

Az autofágia és a mikroRNS expresszió in vivo és in vitro vizsgálata krónikus nem daganatos és daganatos májbetegségekben

Doktori értekezés

Szekerczés Tímea

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA rendes tagja, professor emerita

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika, Ph.D., Osztályvezető főorvos

Dr. Pápay Judit, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Sági Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Vajda Katalin, Ph.D., főorvos

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

1 Rövidítések jegyzéke.....	4
2 Bevezetés, irodalmi háttér.....	9
2.1 Májbetegségek epidemiológiája.....	9
2.2 A májbetegségek patológiai jellemzői.....	10
2.2.1 Krónikus hepatitis.....	10
2.2.2 A máj primer malignus daganatai.....	12
2.3 Molekuláris vizsgálatok májbetegségekben.....	18
2.3.1 MikroRNS szabályozás.....	19
2.3.2 Autofágia.....	20
3 Célkitűzések.....	26
4 Anyagok és Módszerek.....	28
4.1 Betegek és szövetminták.....	28
4.2 RNS szintű vizsgálatok.....	31
4.2.1 Totál RNS izolálás.....	31
4.2.2 mikroRNS-ek kifejeződésének meghatározása CH, fokális noduláris hiperplázia (FNH), cirrózis, HCC és normál máj mintákban.....	32
4.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	33
4.3.1 Szöveti multiblokk (TMA) készítése.....	33
4.3.2 Immunhisztokémiai reakciók.....	34
4.3.3 Reakciók értékelése, morfometria.....	35
4.4 Sejtenyésztés, in vitro vizsgálatok.....	35
4.4.1 Sejtvonalak, anyagok és kezelések.....	36
4.5 Expressziós vizsgálatok.....	37
4.5.1 Immunfluoreszcens reakciók sejtenyészeteken.....	37
4.5.2 Western Blot analízis.....	38
4.6 Proliferációs aktivitás mérése.....	39

4.7	Statisztikai analízis	40
5	Eredmények.....	41
5.1	A krónikus hepatitis C (CHC) és autoimmun hepatitis (AIH) összehasonlítása az autofágia, mitokondriális tömeg és a mikroRNS expresszió vizsgálata szempontjából... 41	
5.1.1	Immunsztokémiai vizsgálatok és statisztikai eredményeik	41
5.1.2	A miR-224, -155, -101 és -204 expresszióinak vizsgálata	44
5.2	mikroRNS expresszió FNH, cirrózis HCC és nem-daganatos májszövetben	45
5.2.1	Az FNH makroszkópos és mikroszkópos jellemzői	45
5.2.2	A mikroRNA expressziója az FNH-ban, cirrózisban és HCC-ben a nem-daganatos májhoz viszonyítva	46
5.2.3	A mikroRNS expressziója FNH-ban cirrózissal és HCC-vel összehasonlítva	47
5.3	Autofágia és mitokondriumok humán kolangiokarcinóma (CC) és a hepatocelluláris karcinóma (HCC) mintákban.....	48
5.3.1	Immunsztokémiai reakciók értékelése és statisztikai elemzése.....	48
5.3.2	Az autofág és a mitokondriális fehérjék expressziója, valamint a proliferációs aktivitás összefüggései kolangiokarcinómában (CC) és a hepatocelluláris karcinómában (HCC).....	54
5.3.3	A kolangiokarcinóma (CC) és a hepatocelluláris karcinóma (HCC) esetek utánkötése.....	55
5.4	A mitokondriális morfológia és az autofágia vizsgálata in vitro intrahepatikus CC, extrahepatikus CC és HCC eredetű sejtvonalakon	56
5.4.1	Mitokondriális morfológia jellemzése	56
5.4.2	Autofagoszómák vizualizációja fixált sejteken.....	58
5.4.3	Rapamycin hatásának vizsgálata az autofágia folyamatára	59
5.4.4	A kemoterápiás szerek hatása az autofágiára.....	61
6	Megbeszélés	66
7	Következtetések.....	86
8	Összefoglalás.....	88
9	Summary.....	89

10 Irodalomjegyzék.....	90
11 Saját publikációk jegyzéke.....	106
11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	106
11.2 Az értekezés témájától független közlemények	106
12 Köszönetnyilvánítás	108

1 Rövidítések jegyzéke

<i>Rövidítés</i>	<i>Angol nyelven</i>	<i>Magyar nyelven</i>
3-MA	3-methyladenine	3-metiladenin
5-FU	5-Fluoro-uracil	5-Fluoro-uracil
AIH	autoimmune hepatitis	autoimmun hepatitis
AKT	v-akt Mouse Thymoma Viral Oncogene Homolog, serin/treonin kinase	v-akt egér thymoma virális onkogén homológ; szerin/treonin kináz
AMBRA1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	Aktiváló molekula a BECN1 által szabályozott autofágiában
ALD	Alcohol induced chronic hepatitis	alkohol indukálta krónikus hepatitis
ANA	Antinuclear antibody	antinukleáris antitest
anti-SLA	Anti-Soluble-Liver-Antigen autoantibodies	szolúbilis máj antigén elleni antitest
ARE	antioxidans response element	antioxidáns válaszórt felelős terület
ASH	Alcohol induced steatohepatitis	alkohol indukálta szteatohepatitis
ATG	Autophagy-related gene	autofágia-kapcsolt gén
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
BCA	bicinchoninic acid	bicinchininsav
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B-cell lymphoma 2
BilIN	Biliar intraepithelial neplasia	biliáris intraepiteliális neoplázia
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	BCL2 és az adenovírus E1B 19-kDa-kölcsönhatásban lévő protein 3
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	-
CA125	cancer antigen 125	-
CC	cholangiocarcinoma	kolangiokarcinóma
CCl4	Carbon tetrachloride	Szén-tetraklorid
CD34	hematopoietic progenitor cell antigen	Hematopoetikus progenitor sejt antitest
cDNS	complement deoxyribonucleotide acid	Komplementer dezoxiribonukleinsav
CH	chronic hepatitis	krónikus hepatitis
CHC	Hepatitis C induced chronic hepatitis	krónikus hepatitis C
CHILD	Child-Turcotte-Pugh Score	-
CK	cytokeratin	Citokeratin
c-KIT	cellular homolog of the feline sarcoma viral oncogene v-kit	-

<i>c-Met</i>	hepatocyte growth factor receptor	Hepatocita növekedési faktor
<i>CO₂</i>	Carbon dioxide	széndioxid
<i>COX</i>	cyclooxygenase	ciklikus oxigenáz
<i>COX4</i>	Cytochrome c oxidase 4 subunit	Citokróm c oxidáz 4 alegysége
<i>CQ</i>	choloquine	Kloroquin
<i>CYP2E1</i>	Cytochrome P450 2E1	Citokróm P450 2E1
<i>DAA</i>	direct acting antiviral	direkt hatású vírusellenes szer
<i>DAB</i>	3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate	3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid-dihidrát
<i>DAPI</i>	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamino-2-fenil-indol
<i>dCC</i>	Distal cholangiocarcinoma	Disztális kolangiokarcinóma
<i>DMSO</i>	dimethyl sulfoxide	Dimetil-szulfoxid
<i>DNS</i>	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
<i>Drp1</i>	Dynamamin realetd protein 1	mitokondriális szétesést aktiváló fehérjén
<i>DUSP4/5</i>	Dual-specificity protein phosphatase 4/5	Kettős specifitású foszfatáz 4/5
<i>eCC</i>	Extrahepatic cholangiocarcinoma	Extrahepatikus kolangiokarcinóma
<i>ECL</i>	enhanced chemiluminescence	erősített kemilumineszcencia
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	Epidermális növekedési faktor
<i>ER</i>	Endoplasmatic reticulum	endoplazmatikus retikulum
<i>ERBB2</i>	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	-
<i>ETT</i>	Medical Research Council	Egészségügyi Tudományos Tanács
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste homolog 2	-
<i>F</i>	fibrosis	Fibrózis
<i>FBS</i>	fetal bovine serum	fötális borjú savó
<i>FFPE</i>	formalin-fixed, paraffin-embedded	formalinban fixált paraffinba ágyazott
<i>FKBP12</i>	FK506-binding protein of 12 kDa	FK506 kötő fehérje 12 kDa
<i>FNH</i>	Focal nodular hyperplasia	Fokális noduláris hiperplázia
<i>GLOBOCAN</i>	Global Cancer database	Globális Rák Adatbázis
<i>HBV</i>	Hepatitis B virus	Hepatitis B vírus
<i>HCC</i>	Hepatocellular carcinoma	hepatocelluláris karcinóma
<i>HCV</i>	Hepatitis C virus	Hepatitis C vírus
<i>HepPar-1</i>	Hepatocyta paraffin 1	Hepatocita paraffin 1
<i>HRP</i>	horseradish peroxidase	torma peroxidáz
<i>HSC</i>	hepatic stellate cells	Máj csillagsejtjei

HSP70	heat shock proteins	hősokk fehérje 70
IC50	half maximal inhibitory concentration	a kezelések azon koncentrációit, amely 50%-kal gátolja a sejt választ
iCC	Intrahepatic cholangiocarcinoma	intrahepatikus kolangiokarcinóma
IFN	interferon	interferon
IHC score	Immunohistochemistry score	immunhisztokémiai eredmények
IL-6	Interleucin 6	interleukin-6
IPNB	Intraductal papillar neoplasia	intraduktális papilláris neoplázia
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1	Inozitolt igénylő enzim 1
Kat.sz.	Catalog number	katalógus szám
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch szerű ECH asszociált fehérje 1
KRAS	Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	-
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3	Mikrotubullus asszociált protein 1A/1B könnyű lánc 3
Ig	Immunoglobuline	immunglobulin
LIR	LC3-interacting region	Lc3-al kölcsönhatásba lépő régió
LKMI	Liver kidney microsomal type 1 antibody	máj és vese mikroszómális 1. típusú antitest
MAPK	mitogen-activated protein kinase	Mitogén aktivált protein kináz
mCEA	Carcino-embriónal antigen	Karcino-embriónális antigén
MCL1	myeloid leukemia cell differentiation protein	Mieolid leukémia sejt differenciált fehérje 1
MDC	Monodansyl-cadaverin	Monodansil-kadaverin
miR	microRNA	mikroRNS
MMP	Matrix metalloproteinases	Mátrix metalloproteáz
mRNS	messenger-RNA	Hírvivő RNS
mTOR	mammalian target of rapamycin	-
MUC	Mucin	Mucin
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide	Redukált formája a nikotinamid-adenin-dinukleotidnak
NAFLD	Non alcohol induced chronic hepatitis	nem alkohol okozta krónikus hepatitis
NASH	Non alcohol induced steatohepatitis	nem alkohol okozta szteatohepatitis
NIX	BCL2 interacting protein 3 like	Bcl2-vel kölcsönhatásba lépő 3-as fehérje
NK	Natural killer	természetes ölősejtek

<i>Nrf 2</i>	nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Nukleáris eritroid
<i>NS</i>	Non structur	nem szerkezeti
<i>OS</i>	Overall survival	teljes túlélés
<i>p62</i>	Multifunctional 62 kDa intracellular protein (SQSTM1 sequentosome-1)	Multifunkcionális 62 kDa intracelluláris fehérje (SQST1-szekventoszóm 1)
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline	Foszfát pufferelt sóoldat
<i>pCC</i>	Perihilar kolangiokarcinóma	perihiláris kolangiokarcinóma
<i>PDGFR β</i>	Beta platelet-derived growth factor receptor	vérlemezke-eredetű növekedési faktorok β
<i>PERK</i>	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase	Fehérje kináz RNS- szerű endoplazmatikus retikulum kináz
<i>PI3K</i>	Phosphatidyl-inositol 3-kinase	foszfatidil-inozitol 3-kináz
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	Foszfátidilinozitol-4,5-bisfoszfátáz 3-kináz katalitikus alegysége α
<i>Pink1</i>	PTEN induced putative kinase 1	PTEN indukálta putatív kináz 1
<i>PIP3</i>	Phosphatidyl-inositol phosphate	Foszfátidil-inozitol-trifoszfát
<i>PSC</i>	Primary sclerosing cholangitis	primer szklerotizáló kolangitisz
<i>PTEN</i>	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	Foszfátidil-inozitol-trifoszfát 3,4,5-trifoszfát 3 foszfátáz
<i>qPCR</i>	Quantitative polymerase chain reaction	kvantitatív polimeráz lánreakció
<i>r</i>	Correlation coefficient	Korrelációs együttható
<i>RAB5A</i>	RAS related Rab-5A protein	RAS kapcsolatos Rab-5a fehérje
<i>Raf</i>	serine/threonine-specific protein kinases, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma	Szerin/threonin specifikus kináz, (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
<i>Rapa</i>	Rapamycin	Rapamycin
<i>RAS</i>	retrovirus-associated DNA sequences	Retrovírus asszociált DNS szekvencia
<i>REF</i>	Reference number	Refenciaszám
<i>RNS</i>	ribonucleotide acid	Ribonukleinsav
<i>ROS</i>	reactive oxygen species	reaktív oxigén gyökök
<i>SDS</i>	sodium dodecyl sulfate	nátrium-dodecilszulfát
<i>SMA</i>	Smooth muscle antibody	simaizom ellenes antitest
<i>SMAD4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4	-
<i>SRB</i>	Sulfuradamine b	szulfurodamin B

<i>STAT</i>	Signal Transducers and Activators of Transcription	Szignál transzdukáló és transzkripció aktiváló
<i>STMN1</i>	Stathmin 1	-
<i>TBST</i>	tris-buffered saline (TBS) and Polysorbate 20 (Tween20)	Tris pufferelt sóoldat és poliszorbát 20 (Tween 20) keveréke
<i>TCA</i>	Trichloroacetic acid	triklór-ecetsav
<i>TGF β</i>	Transforming growth factor beta	transzformáló növekedése faktor β
<i>TMA</i>	Tissue macroarray	szöveti multiblokk
<i>TNF-α</i>	tumor necrosis factor- α	Tumor nekrozis factor α
<i>TNM</i>	tumor, node, metastasis	tumor, nyirokcsomó, metasztázis
<i>TOM</i>	translocase of the outer membrane	külső membrán transzlokáz
<i>TOMM</i>	translocase of the outer mitochondrial membrane	külső mitokondrium membrán transzlokáz
<i>Tris</i>	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Tris (hidroximetil)-aminometán
<i>TUKEB</i>	Committe of Scientific and Research Ethics	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
<i>UBA</i>	ubiquitin-associated domain	Ubiquitin asszociált domén
<i>ULK</i>	uncoordinated 51-like kinase	Koordinálatlan 51-szerű kináz
<i>USA</i>	United American States	Amerikai Egyesült Államok
<i>UTR</i>	Untranslated region	nem transzlálódó régió
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
<i>WHO</i>	World Health Organization	Egészségügyi Világszervezet
<i>YAP</i>	YES-associated protein	YES asszociált fehérje

2 Bevezetés, irodalmi háttér

2.1 Májbetegségek epidemiológiája

A krónikus májbetegségek a mai napig világszerte jelentős egészségügyi problémát jelentenek, mivel közel 2 millió ember halálát okozzák évente (1). Jelen becslés szerint 75 millió az alkoholos károsodással összefüggő betegek száma, akiknél szintén a krónikus májbetegségek állnak a vezető helyen (1). Továbbá körülbelül 2 millió elhízott, túlsúlyos, valamint 400 millió cukorbeteg ember él a világon, akiknél ez az állapot komoly kockázati tényezőt jelent a nem alkohol okozta krónikus májbetegség (NAFLD) és májrák kialakulása szempontjából. A NAFLD a krónikus májbetegség egyik vezető oka világszerte, Európában a becsült megjelenése a populációban akár 30% is lehet (1, 2). A vírushepatitis globális szintén magas prevalenciát mutat, mivel 2015. évi becslések szerint 257 millió ember krónikus hepatitis B (HBV) és 71 millió ember krónikus hepatitis C vírus (HCV) fertőzéssel él (1, 3). Mortalitást tekintve a WHO adatai alapján a vírushepatitis 1,34 millió halálesetet okozott 2015-ben, amelyből 720 000 főnél cirrózis szövődményei miatt és 470 000 esetben pedig a májrák miatt következett be az elhalálozás (4). Globálisan a 11. leggyakoribb halálok a cirrózis okozta szövődmények, míg a májrák a 16. leggyakoribb haláloknak tekinthető (1).

További problémát jelent, hogy a progresszív májbetegség - etiológiai tényezőtől függetlenül - gyakran tünetmentesen vagy enyhe formában zajlik és így legtöbbször későn, már csak a cirrózis szakaszában diagnosztizálják (5), amely jelentős rizikó faktor mind a hepatocelluláris karcinóma (HCC) mind a kolangiokarcinóma (CC) kialakulása szempontjából (5–7).

A krónikus májbetegség korai felismerése, illetve a progresszióját segítő folyamatok feltárása alapvető jelentőségű a páciens és a népegészségügy szempontjából is. A krónikus májbetegségek patomechanizmusának kutatása fontos információt adhat a májbetegségek, beleértve a májtumorok korai felismeréséhez, a prognózis megítéléséhez, a megfelelő terápia megválasztásához, valamint a kezelés hatékonyságának meghatározásához.

2.2 A májbetegségek patológiai jellemzői

2.2.1 Krónikus hepatitis

A krónikus hepatitis (CH) a máj 6 hónapon túl tartó idült gyulladása. A CH klinikai, hisztológiai megjelenését, a betegség progresszióját és terápiás megközelítését nagymértékben az etiológiája határozza meg.

A krónikus májbetegségek egyik legjelentősebb formája az alkohol okozta krónikus májbetegség (ALD), bár azt nem sorolják a „klasszikus” krónikus hepatitisek közé, külön csoportként kezelik (8). A CH etiológiai csoportjai közé a vírus-eredetű (HBV, HCV), az autoimmun hepatitist (AIH), a toxikus- metabolikus tényezők okozta CH-t és az úgynevezett „idiopatiás”, azaz ismeretlen etiológiájú csoportokat sorolják (3, 9, 10). Röviden azonban áttekintem a krónikus alkoholos májkárosodás legfontosabb jellemzőit, mivel összehasonlításként a CH egyes formáival gyakran felmerül a továbbiakban, bár ez nem képezi az értekezésem tárgyát.

Az alkohol mértéktelen fogyasztása a világ legtöbb régiójában jellemző, így az alkohol okozta károsodás vált a krónikus májbetegség egyik fő okozójává. Az alkohol több ponton károsítja a máj szöveteit. Két fő enzimrendszeren keresztül (mikroszómális CYP2E1, alkohol dehidrogenáz) képes oxidatív lebontással metabolizálni az alkoholt acetaldehiddé, amely toxikus és mutagén a májsejtekre (8). A CYP2E1 indukciója korrelál a NAD/NADH arány megváltozásával, amely csökkentett zsírsav-oxidációt és fokozott zsírsav- és trigliceridszintézist idéz elő. A kilomikronok révén a perifériás zsírkészletekből zsírsav mobilizáció történik a májba, amely ez által szteatotikussá válik (11). A tartósan, bizonyos mennyiség fölött fogyasztott alkoholemennyiség a májkárosodás széles spektrumát idézi elő: a májban szteatózis majd akut gyulladós szteatohepatitis kialakulásához vezet, előrehaladott fibrózist és cirrózist idézve elő, amelynek alapján májrák is kialakulhat (8, 11).

Az alkohol indukálta szteatohepatitis (ASH) megjelenésében nagy hasonlóságot mutat a nem alkohol okozta szteatohepatitishez (NASH) (9), amely a kiváltó tényezőt tekintve multifaktoriális. Az inzulinrezisztencia, valamint az elhízás következtében állandó lipolízis zajlik a zsigeri zsírszövetekből, ennek következtében a vérben megemelkedik a szabad zsírsavak szintje. A hiperinzulinémia hatására a szabad zsírsavak felvétele megnő a májban, amely fokozott triglicerid képzéshez és lerakódáshoz vezet, ezt nevezi a szakirodalom az első

csapásnak („first hit”). A második csapás („second hit”) folyamata során pedig a hepatocitákban az emelkedett szabad zsírsavak mitokondriális β -oxidációt indukálnak, amely oxidatív stresszt és fokozott ROS képzést okoz. A csillagsejtek és Kupffer sejtek aktiválódása endotoxinok és proinflammatorikus citokinek felszabadulásával májfibrózishoz és szteatohepatitis megjelenéshez vezet (12).

A CH kórokai között a vírus indukálta formák a legjelentősebbek, kiemelten a HBV és a HCV fertőzés okozta hepatitis (13). A részlegesen kettős szálú DNS-sel rendelkező HBV vírus integrálódhat a gazdaszervezet DNS-ébe, kromoszómális átrendeződést, valamint fokozott genom instabilitást okozva. (14). A fertőzés során a HBV-X fehérje képes közvetlen módon fokozni a TGF β termelést, amely aktiválja a csillagsejteket és ez fokozhatja a májfibrózist (15). A HBV fertőzéssel ellentétben a HCV fertőzés ugyan enyhébb és hosszabb lefolyású, azonban míg a HBV fertőzések kevesebb, mint 10 %-a, addig a HCV fertőzések mintegy 80 %-a válik krónikussá (13, 16). A HCV egyszálú RNS vírus. Nagy genomi variabilitással rendelkezik, mintegy 7 genotípusa és 67 szubtípusa ismert. A vírusgenom úgynevezett „strukturális” (core, E1, E2) és nem szerkezeti (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) fehérje információt tartalmaz. A HCV nem okoz közvetlen citopátiás hatást a gazdasejtekben, hanem a lipid anyagcserébe és immunválaszba szól bele (17). A HCV mind a lipidek felhalmozódását, mind pedig a lebomlását befolyásolja, megszakítja a lipid metabolizmus normál folyamatát és fokozza a ROS termelést. Krónikus HCV fertőzés esetén a NS5 és az NS3 fehérjékről kimutatták, hogy olyan molekuláris események kaszkádját kezdeményezik, amelyek végül fibrózishoz vezethetnek (15).

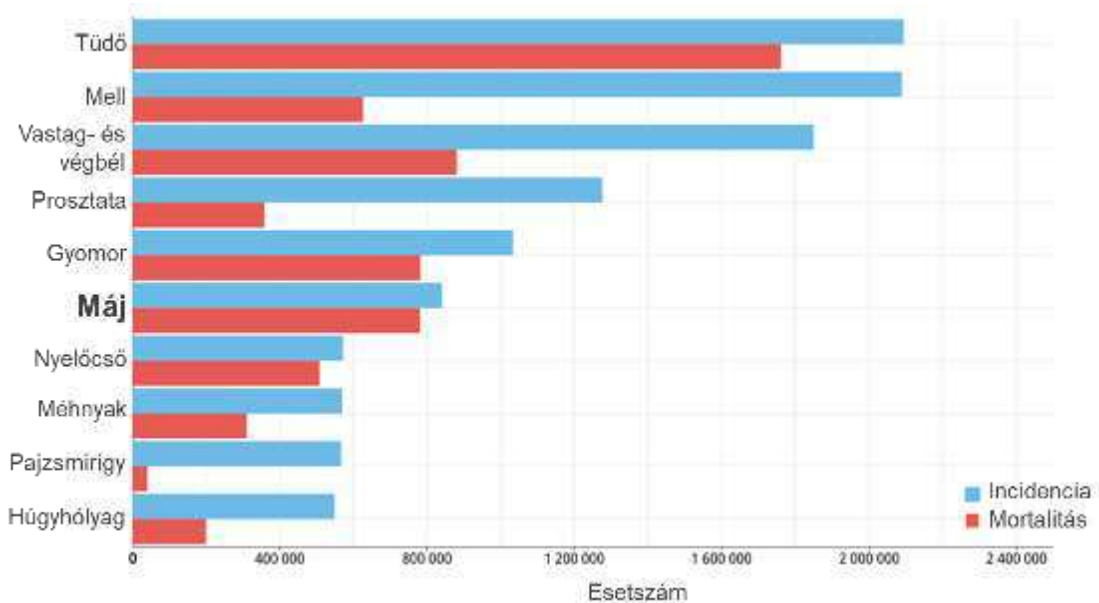
A HBV transzmissziója jelentősen csökkent a HBV elleni vakcináció eredményeként, mely csökkentette a morbiditást és mortalitást (13, 16, 18). A HCV fertőzés kezelését az úgynevezett direkt hatású vírusellenes (DAA) szerek forradalmasították, amelyet 2013-ban vezettek be és a kezelés a fertőzések több, mint 90%-át gyógyította (17).

Az autoimmun eredetű májgyulladások a vírus indukálta formákhoz képest jóval ritkábban fordulnak elő. Az AIH etiológiája nem ismert, jellemzi a májkárosodást okozó aktivált immunsejtek, limfociták, makrofágok, plazmasejtek túlzott jelenléte (10, 19). Az AIH klinikai megjelenése a tünetmentességtől a súlyos állapotig terjedhet, néha akut vírushepatitis tüneteit vagy éppen fulmináns májelégtelenség formáját produkálják (20).

Három féle típusát különítik el a keringő autoantitestek dominanciája alapján. Az 1. típus a leggyakoribb és antinukleáris antitest (ANA), simaizom ellenes antitest (SMA) felszaporodása jellemzi a szérumban. A 2. típus ritkán fordul elő felnőttekben, máj és vese mikroszómális 1. típusú antitest jelenléte (LKM1) jellemzi, amelyhez alacsony IgA-szint társul. A 3. típusra női dominancia és a szolúbilis májantigén elleni antitest (anti-SLA) kimutathatósága jellemző (10). Hisztológiailag többnyire kifejezett gyulladással járó, magas aktivitású krónikus hepatitis látható, nekroinflammációval és „hídképződéssel” („bridging”) (10). Jellemző a plazma sejtekben gazdag mononukleáris beszűrődés, elsősorban a portális és a periportális régiókban, valamint „interface hepatitis”, azaz a határlemez érintettsége, valamint a hepatociták gyakori rozetta-szerű elhelyezkedése (20).

2.2.2 A máj primer malignus daganatai

A GLOBOCAN 2018. évi adatai alapján a máj primer malignus daganata a 6. leggyakrabban diagnosztizált tumor típus és a 4. leggyakoribb halálok világszerte. Évente 841 000 új és 782 000 haláleset regisztrálnak. Az esetek 75-85 %-a HCC, míg a 10-15%-a CC (18). (1. ábra)



1. ábra A 10 leggyakrabban diagnosztizált malignus elváltozás mortalitási és gyakorisági adatai világszerte a GLOBOCAN 2018. évi vizsgálata alapján. A máj primer rosszindulatú elváltozásai az új eseteket megjelenését tekintve a 6. helyen vannak, illetve a 4. leggyakoribb haláloknak tekinthetők (21).

2.2.2.1 Hepatocelluláris Karcinóma (HCC)

A HCC kialakulásának legfontosabb kockázati tényezői a krónikus májbetegségek és a cirrózis, amelyek háttérben vírusfertőzés, alkoholos-toxikus hatás, autoimmun folyamatok és az anyagcserezavar állhat (13). A HCC 2-4-szer gyakrabban fordul elő férfiakban, mint nőkben és megjelenését tekintve nagy földrajzi különbségek észlelhetők, mivel Afrika egyes területein, valamint a Távol-Keleten magasabb az incidenciája (18). A HCC átlagos túlélése 6-20 hónap között mozog és az 5 éves túlélés kevesebb, mint 30 % (13, 22). A HCC kezelés jobb eredményének eléréséhez a korai diagnosztizálás a kulcs. A jelenlegi gyakorlat szerint a cirrotikus májban folyamatosan monitorozzák képalkotó vizsgálatokkal az esetlegesen kialakuló fokális léziókat (22).

