adenocarcinoma is considered the most common neoplasia affecting the pancreas, with limited treatment options and a poor prognosis. Despite the development of imaging and surgical techniques, approximately 40% of patients are diagnosed with locally advanced disease. Ablative techniques have become a new adjuvant in the management of this type of cancer, with a cytoreductive effect researched in numerous studies, complemented by radiotherapy and radio-chemotherapy. Considering the numerous studies that reported cytoreductive and immunomodulatory effects, together with apparently improved survival, the need for randomized trials to validate these findings was emphasized. At the same time, the lack of standardized protocols and the relatively high rate of perioperative complications make this technique not used routinely in specialized centers. Thus, taking into account the information from the specialized literature and the high rate of cases diagnosed in our service with unresectable pancreatic tumors, we considered it important to try to implement a standardized program for the selection of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, advanced loco-regional non-metastatic in which to be possible to use the ablative thermal technique.

**Materials and methods.** In this prospective study, we enrolled patients diagnosed with ductal pancreatic adenocarcinoma, loco-regionally advanced, non-metastatic, hospitalized at the Surgical Department III within the Institute of Gastroenterology and Hepatology, Cluj-Napoca, referred for intraoperative tumor ablation. Data were collected prospectively and analyzed retrospectively.

The patients were informed in detail about the procedure, the results communicated in the specialized literature and the risks that this treatment entails. For this, in collaboration with the oncologist and the anesthesiologist, we developed a specific informed consent for this procedure, which the patient signed before the procedure. The study included patients diagnosed with cephalic or corporeal pancreatic adenocarcinoma, confirmed by biopsy, without indication for radical surgical resection (arterial invasion, superior mesenteric vein or portal vein invasion without possibility of vascular reconstruction). The presence of liver, peritoneal, lymph node metastases, the presence of metal stents in the main bile duct, ascites, severe coagulation disorders and not signing the informed consent, represented a contraindication for the procedure. All patients were investigated/staged preoperatively by imaging, through thoraco-abdominal-pelvic computed tomography scan (CT TAP), echoendoscopy and in some cases, when CT-TAP was inconclusive, abdominal-pelvic nuclear magnetic resonance (MRI). The CA19-9 tumor marker was collected preoperatively in all patients. All patients underwent neoadjuvant chemotherapy preoperatively, according to the international standard protocol.

Intraoperative ablation was performed under general anesthesia for all patients, the approach being through laparotomy. The procedure was standardized. In addition to surgical exploration, intraoperative liver ultrasound was routinely performed to rule out the presence of liver metastases that were not detected preoperatively by CT scan or MRI. The next surgical step was exposure of the pancreas, entering into the omental bursa. In cases where the histopathological result of malignancy was not established preoperatively, the next step was to perform a Tru-cut echo-guided biopsy with extemporaneous histopathological examination.

To perform the ablation procedure, the UniBlate ablation probe connected to the 1500X generator (AngioDinamics®) was used, the probe was constantly cooled on the inside with physiological serum, with the help of the pump that the device is equipped with. In all cases, intraoperative ultrasound established the relationship of the tumor to the neighboring vascular structures and to the main pancreatic duct. The insertion of the ablation needle was performed under ultrasound guidance. The setting of the ablation time

was made according to the size of the tumor (5-15 minutes), with the intention of producing a subtotal ablation, in the center of the tumor, excluding the periphery of the tumor, in order to protect the vascular and digestive structures in the vicinity. In all patients, the area of post-ablation necrosis was verified by intraoperative ultrasound with contrast material.

Postoperatively, all patients were monitored for the first 24 h in the intensive care unit, after which they were transferred to the surgery unit. At 24 h postoperatively, laboratory analyzes were collected, these being repeated as needed. On the first postoperative day, control abdominal ultrasound was performed to evaluate possible pathological abdominal collections. In order to verify the ablation area and exclude possible postoperative complications (hematoma, portal vein thrombosis), abdominal CT scan with contrast agent was routinely performed 24 h post-procedural and then followed up 1 month postoperatively. Immediate therapeutic success was defined as the presence of subtotal tumor ablation (the presence of an intensely hypodense area within the tumor).

**Results.** 10 consecutive patients diagnosed with non-metastatic locally advanced pancreatic adenocarcinoma were included in the study. Of the 10 patients, in 5 patients the tumor was located at the cephalo-pancreatic area and in the remaining 5, at the level of the isthmus or pancreatic body. Clinically, all patients presented neoplastic pain syndrome, caused by invasion of the solar plexus. The unresectable criteria were established preoperatively, in all patients, by CT scan or endoscopic evaluation: arterial invasion in 7 patients and venous invasion without possibilities of venous reconstruction in 3 patients. In 3 patients, the diagnosis of malignancy was confirmed intraoperatively by the extemporaneous examination.