Szövettani szempontból a májcirrózist a nodularizáció, az extracelluláris mátrix túlzott lerakódása és fibrotikus kötegek/szeptumok kialakulása jellemzi, többnyire duktuláris reakcióval és változó mértékű gyulladással (23). A fokális noduláris hiperplázia (FNH) szövettani megjelenése nagyon hasonló lehet a cirrózissal, mintegy „fokális cirrózisként” jelenik meg egyébként ép szerkezetű májban. Az FNH patogenezise nem egyértelműen tisztázott. Legtöbb szerző az FNH kialakulása okaként veleszületett vagy szerzett érrendszeri rendellenességeket feltételez (24). Fontos különbség, hogy FNH nem tekinthető premalignus elváltozásnak szemben a cirrózissal, mivel nem malignizálódik (24, 25).

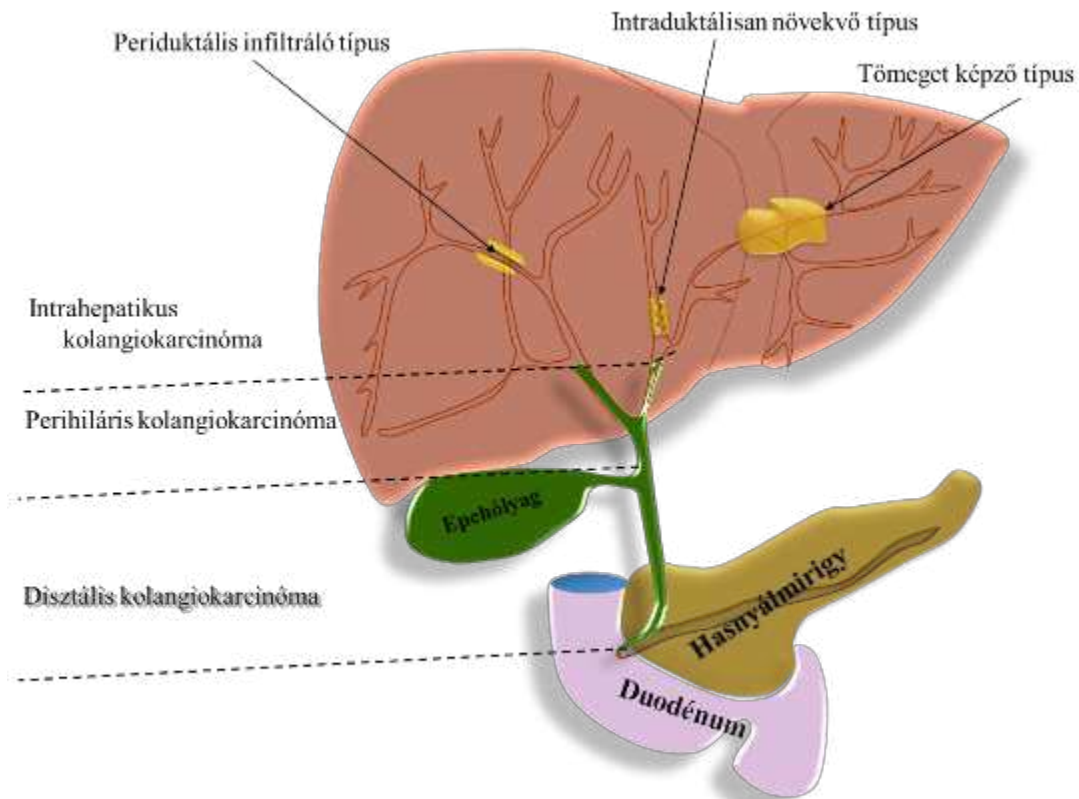
A HCC-t pedig változatos makroszkópos és mikroszkópos kép jellemzi, annak stádiumától (korai vagy előrehaladott), valamint szövettani típusától függően. A prognózis szempontjából a stromális, és/vagy még inkább a vaszkuláris (makro- vagy mikro) invázió jelenléte vagy hiánya jelentős, mely összefüggést mutat a túléléssel (26, 27). Az immunhisztokémiai módszerek segíthetnek a jól differenciált HCC elkülönítésében az adenomától, a fokális noduláris hiperpláziától és a diszplasztikus csomóktól. A Glypikán-3, HSP70 a HCC immunhisztokémiai markerei, az esetek 70-90%-a pozitivitást mutatnak. A CD34 a magasabb fokú diszplasztikus nodulusokban perifériás, fokális festődést mutat, míg a noduláris HCC-ben diffúz, szinuszoid festődés jellemzi. A Glutamin-szintetáz szintén gyakrabban expresszálódik a HCC szöveteiben, mint a premalignus léziókban (27).

A HCC a kezelés tekintetében nagy kihívást jelent a kezelő multidiszciplináris csapatnak, mert a páciensek gyakorta a tünetek csekély volta miatt csak előrehaladott tumorról jelentkeznek. Az 5 éves túlélés leghatékonyabban a kuratív kezeléssel, tumor rezekcióval vagy transzplantációval javítható. (13, 22). Szisztémás kezelés esetében nagy előrehaladást a Sorafenib (Nexavar) bevezetése jelentett. Jelenleg a Sorafenib ajánlott előrehaladott HCC-vel és kóros májfunkcióval rendelkező betegek számára, akiknél nem ajánlott rezekció vagy májátültetés, és nem reagáltak a lokoregionális kezelésekre (13). A Sorafenib, mint multikináz inhibitor blokkolja a Raf fehérjét, valamint a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor β -t (PDGFR β), c-KIT jelátviteli útvonalat, továbbá a tumor angiogenezisét és a tumor sejtek proliferációját. A Sorafenib használatával túlélésben javulást értek el, mivel a Sorafenib-bel kezelt esetek medián túlélése 10,7 hónap volt, míg a placebóval kezelt kontroll csoporté csak 7,9 hónap (13, 26). Bár más tanulmányok megemlítik, hogy a 3 hónap emelkedés nem tekinthető lényeges javulásnak, illetve több esetben is elmaradt a kezelésre adott válasz, amelynek jelenleg prediktív markere nincs (22, 26, 28).

2.2.2.2 Kolangiokarcinóma (CC)

A kolangiokarcinóma a biliáris traktus hámsajtjeiből kiinduló malignus daganat, a máj 2. leggyakoribb primer rosszindulatú daganata (29). A gasztrointesztinális tumorok 3%-át teszi ki (6). Előfordulása alacsonyabb, mint a HCC-é, azonban incidenciája és mortalitása az utóbbi években folyamatos növekedést mutat (27). Globálisan a CC előfordulási és halálozási aránya jelentős földrajzi eltéréseket mutat. Nagyobb az új esetek száma a keleti világ egyes részein (Thaiföld, Kína, Dél-Korea, Japán), mint a nyugati területeken (6). A CC etiológiája multifaktoriális, nagyon sok kockázati tényező hozható összefüggésbe a kialakulásával, melynek egy része a HCC rizikó faktoraival megegyezik. A CC esetek 90%-ában, különösen a nyugati országokban nem ismerik a kialakulási tényezőt, így elsősorban a krónikus gyulladással hozzák összefüggésbe. Az esetek 10%-ában a betegség kialakulását a primer szklerotizáló kolangitiszből (PSC), choledochus cisztából, krónikus HBV és HCV infekcióból vagy cirrózisból eredeztetik (6, 30).

A CC klasszifikációja az elmúlt években változáson ment keresztül. Osztályozása elsősorban az anatómiai lokalizációja alapján történik: intrahepatikus (iCC), perihiláris (pCC) és disztális (dCCA) altípusokba sorolják (2. ábra).

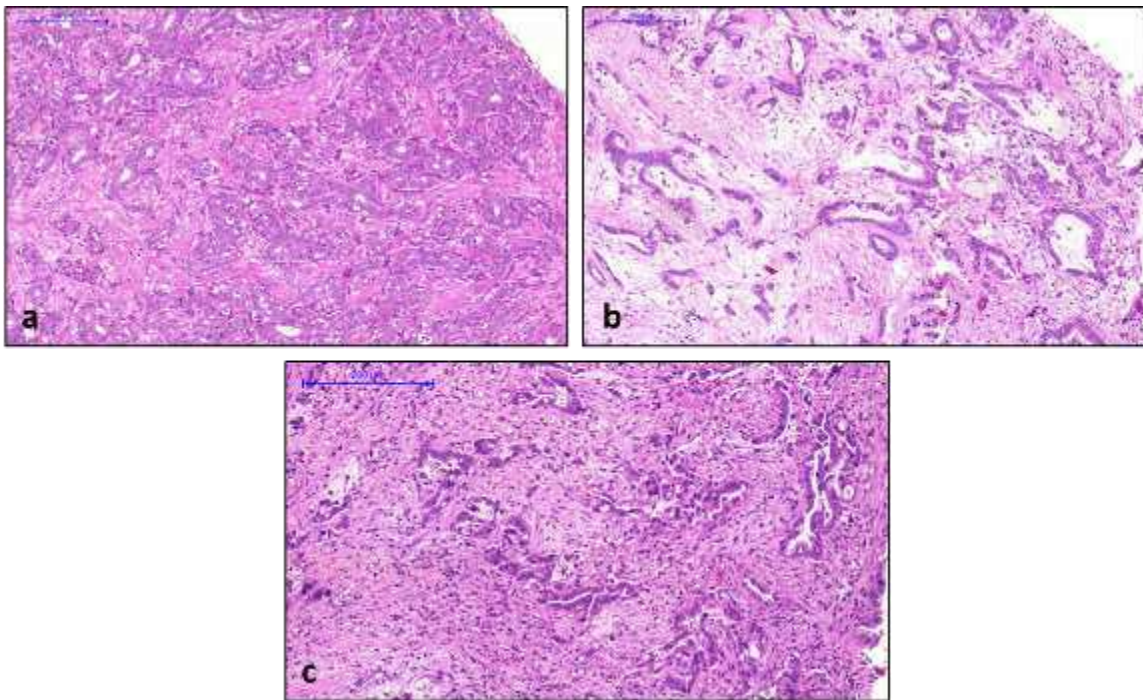


2. ábra A kolangiokarcinóma (CC) klasszifikációja anatómiai lokalizáció szerint. Intrahepatikus (iCC), perihiláris (pCC) és disztális (dCCA) kolangiokarcinómát különítenek el. A iCC három megjelenési formát mutat: tömeget képző, infiltratív-periduktális és az intraduktálisan növekvő típus (29).

A pCC és dCC altípusokat korábban extrahepatikus CC-ként összevontan kezelték, de ma már különálló entitásnak tekintik, melyek a tumorok biológiájában, epidemiológiájában és klinikai megjelenésében is különbséget mutatnak (29, 30). A pCC-ra korábban használt „Klatskin tumor” kifejezés használata csökkenőben van és egyesek szerint nem javasolt. Az iCC makroszkópos megjelenésére 3 forma jellemző: a tömegformáló, periduktális-infiltratív és intraduktális típus (29, 31). (2. ábra)

Hisztológiailag a CC az esetek többségében közepesen differenciált, mirigyes szerkezetű dezmoplasztikus tumor, mely bőséges stromával rendelkezik. Mikroszkóp alatt a

tumor massa centrális része gyakran fibrotikus, míg a proliferáló sejtek a tumor periferiáján helyezkednek el. Mucin tartalma szerint is osztályozzák a CC-kat, mucinózus és kevert típusú CC-t különböztethetünk meg, van azonban olyan tumor, mely „tipikus” adenokarcinóma formában jelentkezik lényeges nyáktermelés nélkül (32). Az egyes altípusok közt mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan is észlelhető eltérés (29, 33). Az pCC és dCC exofitikus és intraduktális morfológiájú, az utóbbi pedig mutathat periduktális vagy noduláris szerkezetet (29). Szövettanilag a pCC és a dCC nagy hasonlóságot mutat az iCC nagy epevezetékekből kiinduló típusával (29, 33). (3. ábra)



3. ábra *Reprezentatív hisztológia képek a tömöttebb struktúrájú (a) intrahepatikus (iCC), lazább stromális szerkezetű (b) perihiláris (pCC) és az angulált mirigyes szerkezetet mutató (c) disztális kolangiokarcinómáról (dCC). A scale bar mérete 200 μ M nagyságú. (saját készítésű képek)*

Az invazív adenokarcinóma kialakulása előtt gyakran látni premalignus elváltozásokat a szövettani mintákban, melyek a biliáris intraepiteliális neoplázia (BilIN) és papilláris növedéket képző intraduktális papilláris neoplázia (IPNB). A BilIN-ban az epeúti sejtek celluláris és nukleáris atípiáját figyelhetjük meg és attól függően, hogy a diszplázia milyen mértéket ölt, megkülönböztetünk alacsony (BilIN-1), közepes (BilIN-2) és magas (BilIN-3) grádusú diszplasztikus léziókat (29, 33, 34).

A CC nagy heterogenitást mutató tumor, diagnosztikája nagy kihívást rejt, amelyben az immunhisztokémiai módszerek segíthetnek. Az iCC HCC-tól való elkülönítését a HepPar-1, Argináz-1, Glutamin szintetáz, Glypikán-3, HSP70 reakciók támogathatják (29, 33). Továbbá a CC esetekre jellemző a claudin 1, 3, 4, 7, occludin sejtkapcsoló fehérjék expressziója, amelyek közül a claudin 3- és 4-et a HCC csak igen alacsony mennyiségben produkálja. Az egyik legnagyobb diagnosztikai kihívás az iCC elkülönítése az intesztinális vagy pankreo-biliáris eredetű adenokarcinómáktól, amelyben CK19, CK20, MUC2, MUC5AC, CA19-9, mCEA, CA125 és a SMAD4 immunreakciók szolgálhatnak segítségként (29).

A CC patogenezisét tekintve általánosságban a folyamat krónikus gyulladással, a részleges epefolyás-elzáródással és az epevezeték-sérüléssel indul. Krónikus gyulladás hatására a kolangiociták és az immunsejtek proinflammatorikus citokineket szekretálnak, (az interleukin-6-ot (IL-6), endotoxinokat, TNF- α -t), valamint növekedési faktorok szabadulnak fel, amelyek a sejtek proliferációját indukálják (30, 35). A tartós IL-6 termelés kulcsszerepet játszik a máj- és az intesztinális gyulladások és a tumorok kialakulásában, elősegítve a mitogén válaszokat és a nitrogén-oxid termelést. Mindez DNS-károsodást és ciklikus oxigenáz (COX)-2-mediált prosztaglandin szekréciót eredményez, amely sejtnövekedést, antiapoptózist és angiogenezist okoz (35). A CC azonban gyulladás hiányában is kialakul, mivel az angiogenezis stimulálása is szerepet játszik a CC fejlődésében és a VEGF-t nagy mennyiségben expresszálják CC sejtek, amely növelni képes a malignus sejtek proliferációját (30, 31). A mai napig számos génről állapították meg, hogy összekapcsolható a kolangiokarcinogenezissel. A KRAS mutációk a CC esetek akár 40%-ában is megtalálhatók, melyek megjelenése a rosszabb prognózissal társul dCC-ban (35). A CC esetek rossz prognózisával a c-Met változásait is összefüggésbe hozták, amelynek a túlzott expressziója a MAPK, PI3K/AKT és STAT útvonalak aktiválásához vezet (29, 31). Továbbá az ERBB2 és az EGFR gének aktivitása is korrelált a kolangiociták malignus transzformációjával, a CC tumorok progressziójával és a rossz túléléssel (30, 31). Fontos megemlíteni, hogy ezek a gének aktivitás-mintázata a CC egyes altípusaiban nagy heterogenitást mutatnak, amiért a CC kialakulásával összeegyeztethető különböző kockázati tényezők lehetnek a felelősek (29, 35).

A CC kezelése hatalmas kihívást jelent a klinikumban, mert a tumor gyors progresszióra képes, és tünetek csak késői stádiumban jelentkeznek. A CC kezelésében a legelőnyösebb a sebészeti megközelítés, azonban ez előrehaladott stádiumban, illetve néha a tumor paraméterei miatt ez nem lehetséges (32, 36).

Az előrehaladott esetekben a palliatív terápia kerül szóba, azonban szignifikáns túlélést csak nagyon ritka esetben tudtak elérni. Az elsők között az 5-Fluoro-uracil (5-FU) alapú szereket alkalmazták, amellyel csak 3,9 hónap javulást tudtak elérni a medián túlélésben (31). Jelenleg klinikai gyakorlatban elsővonalbeli szerként a gemcitabin és cisplatin alapú kemoterápiás kezelést alkalmazzák, azonban így sem haladja meg a medián túlélés a 12 hónapot, valamint a CC esetek 5 éves túlélése kevesebb, mint 5-10% (29, 31). Nincs olyan bevezetett másodvonalbeli palliatív kemoterápia, amelyet a standard kemoterápia kudarca után lehetne alkalmazni, mivel a cisplatin alkalmazása olyan súlyos toxicitással jár, amely korlátozhatja a másodlagos kezelés lehetőségeit (36).

Az újabb kezelési stratégiák kutatására irányuló preklinikai vizsgálatok hangsúlyozzák, hogy figyelembe kellene venni a CC altípusai között mutatkozó nagyfokú heterogenitást. Ígéretes eredményeket mutattak be a tirozin kináz receptor gátlók esetében, bár a Sorafenib terápia hatékonysága az 5-FU kezeléshez hasonlított (31, 36).

A kemoterápia fontos szerepet játszik minden kolangiokarcinómában szenvedő beteg kezelésében, ám a kezelés során gyakran fellép rezisztencia. A hagyományos terápiás lehetőségek nem befolyásolják szignifikánsan a hosszabbtávú túlélést, továbbra is magas a kiújulási arány és a korai áttétek megjelenése. Ezért lenne fontos megérteni a CC daganatok kialakulásának alapját, progresszióját és a kezelésekkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős molekuláris biológiai mechanizmusokat, amelyek elősegíthetik az új diagnosztikai és terápiás lehetőségeket (30, 36).

2.3 Molekuláris vizsgálatok májbetegségekben

A krónikus hepatitis és a máj daganatos elváltozásait vizsgáló kutatások kiegészültek a betegségek molekuláris mechanizmusainak analízisével. A közelmúltbeli előrelépések ellenére a májbetegségek megelőzésének, illetve kezelésének farmakológiai stratégiái továbbra is korlátozottak, ezért hangsúlyozzák az elváltozások patogenezisének alapjául szolgáló molekuláris mechanizmusok mélyebb megértésének szükségességét (37). Az utóbbi

években számos tanulmány született a mikroRNS-ek expressziójának és az autofágia folyamatának fontosságáról a májbetegségekben, mivel széles spektrumban képesek befolyásolni egyes biológiai folyamatokat, beleértve a proliferációt, differenciálódást, gyulladást, apoptózist, vírus fertőzést (38). A következőkben az általunk vizsgált mikroRNS szabályzás és az autofágia folyamatával foglalkozunk.

2.3.1 MikroRNS szabályozás

MikroRNS-ek olyan kis (18-25 nukleotid hosszúságú) RNS-molekulák, amelyek fehérjét nem kódolnak, de a messengerRNS (mRNS) molekula 3' UTR (untranslated region) részéhez kötődve befolyásolják az adott mRNS transzlációját, vagyis a mikroRNS-ek a génexpresszió poszttranszkripció szintű negatív regulátorainak tekinthetők (38). Ritkábban, indirekt módon pozitív szabályzóként is szerepelhetnek. Például a miR-26a közvetlen célpontjai a két MAPK inhibitor (DUSP 4/5), amelyek gátlásával képes a miR-26a fokozni a citoprotektív, autofágia folyamatát, amellyel az etanol okozta májkárosodást képes csökkenteni (39).

A mikroRNS és az mRNS interakció kialakulásának egyik alapvető feltétel az, hogy a mikroRNS teljes komplementer módon körülbelül 7 nukleotid hosszú mag régiójának kapcsolódnia kell a targettel. Egy mikroRNS számos targetre kifejthet hatást, és egy target akár több mikroRNS szabályozása alatt állhat (38, 40). Jelenleg még nem teljesen tisztázott a kérdés, hogy az egyes mikroRNS-ek a számos target közül melyik target felé mutatnak nagyobb affinitást.

Több kutatócsoport aberráns mikroRNS expressziós mintázatot észlelt HBV és HCV infekció, fibrózis és cirrózis során. A tanulmányok igazolták, hogy a mikroRNS-ek epigenetikai szabályozás révén fontos szerepet játszanak a máj fejlődésében, a homeosztázisban, a regenerációban és a májbetegségek patogenezisében is (38).

A májbetegségek kapcsán fokozott miR-155 expressziót mutattak ki a hepatocitákban és a gyulladást okozó sejtekben, például a monocitákban, a NK sejtekben és a makrofágokban (37). Emelkedett miR-155 szintet detektáltak CHC-ben és az ALD-ben, amelyekben fokozta a sejtek növekedését, és az epiteliális-mezenchimális átmenetet a máj karcinogenezisében (41–43).

Érdemes megjegyezni, hogy egyes molekuláris mechanizmusok is képesek hatást gyakorolni a mikroRNS expressziójára. Kimutatták, hogy miR-224 expressziója fordítottan korrelált az autofágia aktivitásával a HBV indukálta HCC-ben. A tanulmányban feltárták, hogy az autofágia képes közvetíteni a miR-224 degradációját, ezáltal fokozni a tumor szupresszióját (44). Mások igazolták, hogy a HBV, a STAT3 útvonal aktiválásával, képes gátolni a miR-204 expressziót, így visszaszorítani a sejt védekező mechanizmusát a HBV infekcióval szemben (45).

Ahogy a példák is mutatják a mikroRNS-ek kiemelt jelentőséggel bírnak mind a máj fiziológiás, mind a kóros állapotaiban, így a krónikus májbetegségek patogenezisében is. Az eltérő expressziós mintázatuk akár összefüggést is mutathat a májbetegség etiológiájával (38, 46). Az ismert, hogy szabályozásuk elősegítheti a májbetegség progressziójának celluláris és molekuláris működését (46), így a kulcsfontosságú autofág effektor molekulák kifejeződésére is hatással lehetnek. Az autofágia mikroRNS-ek általi ellenőrzése és az autofágia folyamatának hatása a mikroRNS-ek biológiájára még rejt megválaszolatlan kérdéseket (38).

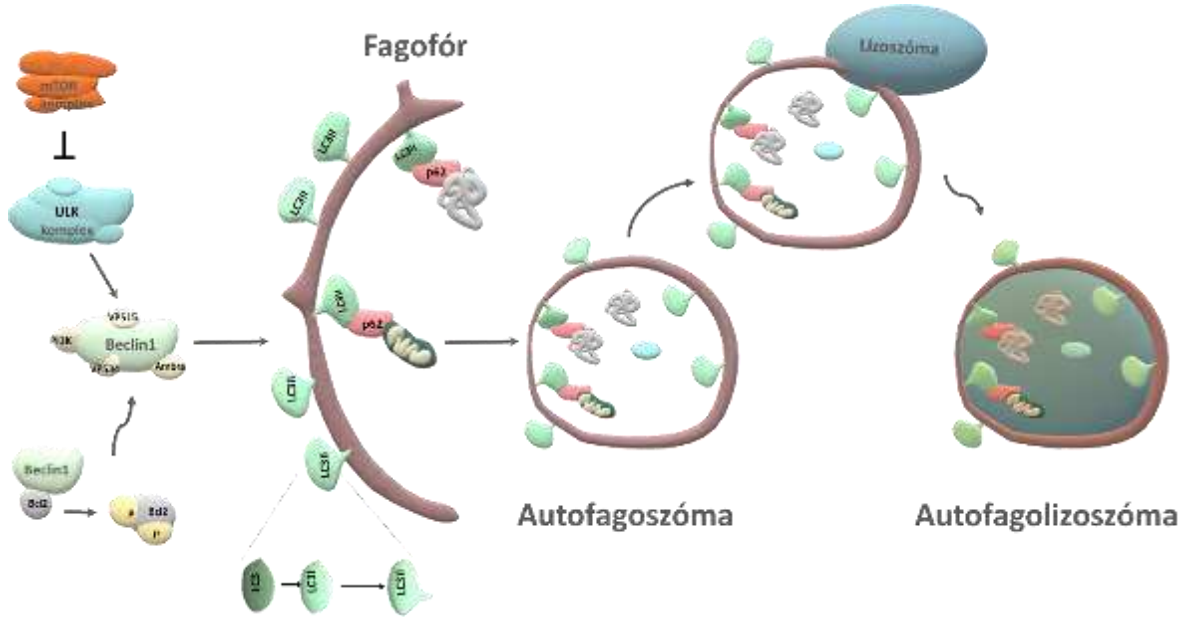
2.3.2 Autofágia

Az autofágia szigorúan szabályozott, evolúciósan konzervált, katabolikus folyamat, amely felelős az intracelluláris térben jelen levő elöregedett, meghibásodott, vagy épp nem funkcionáló sejtorganelleumok, fehérjék és egyéb molekulák lebontásáért (17, 47). Fiziológiás körülmények között fenntartja az egyensúlyt a sejtet felépítő anyagok szintézise, lebomlása és újrahasznosítása között, ezzel támogatva a sejt növekedését és fejlődését. A sejt túlélése céljából az autofágia részt vesz az intracelluláris mikrobák, vírusok eliminációjában és az antigén prezentációban, így védve a sejtet a stresszt kiváltó tényezőkkel szemben (48, 49).

Három fő formája van: a chaperon mediált, a mikro- és a makroautofágia. Közös jellemzőjük, hogy a katalitikus komponensük a lizoszóma, melynek savas hidrolázai biztosítják a degradációt. A különböző formák tulajdonképpen a lebontásra ítélt anyagok lizoszómába juttatásának mechanizmusában térnek el. A legtöbbet vizsgált és legjobban ismert típus a makroautofágia, amelyet a szakirodalom általánosságban csak autofágiaként emleget (47).

2.3.2.1 Morfológiai jellemzés és molekuláris mechanizmus

Az autofágia folyamat kezdeti lépéseként a lebontandó anyagok körül a citoplazmában egy izolációs, lipid kettős membrán jön létre, amelyet fagofórnak neveznek (49). (4. ábra)



4. ábra Az autofágia molekuláris mechanizmusa (saját készítésű ábra)

Külső ingerek hatására a kezdeti lépésben a Beclin1 fehérje disszociál a Bcl-2, antiapoptotikus fehérjével alkotott kötéséből, így az aktivált ULK komplex aktiválni képes a Beclin1 PI3K-al alkotott komplexét. A Beclin1 állványként szolgál a PI3K komplex számára, amely egy foszfatidil-inozitol 3-kináz és működése során a kettős membránon hozza létre foszfatidil-inozitol-trifoszfátot (PIP3), amelyen keresztül horgonyzódnak ki a folyamathoz szükséges fehérjék (17). Többek között az LC3 fehérje is, amely a membrán külső-belső oldalához kapcsolódik. A kialakuló autofagoszóma felületén az ATG 4 általi proteolitikus hasítás révén és a foszfatidil-etanol-aminnal történő konjugálás követően alakul ki az LC3 I formájából az aktív lipidált LC3 II forma (49). Eközben a p62 képes felismerni és UBA doménjének köszönhetően megkötni a lebontásra szánt anyagokat és azokat a fagofór belsejébe irányítani, ahol a LIR (LC3-interacting region) motívumának segítségével a LC3 II fehérjéhez kötődik. A lebontandó aggregátumok körül záródik az autofagoszóma, amely aztán lizoszómával olvad össze. Ennek során a belső membrán által határolt vezikulum a benne levő tartalommal együtt hidrolitikus enzimek által lebontásra kerül (35, 49).

Az autofágia értékelésének leggyakoribb morfológiai megközelítése az elektronmikroszkópia, amelynek felbontása révén direkt módon vizsgálható a fagofór, az autofagoszóma és az autofagolizoszóma ultrastruktúrája (50, 51). A folyamat teljes egészének molekuláris szempontból való vizsgálata a főbb autofág fehérjék (Beclin1, LC3, p62) expressziós szintjének meghatározásával történik (50). Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban APAP kezelés hatására mutatta be egér máj mintákon, hogy az elektronmikroszkóp segítségével detektált autofágvakuólum megjelenése és az immunhisztokémiailag detektál Beclin1, LC3 és p62 hogyan viszonyul egymáshoz (52).

Az autofágia a ROS elleni védekezésben is szerepet játszik, amelyben a p62 fehérjének van jelentős funkciója, mert KIR doménja segítségével megköti a Keap1 fehérjét, amely egy intracelluláris ROS szenzor. Normál körülmények között a Keap1 negatívan szabályozza a Nrf2 expresszióját azáltal, hogy elősegíti annak ubiquitinációját. Az oxidatív stressz hatására azonban megnő a sejtekben a ROS koncentráció, a Keap1 disszociál Nrf2-ről és a p62 fehérjéhez kötődik. Ez elősegíti az Nrf2 sejtmagba való transzportját, ahol képes aktiválni a promóterükben ARE (antioxidant response element) szekvenciát tartalmazó gének transzkripcióját, melyek a sejtek oxidatív stressz elleni védelmét segítik. Ezenkívül a p62 fehérje képes növelni a Nrf2 aktivációját, a p62-Keap1 kölcsönhatásnak köszönhetően a Keap1 fehérjét autofágiás lebontásra ítélni (53, 54).

A túlzott ROS termelés egyik fő forrása a sérült, elöregedett mitokondriumok is lehetnek (55). A sérült mitokondriumok eltávolítása szintén az autofágián, vagyis annak egyik formáján a mitofágián keresztül zajlik, de a folyamat ebben az esetben előkészítő lépéseket is igényel. (56). A mitokondriumok összefüggő hálózatokat alkotnak és az ATP előállításának fő helyszínei. A hálózat morfológiája képes meghatározni az autofágia sejtválaszt is, mivel a hosszúkás mitokondriumok megóvásra kerülnek az autofágiás lebontástól, hogy fenntartsák a fokozott ATP termelést. A sérült mitokondriumok hálózata azonban fragmentálódik a lebontás előtt, mert a „feldarabolódás” szignálként szolgál a mitofágia számára (57). A mitokondriumok alapozása a Pink1-Parkin fehérjéken, vagy a Nix és Bnip3 mitofág receptorokon keresztül történik (58).

Az autofágia hiánya vagy károsodása kapcsán a diszfunkcionális mitokondriumok a ROS és az oxidatív stressz által súlyos sejtkárosodást, gyulladást, onkogén mutációkat és

malignus transzformációt indukálnak (59). Ezért többen hangsúlyozták a sérült mitokondriumok és a mitofágia detektálásának jelentőségét, amellyel információt szolgáltathatnak egyes betegségek állapotáról (60). A fentiekből következik, hogy a mitokondriumok eliminálása többlépcsős, összetett folyamat eredménye, amelyet egyetlen paraméterrel vizsgálni nem lehet. Számos tanulmányban indirekt módszerként a mitokondriális massa/tömeg vizsgálatából és a mitofágia folyamatának együttes analiziséből következtetnek a mitokondriális hálózat állapotára (52, 60), amelyet kiegészítenek a mitokondriális energiatermelés ellenőrzésével, az oxidatív foszforiláció markereinek detektálásával (61, 62).

A mitokondriális tömeg detektálására a mitokondriális külső membránon elhelyezkedő TOMM20 fehérje is használható. A receptor a TOM komplex része és feladata a citoszolban keletkező mitokondriális pre-proteinek felismerése és a komplex többi fehérjével együtt mitokondrium hálózatba juttatása. A TOMM20 expressziója a sejtben az elérhető teljes mitokondriális hálózatot, az aktív és a sérült mitokondriumokat együttesen prezentálja. Egyes vizsgálatokban expressziós szintje összefüggést mutatott a mitofágiával. (52, 60, 63).

2.3.2.2 Az autofágia klinikai jelentősége

Az autofágia változatos funkciói, valamint a máj sejt típusaira jellemző egyedi tulajdonságai arra utalnak, hogy a máj normál működése és a betegségek megelőzése erősen függ az autofágiától (48). Így az autofágia megváltozása fontos szerepet játszik, a májbetegségek patogenezisében is (64). Az autofágia által a lizoszómák a lipidcseppeket zsírsavakra bontják normál körülmények között. Az autofágia markerek csökkenése viszont hozzájárul a szteatotikus májszövet kialakulásához, amelyet NAFLD-ben és NASH-ben írtak le (59). Ezért az autofágia aktiválása a májsejtekben terápiás megközelítést jelenthet, melyet igazol, hogy az ATG7 túlzott expressziója magas zsírtartalmú étrenddel táplált egerekben javította a zsíros máj állapotát és az inzulinrezisztencia mértékét (12)

Az autofágia felhasználható az intracelluláris mikrobiális kórokozók eltávolítására xenofágia révén a sejtekben. Számos patogén vírus, köztük a HBV és a HCV is, olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki, amellyel saját replikációjuk támogatására használják fel az autofágiát (65). A HBV-vel ellentétben a HCV az autofágiát nem csak a replikációjához,

hanem a vírus partikulumok összeszereléséhez, a fertőzés lefolytatásához, a veleszületett immunválasz elkerüléséhez és krónikus fertőzés esetén pedig a fertőzött sejtek túléléséhez és fenntartásához is felhasználja (17, 65).

Az alkohol indukálta, metabolikus eredetű és vírushepatitisben az autofágia vizsgálata hozzájárult a patogenezisük mélyebb megértéséhez (12, 38), míg az ismeretlen etiológiájú AIH esetén az autofágiára vonatkozó ismeretek korlátozottak (66).

Az autofágia csökkenése a májszövet károsodását okozza ALD-ben, amely szteatohepatitist és HCC-t eredményezhet. A HCV fertőzés esetén a megnövekedett autofágia támogatja a vírus replikációját és a krónikus fertőzés talaján alakul ki a HCC (38, 64). Így az autofágia kettős szerepe, az elmúlt évek vizsgálatai szerint más daganatokhoz hasonlóan, májtumorok esetében is fellelhető (38). A HCC-ben az autofágia hiányosságai olyan károsodott makromolekulák és organelák felhalmozódásához vezetnek, amelyek megbontják a sejtek egyensúlyát. A malignus transzformáció során az autofágia citoprotektív folyamatként, főképp tumorszuppressorként működik, csökkentve a sejteket károsító stresszt. Az autofágia tumor promóterként is funkcionálhat olyan HCC tumorokban, ahol szélsőséges környezeti viszonyok (korlátozott tápanyagszint, magas energiaigény) jellemzőek. Ekkor az autofágiát adaptív sejtválasznak tekintik, mert a tumorsejt a túlélést próbálja biztosítani a folyamattal (35, 38, 48). Egyesek szerint, ha az autofágia támogatja a rákos sejtek túlélését, akkor hozzájárulhat az áttétek és a kemoterápiás rezisztencia kialakulásához is HCC-ben (67).

CC esetében a krónikus gyulladást tekintik a malignus transzformáció egyik fő kockázati tényezőjének (6). A CC karcinogenezise során a gyulladást szabályozó jelátviteli útvonalak közül számos ismert, mint autofágia szabályozója (például IL-6). A kolangiociták onkogén transzformációja korrelál az IL-6 tartós expressziójával, ami csökkent autofágiát eredményezhet STAT3 útvonalon és Beclin1-Bcl2 gátláson keresztül, valamint fokozott ROS termelést és mitokondriális károsodás produkálhat (35). A különböző szignáltranszdukciós pályák és CC kapcsolatának a vizsgálatok tették azt a felfedezést is, mely szerint a PI3K/AKT/mTOR tengely hibás működése is befolyásolhatja a CC kialakulását, amely az autofágia egyik fő negatív szabályozója. Az eddig feltárt irodalmi adatok azt sugallják, hogy az autofágia fontos szerepet játszhat a CC patomechanizmusában

és stresszes körülmények között adaptív mechanizmusként is viselkedhet CC-ban, a HCC-hoz hasonlóan. Azonban ugyanezen publikációk hangsúlyozzák azt is, hogy az autofágia pontos szerepének megértéséhez a CC patogenezisében és progressziójában mindenképp további vizsgálatok szükségesek (35).

3 Célkitűzések

A fenti irodalmi áttekintés rávilágított a májbetegségek jelentőségére epidemiológiai szempontból, valamint a diagnosztika és a terápia problémáira. A molekuláris mechanizmusok megismerése mind a krónikus májbetegségek, mind a májdaganatok területén új távlatokat nyitott, nemcsak elméleti síkon, hanem ezen betegségek jobb felismerése és kezelhetősége szempontjából is. Ezen ismeretek figyelembevételével fogalmaztuk meg célkitűzéseinket, melyek a krónikus májbetegségek, ezen belül a krónikus hepatitis különböző formáinak, így a CHC és az AIH, valamint egyes jó (FNH) és rosszindulatú (HCC, CC) májdaganatok molekuláris alapjainak jobb megismerését célozta. A közös összekötő kapocs ezen nem-daganatos és daganatos kórképek között az autofágia és a mikroRNS expresszió szabályzásának jobb megismerése volt.

Munkánk kiindulását emberi anyag – biopsziás minták és sebészi rezekátumok – képezték. Az ezeken tett ismereteink sarkaltak további in vitro vizsgálatokra CC és HCC-eredetű sejtvonalakon, melyekkel az autofágia és mikroRNS szabályzás, valamint terápiás válasz jobb megismerést céloztuk.

A fenti szempontok alapján a **célkitűzésünk** során **a következő kérdésekre** kerestük a választ:

1. Az autofágia, a mitokondriális tömeg és a mikroRNS expresszió különbözik-e a különböző etiológiájú CH-ben – így a CHC és AIH-ben - és az összefügg-e a szteatózissal, a fibrózis stádiumával és a nekroinflammáció fokozatával?
2. Van-e különbség a mikroRNS expresszióban a nem-tumoros, premalignus, benignus és malignus májelváltozások között és igazolható-e jellegzetes mintázat az egyes elváltozásokban?
3. Az egyes autofág fehérjék expressziója különbözik-e a humán CC és HCC esetén és van-e változás a környező nem-daganatos májhoz viszonyítva? A változás összefügg-e detektálható mitokondriális diszfunkcióval?

4. Az autofág markerek és mitokondriális fehérjék jellemzik-e a különböző anatómiai kiindulású CC-t, az újabb felosztást követve (iCC, pCC, dCC) és a tumor differenciáltsági fokát, valamint tükrözik-e az eltérő patogenezist?
5. Van-e összefüggés a betegek túlélése és a vizsgált autofág fehérjék expressziója között CC és HCC esetén?
6. Mutatkozik-e eltérés *in vitro* iCC, eCC és HCC eredetű sejtvonalak mitokondriális morfológiája és a fluoreszcensen jelölt autofagoszómáiban?
7. Indukálható-e és van-e különbség az autofágia Rapamycinnel vagy kemoterápiás szerekkel való indukciójában a különböző eredetű sejtvonalakban?
8. Befolyásolható-e autofág-inhibitor alkalmazásával az egyes sejtvonalak kezelésre adott proliferációs válasza?

4 Anyagok és Módszerek

4.1 Betegek és szövetminták

Vizsgálatainkhoz összesen 279 db formalinnal fixált paraffinba ágyazott (FFPE) sebészeti rezekátum, valamint máj tübiopsziás anyagot választottunk ki a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézet és II. számú Patológiai Intézet archívumából. Az elemzéseket retrospektív módon végeztük és az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) TUKEB (Tudományos és Kutatásetikai Bizottság) engedélyével (45727-2/2013/EKU).

Az elemzett 63 tübiopsziás mintából a diagnózis 45 esetben krónikus hepatitis C (CHC), 18 esetben autoimmun hepatitis (AIH) volt. Az esetek klinikopatológiai jellemzőjüket a 1. táblázatban összesítettem.

1. táblázat A krónikus hepatitis diagnózisú minták klinikopatológiai adatai

Jellemzők	Etiológiai alcsoportok	
	CHC (n=45)	AIH (n=18)
Átlagéletkor	48,88	43,4
Nem (férfi/nő)	31/14	5/13
Szteatózisz		
negatív (0 = 5% alatti)	12	14
gyenge (1 = 5-33%)	14	2
közepes (2 = 34-66%)	14	2
magas (3 = 66% feletti)	5	0
Fibrózis stádium (F)		
F1	18	3
F2 (F1-F2)	13 (31)	4 (7)
F3	3	10
F4 (F3-F4)	11 (14)	1 (11)
Nekroinflammációs osztályozás		
Gyenge (6 alatti)	25	4
Közepes (7-12)	18	3
Súlyos (13-18)	2	11

(CHC: Hepatitis C, AIH: Autoimmun hepatitis)

A krónikus hepatitis minták esetében a mintavétel minden esetben diagnosztikai céllal történt, a betegek kezelésének megkezdése előtt. A kiválasztás során kizártuk a vegyes etiológiájú, az alkohol, a HBV vagy más vírusfertőzés indukálta, a metabolikus vagy daganatos májbetegségben szenvedők anyagait, valamint az előrehaladott cirrózist mutató, illetve gyógyszeres kezelésen átesett pácienseket. A krónikus hepatitises betegek életkora 18 – 73 év között volt, az átlagéletkor a CHC-ben 48,8 év, míg AIH-ben 43,4. A nemek aránya a CHC csoportban 31 férfi és 14 nő, AIH diagnózis esetében pedig 5 férfi és 13 nő. Patológus szakorvos bevonásával a fibrózis, szteatózis és a nekroinflammációt is újraértékeltek. A fibrózis mértékét METAVIR score szerint adtuk meg F0-F4-ig (68), amely értékelést felosztottunk alacsony (F1-2) és magasabb (F3-4) fibrózist mutató kategóriákra a további elemzések során. A nekroinflammációt az Ishak által módosított Knodell hisztológiai aktivitási index szerint 0-18-ig értékeltek (69), amelyet felosztottunk gyenge (6 alatti), közepes (7-12) és súlyos (13-18) grádusú csoportokra. A zsír mennyiségét százalékosan határoztuk meg, amelyet a következőképpen csoportosítottunk: 5% alatti negatív, 5-33% közötti gyenge, 34-66% közötti közepes és 66% feletti magas zsírlerakódás (70).

A mikroRNS expresszió vizsgálatához 22 FNH, 45 cirrózis és 24 HCC, valamint 15 nem daganatos májmintát gyűjtöttünk ki az archívumból. A májcirrózis mintáink 30 HCV fertőzés indukálta cirrózisból és 15 pedig HCC-t körülvevő cirrózisból származtak. A 30 májcirrózis minták olyan betegekből származtak, akik orthotopikus májtranszplantáción estek át, vaszkuláris és/vagy parenhimális dekompenzált cirrózis miatt. Az összes beteg életkora 23 és 82 év között volt, az átlag életkor pedig 49,5 év volt. A betegek klinikopatológiai összefoglalását a 2. táblázat mutatja. Az összes HCC eset cirrotikus májból alakult ki, és a szövettani osztályozás szerint az alacsony/magas differenciáltsági fok aránya 14/10 volt. A cirrotikus és a HCC esetekben az etiológia HCV-fertőzés, alkoholfogyasztás vagy a kettő kombinációja volt. 28 HCV-fertőzött beteg részesült antivirális kezelésben; 8 cirrózis esetén a romlott egészségi állapot miatt nem lehetett megkezdeni a kezelést, 5 esetben pedig a kezeléssel kapcsolatos információkat nem ismertük.

2. táblázat Cirrózis, HCC és FNH esetek klinikopatológiai összefoglalása

(nössz: 91)

	Cirrózis	HCC	FNH
Esetek száma:	45	24	22
Nem			
Férfi	31	20	1
Női	14	4	21
Átlagos életkor:	53,1	61,5	37,2
(minimum-maximum)	(27-81)	(42-82)	(23-66)
Etiológia:			
HCV fertőzés	27	8	
HCV fertőzés + alkohol	5	1	
Alkohol bevitel	9	6	
Ismeretlen	4	9	
Antivirális HCV kezelés:			
Kapott	21	7	
Nem kapott	8		
Ismeretlen	3	2	
Végstádiumú cirrózis jellemzői:			
CHILD A	6		
CHILD B	16		
CHILD C	8		
ascites	14		
HCC:			
Alacsony differenciáltsági fokú		14	
Magas differenciáltsági fokú		10	

HCC - hepatocelluláris karcinóma, FNH - fokális noduláris hiperplázia,

HCV hepatitis C vírus, CHILD - Child-Turcotte-Pugh Score

A szöveti multiblokkok (TMA) készítéséhez összesen 70 kolangiokarcinóma (CC) és 31 CC körüli nem tumoros májszövetet és 9 hepatocelluláris karcinóma (HCC) mintát gyűjtöttünk ki a 2007-2015 közötti évekből. A betegek nem részesültek kemo-, illetve radioterápiában a műtét előtt, valamint más daganatos megbetegedést nem diagnosztizáltak a pácienseknél. A tumor mintákat a 2017. január 1.-én megjelent 8. TNM rendszer alapján két patológus szakorvos bevonásával értékeltük újra. Az CC szövetmintákat a ma használt

klasszifikációnak megfelelően intrahepatikus, perihiláris és disztális kategóriákra osztottuk. A vizsgált sebészeti rezekátumok klinikopatológiai jellemzőit a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat A TMA készítéséhez felhasznált sebészetileg eltávolított tumoros minták klinikopatológiai jellemzői

Jellemzők	iCC (n=28)	eCC (n=42)		HCC (n=9)
		pCC (n=19)	dCC (n=23)	
Nemek aránya (férfi/nő)	7/21	10/9	12/11	8/1
Átlagéletkor (évek)	60,45	64,25	65,91	64,23
Medián teljes túlélési idő (hónap)	20,67	7,27	14,9	87,9
A környező nem tumoros minta	10	10	11	0
Differenciáltsági foka (Grade)				
I	6	5	3	1
II	15	9	12	6
III	7	5	8	1
IV	0	0	0	1
Stádiuma (8. TNM alapján)				
	IA (6) IB (6) II (10) IIIB (1) IV (5)	I (1) II (10) IIIA (1) IIIB (1) IIIC (6)	IIA (6) IIB (16) IIIB (6)	IB (3) II (4) IIIA(1) IVB(1)

(iCC: intrahepatikus kolangiokarcinóma; eCC: extrahepatikus kolangiokarcinóma; pCC: perihiláris kolangiokarcinóma; dCC disztális kolangiokarcinóma; HCC: hepatocelluláris karcinóma)

4.2 RNS szintű vizsgálatok

4.2.1 Totál RNS izolálás

A mikroRNS kifejeződésének meghatározásához a szövetmintákból totál RNS izolálást végeztünk. A biopsziás mintákat patológus szakorvos ismételt ellenőrizte a diagnózis pontossága szempontjából. A teljes RNS izolálás 3×5 µm vastag mintából a RNeasy FFPE kit (Kat.sz.: 73504; Qiagen, Venlo, Németország) segítségével a gyártó által

javasolt utasítások szerint, mikroRNS-re optimalizált módon történt. A genomiális DNS szennyeződés eltávolítását Turbo DNA-Free kit-tel végeztük a gyártó protokollja szerint (Kat.sz.: AM1907; Ambion by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA). Az izolált totál RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Life Technologies; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével mértük meg, és a RNS mintákat felhasználásukig - 80 °C-on tároltuk.

4.2.2 mikroRNS-ek kifejeződésének meghatározása CH, fokális noduláris hiperplázia (FNH), cirrózis, HCC és normál máj mintákban

A mikroRNS-ek expresszióját TaqMan MicroRNA Assay-vel Life Technologies; Thermo Fisher Scientific Inc.), valós idejű PCR-en alapuló módszerrel határoztuk meg. A vizsgálatainkhoz használt mikroRNS-ek listája a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat A kiválasztott mikroRNS-ek listája

A CHC és AIH esetek vizsgálatához	
Azonosító	mikroRNS
002099	hsa-miR-224-5p
002253	hsa-miR-101-3p
002623	hsa-miR-155-5p
000508	hsa-miR-204-5p
001187	hsa-miR-140-3p
001093	RNU6B
Az FNH, cirrózis, HCC és normál máj minták vizsgálatához	
Azonosító	mikroRNS
000393	hsa-miR-17-5p
002422	hsa-miR-18a-5p
000397	hsa-miR-21-5p
000426	hsa-miR-34a-5p
002245	hsa-miR-122-5p
000462	hsa-miR-140-5p
000494	hsa-miR-195-5p
000512	hsa-miR-210-3p
002306	hsa-miR-214-3p
000524	hsa-miR-221-3p
002276	hsa-miR-222-3p
002295	hsa-miR-2233p
002099	hsa-miR-224-5p
000543	hsa-miR-328-3p

A cDNS szintézist TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Kat.sz.: 4366597; Applied Biosystem; Thermo Fisher Scientific Inc.) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A reakciót a biopsziás mintáknál 20 ng, a rezekátumoknál 10 ng totál RNS-ből végeztük 7,5 µl végtérfogatban. A reverz transzkripció Eppendorf Mastercycler Gradient PCR készülékben történt. A qPCR-t TaqMan Universal Master Mix II no UNG (Kat.sz.: 4440048; Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific Inc.) felhasználásával a gyártó ajánlását figyelembe véve végeztük el, 10 µl végtérfogatban, amely 0,65 µl reverz transzkripció termékét tartalmazott. A reakciót triplikátumban futtattuk le a LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) berendezésben. A relatív expressziót ΔC_q (ahol a $\Delta C_q = C_q(\text{referencia gének átlaga}) - C_q(\text{vizsgált miRNS})$) képlet alapján számoltuk. A CHC, AIH minták eredményeinek vizsgálatokor a $2^{\Delta C_q}$ formulát alkalmaztuk és a miR-140-et és RNU6B átlagát használtuk, mint a legstabilabb referenciagén. A mikroRNS expresszió vizsgálata FNH, cirrózis, HCC esetében a $2^{-\Delta \Delta C_q}$ formulát használtunk fel, amikor is a miR-140 és miR-328 átlaga számított referenciának. A FNH, cirrózis, HCC minták vizsgált mikroRNS expresszió értékeiket normalizáltuk a normál minták vizsgált mikroRNS expresszióinak medián értékeivel. A legstabilabb referenciagén meghatározását minden esetben a NormFinder applikációval végeztük (71).

4.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok

LC3, p62, TOMM20 expresszió meghatározást végeztünk immunreakció segítségével a CHC és az AIH mintákban. A 9 HCC-ből, 70 CC-ből és 31 CC környező szöveteiből multiblokkokat készítettünk a Beclin1, LC3, p62, TOMM20, COX4 és Ki-67 immunhisztokémiai detektálásához.

4.3.1 Szöveti multiblokk (TMA) készítése

A vizsgálatunkban 5 db TMA blokkot készítettünk a 3D Histech (1122, Budapest, Hungary) cég automatizált TMA Master készülék felhasználásával. Fénymikroszkóppal a patológus szakorvos reprezentatív területeket jelölt ki a donor blokkból készült hematoxilin-eozininnal (HE) festett metszeteken, ami alapján 2 mm vastagságú szövethengereket duplikátumba kiszúrtunk és azokat az üres recipiens blokkba helyeztük. A befogadó blokk az automatizált technika segítségével egy előre elkészített standard méretű paraffin blokk

volt, amely 5×10 férőhelyes és az úgynevezett core-ok között 0,75 mm távolság volt. A könnyebb tájékozódás érdekében jelzőanyagot (colon és pankreász szövet) helyeztünk el a blokkokban előzőleg rögzített pozícióban.

4.3.2 Immunhisztokémiai reakciók

Az biopsziás és a TMA FFPE blokkokból frissen, 3-5 µm vastagságú Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezre készült metszeteken történt az immunhisztokémiai detektálás. A reakciók a Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA) automatizált immunfestő automatában készültek. A deparaffinizálás követően 30 perces 95 °C-on feltárás és endogén peroxidáz blokkolás következett. A primer antitestek Antibody Diluent-ben (Ventana Medical Systems Inc.; Ref.: 251018) hígítva 42 °C-on 30 percig inkubálódtak a mintákon. A felhasznált elsődleges ellenanyagok jellemzőit, gyártóit és az alkalmazott hígításukat az 5. táblázatban tüntettem fel.

5. táblázat Az elsődleges antitestek jellemzőik

Primer Antitestek	Klonalitás/ Species	Gyártó	Kat. Sz.	Hígítási arány	Pozitív kontroll
BECN1 (H-300)	Poliklonális, nyúl	Santa Cruz Biotechnology	sc-11427	1:100	Cervikális karcinóma /humán szívizom
LC3	Poliklonális, nyúl	Novus Biologicals	NB-100-2331	1:200	Cervikális karcinóma
p62	Monoklonális, egér	AbCam	ab56416	1:1000	Hepatocelluláris karcinóma
TOMM20 (F-10)	Monoklonális, egér	Santa Cruz Biotechnology	sc-17764	1:200	Cervikális karcinóma
Cox4 (F-8)	Monoklonális, egér	Santa Cruz Biotechnology	sc-376731	1:100	Humán rektum karcinóma
Ki-67 (AC3)	Monoklonális, egér	Dako	274-11	1:200	Tonsilla

Az automatában felhasznált másodlagos antitestet és egyéb reagenseket a Ventana Medical Systems gyártó által ajánlott UltraView Universal DAB Detection Kit (LOT:

B03403, REF: 760-500) tartalmazta. Az előhívás HRP Multimer alapú biotin-mentes detektálási technikával 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) kromogén használásával történt a gyártó előírásainak megfelelően. Háttérfestésként hematoxilint (REF: 790-2208) és „bluing” (kékítő) reagenst (REF: 760-2037) alkalmaztunk. A reakciók negatív kontrolljának alkalmazásakor a primer antitestet elhagytuk és csak az antitest hígító oldat került a metszetekre. Pozitív kontrollok esetében az egyes elsődleges antitestek gyártói által javasolt FFPE minták voltak, amelyeket szintén az 5. táblázatban tüntettem fel.

4.3.3 Reakciók értékelése, morfológia

Az elkészült immunhisztokémiai reakciókat digitalizáltuk Mirax Midi Slide Scanner (3D Histech, Budapest, Hungary) segítségével és a kiértékeléshez a Panoramic Viewer Programot (3D Histech) használtuk. A kiválasztott nagyítású látótérben (40× objektív) a reakciókat egymástól független két vizsgáló szemikvantitatív módon értékelte. Citoplazmás kifejeződést mutató Beclin1, LC3, p62, TOMM20, COX4 reakciók esetében az immunreakciók erősségét és is kiterjedését is osztályoztuk. Így minden eset kapott egy értéket, amely a pozitívan festődő sejtek százalékos arányából és a festődés intenzitásának erősségének összegéből tevődött össze. A reakcióerősség pontértékei a következők voltak: 0 pont - negatív reakció; 1 – minimális, 2 – gyenge, 3 – közepes, 4 – erős; 5 – intenzív reakció. A pozitívan festődő sejtek százalékos arányát a következők szerint adtuk meg: (0) < 6%, (1) 6-20%, (2) 21–40%, (3) 41–60%, (4) 61–80% és (5) > 81%. A nukleáris megjelenést mutató Ki-67 reakció esetében tíz random kiválasztott nagy nagyítású látótérben (40× objektív) 100 - 100 sejtet vizsgáltunk és csak a pozitív reakciók kiterjedését százalékosan értékeltük, a látótérek értékeit pedig átlagoltuk.