Intraoperative ultrasound with contrast agent was performed for diagnostic purposes in 2 patients, in whose case intraoperative B-mode ultrasound and palpation raised the suspicion of a multicentric neoplasia; in both cases, this suspicion was disproved by ultrasound examination with contrast material. Verification of the ablation zone was performed in all patients by intraoperative ultrasound with contrast agent.

Postoperative complications included: 1 lower digestive hemorrhage, 1 portal vein thrombosis, 1 obstructive jaundice, 1 hemoperitoneum, these complications being practically present grouped in 2 patients. For the case with hemoperitoneum, emergency reintervention was necessary, the other postoperative complications being resolved by conservative treatment, anticoagulant treatment in a therapeutic dose, respectively by biliary stenting. Collection of the tumor marker CA19-9 both preoperatively and postoperatively did not show us significant differences between the serum values. Postoperative CT imaging control indicated in all cases the area of tumor necrosis (subtotal), according to the therapeutic protocol. At the 1-month follow-up CT scan, one patient was diagnosed with an intra-abdominal abscess (also confirmed clinically), which was treated by ultrasound-guided percutaneous drainage. At the 3-month postoperative follow-up, a patient was diagnosed with 3 hypodense liver lesions, suspected of liver metastases, being interpreted as an evolving systemic disease. At 6 months postoperatively, 1 patient presented imaging regression of the pancreatic neoplasia (on CT examination and RVS real-time fusion ultrasound), with the description of an area of complete necrosis. All patients included in the study had the pain syndrome described preoperatively controlled by minor, non-opioid analgesics during the follow-up period. The median survival was 7.5 months (min 4.5- max 10 months; IQR=5.5), with a survival rate at 3 months of 80%, at 6 months of 10% and at 12 months of 10%.

**Conclusions.** The results of our pilot study indicate the feasibility of introducing tumor ablative techniques into a palliative therapeutic protocol for unresectable non-metastatic pancreatic cancers, a fact underlined by the lack of mortality or major postoperative complications and with the advantage of ameliorating the pain syndrome and the possibility of associating other targeted surgical interventions palliative. Despite the fact that intraoperative ultrasound is essential in guiding this technique, performing ultrasound with contrast agent is not necessary. The fact that we obtained a non-inferior survival rate compared to that associated with systemic chemotherapy only indicates the need to continue this study on a larger group of patients and to develop an algorithm for selecting patients and choosing the best type of approach. Moreover, carrying out a comparative, randomized study with patients who benefit only from the standard treatment, will be essential to draw pertinent conclusions related to the possible advantages on the survival of patients who benefit from tumor ablative techniques.

### **3rd Study. Sorafenib loaded nanoliposomas: in vitro study**

**Introduction. Reasoning.** The treatment of hepatocarcinoma involves several options depending on the stage of the disease: in the early stage, techniques with a curative purpose (resection, liver transplantation or local ablations); in the intermediate stages, chemoembolization. Unfortunately, for advanced-stage hepatocarcinoma, the only option remains systemic chemotherapy. Among targeted therapies, Sorafenib is

the first chemotherapy to demonstrate efficacy in advanced tumors. However, the effectiveness of these chemotherapeutics is frequently limited by altered liver function (as in the case of cirrhosis), thus showing the need to research possible combined targeted therapies, such as the ultrasound-guided ablative technique combined with targeted therapy on tumor cells, which could improve the effects of chemotherapeutics in locally advanced hepatocarcinomas. This approach is possible through the use of nanotechnology, which allows targeting, improving pharmacological properties and combining multiple chemotherapeutic substances. However, despite the theoretically promising characteristics, the therapeutic effect is limited due to inadequate transport given by the increased heterogeneous permeability, retention effect, dense extracellular matrix and high interstitial fluid pressure of tumors. One of the physical effects of ultrasound, called sonopermeation, could increase the permeability of the extracellular matrix, which would lead to increased accumulation and targeted delivery of nanoparticles and chemotherapeutic substances in tumor tissues. Liposomes are nanoparticles that could be effective in the treatment of hepatocarcinoma, given their ability to encapsulate chemotherapeutic substances and their potential for ultrasound-mediated delivery. Currently, liposome-based nanomedicine is used in the management of several cancers, but for hepatocarcinoma there is still no approved nano-chemotherapeutic. Thus, we set out to synthesize sorafenib loaded nanoliposomes, characterize them and study their therapeutic effect on in vitro studies (on hepatocarcinoma cell cultures).