4.4 Sejttenyésztés, in vitro vizsgálatok

A mitokondriális hálózat és az autofágia vizsgálatához 3 sejtvonalat használtunk: a HuH-28 (iCC eredetű); TFK-1 (eCC eredetű), valamint a HepG2 (HCC eredetű), amelyeket a Heidelbergi Egyetem, Patológia Intézet (Stephanie Roessler) bocsájtott rendelkezésünkre Szabó Erzsébet Ph.D, tudományos munkatárs külföldi tanulmányútja keretein belül. A sejtek tenyésztéséhez RPMI-1640 (Kat. sz.: 21875091; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) médiumokat használtunk 10% főtális borjú savó (0,2 µm

szűrővel sterilre szűrt FBS, Kat. sz.: P40-37500 - Pan Biotech, Aidenbach, Németország) és 1% Penicillin-Streptomycin antibiotikumok (Kat.sz. P0781, Sigma-Aldrich Saint Luise, Missouri, USA) és 1% 200 mM L-Glutamine (Kat. sz.: P04-08100; Pan Biotech, Aidenbach, Németország) mellett. A sejteket 37 °C-on, 5 %-os CO₂ koncentráció mellett T25, T75 tenyésztőflaskákban tenyésztettük. Az adherens sejteket 3-4 naponta passzáltuk tripszinnel (Kat. sz.:25200056; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

4.4.1 Sejtvonalak, anyagok és kezelések

Vizsgálatainkhoz 6-, 12-, illetve 96-lyukú plate-eket használtunk és a kísérlet típusától, az inkubációs idejétől, az alkalmazott technikától és a sejt proliferációs tulajdonságától függően. Kezelések során először mindig megvártuk a sejtek letapadását (24 h), ezt követően médiumot cseréltünk és a friss médium tartalmazta a vizsgálni kívánt kezelőszert. A DMSO-t (Kat.sz.: D2650, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) használtunk a hatóanyagok feloldására: Sorafenib (Kat. sz.: CAS284461-73-0; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország), 5-Fluoro-uracil (5-FU, Kat. sz.: F6627, Sigma-Aldrich) és Rapamycin (Rapa, Kat. sz.: R0395, Sigma-Aldrich) esetében. Ezeknél a kezeléseknél a kontroll, kezeletlen minta mellett egy DMSO-val kezelt kontroll sejtvonalat is indítottunk, figyelve a DMSO hatását a sejtekre, ezért a kezelések során maximálisan alkalmazott oldószermennyiséget adtuk hozzá a sejtek médiumához, így a DMSO koncentrációja minden esetben kevesebb volt, mint 0,1%. A kloroquint (CQ, Kat sz.: C6628, Sigma-Aldrich) vízben oldottuk. A kezelések időtartamát és a kezelőszer dózisait irodalmi adatokból nyertük, de a sejtek proliferációs válaszait is figyelembe vettük.

Immunfluoreszcens technika segítségével detektáltuk a mitokondriális morfológiát és az autofágia a sejteken A vizsgálatához HuH-28, TFK-1 esetében 1×10^5 , HepG2 esetében 8×10^4 kezdő sejtszámmal indítottuk a tenyésztést 12 lyukú plate-be kör alakú fedőlemezen, a letapadás után pedig még 24 h keresztül növesztetük a sejteket. Az autofágia detektálásához 50 μ M CQ-val is kezeltük a sejteket 24 h keresztül.

A sejtek Rapamycin, mint mTOR gátló és a kemoterápiás szerek általi autofágia indukálhatóságát Western Blot analízissel vizsgáltuk. A HuH-28 $4,5 \times 10^5$, TFK-1 5×10^5 és a HepG2 3×10^5 sejtszámmal tettünk ki 6-lyukú plate-re. A mTOR inhibitor alkalmazásakor a sejtvonalakat 24 h keresztül inkubáltuk, 0,2 μ M Rapa, 50 μ M CQ és a két szer kombinációját

alkalmazva. A kemoterápiás szerek vizsgálatokor az 5-FU-val (0, 10, 50, 200, 400 μM koncentrációkkal) és Sorafenib-bel (0, 5, 10, 15, 20 μM koncentrációkkal) 48 és 72 órán keresztül végeztük a kezelést.

Az irodalmi adatok mellett a Western blot vizsgálatoknál a kezelőszer koncentrációit és kezelési idő kiválasztásánál a sejtek 5-FU-val 10, 50, 200, 400 μM koncentrációira és Sorafenib-bel 5, 10, 15, 20, 25 μM koncentrációira adott válaszait is figyelembe vettük, amit a proliferációs aktivitás vizsgálatával követtünk. Továbbá proliferációs aktivitással vizsgáltuk azt is, hogy javítható-e a kemoterápiás szerre adott sejt válasz az autofágia inhibitor, CQ alkalmazásával. Így az 5-FU és a Sorafenib-et az egyszeres kezelés mellett kombináltunk 10 μM , valamint 50 μM CQ-val is, és a kezeléseket szintén 96 lyukú plate-n és 24, 48, és 72 órás kezelési idővel végeztük HuH-28, HepG2 esetében 5×10^3 , TFK-1 esetén 8×10^3 TFK-1 kezdő sejtszámmal.

4.5 Expressziós vizsgálatok

4.5.1 Immunfluoreszcens reakciók sejtenyészeten

A mitokondriumok detektálására Mitotracker Orange CMTMRos (Kat. sz.: M7510; Life Technologies Eugene, Oregon, USA) és Mitoview Green-t (Kat. sz.: 70054, Biotium Inc.; Fremont, Kalifornia, USA) immunfluoreszcens festékek használtuk. Az autofágia mikroszkópos megjelenítéséhez Monodansyl-cadaverint (Kat.sz.: D4008, Sigma Aldrich) (MDC) alkalmaztuk. A sejtek kezeléseit a fentebb leírt módon, az immunfluoreszcens reakciókat pedig a gyártók protokollja alapján végeztünk el. A reakciókat Leica DM-RXA széleslátóteres fluoreszcens mikroszkóp (Leica, Wetzlar, Germany) segítségével értékeltük és fotóztuk, a képeket Leica CW4000 FISH Visualisation és Documentation Software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Wetzlar, Germany) segítségével dokumentáltuk.

4.5.1.1 Mitokondriumok detektálása

A mitokondriumok fluoreszcens meghatározásához hideg PBS-sel (Kat.sz.: 17-515; Lonza Walkersville Inc. Walkersville, Maryland, USA) átmostuk a sejteket és 45 percig 37 °C-on inkubáltuk FBS nélküli médiummal hígított 150 nM Mitotracker Orange CMTMRos oldattal. A fedőlemezen növesztett sejteket 4% formaldehiddel fixáltuk 12-lyukú plate-ben és acetonnal mostuk 5 percig. A fixált sejtekre 100 nM Mitoview Green-t alkalmaztuk 30

percig 37 °C-on. A fedőlemezeket Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezekre rögzítettük Mounting Medium with DAPI (Kat.sz.: LS-J1033-10; Vectashield, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) alkalmazásával.

4.5.1.2 Autofágia detektálása

A sejtek tenyésztőközegét lecseréltük és 0,1 mM MDC-t tartalmazó médiummal inkubáltuk 30 percig 37 °C-on, majd hideg PBS-sel többször mostuk. A 12-lyukú plate-ben a kör fedőlemezre növesztett sejteket szobahőmérsékleten 10 percig 4% formaldehiddel fixáltuk, és a fedőlemezekkel a fixált sejteket fluoreszcens reakciókhoz való fedőanyaggal (Kat. sz.: S3023; DAKO, Glostrup, Dánia) rögzítettük Superfrost UltraPlus® (Kat.sz.: J3800AMNZ; Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Germany) tárgylemezekre.

4.5.2 Western Blot analízis

A sejtekből származó minták fehérje expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk. A sejteket begyűjtöttük lízis pufferrel, amely tartalmazott 1 % proteináz inhibitor (Kat.sz. P8340, Sigma-Aldrich, Saint Luis, Massachuttests, USA) M-PER Reagenst (Kat.sz.:78501, (M-PER) Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific Rockford, Illinois, USA). Többszöri vortexelés mellett jégen inkubáltuk 30 percig. Centrifugálást (15 000 g, 30 perc) követően a felülúszó fehérjetartalmát Pierce BCA Protein Assay (Kat. sz.: 23227; Thermo Scientific Rockford, Illinois, USA) felhasználásával EL-800 Microplate Reader (BioTek Instruments; Bad Friedrichshall, Németország) készülékkel 570 nm hullámhosszon mértük meg. Egyenlő mennyiségű – 35 µg – fehérjét 2- merkaptotanol 4x Laemmler puffer (Kat.sz.: 161-0747, Bio-Rad Laboratories Ltd. Hercules, Kalifornia, USA) 1:20 elegyével 7 percig 98 °C-on inkubáltuk, majd 15 %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk. A minták futásához a stacking gélhez alacsonyabb feszültséget (85 V), míg a szeparáló gélhez magasabb feszültséget (150 V) alkalmaztuk. A gélről a fehérjéket 90 percig blottoltuk vizes közegben nitrocellulóz membránra (Kat.sz. 1620115; Bio-Rad Laboratories Ltd.) 4 °C-on 95 V-on. A membrán többször mostuk Tween-20 (Kat. sz.: 1706531 Bio-Rad Laboratories Ltd.) és Tris pufferolt sóoldat 1:500 (TBST; Kat. sz. 1706435; Bio-Rad Laboratories Ltd.)

elegyével, majd 1 órás 5 %-os TBST-ben hígított tejporos oldatban végzett blokkolása után 4 °C-on éjszakán át az 6. táblázatban feltüntetett primer ellenanyagokkal inkubáltuk.

6. táblázat A felhasznált elsődleges antitestek és jellemzőik

Primer antitest	Klonalitás/Species	Gyártó	Katalógus szám	Hígítási arány
LC3	Poliklonális, nyúl	Cell Signaling	4108	1:1000
p62	Monoklonális, egér	AbCam	ab56416	1:1250
β-actin (AC-15)	Monoklonális, egér	Sigma-Aldrich	A5441	1:2000

A megfelelő másodlagos antitestek (1:2000; Kat.sz.: 31430 tormaperoxidáz (HRP) konjugált kecskében termelt anti-egér IgG; és 1:4000 Kat.sz.: 32460, anti-nyúl; Thermo Scientific Rockford, Illinois, USA) 5%-os tejporos TBST-ben oldottuk fel, amiben a membránt 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az előhíváshoz kemilumineszcens (Kat.sz.: 1705060 S; Clarity Max ECL Western Substrates, Bio-Rad Laboratories Ltd. Hercules, Kalifornia, USA) rendszert használtuk és a képeket a G:BOX Chemi XR 5 (Syngene, Cambridge, Egyesült Királyság) képdokumentációs rendszerrel készítették. A kiértékeléshez pedig az ImageJ 1.46r (Bethesda, Maryland, USA) szoftvert alkalmaztuk. A minták fehérje expresszióit a minták β -aktin expressziójához normalizáltuk.

4.6 Proliferációs aktivitás mérése

A sejtek proliferációs aktivitását, illetve a citotoxicitást mérésére a szulforodamin B (SRB) módszerrel határoztuk meg. Az SRB elektrosztatikusan és pH-függő módon kötődik a fehérjék bázikus aminosav-maradékaihoz a fixált mintákban. A kezeléseket leállítása miatt a kezelőanyagot és a médiumot eltávolítottuk a 96-lyukú plate-ről, a sejteket átmostuk hideg PBS oldattal, és 1 órán át 10 % TCA oldattal 4 °C-on fixáltuk. Majd csapvízzel 5-szor átmostuk és levegőn szárítottuk. A sejteket 1 % ecetsavban oldott 0,4 % SRB oldattal festettük 15 percig. A nem kötött festéket 1 % ecetsavval mostuk ki, a mosást többször megismételve. A kötött festéket 10 mM Tris bázissal oldottuk, és az abszorbanciát az EL-800 microplate reader (BioTek Instruments; Bad Friedrichshall, Németország) készülékkel 570 nm hullámhosszon határoztuk meg. A kezelt sejtek abszorbancia értékét a nem kezelt kontrollhoz vagy a megfelelő oldószeres kontrollhoz viszonyítottuk.

4.7 Statisztikai analízis

A vizsgálataink során az eredményeink a nem normál eloszlást követték, ezért a nem parametrikus próbákat alkalmaztuk a statisztikai analízis során. A projektek során, ha két csoport összehasonlítása volt a cél, akkor a Mann-Whitney U tesztet, míg több csoport összevetése kapcsán Kruskal-Wallis tesztet és post hoc analízist alkalmaztunk. A fehérjék egymásra gyakorolt hatását, a fehérje és a mikroRNS expressziók közti összefüggés vizsgálatához, valamint az immunreakciók és a klinikopatológiai jellemzők közti kapcsolat analíziséhez a Spearman Rank korrelációs tesztet használtuk. A túlélés vizsgálatához az esetek elhalálozásának dátumát a Belügyminisztérium Nyilvántartások Vezetéséért Felelős Helyettes Államtitkárság Személyes Ügyfélszolgálati és Okmányügyeleti Főosztály Személyi Okmányok Osztályától igényeltük meg. Az adatokat a teljes túlélést (OS) számításához használtunk fel, amely a patológiai diagnózis felállításától a halál időpontjáig eltelt időt volt, hónapokban megadva. A túlélési analízist (teljes túlélést) Kaplan-Meier módszerrel végeztük, a kapott túlélési görbék összehasonlításához pedig Log-rank tesztet végeztünk.

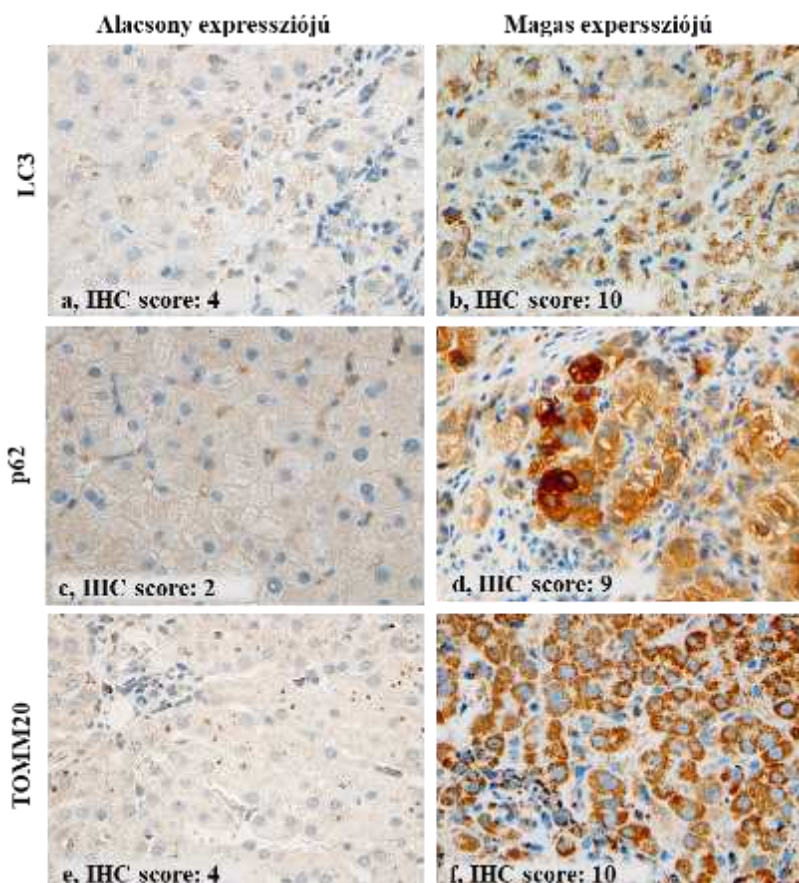
Az in vitro vizsgálatok esetében a kezelések azon koncentrációit, amely 50%-kal gátolja a sejtek proliferációs aktivitását (IC50) nem-lineáris regresszió módszerével határoztuk meg. A statisztikai analíziseket, illetve a prezentálásukhoz szükséges ábrákat GraphPad Prism (verzió 5.01; Kalifornia, USA) és Statistic v.13 (Stat-Soft Inc.,Tulsa, Oklahoma, USA) szoftverrel készítettük. A vizsgálatok során az elemzést statisztikai szignifikánsnak tekintettük, ha a $p \leq 0,05$ volt.

5 Eredmények

5.1 A krónikus hepatitis C (CHC) és autoimmun hepatitis (AIH) összehasonlítása az autofágia, mitokondriális tömeg és a mikroRNS expresszió vizsgálatára szempontjából

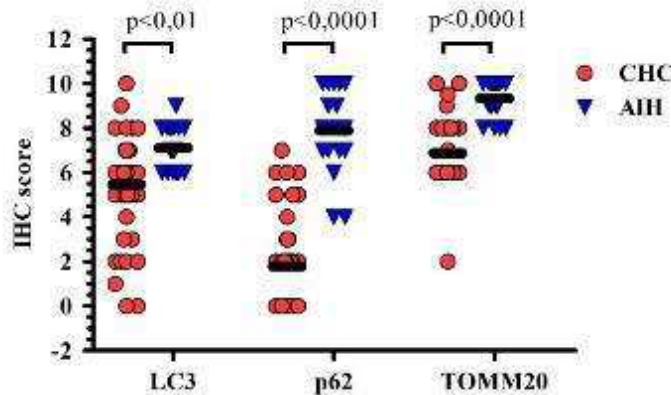
5.1.1 Immunhisztokémiai vizsgálatok és statisztikai eredményeik

A krónikus hepatitis mintákon immunhisztokémia technikával detektáltuk az autofágia markereket, az LC3 és a p62-t, valamint a mitokondriális tömeget, TOMM20 fehérjét. Összességében 42 CHC és 18 AIH mintában lett értékelhető LC3, p62 és TOMM20 immunhisztokémiai reakció. A festődési mintázatot tekintve az LC3 és a p62 festések meglehetősen diffúzak voltak, esetenként változó sűrűségű granulált citoplazmatikus reakciót mutatva mind a májsejtekben, mind a kolangiocitákban, míg a TOMM20 esetében egy erőteljesebb barnás, szemcsés citoplazmatikus reakció volt megfigyelhető. (5. ábra)



5. ábra LC3, p62 és TOMM20 kifejeződése krónikus hepatitis mintákon, bemutató az alacsony és magas expressziót mutató reakciókat. (objektív: 40x)

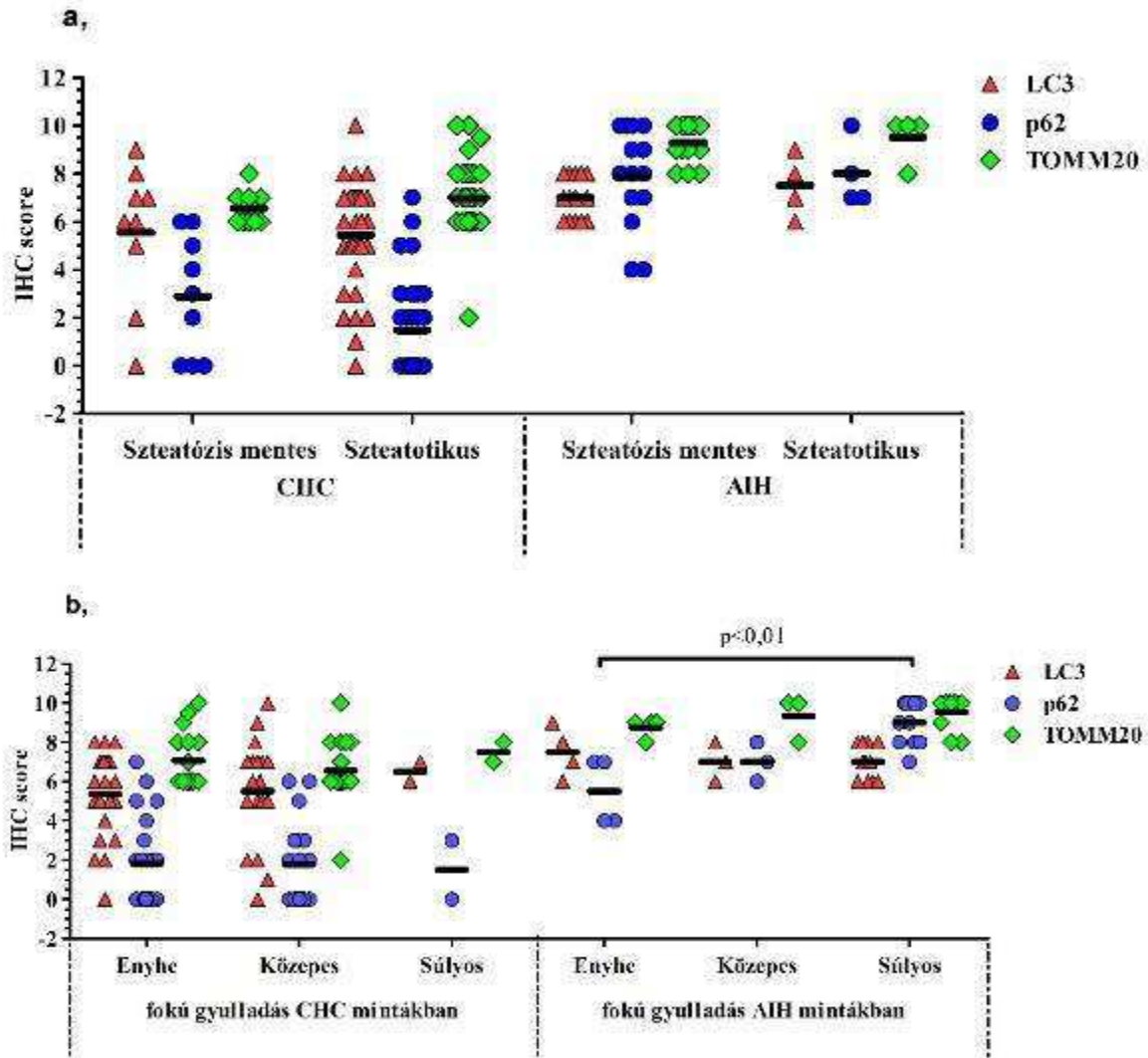
A statisztikai értékelés során összességében azt tapasztaltuk, hogy az LC3 ($p < 0,01$), p62 ($p < 0,0001$) és a TOMM20 ($p < 0,0001$) festődések intenzitása és a reakciót mutató sejtek aránya szignifikánsabb magasabbnak bizonyult az AIH esetekben a CHC esetekhez képest. (6. ábra) Azt a gondolatmenet követve, mely szerint összefüggés lehet az autofág markerek expressziója és a mitokondriális markerek közt, aránypárokat állítottunk fel az egyes etiológiákat tekintve. Az arányok kiszámításakor a LC3 és TOMM20 IHC score átlagainak arányában nem mutatott eltérést, mert AIH esetében 0,76 és CHC esetében 0,80 volt. Azonban a p62 és TOMM20 IHC score átlagainak aránya az AIH esetében magasabbnak bizonyult, mivel AIH mintáknál 0,85, míg CHC esetében ez az érték csak 0,26 volt.



6. ábra Az LC3, p62 és TOMM20 expresszió HCV indukálta (CHC), illetve az autoimmun hepatitisben (AIH) a szemikvantitatív immunhisztokémiai pontrendszer függvényében. LC3 ($p < 0,01$), p62 ($p < 0,0001$) és a TOMM20 ($p < 0,0001$) kifejeződése szignifikánsabb magasabbnak bizonyult az AIH esetekben a CHC esetekhez viszonyítva.

A vizsgált markerek expressziós mintázatát vizsgáltunk az egyes hisztopatológiai paraméterek vonatkozásában is. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a fehérjék IHC-értékeiben, amikor a szteatózissal rendelkező vagy szteatózist nem mutató eseteket hasonlítottuk össze CHC, illetve AIH mintákban (7.a ábra). Bár eltérést mutatott a p62 expressziója a szteatotikus CHC mintákban a nem szteatotikus csoporthoz képest, de ez a különbség nem érte el a szignifikancia szintet. Ezenkívül a fibrózis stádiumai és a LC3, p62, TOMM20 expressziós szintjei között sem volt megfigyelhető a kapcsolat. (nem ábrázoltam) A nekroinflammáció tekintetében szignifikáns különbséget tapasztaltunk a súlyos fokú és az enyhe szintű gyulladást mutató AIH esetek közt ($p < 0,01$). (7.b ábra) A korrelációs vizsgálat

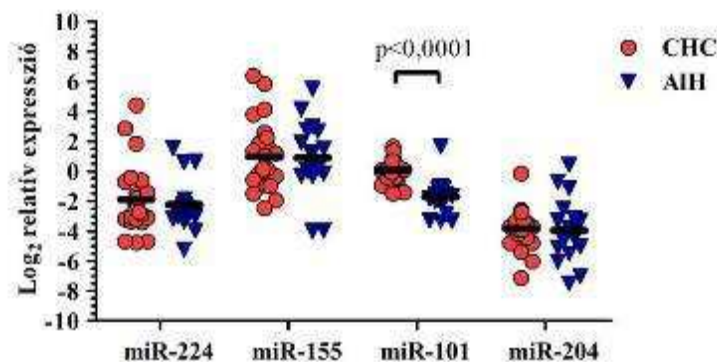
is egy erős kapcsolatot mutatott AIH mintáknál a nekroinflammáció mértéke és p62 expressziós szintje közt ($r = 0,84$; $p < 0,0001$). CHC mintáknál ezt az összefüggést ($r = -0,03$; $p = 0,8445$) nem tapasztaltuk, bár CHC esetek között az irodalmi adatokhoz hasonlóan kevés súlyos fokú gyulladás mutató esetet találtunk. Továbbá nem tapasztaltunk változást az LC3 és TOMM20 expressziójában a gyulladás súlyosbodása esetén egyik etiológiájú krónikus hepatitis esetében sem.



7. ábra LC3, p62 és TOMM20 expressziója (a) a szteatózis mentes és szteatótikus CHC és AIH mintákban, valamint (b) a különböző mértékű gyulladási esetekben az IHC score függvényében ábrázolva. Csökkenést mutatott a p62 szintje a CHC minták szteatótikus esetekben a nem szteatótikusakhoz viszonyítva, de ez a különbség nem lett szignifikáns. De szignifikáns eltérés mutatkozott a súlyos fokú és az enyhe szintű gyulladást mutató AIH esetek p62 expressziója közt ($p < 0,01$)

5.1.2 A miR-224, -155, -101 és -204 expresszióinak vizsgálata

A miR-224, -155, -101 és -204 kifejeződését határoztuk meg a biopsziás mintákban. A vizsgálat során a minta szettünkéből 24 CHC és 18 AIH eset volt alkalmas a mikroRNS-ek relatív expressziójának elemzésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a miR-224, -155 és -204 expressziója statisztikailag nem különbözött az CHC és az AIH minták között, azonban a miR-101 emelkedett szintet mutatott a CHC esetekben az AIH biopsziákhoz képest ($p < 0,0001$) (8. ábra).

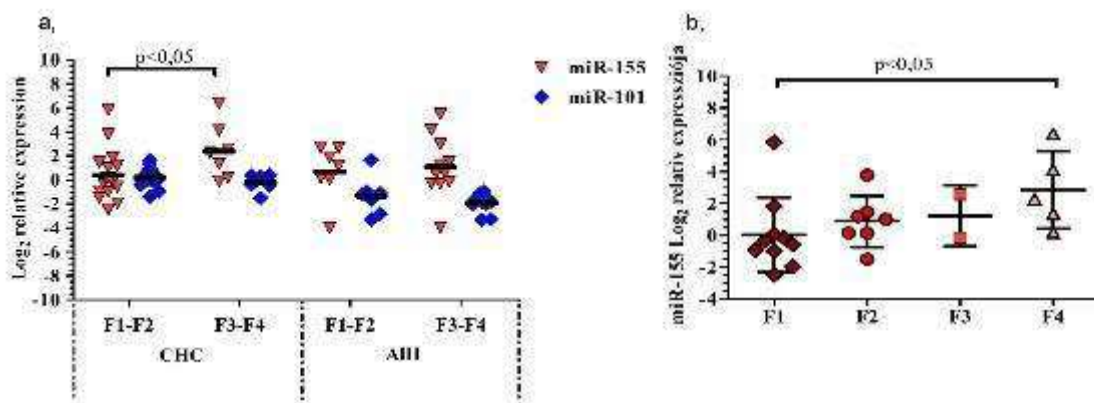


8. ábra A miR-224, -155, -101 és -204 relatív expressziója a CHC és az AIH esetekben. A miR-224, -155 és -204 kifejeződése nem mutat különbséget, míg a miR-101 emelkedett CHC mintákban az AIH esetekhez képest.

Az immunreakciók elemzéséhez hasonlóan a miR-224, -204, -101 és -155 expresszióját is megvizsgáltuk az egyes hisztopatológiai paraméterek vonatkozásában. Az etiológia szempontjából nem tapasztaltunk különbséget a miR-224, -204, -101 és -155 expressziójában a szteatotikus és nem szteatotikus esetek közt. Ezzel szemben a miR-224 szintje pozitív korrelációt mutatott a szteatózissal a CHC-ben ($r = 0,42$; $p < 0,05$), míg az AIH eseteiben nem. A nekroinflammációt tekintve sem tapasztaltunk összefüggést a gyulladás fokozata és a mikroRNS-ek relatív expressziója között a CHC és az AIH mintákban.

Összehasonlítottuk a mikroRNS-ek expresszióját a fibrózis stádiumai szempontjából CHC és AIH-ben. Az eseteket az alacsony (F1-2) és a magas (F3-4) fibrózist mutató esetekre bontottuk, de az egyes stádiumok szerint (F1-4) is elvégeztük az elemzést. Az analízis során nem észleltünk különbséget a miR-224, -101, -204 kifejeződésében a különböző fibrózis csoportok közt. Ugyanakkor emelkedett miR-155 expresszió volt megfigyelhető a magasabb

fibrózisú CHC csoportban (F3-4, $p < 0,05$) az alacsonyabb fibrózist mutató CHC csoporthoz képest (F1-2). (9.a ábra). A fibrózist szintenként, külön vizsgálva az egyes mintákban a mikroRNS-ek szempontjából, azt látható, hogy statisztikai különbséget csak az F1 és az F4 között találtunk miR-155 szintjében ($p < 0,05$) a CHC mintákban, azonban ahogy a 9. b ábrán is látható, F1-től F4-ig növekvő tendencia figyelhető meg, amit a korrelációs teszttel is tudtuk bizonyítani ($r = 0,56$; $p < 0,01$). Az AIH minták esetében nem tapasztaltuk kapcsolatot és a vizsgált mikroRNS kifejeződése és a fibrózis közt.

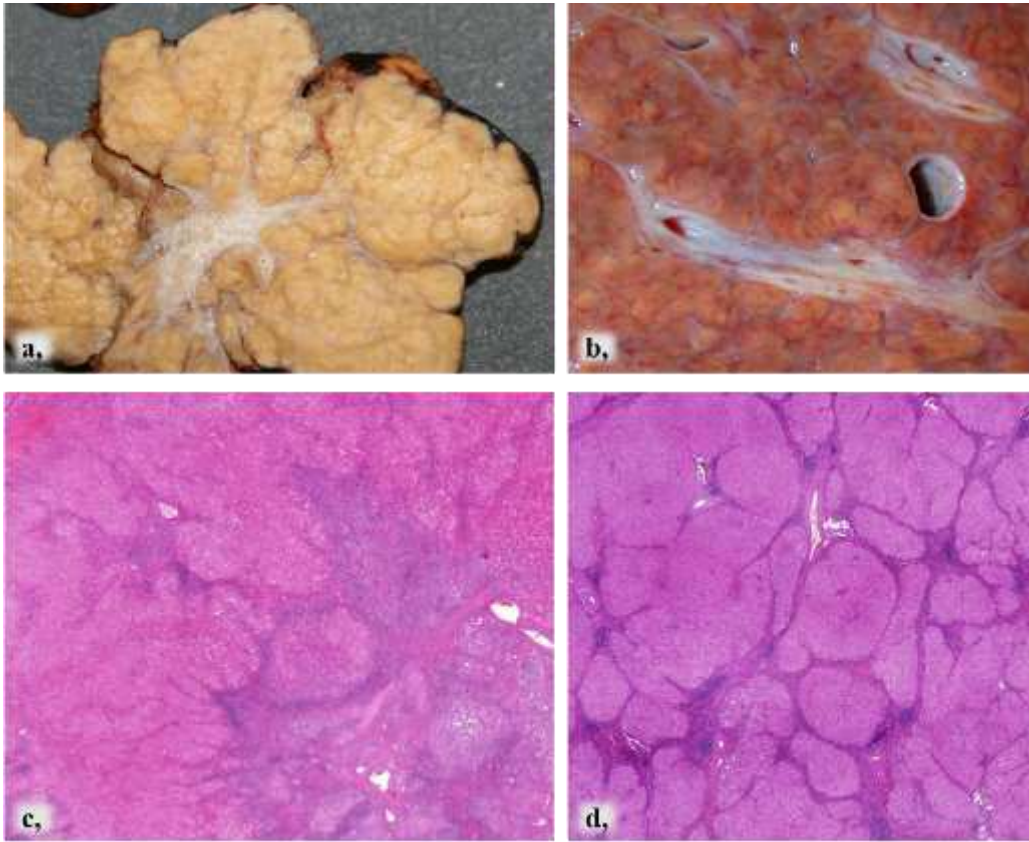


9. ábra A miR-155 és a miR-101 expressziója (a) az alacsony és magas fibrózist mutató CHC és az AIH esetekben. Továbbá (b) a miR-155 kifejeződése egyes stádiumait mutató CHC mintákban. Emelkedett miR-155 expresszió ($p < 0,05$) volt megfigyelhető a magasabb fibrózisú CHC-ben.

5.2 mikroRNS expresszió FNH, cirrózis HCC és nem-daganatos májszövetben

5.2.1 Az FNH makroszkópos és mikroszkópos jellemzői

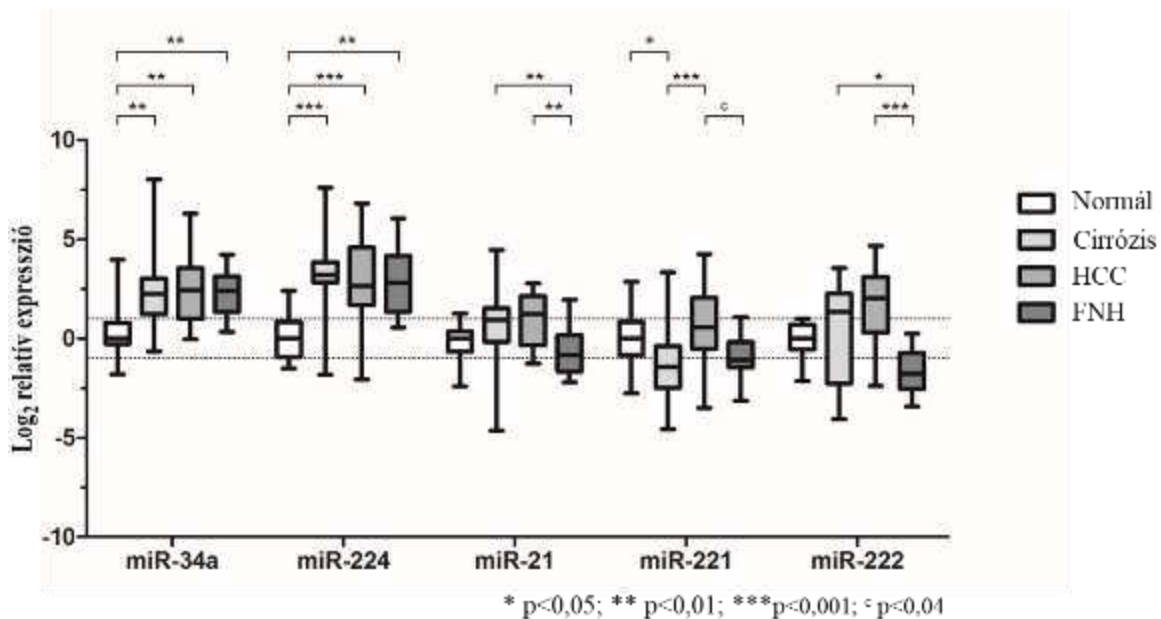
A FNH makroszkóposan tumor-szerű megjelenést mutatott tipikus központi hegesedéssel és noduláris szerkezettel (10. a,c ábra.), ellentétben a cirrózissal, amelyet diffúz nodularizáció jellemzett (10. b ábra). Szövettanilag az FNH esetek klasszikus típusúak voltak a Bordeaux-osztályozás alapján (72): különféle méretű nodulusokat, rostos kötegeket és duktuláris reakciót mutattak (10. c ábra), amelyek hasonlóak voltak a cirrózis szerkezeti változásaihoz (10. d ábra).



10. ábra A fokális noduláris hiperplázia makroszkópos (a) és szövettani képe (c) a cirrózishoz képest (b, d). (a) az FNH központi hegesedéssel és noduláris szerkezettel (b) diffúz nodularizációt mutató cirrózis; (c) FNH különböző méretű nodulusokkal, (d) rostos szeptumok és göbök cirrózisban (H&E ábrák nagyítása 150×)

5.2.2 A mikroRNA expressziója az FNH-ban, cirrózisban és HCC-ben a nem-daganatos májhoz viszonyítva

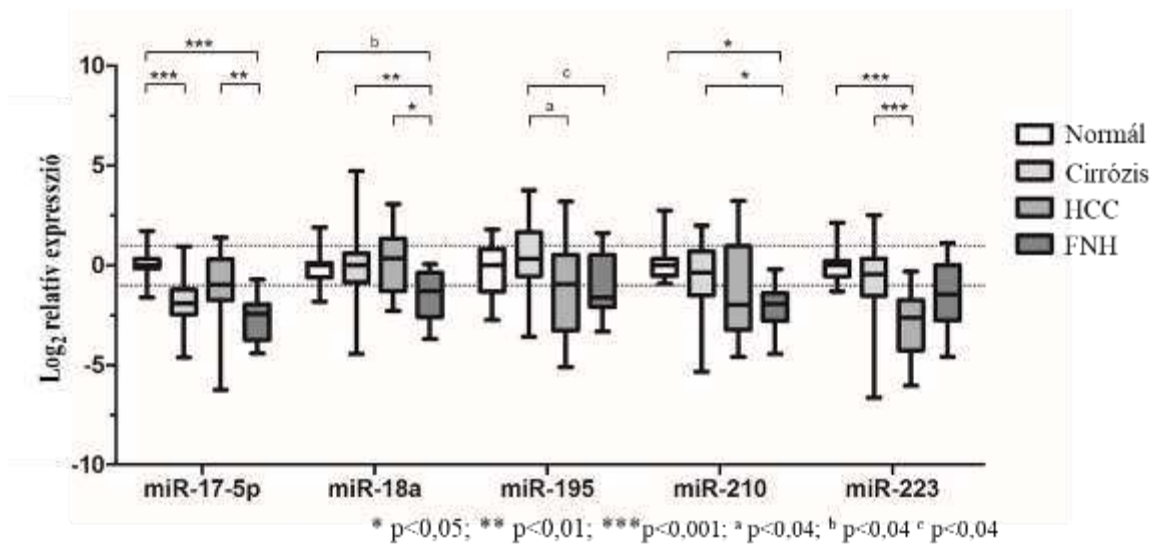
A relatív mikroRNS kifejeződést vizsgáltunk FNH-ban, cirrózisban és HCC-ben a nem-daganatos májszövethez viszonyítva. Az eredményeket a 11. ábrán összegeztem. A nem-daganatos májhoz képest a miR-34a és a miR-224 szintje is megemelkedett FNH-ban, cirrózisban és HCC-ben is ($p < 0,001$). Míg a miR-17-5p, a miR-18a és a miR-210 szintje csökkent az FNH-ban ($p < 0,03$), a miR-17-5p és a miR-221 cirrózisban ($p < 0,01$) és miR-223 pedig HCC-ben ($p < 0,0001$) a nem-daganatos májszövethez képest.



11. ábra mikroRNS-ek relatív expressziója cirrózisban, hepatocelluláris karcinómában (HCC) és fokális noduláris hiperpláziában (FNH) nem-daganatos májszövethez képest. A felső pontozott vonal a $2\times$ expressziós magasságot; az alsó pontozott vonal az expressziók $1,5\times$ csökkentésének szintjét mutatja. A *, **, * és ^c jelöléseket a szignifikancia szintek kiemelésére használtam**

5.2.3 A mikroRNS expressziója FNH-ban cirrózissal és HCC-vel összehasonlítva

A kiválasztott mikroRNS-ek expresszióit megvizsgáltuk FNH-ban cirrózishoz és HCC-hez képest. (12. ábra) FNH-ban a miR-18a, a miR-21 és a miR-222 expressziója csökkent mind a cirrózissal, mind a HCC-vel összehasonlítva ($p < 0,01$); míg a miR-195, a miR-210 a cirrózishoz ($p < 0,04$) és a miR-17-5p, a miR-221 pedig a HCC-hez képest mutatott csökkenést ($p < 0,04$). Amikor összehasonlítottuk a cirrózist HCC-vel, cirrózisban emelkedett miR-195 szintet és csökkent miR-221 expressziója detektáltunk ($p < 0,02$). Emellett a miR-18a, a miR-21 és a miR-222 szintje szintén csökkent az FNH-ban, azonban csak a HCV-fertőzéssel összefüggő cirrózis mintákhoz viszonyítva ($p < 0,04$, az adatokat nem ábrázoltam).

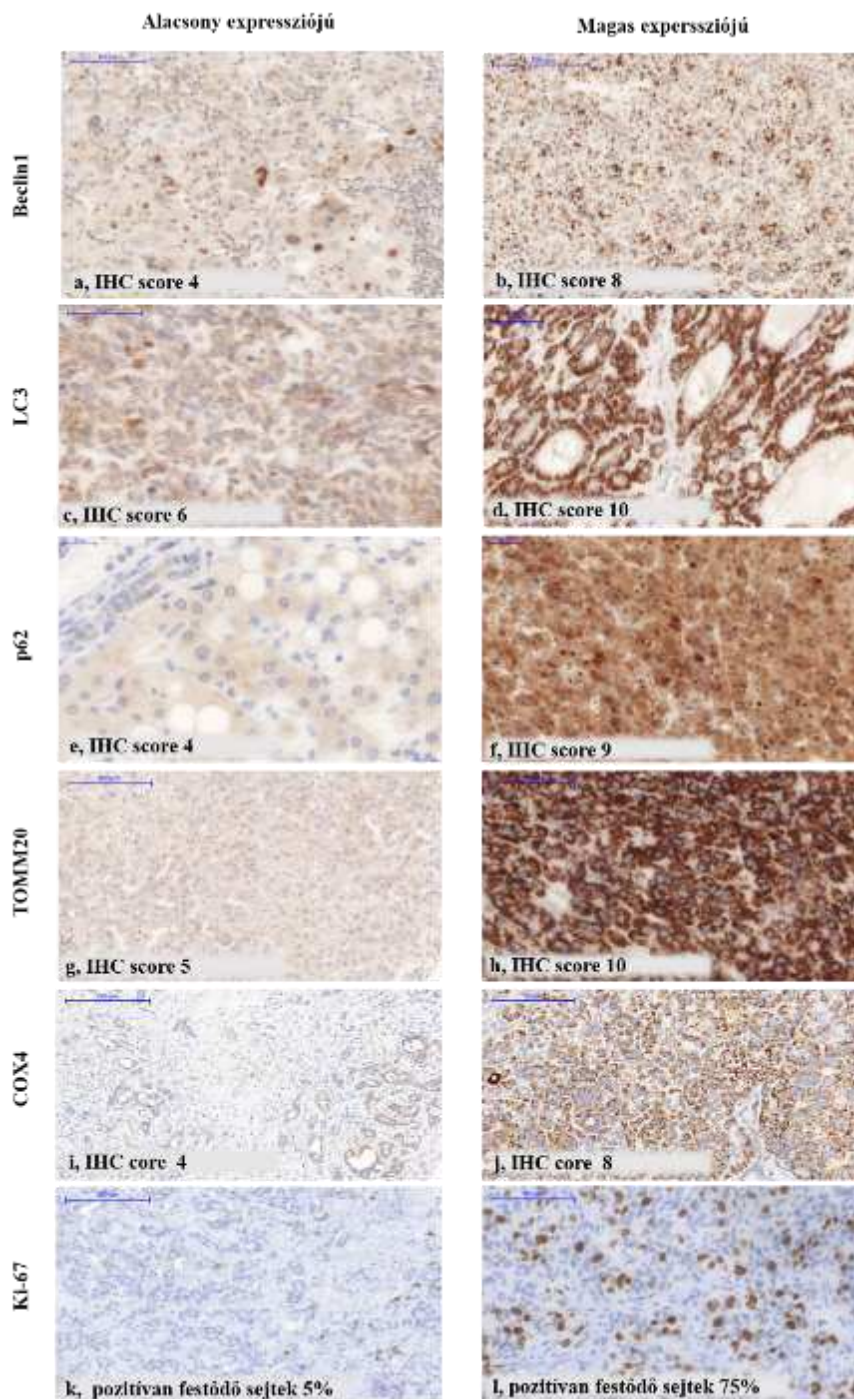


12. ábra mikroRNS-ek relatív expressziójának összehasonlítása cirrósizisban, hepatocelluláris karcinómában (HCC) és fokális noduláris hiperpláziában (FNH)

5.3 Autofágia és mitokondriumok humán kolangiokarcinóma (CC) és a hepatocelluláris karcinóma (HCC) mintákban

5.3.1 Immunhisztokémiai reakciók értékelése és statisztikai elemzése

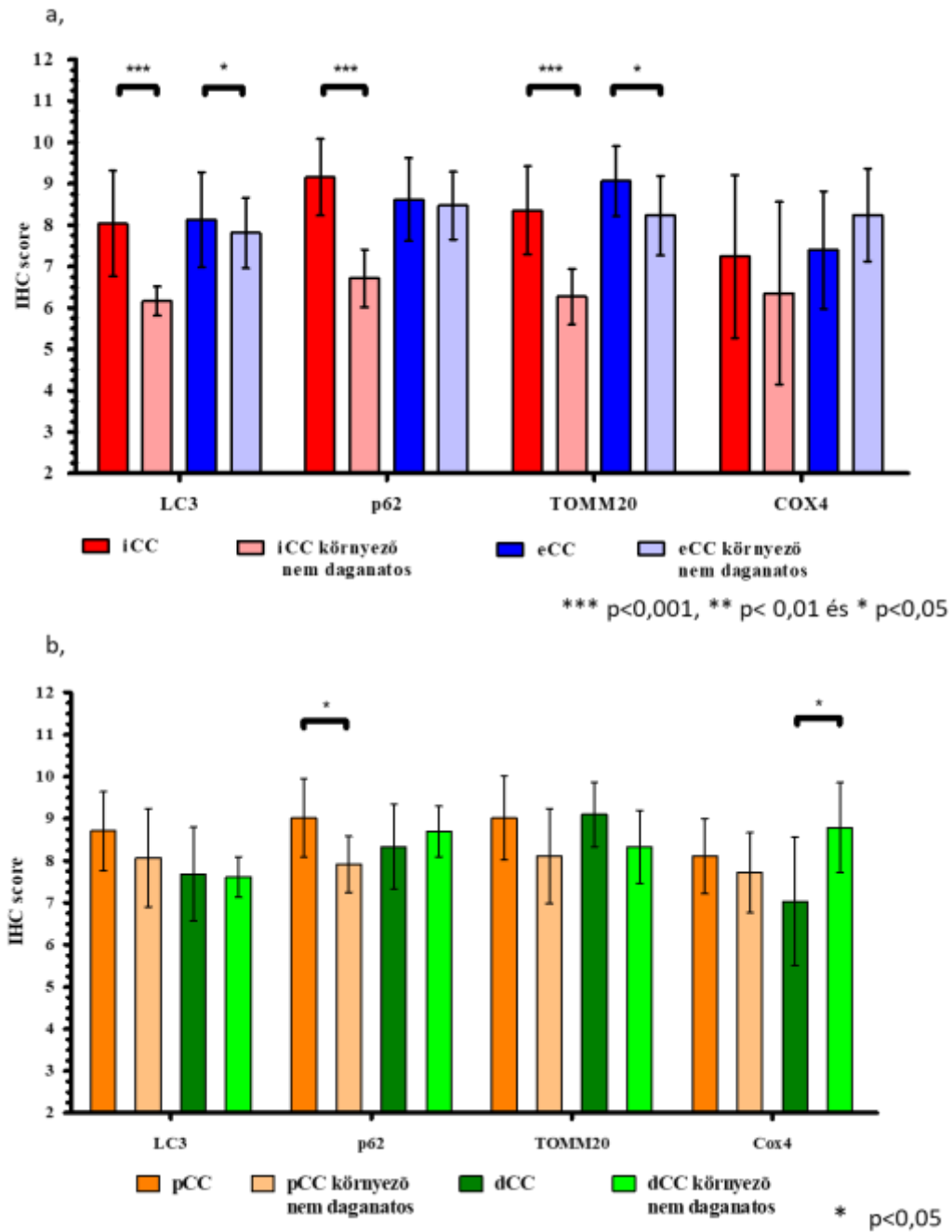
A biopsziás mintákhoz hasonlóan immunhisztokémia technikával meghatároztuk az autofág markereket, (Beclin1, LC3, p62) a mitokondriális fehérjéket (TOMM20, COX4) és a proliferációt jelző Ki-67 fehérjét CC és a környező területein, valamint a HCC mintákon is. A 13. ábrán prezentáltuk az autofág fehérjék, mitokondriális fehérje és a Ki-67 immunhisztokémiai reakcióit CC és HCC szöveteken.



13. ábra Beclin1 (a, b), LC3 (c, d), p62 (e, f) a TOMM20 (g, h), COX4 (i, j), és a Ki-67 (k, l) alacsony és magas expressziója immunhisztokémiailag detektálva CC és HCC szöveteken. A képen szerepel a reakciók IHC score értéke, Ki-67 esetében a pozitívan festődő sejtek százalékos aránya. (Az objektív nagyítás: 10x (b, g, i, k); 20x (a, d, h, j, l); 40x (c, e, f))

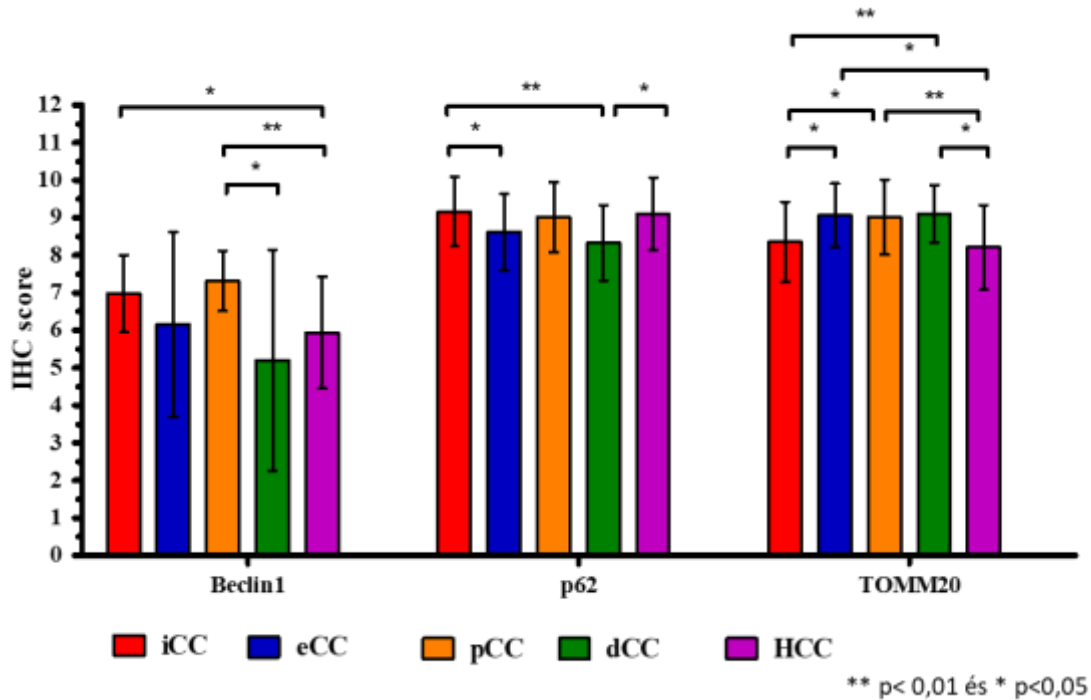
A kiértékelés során a festődési mintázatot tekintve erős diffúz, néha pontozott LC3 és p62 reakciót tapasztaltunk különböző intenzitással mind a nem daganatos hepatocitákban, mind a kolangiocitákban. Megfigyeltük, hogy irodalmi adatoknak megfelelően a p62 néhány esetben nukleáris megjelenést is produkált a citoplazmatikus mellett. Míg a Ki-67 a leírásoknak megfelelően csak nukleáris expressziót mutatott. A TOMM20 reakciója granuláris intenzív citoplazmatikus, míg a COX4 megjelenésére inkább homogént közepes intenzitás volt a jellemző. A Beclin1 kifejeződésében az tapasztaltunk, hogy intrahepatikus esetekben inkább homogén reakciót mutatott, az extrahepatikus mintákban pedig erőteljesebb granuláris volt a megjelenése. A környező nem daganatos területekben a duktus sejtszejtjei minimális Beclin1 és intenzív TOMM20 expressziót mutattak, míg LC3, p62 és TOMM20 erőteljesen intenzív kifejeződése volt az idegekben. Továbbá megfigyeltük, hogy Beclin1 és TOMM20 reakciója granuláris és intenzívebb volt centrális véna körüli zóna hepatocitáiban.

Az elemzés során összehasonlítottuk az egyes fehérjék expresszióját a tumorban a környező nem daganatos területekhez képest és azt tapasztaltuk, hogy az LC3 ($p < 0,001$), p62 ($p < 0,001$) és TOMM20 ($p < 0,001$) szintje megemelkedett iCC-ban, míg eCC minták LC3 ($p < 0,05$) és TOMM20 ($p < 0,05$) expressziójában mutatott szignifikáns növekedést. (14. a, b ábra) A pCC és dCC tekintve a pCC p62 szintjében ($p < 0,05$) és dCC COX4 reakciójában ($p < 0,05$) volt tapasztalható szignifikáns különbség a környező nem daganatos epeutakhoz viszonyítva. Beclin1 expressziójában nem mutatkozott eltérés a tumor és a tumort körülvevő nem daganatos minták összehasonlításakor. (nem ábrázoltam)



14. ábra Az LC3, p62, TOMM20 és COX4 expresszió (a) az iCC, eCC és a környező nem daganatos területekben, valamint (b) az eCC tumor felosztásakor pCC és dCC mintákban. Az iCC szignifikáns eltérést mutat LC3, p62 és TOMM20 szintjében, míg az eCC csak a TOMM20 és LC3 szintje emelkedett meg a környező területhez képest. Az eCC felosztásakor a pCC p62, míg a dCC COX4 szintje változott a környező területhez viszonyítva. A * és *** jelöléseket a szignifikancia szintek kiemelésére használtam.