**Materials and methods.** In the materials and methods chapter, the process of synthesizing and functionalizing liposomes with Sorafenib was described, later the liposomes were characterized by Raman spectroscopy, which sought to highlight the organization of lipid molecules in the structure of liposomes, respectively the identification of experimental data to confirm the functionalization with sorafenib at the level the lipid bilayer. Three types of samples were measured: blank liposomes, liposomes loaded with Sorafenib, respectively pure Sorafenib. To perform the measurements, the 785 nm laser line was used, the measurements being performed in the spectral range 200-3200  $\text{cm}^{-1}$

This was followed by determination of liposome concentration, size and zeta potential and transmission electron microscopy (TEM) measurements. Finally, we performed experimental cytotoxicity studies on cell cultures. The in vitro experimental studies were carried out on two liver cell lines: a normal line - LX2 - hepatic stellate cells, and a tumor line - SK-HEP-1 - hepatic adenocarcinoma epithelial cells. Cytotoxicity studies with sorafenib, respectively with the synthesized nanoparticles, in order to determine the IC50 concentration, were carried out at 24 and 48 h. After 24 hours from the culturing the plates, the treatment (SOR / Lipo\_SOR) was added in concentrations of 2.5-20  $\mu\text{M}$ . MTT cellular viability assay with an incubation step at 37 ° C for 3 h was performed 24 and 48 h after the application of the treatment. The absorbance was measured using the Spark 10M microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland), and the results were analyzed using GraphPad Prism 6 software.

**Results.** In this study we demonstrated the potential therapeutic effect on hepatocarcinoma through in vitro studies performed on tumor cell lines. As we pointed out, in our study, the inclusion of sorafenib in liposomes allowed the accumulation of the chemotherapeutic agent at the level of tumor cells (the concentration of SOR at 48 h had a value of 8,845  $\mu\text{M}$ , which is almost 4.5 times higher than in the non-encapsulated varinate ) and improved the pharmacokinetics of the chemotherapeutic (IC50 dose at 48 h after treatment with Lipo\_SOR - 1.968  $\mu\text{M}$ , it was almost half of the concentration determined at 24 h - 4.361  $\mu\text{M}$ ). The presence of the two vibrational peaks, assigned to specific vibrations of sorafenib, only in the case of Lipo\_SOR, represents an irrefutable proof of sorafenib incorporation in the liposomal bilayer.

**Conclusions.** Sorafenib-functionalized liposomes were synthesized and were rigorously characterized in order to evaluate the therapeutic effects through in vitro studies on cell cultures. Three hepatic cell lines were selected for these experiments, a normal LX2 cell line and two tumor cell lines, SK-HEP-1 and HepG2, respectively. The physical properties of the liposomes were determined: in the case of simple liposomes, a homogeneous population with dimensions of up to 200 nm was obtained, and in the case of sorafenib-functionalized liposomes, medium-sized populations between 100 and 300 nm were predominant.. The Raman analysis offered interesting nanoscale insights related to the interaction of SOR molecules with the lipids forming the hydrophobic liposomal bilayer. By analyzing the zeta-potential, slightly positive values were determined for both types of samples. SOR, Lipo, and Lipo\_SOR were used for in vitro cell culture experiments, and their effects were evaluated after 24 and 48 h of treatment by the MTT cell viability test. In the case of hepatocarcinoma cell lines, it has been shown that the encapsulation of sorafenib in nanoliposomes leads to a strong decrease in the IC50 values as compared to those obtained in the case of the treatment with pure sorafenib, at both time points of the experiments (24 and 48 h). We consider that a limitation of our study is represented by the absence of a control group of cell lines to have analyzed their viability when exposed only to liposomes, in order to also check their harmful effect per se, without Sorafenib association. A further study will be necessary to strengthen the conclusions.

## Original and innovative contributions of the thesis

The routine use of intraoperative ultrasound in patients with liver tumors may increase the detection rate of new lesions not detected in preoperative imaging. The greatest advantage of using intraoperative ultrasound is in patients with liver metastases, in whom the chance of obtaining R1 resection margins is reduced by this standardized protocol. Future studies are needed to evaluate and reconfirm the role that contrast-enhanced ultrasound can play in the intraoperative protocol.

Radiofrequency ablation of unresectable nonmetastatic pancreatic tumors by surgical approach (laparotomy) is feasible without significant postoperative mortality and morbidity. The results of our initial study indicate that the follow-up survival of this palliative ablative technique is non-inferior to systemic chemotherapy, and further studies in a larger cohort are needed to highlight any advantages on long-term outcomes. Since the intention of our pilot study was to verify the feasibility of the technique and to identify possible advantages/disadvantages, the lack of a control group (patients who benefited from the standard palliative systemic chemotherapy treatment) represents an important limitation regarding the conclusions related to survival, the comparison distance results from our batch being done with the specialized literature.

Sorafenib loaded nanoliposomas is feasible and reproducible. Testing of Sorafenib loaded naoliposomas on HCC cell lines indicated a superior cytostatic potential compared to the use of Sorafenib alone. Starting from these conclusions, the future line of research will aim at the development of a nano-bioconjugate with Sorafenib loaded liposomas, included in the gas of the potential ultrasound contrast agent, together with specific antibodies, and its testing under *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* conditions .

The studies included in the thesis aim to analyze some important elements from the diagnostic and therapeutic field of liver and pancreatic malignant pathology, with the potential to improve immediate and long-term oncological results.