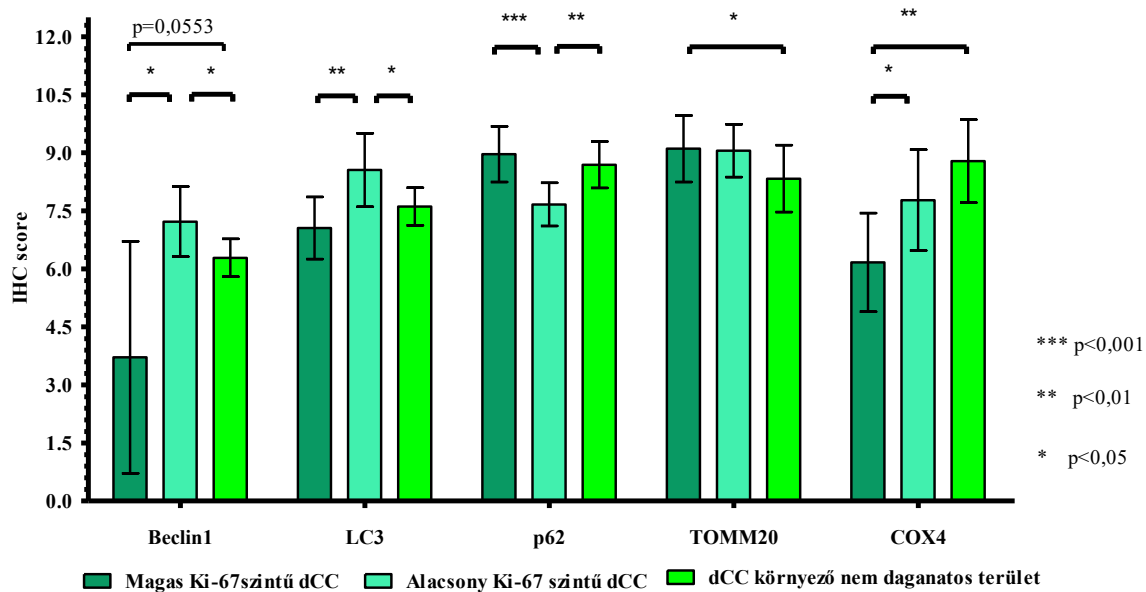
A tumorok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy csökkent a p62 ($p < 0,05$) és emelkedett a TOMM20 ($p < 0,05$) expressziója eCC-ban iCC-hoz képest. (15. ábra) Az emelkedett TOMM20 szint jelent volt eCC-ban HCC-val ($p < 0,05$) való összehasonlításkor is. Az iCC, pCC és dCC klasszifikáció szerint vizsgálva az volt látható, hogy TOMM20 expressziója megnövekedett pCC-ban ($p < 0,05$) és dCC-ban ($p < 0,01$), míg p62 csökken dCC-ban ($p < 0,05$) iCC-hoz képest. HCC mintákkal való összehasonlításkor a dCC esetek p62 ($p < 0,05$) és TOMM20 ($p < 0,05$) expressziója, valamint iCC esetek ($p < 0,05$), pCC ($p < 0,01$) Beclin1 szintje mutatott különbséget. Azonban az LC3 és COX4 expressziójában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a tumorok között.



15. ábra A Beclin1, p62 és TOMM20 expresszió az egyes tumorok esetében. A *és ** jelekkel a szignifikancia szinteket jelöltem.

A Ki-67 vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az iCC, pCC és a HCC hasonló expresszió szintet mutatott. A Ki-67 immunhisztokémiai eredményeinek mediánját tekintve a medián értéke az iCC esetében 15 %, pCC és HCC is esetében 25 % volt, míg dCC esetében a medián értéke 70 % volt. A Ki-67 expressziója az egyes dCC minták között is nagy eltéréseket produkált, így a Ki-67 mediánt felhasználva a dCC eseteket felosztottuk magas és alacsony

proliferációs aktivitású csoportokra és ezeken belül is megvizsgáltuk az egyes fehérjék expressziós mintázatát. (16. ábra) Összehasonlítva a dCC környező nem daganatos területeivel az alacsony Ki-67 expresszió dCC tumorok emelkedett Beclin1 ($p < 0,05$), LC3 ($p < 0,05$) és csökkent p62 szintet mutattak, míg a magas Ki-67 szintűek emelkedett TOMM20 ($p < 0,05$) és csökkent COX4 ($p < 0,01$) expressziót. Beclin1 tekintetében a magasabb Ki-67 aktivitást mutató esetek is mutattak különbséget a környező máj nem daganatos epeutjaitól, de statisztikailag ez nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,0553$). Az eltérő Ki-67 expressziót mutató dCC tumorok összehasonlításakor emelkedett Beclin1 ($p < 0,05$), LC3 ($p < 0,01$), COX4 ($p < 0,05$) és csökkent p62 ($p < 0,001$) szintet láttunk az alacsony Ki-67 expressziót mutató dCC tumorokban.



16. ábra A vizsgált fehérjék expressziója az alacsony és magas Ki-67 expressziót mutató dCC tumorok esetében. Szignifikáns különbséget találtunk a környező nem daganatos májterület és az alacsony Ki-67 expressziót mutató dCC minták közt az autofág markerekben, míg a magas Ki-67 szintű minták tekintetében a mitokondriális markerek mutattak az eltérést. A *, ** és *** jelekkel a szignifikancia szinteket jelöltem.

5.3.2 Az autofág és a mitokondriális fehérjék expressziója, valamint a proliferációs aktivitás összefüggései kolangiokarcinómában (CC) és a hepatocelluláris karcinómában (HCC)

Az elemzések során kitértünk arra is, hogy az egyes tumorok és a vizsgált fehérje expressziója között milyen kapcsolat tapasztalható. A korrelációs analízis eredményeit a 7. táblázatban összegeztem.

7. táblázat Kapcsolat a vizsgált fehérjék expressziójában az egyes tumorokban. (A táblázat tartalmazza r korrelációs együttható értékeket, illetve a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt)

($p < 0,05$)	iCC	eCC	pCC	dCC	HCC
Összefüggés a vizsgált fehérjék expressziója között	Beclin1-LC3 $r=0,60$	Beclin1-LC3 $r=0,60$		Beclin1-LC3 $r=0,61$	
	Beclin1-TOMM20 $r=0,41$			Beclin1-p62 $r=-0,55$	
		LC3-TOMM20 $r=0,39$	LC3-TOMM20 $r=0,51$		
		LC3-Ki-67 $r=-0,36$		LC3-Ki-67 $r=-0,42$	
	p62-Ki-67 $r=0,42$		p62-TOMM20 $r=0,50$	p62-Ki-67 $r=0,44$	
	COX4-Ki-67 $r=0,61$				COX4-TOMM20 $r=0,89$

Beclin1 pozitív összefüggést mutatott az LC3 megjelenésével az eCC ($p < 0,05$) esetekben és az eCC eseteket felosztva a dCC mintákban ($p < 0,05$). Azonban a Beclin1 negatívan korrelált a TOMM20 expressziójával iCC ($p < 0,05$), és a p62 szintjével dCC-ban ($p < 0,05$). TOMM20 eCC-ban kapcsolatot mutatott az LC3 szintjével ($p < 0,05$), míg az eCC alcsoportjait vizsgálva a TOMM20 LC3-al való összefüggése csak a pCC-ban ($p < 0,05$) jelentkezett, ahol a p62-vel is mutat korrelációt ($p < 0,05$). A Ki-67, mint proliferáció markere iCC esetében kapcsolatot mutat p62-vel ($p < 0,05$), és a COX4 ($p < 0,05$) expressziós szintjével, míg dCC mintákban csak az autofág markerekkel, az LC3 ($p < 0,05$) és p62 ($p < 0,05$)

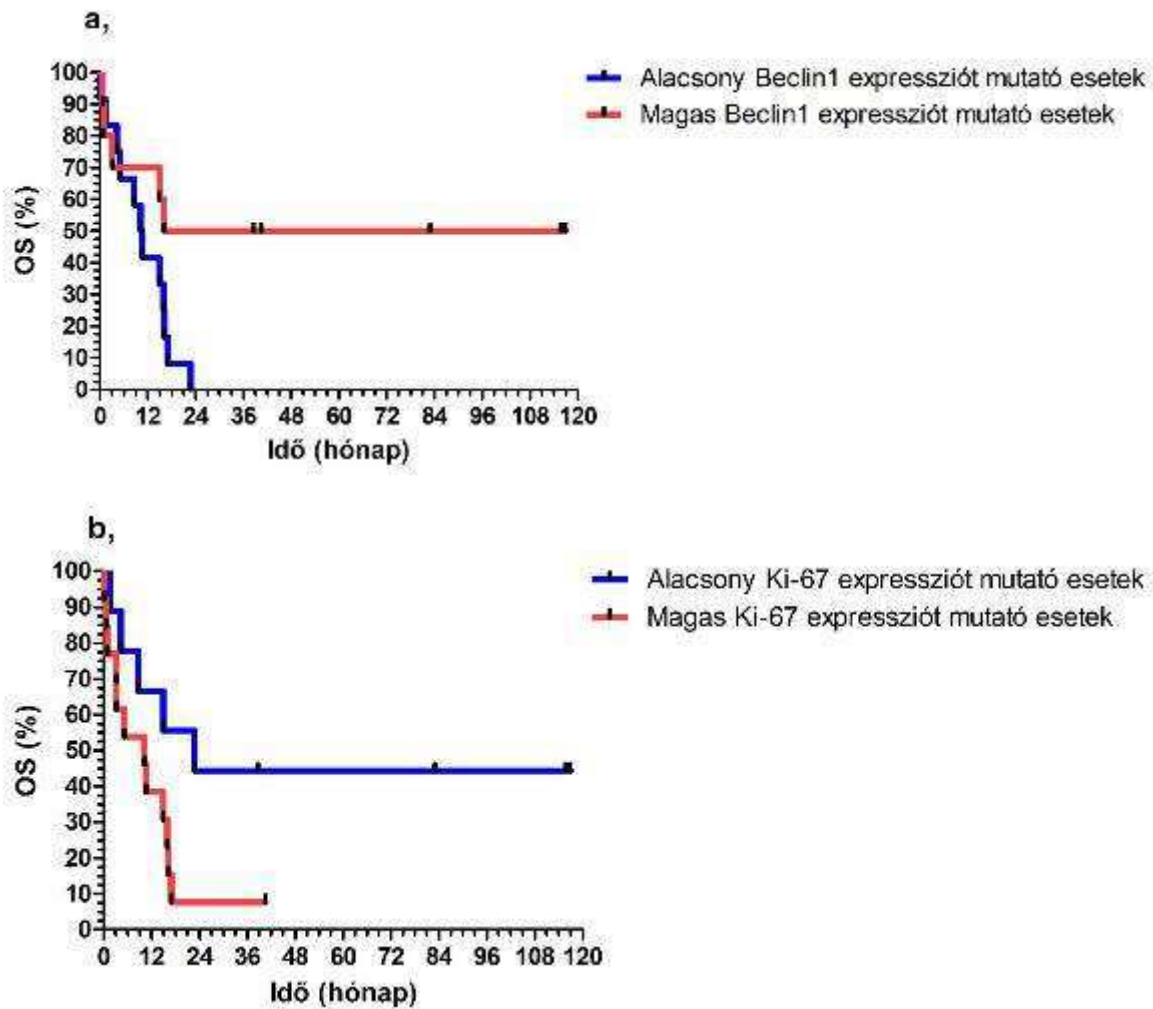
szintjével. Erős kapcsolatot találtunk a TOMM20 és COX4 ($p < 0,05$, $r = 0,89$) között HCC esetekben, amely azonban CC-ban nem jelentkezett.

A klinikopatológiai jellemzők és a fehérjék expressziója között vizsgált összefüggések esetében az LC3 expressziója és a minták differenciáltsági foka között ($p < 0,05$, $r = 0,51$) egy pozitív viszony állt fenn pCC mintákban, amely azt mutatta, hogy a magasabb grádusú pCC esetekben az LC3 szintje is várhatóan magasabb lesz. Ezt a kapcsolatot a többi tumor esetében nem tapasztaltuk.

5.3.3 A kolangiokarcinóma (CC) és a hepatocelluláris karcinóma (HCC) esetek utánkövetése

A 79 betegből a vizsgálatunk során 62 (78,4 %) páciens hunyt el, 24 fő iCC-ban, 19 főt pCC-ban, 18 főt dCC-ban és 1 főt HCC-ban veszítettek el. A medián OS iCC esetében 20,67 hónap, pCC-nál 7,27 hónap, dCC-nál 14,9 hónap volt, míg HCC esetében 89,7 hónap volt. A Kaplan-Meier módszerhez az egyes csoportokat kettéválasztottuk a vizsgált fehérjék expresszió alapján, vagyis felhasználva az IHC score értékek mediánját, így minden szövettani típus esetében elkülönítettük a fehérjék tekintetében egy magasan és egy alacsonyan expresszáló csoportot.

A túlélés és a vizsgált fehérjék expressziója között csak a dCC esetében kaptunk összefüggést. Az eredményeink azt mutatták, hogy a magasabb Beclin1 expressziót mutató dCC esetekhez hosszabb átlagos túlélés társult, mivel átlagban 66,53 hónap volt a túlélési ideje a magasabb Beclin1 szintet mutató dCC tumorral rendelkező páciensnek, míg ez az alacsony Beclin1 expressziójú esetben csak 10,41 hónap volt (17.a ábra). Továbbá a dCC esetek és a Ki-67 expresszió közt is kapcsolat mutatkozott meg, azaz a medián alatt expresszáló dCC esetek szignifikánsan rövidebb OS-el rendelkeztek. A Ki-67-et magasan expresszáló esetekben az átlag OS 22,8, míg az alacsony csoportban 10,23 hónap volt ($p < 0,05$). (17.b ábra).



17. ábra A dCC betegek túlélési analízis eredményei (a) a Beclin1 és (b) a Ki-67 expresszió függvényében. A magasabb Beclin1 és az alacsony Ki-67 expresszió szignifikánsan jobb túlélés társult dCC esetekben. ($p < 0,05$)

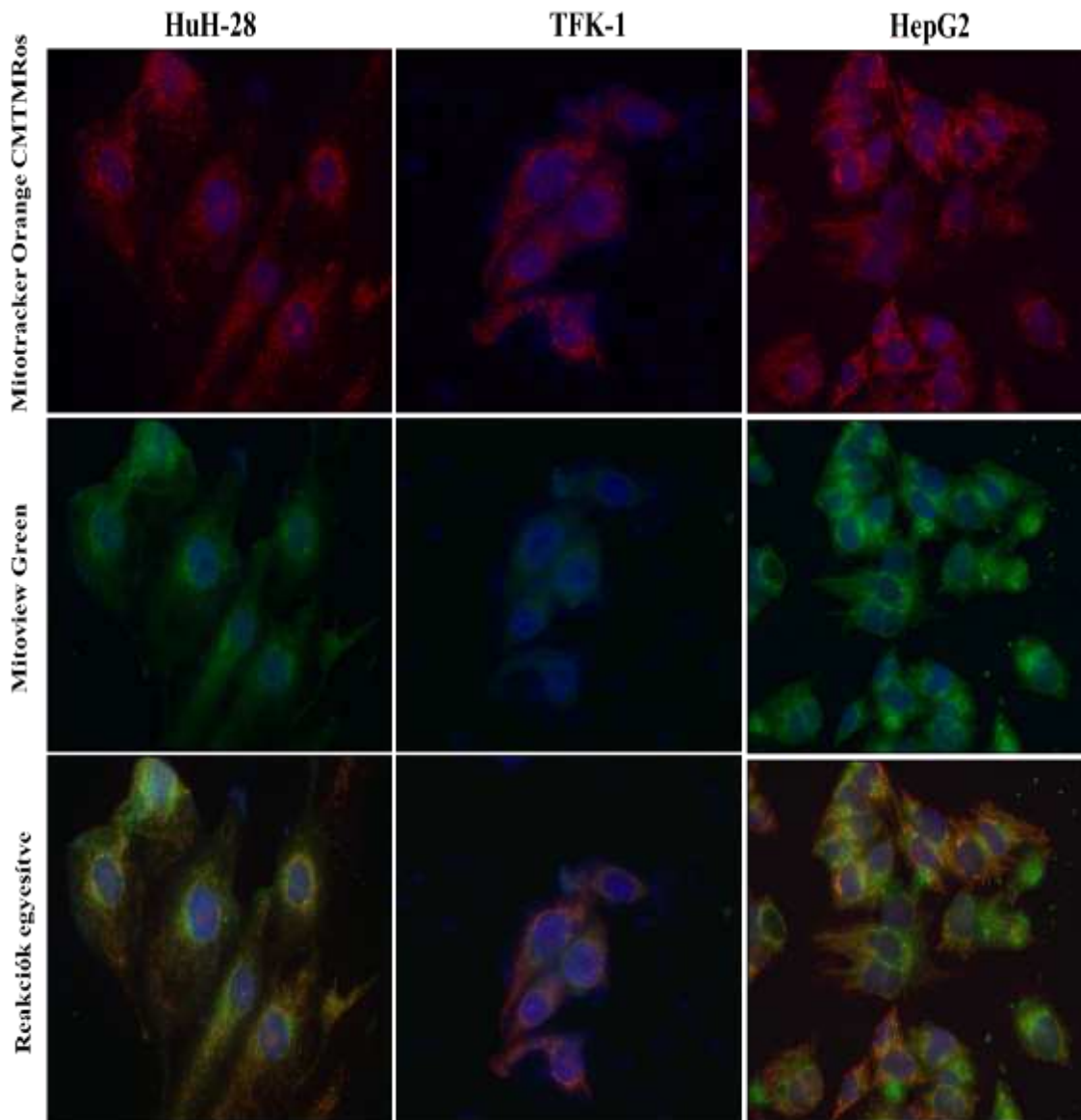
5.4 A mitokondriális morfológia és az autofágia vizsgálata in vitro intrahepatikus CC, extrahepatikus CC és HCC eredetű sejtvonalokon

5.4.1 Mitokondriális morfológia jellemzése

A CC- és a HCC-sejtvonalakban a mitokondriumok morfológiáját Mitotracker Orange CMTMRos (vörös, narancssárga) és Mitoview Green (zöld) festékekkel vizualizáltuk. A Mitoview Green inkább membránpotenciáltól függetlenül festi a mitokondriumokat, tehát a sejtek mitokondriális tömegének detektálását biztosítja. Ezzel szemben a Mitotracker Orange

CMTMRos egy membránpotenciál függő reakció, így csak az élő sejtekben a működő, aktív mitokondrium esetében halmozódik fel.

A festett mitokondriumok morfológiájának fluoreszcens mikroszkóp alatt történő ábrázolása különbségeket derített fel az iCC (HuH-28), eCC (TFK-1) és a HCC (HepG2) sejtvonalak narancssárga és zöld színében (18. ábra).

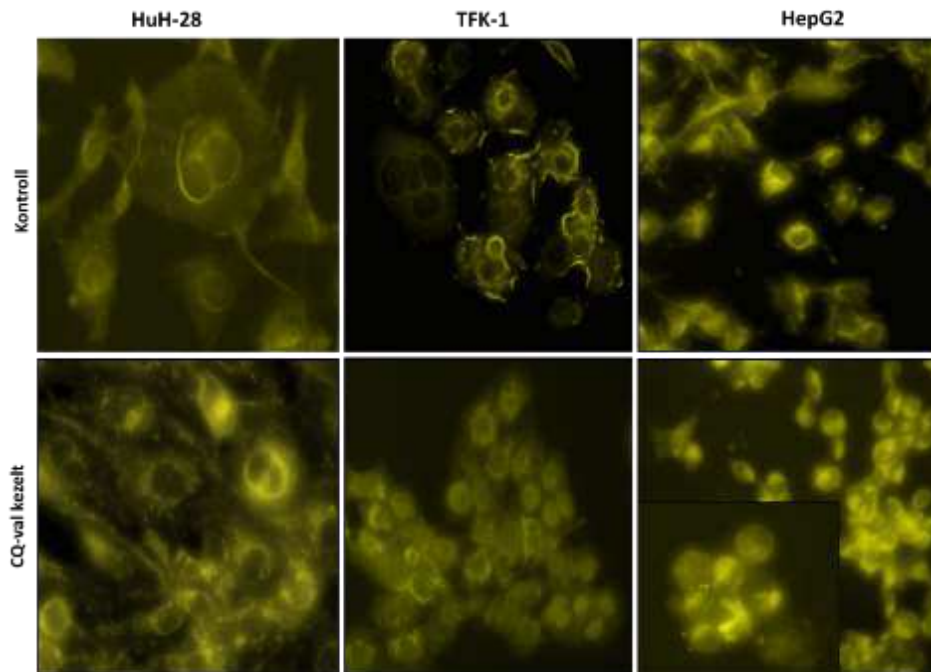


18. ábra Az immunfluoreszcens mitokondriális reakció HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejteken Mitotracker Orange CMTMRos (narancssárga) és Mitoview Green (zöld) jelöléssel. A reakciót mellett kék magfestés(DAPI). Eredeti nagyítás 400x

A HepG2-ban a vöröses szín meglehetősen tubuláris eloszlású mitokondriális hálózatot mutatott. Míg a HuH-28 és a TFK-1 sejtekben ez a hálózat sokkal rövidebb mitokondriumláncokat tárt fel, és néhol a mitokondriumokat pontozott formában jelentek meg. A két utóbbi sejtvonalban a zöld fluoreszcens jelek árnyékolva, hálóként mutatkoztak, míg a HepG2-ban inkább képest tubuláris megjelenés jellemezte. Az egyesített képek nagyfokú narancssárga színt mutattak a TFK-1-ben, jelezve az aktív mitokondriumokat, míg a HuH-28-ban és kisebb mértékben a HepG2-ben is jelentős mennyiségű zöld szín volt felismerhető.

5.4.2 Autofagoszómák vizualizációja fixált sejteken

Az autofágiás vakuólumok fluoreszcens megjelenítésére az irodalomban elfogadott a Monocadaverin (MDC) fluoreszcens festék által végzett reakciók. MDC beépülésének hatására az autofágiás vakuólumok a citoplazmatikusan, pontszerű fluoreszcens jelként mutatkoznak. (19. ábra)



19. ábra Az autofagoszómális vakuólumok detektálása MDC fluoreszcens reakció által a kontroll és CQ-val kezelt HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalakban. A kontroll HuH-28, TFK-1 sejtvonal diffúz reakciót, míg a CQ-val kezelt sejtek pontszerű intracitoplazmás reakciót mutattak. A HepG2 esetében a kezeletlen sejtekre inkább a diffúz, míg a CQ-val kezelt esetén diffúz és néhol pontozott reakció volt jellemző. Az eredeti nagyítás 400x, a beágyazott kép nagyítása pedig 600x.

A reakciókat elvégeztük kontroll, kezeletlen HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalakon, illetve a reakciót megelőző 24 órában CQ-nel kezelt HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejteken is. Megvizsgáltuk az MDC beépülését a sejtekbe, ezáltal az egyes sejtvonalat az autofágia szempontjából is megfigyeltük. Amint az a 19. ábrán látható, míg kezeletlen HuH-28 és TFK-1 sejtvonalakban az MDC jelek csak diffúz megjelenést produkáltak, addig a kezeletlen HepG2 sejtekben a diffúz reakció mellett néhány pontszerű jel is megjelent intracitoplazmatikusan. A CQ-val kezelt HuH-28 és TFK-1 sejtekben láthatóan megemelkedtek a pontszerű jelek száma, míg a HepG2 sejtekben csak minimálisan volt megfigyelhető.

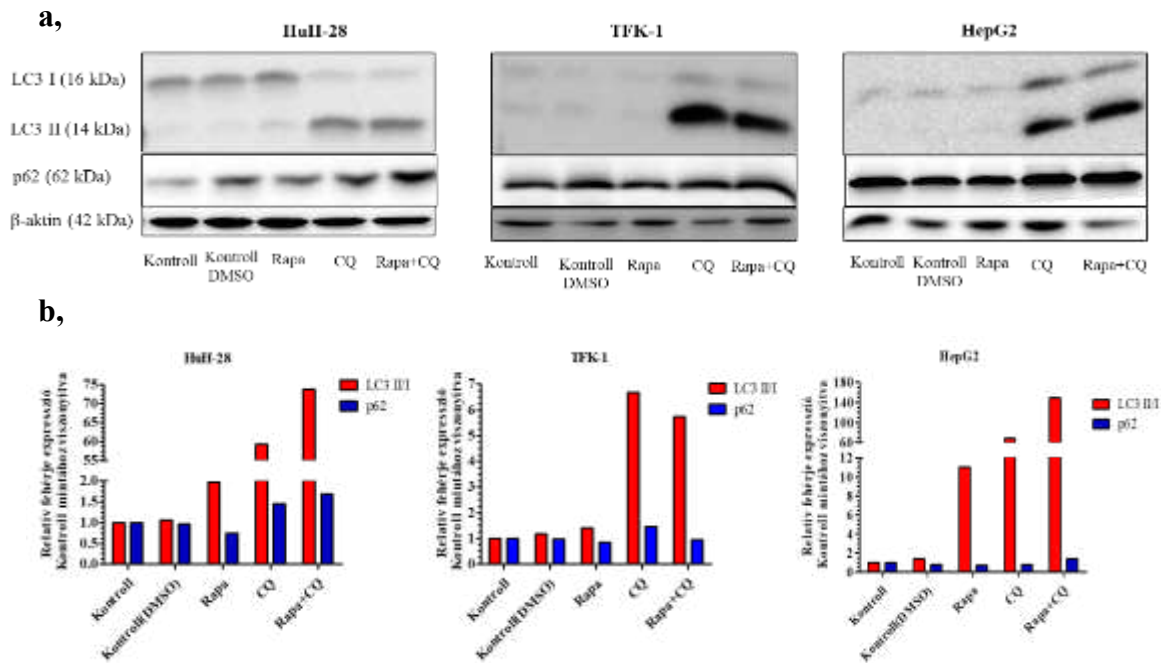
5.4.3 Rapamycin hatásának vizsgálata az autofágia folyamatára

A kiindulási autofágiát és annak indukálhatóságának vizsgálatához a HuH-28, TFK-1, HepG2 sejtvonalat 0,2 μ M Rapa-val vagy 50 μ M CQ-val vagy Rapa+CQ kombinálásával kezeltük. Az autofágia kapcsolatos fehérjék (LC3 II/I, p62) expresszióját Western blot módszerrel mértük (20. ábra). Western blottal az LC3 I és LC3 II méretkülönbségük miatt mindkettő detektálható, de az autofágia folyamata során a LC3 I-ből alakul ki az LC3 II, ezért a folyamat jellemzésére az LC3 II/I arányt, vagyis az autofágia fluxust prezentálják az irodalomban Western blot analízis esetében (50).

A kontroll, kezeletlen minta mellett egy DMSO-val kezelt, kontroll sejtvonalat is indítottunk a kezelésnél, figyelve a DMSO hatását a sejtekre, ezért ezekben a kontrollokban a kezeléseknél megfelelően a maximálisan alkalmazott oldószermennyiség minden esetben kevesebb volt, mint 0,1%. A kontroll és csak DMSO-val kezelt között HuH-28, TFK-1 és HepG2 esetében nem tapasztaltunk eltérést a vizsgált fehérjék expressziójában, így az eredményeinket a kezelés során a kontroll, kezeletlen sejtvonalakhoz viszonyítottuk.

Az eredményeink azt mutatták, hogy sejtek reakciói az egyszeres Rapa-val, CQ vagy Rapa + CQ kombinálások a kezelésekre eltérőek voltak. Az LC3 II/I szintjének emelkedése a Rapa, CQ és Rapa + CQ kezelések után a legmagasabb a HepG2-ban volt (11 \times , 68 \times és 149 \times) a másik két sejtvonálhoz képest. (a HuH-28-ban: 2 \times , 60 \times és 74 \times ; TFK-1-ben: 1,4 \times , 6,7 \times és 5,8 \times). (20. ábra) A p62 szintje emelkedett a HepG2-ben a Rapa + CQ után (1,4 \times), a HuH-28-ban a CQ-t és a Rapa + CQ-t (1,5 \times és 1,7 \times) és a TFK-1-ben a CQ-kezelés után

(1,5×). A kezelések többi részében a p62 expressziója változatlanul vagy kissé csökkent le ezekben a sejtvonalakban. Összehasonlítottuk az LC3 II/I szintjét is a kiindulási ([Kontroll + CQ] - [Kontroll]) és az indukált [Rapa + CQ] - [Rapa]) autofágia között, és megállapítottuk, hogy az indukált autofágia különbsége nagyobb volt a HepG2 és a HuH-28 esetében (5,2 és 6,9) az a kiindulási állapothoz képest (2,5 és 5,6). A TFK-1-ben azonban az indukált LC3 II/I különbsége alacsonyabb volt (6,6), mint a kiindulási állapotban (8,6). A p62 számításánál az eredmények az LC3II/I hasonlóak voltak: magasabb az indukált állapotban a p62 értékei HepG2-ben és a HuH-28-ban (1,4 és 0,4) a kiindulási állapothoz képest (-0,4 és 0,2); míg TFK-1-ben az indukált állapotban alacsonyabb a p62 értékei (0,2) az kiinduláshoz képest (0,9).

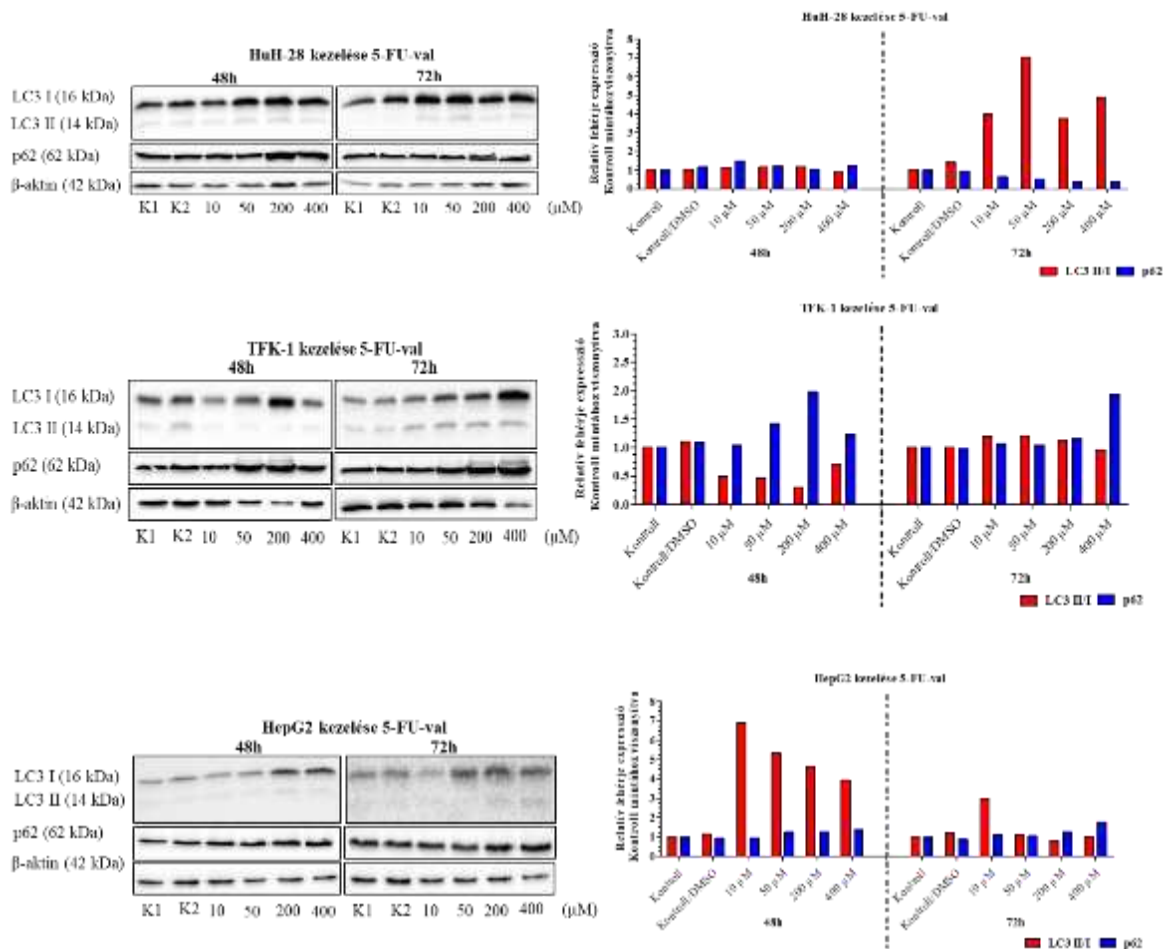


20. ábra A Rapa kezelés hatása az autofág fehérjék (LC3 II/I, p62) expressziójára HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalakban. A sejteket 24 órán keresztül kezeltük 0,2 μ M Rapanel, 50 μ M CQ-nel és a két szer kombinációjával. A fehérjék expressziójának analízisét Western blot analízissel végeztük (a). A fehérjék expresszióját β -aktin expressziójával normalizáltunk és kontroll/kezeletlen minták relatív fehérje expresszióihoz hasonlítottuk, amit oszlop diagramon ábrázoltuk. (b)

5.4.4 A kemoterápiás szerek hatása az autofágiára

A kemoterápiás szerek autofágia indukáló hatásának vizsgálata céljából a CC és a HCC sejtvonalakat 48 és 72 órán át kezeltük 5-FU-val vagy Sorafenib-bel. Az autofágia kapcsolatos fehérjék expresszióját Western blot analízissel mértük. A vizsgálat során a kontroll és csak DMSO-val kezelt között HuH-28, TFK-1 és HepG2 esetében nem tapasztaltunk eltérés a vizsgált fehérjék expressziójában, így az eredményeinket a kezelés során a kontroll kezeletlen sejtvonalakhoz viszonyítottuk. Amikor kemoterápiát adtunk a sejtekhez, megváltozott a sejtvonalakkal LC3 II/I és p62 szintjei az alkalmazott kemoterápiás szerrel és az inkubációs idővel kapcsolatban.

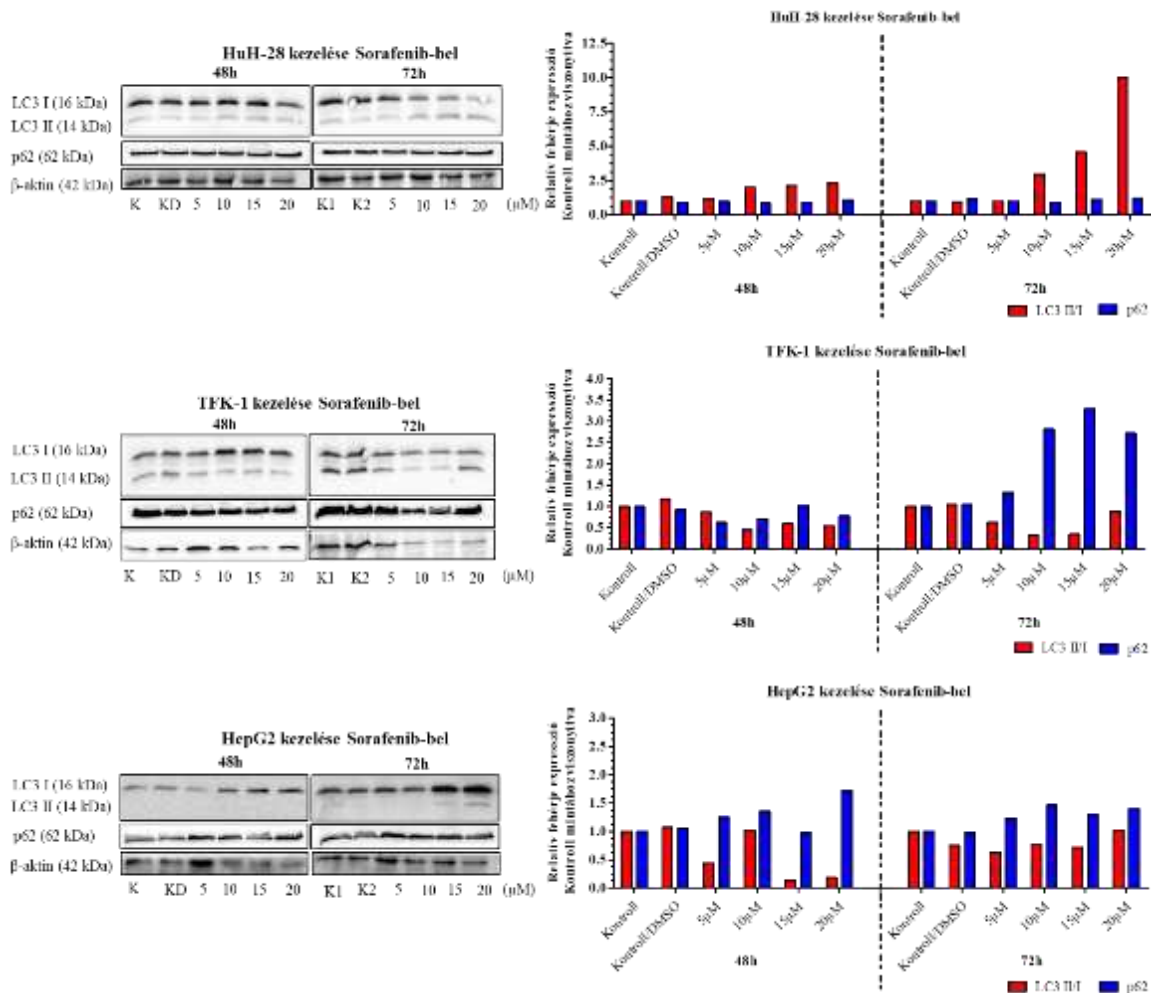
Az LC3 II/I szintje 10 μM 5-FU kezelést során a kontrollhoz képest megnőtt a HuH-28-ban 72 óra múlva több mint 3,8 \times -osával, HepG2-ban 48 óra múlva több mint 3,9 \times -esével, 72 óra múlva pedig 3 \times -osával. Ezenkívül az LC3 II/I szintje koncentrációtól függő csökkenést mutatott HepG2-ban az 5-FU dózist 10 μM -ról 400 μM -ra emelve 48 óra kezelés követően. Az LC3 II/I szintje nem mutatott változást a HuH-28-ban 48 órás, TFK-1-ben 72 óra kezelés után, míg a TFK-1-ben 48 órás kezelés követően inkább csökkent a kontrollhoz sejtvonal LC3 II/I szintjéhez viszonyítva. A p62 expressziójának (1,6 \times vagy annál nagyobb mértékű) csökkenését figyeltük meg HuH-28-ban 72 óra 5-FU történő kezelés követően a kontroll HuH-28-hoz képest. A p62 szintje változatlan maradt a kontrollhoz képest a HuH-28-ban 48 órás, a TFK-1-ben 72 órás és a HepG2-ben 48 és 72 órás 5-FU kezelés után. A TFK-1-ben a p62 szintje megnövekedett (több mint 1,2 \times -esével) 48 órás 50-400 μM koncentrációjú, és (1,94 \times -esével) 72 órás 400 μM koncentrációjú 5-FU kezelés követően. (21. ábra)



21. ábra A *HuH-28*, *TFK-1*, *HepG2* sejtvonalak kezelése 5-FU-val. A sejteket 48 és 72 órán át kezeltük 10, 50, 200 és 400 μM 5-FU-val. A fehérjék expresszióját Western blot analízissel végeztük el. A β -aktin expressziójával normalizáltunk a fehérjék expresszióját és kontroll/kezeletlen minták relatív fehérje expresszióihoz hasonlítottuk, amit oszlop diagramon ábrázoltunk.

A 72 órás Sorafenib-kezelés során emelve a koncentrációt 5 μM -ról 20 μM -ra az LC3 II/I szintje dóziszfüggő módon emelkedett meg a *HuH-28*-ban. (22. ábra) A 20 μM Sorafenib kezeléssel 48 óra múlva az LC3 II/I szintje 2,3×-os emelkedést és 72 óra elteltével 10×-es emelkedést mutatott *HuH-28*-ban összehasonlítva a kontroll sejtekkel. A *TFK-1* és a *HepG2* esetében az LC3 II/I szintje mind 48, mind 72 óra alatt csökkent. Az LC3 II/I expresszió elsősorban 10 és 15 μM koncentrációjú Sorafenib hatására csökkent a *TFK-1*-ben (több mint 2,5×-es csökkenést elérve 15 μM mellett 72 óra alatt) és a *HepG2*-ben pedig 15 μM és 20 μM Sorafenib hatására mutatott csökkenést 48 óra (kb. 10×-es csökkenést 15 μM esetén) és 72

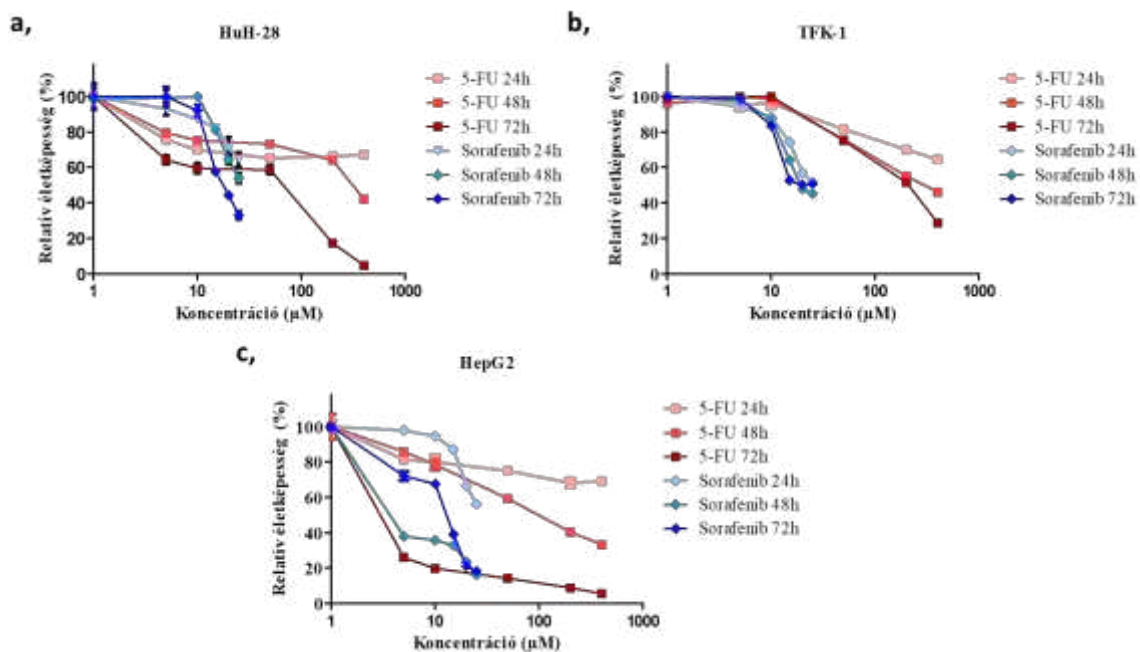
elteltével (kb. 1,4×-es csökkenést elérve 15 μ M esetén) a kontrollhoz képest. A p62 csökkent szintje nem volt megfigyelhető a sejtvonalakban a Sorafenib kezelés hatására. Míg változatlan maradt a HuH-28-ban mind 48, mind 72 óra alatt, és TFK-1-ben 48 órás kezelés követően. Azonban TFK-1-ben 72 órás Sorafenib kezelés követően a p62 szintje megemelkedett, több mint 2×-es emelkedést mutatva, HepG2-ban pedig mind 48, mind 72 óra elteltével több mint 1,5×-es emelkedést produkált.



22. ábra A HuH-28, TFK-1, HepG2 sejtvonalak kezelése Sorafenib-bel. A sejteket 48 és 72 órán keresztül 5, 10, 15 és 20 μ M Sorafenib-bel kezeltük. A fehérjék expresszióját Western blot analízissel detektáltuk. Az LC3 II/I; p62 fehérjék expresszióját β -aktin expressziójával normalizáltunk és kontroll/kezeletlen mintákhoz relatív fehérje expresszióihoz hasonlítottuk, amit oszlop diagramon ábrázoltunk.

5.4.4.1 A kemoterápiás szerek hatása a sejtek proliferációjára

A kemoterápiás szerek hatásának vizsgálatára SRB proliferációs vizsgálatokat végeztünk CC és HCC sejtekben. A kezelések 5-FU-al és Sorafenib-bel történtek különböző koncentrációban HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalakon. Amint a 23. ábrán látható, mindkét szer a 24, 48 vagy 72 órás kezelés követően dóziszfüggő módon gátolta a HepG2, HuH-28 és TFK-1 sejtvonalak proliferációját. Ennek ellenére a sejtvonalak eltérően reagáltak a kezelésekre. A sejtek életképességének legszembetűnőbb csökkenését a HepG2-ben figyeltük meg mind az 5-FU, mind a Sorafenib kezelés során 48 és 72 óra alatt, bár alacsony koncentrációjú Sorafenib kezelés esetén 48 óra alatt nagyobb életképesség csökkenést tapasztaltunk szemben a 72 órás kezeléssel. A HuH-28-ban mind az 5-FU, mind a Sorafenib alacsonyabb életképességet eredményezett 72 óra elteltével, míg a 48 és 72 órás kemoterápiás kezelést követően a TFK-1-ben hasonló sejtek életképességét találtunk, és ez a sejtvonalak közül a legkevesebb proliferációs aktivitás csökkenést mutatott a kezelésekre a vizsgált sejtvonalak közül.



23. ábra A 5-FU és a Sorafenib 24, 48 és 72 órás kezelésének hatása (a) a HuH-28, (b) TFK-1 és a (c) HepG2 sejtek relatív életképességére. HuH-28 és HepG2 esetén mindkét szer dóziszfüggő módon gátolta a sejtek proliferációját. Míg a TFK-1 estében nem volt olyan hatásos a szer, mint a másik két sejtvonalnál.

Ezután megvizsgáltuk egy autofágia-gátló (CQ) citotoxikus hatását 5-FU, illetve Sorafenib-bel kombinálva a CC és a HCC sejtvonalakon. A 48 és a 72 órás kezelések IC50 értékeit a 8. táblázat mutatja. Az 5-FU és a Sorafenib, mind a CQ-val kombinálva, csökkenthetik a HuH-28 IC50-értékeit 48 és 72 óra alatt, ami a sejtvonalak között a legnagyobb megfigyelt csökkenés. A TFK-1-ben az 5-FU CQ-val csökkentette az IC50-et 48 óra múlva, de 72 óra múlva nem, és a Sorafenib CQ-val nem vezetett az IC50 hirtelen csökkenéséhez. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a HepG2 nem reagált olyan nagy intenzitással a kemoterápiás kezelésekre kombinálva a CQ-val, bár a 72 órás 5-FU+ 50 μ M CQ-kombinációs kezelés enyhén csökkentette az IC50 értéket.

8. táblázat Az 5-FU és CQ, valamint Sorafenib és CQ kezelések citotoxikus hatásai a HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtekre, a kezelések IC50 értékeinek meghatározása alapján.

Kezelések	HuH-28 (IC50 értékek) [μ M]		TFK-1 (IC50 értékek) [μ M]		HepG2 (IC50 értékek) [μ M]	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h
	5-FU	361,6	27,2	106,2	3,5	286,3
5-FU + 10 μ M CQ	24,3	7,1	53,0	3,3	361,4	182,9
5-FU + 50 μ M CQ	2,6	2,8	3,1	3,0	322,4	151,4
Sorafenib	24,9	18,2	5,58	11,6	20,9	21,14
Sorafenib + 10 μ M CQ	23,4	13,8	6,1	5,0	24,5	21,9
Sorafenib + 50 μ M CQ	6,5	3,1	4,3	2,8	24,9	20,8

6 Megbeszélés

Az autofágia szorosan koordinált, többlépcsős katabolikus folyamat. Az autofágia, mint túlélési mechanizmus, segít a sejteknek fenntartani a homeosztázist a stresszes körülmények között is. Ezt elsősorban az energia- és tápanyag-egyensúly szabályozásával és az intracelluláris térben lévő elöregedett, meghibásodott sejtorganellumok eltávolításával, így például a már nem funkcionáló mitokondriumok eliminálásával valósítja meg. Az autofágia hiányos működése p62 aggregátumok, valamint károsodott mitokondriumok felhalmozódását eredményezi, amelyek DNS-károsodáshoz és kromatin instabilitáshoz vezetnek. Mindez növeli az intracelluláris ROS termelést és kedvez a malignus transzformáció kialakulásának.

Az autofágia jelentőségét kiemelten hangsúlyozzák a krónikus májbetegségekben és májdaganatokban. Munkánk során egyes krónikus májbetegségekben, kiemelten CHC-ben és AIH-ben, valamint májdaganatokban vizsgáltuk az autofágia egyes jellemzőit, valamint összefüggését a mitochondriális tömeggel és mikroRNS expresszióval.

Az alkohol indukálta, metabolikus eredetű és vírushepatitiszben az autofágia vizsgálata hozzájárult a patogenezisük mélyebb megértéséhez különösen a CHC esetében, mivel a folyamat elősegíti a HCV perzisztenciáját és elnyomja az aktivált immunválaszt (12, 38). Ellenben az ismeretlen etiológiájú AIH-ben az autofágia általános ismerete korlátozott (66). Az autofágia fiziológiás körülmények közt részt vesz az adaptív immunitás aktiválásában, elősegítve a kórokozók közvetlen eliminációját, valamint az antigének feldolgozásában és a T sejteknek történő bemutatásban is fontos szerepe van (73). Ezen ismeretek felvetették, hogy az autofágia kapcsolódhat elégtelen vagy épp túlműködő funkcióval AIH-ben, de az összefüggés feltárásához még további vizsgálatok szükségesek (66). Ez indokolta azon kutatásainkat, melyek az autofágia vizsgálatára irányultak AIH és CHC-ben, és ennek összefüggésére a mitochondriális tömeg változására.

Munkánk során az LC3 és p62 fehérjék, mint az autofágia funkció közvetett indikátorainak fokozott szintjét igazoltuk AIH-ben, összehasonlítva a CHC-vel. Az LC3 fehérjének kiemelt jelentősége van az autofágia kimutatásában a kezdeti folyamatot meghatározó Beclin1 molekulán kívül (35, 49). Az érett autofagoszóma membránja

viszonylag fehérjeszegény, az ATG fehérjék jelentős része nem található meg a folyamat teljes egészében, azonban az LC3 mindvégig detektálható az autofagoszóma külső és belső membránjában is (35, 49). Így az immunhisztokémiailag detektált LC3 szintje önmagában az autofágia folyamat megindulását jelzi, de nem tükrözi, hogy az autofágia lezajlott-e, vagy károsodott (43, 50). Fiziológias körülmények között az autofágia folyamatosan eltakarítja a citoplazmából a p62 fehérjét a hozzákötődő szállítómánnyal együtt, így ezen fehérje alacsony szintje utal a beteljesült autofágia mechanizmusára (54). A vizsgálatainkban tapasztalt megnövekedett LC3 és p62 szint AIH mintákban azt mutatta, hogy az autofagoszóma-képződés lizoszómális lebomlás nélkül történt meg. Babuta és munkatársai egy nemrégiben elvégzett tanulmányukban az általunk tapasztalathoz hasonló fehérje mintázatot mutattak ki. A p62 és LC3 szint emelkedését észlelték ALD esetekben krónikus alkoholbevitel eredményeként, amit a lizoszómális szintű autofágia funkció zavarának tulajdonítottak (43).

Az AIH-val ellentétben a CHC-ben csökkent p62 szintet figyeltünk meg, ami arra utal, hogy az autofág funkció sokkal nagyobb ütemben történik CHC-ben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy a Huh7.5 sejtekben a HCV fertőzést követő 3–6 napon belül a p62 szint csökkent, míg az LC3 fehérje emelkedett, amelyek az autofágia válasz növekedést jelezték. Tanulmányok bizonyítják, hogy a HCV az életciklusának különböző szakaszaihoz aktív autofágiát használ fel. A HCV replikációja endoplazmatikus retikulumhoz (ER) kötött és így megváltoztatja annak homeosztázisát, ER stresszt idéz elő, amely az ATF6, IRE1 és PERK fehérje útvonalakon keresztül autofágiát indukál. Az ER stressz kalcium felszabaduláshoz vezet, ami károsodott mitokondriális aktivitást eredményez, és a ROS túlzott termelésével jár. A sérült mitokondriumok pedig mitofágia útján eliminálódnak (17, 65).

A vizsgálataink során a rendelkezésre álló mitokondriális tömeg detektálására a TOMM20 fehérje immunhisztokémiai jelölését használtuk AIH és CHC mintákban. Az AIH-ben megnövekedett TOMM20 értéket figyeltünk meg a CHC-hez képest, ami arra utalhat, hogy megnövekedett az aktív mitokondriumok száma és/vagy felhalmozódtak a sérült mitokondriumok. A TOMM20 emelkedéssel párhuzamosan azonban a p62 szint is nőtt, amelyből az feltételezhető, hogy a károsodott sejtorganelumot az autofagolizoszómák nem tudták eliminálni. Ennek alapján a kimutatott magas TOMM20 és p62 azt jelezheti, hogy a sérült mitokondriumok valószínűleg nem olyan hatékonyan eliminálódnak az AIH-ban, mint

a CHC-ben. A feltételezéseinket alátámasztva egy NASH eseteket vizsgáló tanulmányban azt találták, hogy az egér májsejtjeibe beadott palmitinsav eredményeként megemelkedett mitofágia szintet megnövekedett LC3/TOMM20 és csökkent p62/TOMM20 arányok jellemezték (60). Az AIH és a CHC mintákban megfigyelt LC3/TOMM20 aránya hasonlóan bizonyult vizsgálatainkban, de az átlagos p62/TOMM20 arány háromszor magasabb volt az AIH-ben, mint a CHC-ben. Ez alátámasztja a károsodott mitofágiára vonatkozó megfigyeléseinket AIH mintákban.

A csökkent p62/TOMM20 arány a CHC esetekben, valamint a csökkent p62 szint (az AIH-ban megfigyelt expresszió negyede) és a csökkent TOMM20 szint (1,4-szer kevesebb, mint az AIH-ban) aktív és nem károsodott autofágiát jelzett. A CHC eseteinkben tapasztalt eredményeinket támogatja egy tanulmány, amelyben a HCV a fertőzést követő 2 napon belül elősegítette a mitokondriális hasadást a Huh7 sejtekben, ahol a károsodott organellumokat a mitofágia eliminálta (74). CHC esetében a HCV nem vált ki közvetlen citopátiás hatást, hisz a fertőzött sejtek fennmaradása szükséges a fertőzés lefolytatásához. Ezzel állhat összefüggésben, hogy a vírus a károsodott mitokondriumok által előidézhető sejtkárosodást képes kivédeni a sérült sejtorganellumok eliminálásával mitofágia útján (17). A mitofágiát a HCV egy mitokondriális szétesést aktiváló fehérjén, a Drp1-en (Dynamin related protein1) keresztül is képes stimulálni (17), amellyel közvetett úton apoptózis csökkentést idéz elő a fertőzött sejtekben (65). Ezzel szemben AIH-ben a Drp1 fehérje a TOMM20 megjelenésével kolokalizálódott. Ennek alapján egyes szerzők arra következtetésre jutottak, hogy a mitokondriális hasadás részt vesz az AIH-ben, azonban ebben az esetben a nekrozis folyamatához kapcsolódott (75).

A vizsgálataink során az AIH esetek nagyobb százalékát jellemezte az erőteljesebb nekroinflammatorikus megjelenés, mint az CHC mintákat. Az irodalomban az AIH esetekre a kiterjedt gyulladás mellett a sejtek erőteljes immunválasza jellemző, amely CHC-ben csökkent mértékben tapasztalható. A fertőzés során a HCV a mitofágia aktiválásával és a kulcsfontosságú veleszületett immun jelátviteli tényezők megcélzásával befolyásolja a gyulladással citokinek felszaporodását és a sejtkárosodást CHC-ben (17, 76, 77). A károsodott mitokondriumok felhalmozódása ugyanis túlzott gyulladással reakciót okozhat, ezért igen fontos az eliminálásuk (76). A gazdasejt veleszületett immunitása, interferonok

(IFN) aktiválásával, és gyulladáscitokinek szekretálásával reagál a HCV fertőzésre, hogy elnyomja a HCV replikációt (76, 77). Azonban a vírus képes az autofágia ATG5-ATG12 komplexén és a NS3/NS4A fehérjéken keresztül a gazdasejt interferon immunválaszának elnyomására (17, 65). A vizsgálataink során az AIH mintákban a p62 expressziójának növekedése és a nekroinflammáció súlyosbodása közt összefüggést találtunk, amely arra utal, hogy az autofágia aktivitásának csökkenése a gyulladás súlyosságához kapcsolódik; vagyis minél inkább romlik a sejtek funkciója a kiterjedt gyulladás következtében, annál kevésbé képes az autofágia „megmenteni” a sejteket, amelyek később ezért nekrozis révén elpusztulnak. Úgy tűnik, a hiányos mitofágia a gyulladáscitokinek szekréciójával és az immunsejtek homeosztázisának diszregulációjával jár, így hozzájárulva a máj gyulladáscitokinek károsodásához és az autoimmun májbetegség kialakulásának patomechanizmusához.

Az mTOR erőteljes aktivitását figyelték meg az autoimmun elváltozások, mint az AIH eseteiben is (66), és megállapították, hogy ez hozzájárulhat a gyulladáscitokinek károsodásához (78). Az mTOR úgy is ismert, mint az autofágia fő negatív szabályozója (35, 49) és az mTOR inhibitor, Rapamycin, alkalmazásával hatásos eredményt értek el az AIH előrehaladott eseteiben (66). Az eredményeink alapján a kezelés hatékonyságát magyarázhatja, hogy az mTOR gátlásával autofágia indukciót érhetnek el AIH esetekben, amely csökkentheti a gyulladási folyamatokat, bár ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

A megváltozott lipidmetabolizmus szorosan kapcsolódik a HCV életciklusához. A HCV-virionok lipoproteinekhez kapcsolódnak a keringésben és lipoprotein-receptorokon keresztül kapcsolódva lépnek be a sejtekbe (17, 77). A HCV azonban nemcsak az intracelluláris lipid-kompartmentek, hanem a lipid-anyagcsere alapos megváltozását is kiváltja, mivel a HCV-indukálta ER-stressz szteatózist eredményezhet (17). A HCV azonban a lipofágia által „próbálja megvédeni” a sejteket a HCV által kiváltott túlzott lipid-akkumulációtól (79, 80). Vescovo és munkatársai számoltak be arról, hogy az autofágia hatással van a HCV által kiváltott lipidanyagcsere változásaira, és az autofágia zavara esetén szteatózisz alakulhat ki (77). Magunk nem figyeltünk meg különbséget az autofág markerek - az LC3 és a p62 expressziójában - a szteatótikus vagy nem szteatótikus krónikus hepatitisz minták között, sem a CHC, sem az AIH esetek tekintetében. A p62 szintje csökkent ugyan a

szteatotikus CHC-ben a nem szteatotikus CHC-hez viszonyítva, de statisztikailag az eltérés nem érte el a szignifikancia küszöböt.

A májfibrózis igen fontos májelváltozás, mely számos krónikus májbetegség kísérője, következménye, illetve patomechanizmusában fontos szerepet játszó tényező. A fibrózis során a máj csillagsejtjei (HSC, hepatic stellate cells) aktiválódnak, melynek döntő szerepe van a kötőszöveti rostok felszaporodásában (81). Vizsgálataink során tanulmányoztuk az autofágiával kapcsolatos fehérjék expresszióját a krónikus hepatitis minták fibrózis stádiumának (F1- F4) összefüggésében. Eredményeink alapján nem találtunk összefüggést a minták fibrózis stádiumai és az autofág markerek szintje közt sem CHC, sem AIH esetekben. Vizsgálatainkban a CHC és AIH esetek fibrózis stádiumai egyenetlen eloszlást mutattak, azonban az autofágia és fibrózis közötti összefüggés hiánya nem zárja ki a kettő szoros kapcsolatának lehetőségét. A fibrózisban zajló autofágia igen összetett folyamat, melynek feltárása további tanulmányokat igényel. A rosszul feltekeredett, károsodott fehérje aggregátumok felhalmozódása, az autofágia károsodása következtében fibrogenézishez vezethet (48, 80, 81). Kimutatták, hogy az autofágia képes megvédeni a máj szinusoid endotél sejtjeit az oxidatív stressztől, javítva ezzel a máj hegesedését. Egyesek beszámoltak arról, hogy az autofágia a májfibrózis kialakulásában részt vesz. Igazolták, hogy az autofágián keresztül aktiválódhatnak a HSC sejtek és 3-metiladenint (3-MA), mint autofágia inhibitor használva egérmáj fibrotikus állapotának javulását érték el (80). A HCV fertőzött sejtekben a vírus core és a nem - struktúr proteinjei HSC sejtproliferációt indukálnak és a HCV replikációja fibrogén ingereket eredményez (81). Az autofágia szerepének kettősége a fibrózisban azt mutatja, hogy májbetegségeket befolyásoló tényezők eltérő hatást gyakorolhatnak az autofág folyamatra is és a kialakult autofágiás válasz az eredő hatások együttese lehet, amely eddig kevésbé tisztázott az irodalomban.

Az autofágia szabályozás mellett mikroRNS-ek általi szabályozás kérdése egyre nagyobb érdeklődést váltott ki az elmúlt időben a krónikus májbetegségekből (38, 46). Az autofágiához kapcsolódó mikroRNS expressziók elemzése további ismereteket nyújthat az autofágia szerepének megismeréséről az eltérő etiológiájú krónikus hepatitisben (38, 46). Az autofágia-szabályozó mikroRNS-ek expresszióit a HCV fertőzés során már tanulmányozták (38, 82), de legjobb tudásunk szerint csekély adat áll rendelkezésre a

mikroRNS-ek expressziójáról az AIH-ban (83). Munkánk során olyan mikroRNS-ek expressziójának vizsgálatát tűztük ki célul, amelyekről ismert, hogy befolyásolhatják az autofágias aktivitást, vagy az autofágia képes szabályozni a mikroRNS kifejeződését, illetve a mikroRNS expressziója hatás gyakorolhat a krónikus hepatitis progressziójára.

A vizsgálatunk során emelkedett miR-101 expressziót találtunk a CHC mintákban az AIH esetekhez képest. Ez váratlan volt, mivel az irodalomban a miR-101 autofágia-gátlóként ismert (84). A miR-101 hatására csökkent autofágia jelent meg emlő adenokarcinómájában RAB5A, STMN1 és ATG4D targetjeinek szabályozása révén, HCC-ban EZH2-en keresztüli regulációja kapcsán (38, 84), valamint ischaemiás májban az mTOR jelátviteli út aktiválásával (85). Ennek ellenére a jelen vizsgálatban megfigyelt LC3 és p62 szintek támogatják az aktív autofágia elméletét és nem gátolt állapotát CHC mintákban. Érdekes módon szérumban megnövekedett miR-101 expressziót tapasztaltak HCV fertőzött HCC mintákban (86). Ezenkívül a közelmúltban arról számoltak be, hogy a miR-101 antifibrotikus hatást is kiválthat, valószínűleg a PI3K/AKT/mTOR útvonal szabályozása révén (87). A vizsgálatunkban a miR-101 és a fibrózis stádiuma között nem volt megfigyelhető kapcsolat sem CHC, sem AIH eseteiben, azonban amikor az összes CHC és AIH mintát egy csoportba egyesítettük, úgy találtuk, hogy a miR-101 negatívan korrelál a fibrózis stádiummal ($r = -0,36$, $p < 0,05$) és nekroinflammációval ($r = -0,47$, $p < 0,01$). Figyelembe kell venni azonban, hogy a CHC esetek többsége (68,9%) alacsony fibrózis stádiumú volt, míg az AIH esetek többsége (61,1%) magasabb fibrózis stádiumot mutatott. Emellett magasabb miR-101 expressziót találtunk azokban a CHC esetekben, amelyek alacsony fibrózis stádiumot mutattak (F1, F2). Ezért feltételezzük, hogy a miR-101 viszonylag magasabb szintje elegendő lehet a sejteknek az előrehaladott fibrózis elkerüléséhez, de nem elég ahhoz, hogy megakadályozza az autofágia kialakulását. Ezenkívül a mikroRNS-ekről ismert, hogy számos célgénre gyakorolják szabályozó hatásukat, ezzel egyidejűleg több biológiai folyamatot befolyásolva, továbbá egy folyamatot akár több mikroRNS is képes szabályozni, így a miR-101 sem az egyetlen mikroRNS, amely egyidejűleg gátolhatja az autofágia kialakulását. Bár a vizsgált mikroRNS-ek (miR-224, miR-155 és miR-204) expressziója esetében a miR-101-en kívül nem tapasztaltunk összefüggést az autofág markerek

kifejeződésével, azonban eltérést találtunk az miR-224 és miR-155 szintjében a hisztopatológiai paraméterekkel vonatkozásában.

Kapcsolatot figyeltünk meg a miR-224 szintje és a szteatózis mértéke között CHC mintákban, míg AIH esetekben ez az összefüggés nem volt tapasztalható. A munkacsoportunk korábbi vizsgálatában emelkedett miR-224 szintjét találta a szteatotikus CHC-ben a nem szteatotikus CHC-hez viszonyítva (88). Egy másik tanulmányban emelkedett miR-224 szintjét írtak le HCV fertőzött mintákban a normál máj szövetekhez képest, míg szintén eltérést tapasztaltak az interferon/ribavirin kezelés során a kezelés előtti és utáni minták miR-224 expressziójában (89). A miR-224 ismert prediktív faktora a hepatoblasztóma prognózisának (90), valamint ismert oncomiR, és expressziójával támogatja a HCC proliferációját (88). A miR-224 és a szteatózis közt tapasztalt összefüggés utalhat arra a HCC-vel való összefüggésre, mivel a szteatotikus CHC esetek egyik leggyakoribb kockázati tényezők a HCC kialakulásának (65, 91).

A miR-224-hez hasonlóan csak a CHC esetekben tapasztalhatunk miR-155 szintjében változást hisztopatológiai paraméter vonatkozásában, míg az AIH mintákra ez nem volt jellemző. Megnövekedett miR-155 expressziót figyeltünk meg a magasabb fibrózis stádiumú CHC mintákban, összehasonlítva az alacsonyabb fibrózis stádiumúakkal. Az eredményeinket támogatta az a vizsgálat, amiben a miR-155 génjének kiütése az egerek máját megóvta a korai és előrehaladott fibrózistól a CCl₄ kezelés során (42). Továbbá a miR-155-ről nemcsak azt találták, hogy az ALD-ben szabályozza az autofágiát az mTOR szabályozása révén, hanem az autofagoszóma lizoszómával való összeolvadását is képes rontani, ami megnövekedett LC3 és p62 szintet eredményez (43). Vizsgálataink ezzel csak részben értenek egyet. A többi vizsgált mikroRNS expresszióját nézve a legtöbb terméket a miR-155 vizsgálata esetén mértük mind a CHC, mind az AIH mintákban, azonban az LC3 és a p62 szintje csak AIH esetében volt növekedett, utalva károsodott autofágiára, a CHC mintákban azonban nem. Ennek ellenére a miR-155 expressziójának jelentős növekedéséről számoltak be HCV-fertőzött betegekben, ami úgy tűnik, hogy részt vesz az antivirális immunválasz szabályozásában, elősegítve a HCV replikációját és perzisztenciáját (41). A miR-155 szabályozásáról további adatok nem állnak rendelkezésre AIH-ben, de a miR-155-nek egyéb szerepe is lehet, például a gyulladásos sejtek toborzásában és a májkárosodásban is (92).

Bár vizsgálatunk nem utalt arra, hogy a vizsgált mikroRNS-ek kiemelt hatásúak lennének az autofágia szempontjából CHC és AIH-ben, azonban eredményeink az irodalomban is tapasztalt mikroRNS expressziók CHC progresszióját befolyásoló tényezőkkel mutatott összefüggését támogathatják.

Számos publikáció vizsgálja a mikroRNS-ek szerepét a máj karcinogenezisében és hogy a mikroRNS expressziós mintázata hogyan jellemezheti a benignus és malignus májváltozásokat meghatározó biológiai folyamatokat (93–95). Ezért munkánk során célunk volt olyan mikroRNS expressziós mintázat kimutatása, amely a cirrózis vagy HCC vagy pedig a fokális noduláris hiperplázia (FNH) jóindulatú proliferációját jellemezheti. A benignus hámeredetű daganatok közé sorolják az adenomán (hepatocelluláris és kolangiocelluláris adenoma) kívül a FNH-t, bár ennek daganat voltát egyesek kétségbe vonják, mások viszont megjelenése és klinikai képe alapján daganatnak tekintik. A máj primer malignus daganatai közül a leggyakoribb és a diffúz krónikus májbetegségekkel szoros kapcsolatot alkot a HCC és a CC (24, 25).

A vizsgált mikroRNS-ek túlnyomórészt csökkent szintet mutattak FNH-ban, de a miR-34a és a miR-224 FNH-ban, cirrózisban és a HCC-ben is megnövekedett a normál májhoz képest. Ez az eredmény összhangban áll a szakirodalommal, mivel mind a miR-34a, mind a miR-224 fokozott expresszióját írták le májbetegségekben, ideértve a fibrózist, a HCV-fertőzést, a cirrózist, az alkoholos és nem alkoholos májbetegségeket, valamint a HCC-t (96). A miR-34a egyik aktivátora a p53, amely a májsejtek apoptózisát és a HSC-k aktiválását eredményezi (97). A HSC-k szabályozása révén úgy tűnik, hogy a miR-34a szerepet játszik a májfibrózisban is, és a miR-34 csendesítése α -SMA, az I. típusú kollagén és a dezmin csökkenését idézte elő (98). A HSC-k aktiválódását mutatták ki FNH-ban, mivel az artériás hiperperfúzióból származó oxidatív stressz aktiválhatja a HSC-eket a központi hegesezésben (99). Tehát úgy tűnik, hogy a miR-34a elősegíti a sejtek túlélését, amint azt korábban javasolták a HCC sejtenyészetekben (100), hozzájárulva a májszövet helyreállításához és a fibrózishoz.

Megállapították, hogy a miR-224 elősegíti a proliferációt, a migrációt és az inváziót az AKT aktiválásával (101) és a TGF β (102) jelátviteli útvonalon keresztül, valamint az MMP-9 expressziójának fokozásával (103). Továbbá az a tény, hogy a p65/NF- κ B-t a miR-224

közvetlen transzkripciós regulátoraként azonosították, összekapcsolja ezt a mikroRNS-t a gyulladással és a sejtek migrációjával, ebből a szempontból a HCC fejlődésével és progressziójával is (104). Ezért valószínű, hogy a miR-224 elősegíti a proliferációt májkárosodások során. Ezt a feltételezést támasztja alá az emelkedett miR-224 jelenlétére vonatkozó adatok egyre növekvő száma krónikus májbetegségekben (94, 105), illetve a CHC mintákban általunk tapasztalt szteatózis és miR-224 szintjének összefüggése.

Vizsgálatunkban a miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-195, miR-210, miR-221 és miR-222 csökkent expressziót mutattuk be FNH-ban, összehasonlítva a cirrózissal, HCC és/vagy normál májjal. Az FNH-ban a csökkent miR-21, miR-222, miR-17-5p, miR-18a szintje érdekes megállapítás, mivel ezek a mikroRNS-ek targetei gátolhatják a sejtproliferációt és a sejtciklus előrehaladását. Az emelkedett miR-21-et és miR-222-t találtak különféle típusú rákokban, köztük a HCC-ben (106–108), mivel statisztikailag alacsony miR-21 és miR-222 expressziót detektáltak a hepatocelluláris adenomában és az FNH-ban (109). A miR-21 megcélazza a PTEN-t, a PI3K/AKT út negatív szabályozóját (110), ami a sejtek proliferációjához, migrációjához és a daganat növekedéséhez vezet (111). A miR-222 targetei az CDKN1B, p27/Kip1 (112) és a PPP2R2A (106), amelyek a sejtciklus és a sejtnövekedés két negatív szabályozója. Megfigyeléseink szerint a miR-21 és a miR-222 emelkedett a cirrózisban és a HCC-ben, de az FNH-ban nem, amely alátámasztja ezeknek a mikroRNS-eknek a hepatokarcinogenezisben való részvételét. Tulajdonképpen a miR-21 célgénje befolyásolja a tumor biológiai meghatározó folyamatait (113) és az NF- κ B-vel együtt hozzájárul a transzformált állapot fenntartásához (114). Míg az alacsony miR-21 szintje a Hippo-út vonal gátlójának aktiválásával is megindíthatja a proliferációt, engedve hogy a YAP transzkripciós koaktivátor iniciálja a génexpressziót (115, 116). Ez magyarázhatja azt a megfigyelésünket, miszerint az FNH-ban a proliferáció akkor is megengedett, ha alacsony a miR-21 szintje, de ez minden bizonnyal egy olyan szabályozás alapján nyilvánul meg, amely eltér attól az állapottól, amikor magas miR-21 expresszió van.

A miR-17-5p és a miR-18a célpontjai szintén a sejtciklus-gátlók (117, 118) Ennek ellenére arról számoltak be, hogy a miR-17-5p magas és alacsony szintje is elősegítheti a proliferációt (118). Így az FNH-ban és a cirrózisban kimutatott alacsony miR-17-5p szintek

támogathatják a proliferációt, de eltérő útvonalakon keresztül, mint amikor magas a miR-17-5p expresszió.

A korábbi onkogén mikroRNS-ekkel ellentétben a miR-195 tumorszupresszor funkcióval rendelkezik, mivel gátolja a proliferációt és az angiogenezist (119). Ennek oka lehet az FNH-ban és a HCC-ben megfigyelt alacsony miR-195 expresszió a cirrózishoz képest, jelezve a folyamatos proliferációt. Ennek ellenére a miR-195 aktiválhatja a HSC-eket, megnövekedett α -SMA és csökkent Smad7 szintet eredményezhet (120), ami pedig magyarázhatja, hogy miért az miR-195 emelkedett a cirrózisban, mivel a TGF β /Smad út kulcsszerepet játszik a májfibrózis elősegítésében, ahol a Smad7 a negatív szabályozó. A miR-210 egy sokrétű mikroRNS, amely túlnyomórészt részt vesz a túlélő hipoxiában (121). Ennek ellenére arról számoltak be, hogy a miR-210 túlzott expressziója sejtciklus leállításához vezet, és a gátlása pedig felgyorsítja a sejtciklus előrehaladását (122). Ez tisztázhatja a miR-210 alacsony szintjét a FNH-ban és HCC-ben, a cirrózishoz viszonyítva.

Összefoglalva vizsgálati eredményeink olyan mikroRNS-ek expressziójának megváltozását tárták fel, amelyek emelkedése összefüggésben lehet a máj mind a jóindulatú, mind a rosszindulatú proliferációs folyamataival, illetve megkülönböztetheti az FNH-t a cirrózistól, ami tükrözheti a két entitás eltérő patogenezisét, ellentétben a szövettanilag némileg hasonló tulajdonságokkal, bár az FNH fokális és a cirrózis diffúz jellege alapvetően eltérő makroszkópos tulajdonság. A mikroRNS szabályozás vizsgálatához hasonlóan az autofágia szerepét nemcsak krónikus hepatitis mintákon hanem daganatos esetekben is megvizsgáltuk.

Az autofágia szerepét kettőség jellemzi a májtumorokban, hasonlóan a krónikus hepatitis esetében megfigyeltekhez, például a májfibrózisban amelyben az autofágia profibrotikus és antifibrotikus szerepet is betölthet (38, 64). Alapszinten tumorszupresszív mechanizmusaként működik, a károsodott sejtes alkotóelemek és fehérjék csökkentésével és a homeosztázis fenntartásával. (59) Ekkor autofágia citoprotektív folyamatként működik, csökkentve a sejteket károsító stresszt és a genom instabilitás hatásait. A gátolt vagy hiányos autofágiát mutató tumorokban leginkább a PI3K/AKT/mTOR út túlzott aktiválása figyelhető meg, amely a sejtnövekedést és a proliferációt indukálja. Míg ha az autofágia adaptív sejtválaszt produkál, akkor tumor promóter funkcióval is bírhat és rendkívül stresszes

körülmények között a tumorsejt a túlélését próbálja biztosítani, akár a tumor ellenes kezelésekkel szemben is, támogatva a rezisztencia kialakulását (35, 38, 48).

A CC vonatkozásában a közzétett adatok erősen azt sugallják, hogy az autofágia a kolangiokarcinogenezis során deregulált állapotban van, amely támogatja az onkogén transzformációt (123). Míg egy rágcső iCC modellben az autofágia gátlásának lehetőségével a tumorban aktív autofágia tártak fel (124). Továbbá arról számoltak be, hogy a ciszplatin-alapú kezelés hatására autofágia indukálódik CC sejtekben, és a kezelés hatására indukált autofágia gátlásával a sejtek érzékenyebbek lettek ciszplatin kezelésre (125). Ezen eredmények hangsúlyozzák az autofágia, mint molekuláris mechanizmus relevanciáját CC fejlődésében és progressziójában, bár a szerepe a patogenezis folyamatában még mindig rejt tisztázatlan kérdéseket.

Ennek egyik oka az is lehet, hogy a CC, mint tumor genetikai, klinikai megjelenés és progresszió szempontjából rendkívül heterogén (35). Amelyet a nemrégiben bevezetett újabb CC klasszifikáció alapján elvégzett teljes genom szekvenálási adatok is bizonyítanak, mivel a különböző helyekről kiinduló CC-k (iCC, pCC, dCC) eltérő genetikai profillal rendelkeztek (29, 32, 35). Ez részben magyarázhatja a jelenlegi diagnosztikai módszerek problémáit és a terápia alacsony hatékonyságát (35). Ennek a ténynek köszönhetően, hogy a CC altípusok eltérő jellemzőkkel bírnak, a tanulmányunkban arra törekedtünk, hogy felfedezzük ezen eltérő anatómiai helyekből származó daganatos betegekből gyűjtött CC altípusok autofágiás aktivitásának lehetséges különbségeit (iCC, pCC és dCC), valamint az intrahepatikus és extrahepatikus eredetű CC sejtvonalak tekintetében is.

Munkánk során immunhisztokémia módszerekkel összehasonlítottuk az autofág markerek, így a Beclin1, a LC3 és a p62 expresszióját a CC egyes altípusaiban és a környező tumormentes májterületekkel, valamint HCC mintákkal. Mint korábban, másokhoz hasonlóan ismertettük, az autofágia folyamata és a mitokondriális funkció szorosan összefügg (56). Az utóbbi vizsgálatára a TOMM20 és a COX4 fehérjét használtuk mitokondriális markerként.

Az eredményeink azt mutatták, hogy fokozott volt az LC3 szintje mind az iCC-ben, mind az eCC-ben, és megemelkedett a p62 expressziója az iCC-ben, összehasonlítva a szomszédos nem tumoros szövetekkel. Ez arra utal, hogy az iCC-ben gátolt autofágia jelenik

meg, autofagoszóma képződéssel, de autofagolizozómális degradáció nélkül. Ha külön vettük az eCC altípusait, akkor az LC3 expresszió pCC-ben és a dCC-ben, a p62 expresszió a dCC-ben nem különbözött a nem tumoros környező szövetekhez expressziójához képest, míg a pCC-ben megnövekedett p62 szintje a környező nem daganatos területhez képest. Az eredmény azt mutatta, hogy az autofágia a pCC-ben inkább gátolt állapotban volt, míg a dCC-ben emelkedett autofágiás aktivitás mutatkozott. Sasaki és munkatársai az eredményeinkhez hasonlóan IHC által detektálva megnövekedett LC3 és p62 szintet tártak fel BilLIN 1-2, 3 léziókban és invazív CC esetekben, a normál epevezetékekhez képest, jelezve, hogy hiányos autofágia kapcsolódik a CC kialakulásához (123) A HCC-ben pCC-hez hasonlóan magas LC3 és p62 szintet találtunk utalva arra, hogy ezekben a daganatokban az autofágia funkció szintén gátolt, hasonlóan az iCC-hez. Chava és munkatársai IHC által szintén emelkedett p62-szintet publikáltak a HCC minták 84% -ában, ami a károsodott autofágiás funkciónak tulajdonítottak (126).

Az LC3, és a p62 fehérje vizsgálata mellett a Beclin1 expresszióját ritkábban alkalmazzák autofágia markerként. Részt vesz az autofagoszóma kialakulásának kezdeményezésében (35), de arra nincs bizonyíték arra, hogy a folyamat során az autofagoszóma-beépülésbe e. A tanulmányunkban, az LC3-mal ellentétben, nem találtunk különböző Beclin1 expressziót a tumor és a tumor körüli nem daganatos szövetek közt, valamint az tumorok vizsgálata során az iCC-eCC, iCC-pCC és iCC-dCC között, amely arra utal, hogy az autofágia indukciós szintje nem változik az iCC-ben és az eCC-ben. Míg a Beclin1 dCC-ben csökkent volt pCC-hez viszonyítva, és a HCC-ben is iCC-hez és a pCC-hez képest, jelezve, hogy az autofágia indukciója dCC-ben és HCC-ben csökkent. Ez azonban nincs összhangban a megfigyelt autofágia funkcióval, amelyet a p62-espresszió alapján a dCC-ben aktívabbnak találtunk. Emellett elemzésünk kimutatta, hogy a Beclin1 korrelált az LC3-val az iCC-ben és az eCC-ben, különösen a dCC-ben, jelezve, hogy ezekben a CC altípusokban előfordulhat autofágia indukció. Ennek ellenére a Beclin1 csak a dCC-ben korrelált negatívan a p62-vel, ezzel is támogatva, hogy aktív autofágia fordul elő dCC-ben, legalábbis bizonyos mértékben a többi CC altípushoz képest, míg az iCC, pCC és HCC-ben gátolt állapotban van.

Eredményeinkből kitűnik, hogy a pCC, bár eCC, de közelebb van az iCC-hez, tekintettel a hasonló LC3, p62 és Beclin1 szintjére. Az LC3 és a p62 szintjei szintén hasonlóak voltak az iCC-ben és a HCC-ben, de a Beclin1 különösen lecsökkent HCC-ben. A májdaganatokkal kapcsolatban leírták, hogy a csökkent Beclin1 korrelált a HCC differenciáltsági fokozatával (127), de alacsony Beclin1 társítottak a HCC kiújulásával (128). Emellett magas Beclin1 expressziót figyelhetek meg krónikus hepatitisben (129), és az iCC 76% -ában (125), de egy másik vizsgálatban az iCC esetek 32% -ában és az eCC 27% -ában volt tapasztalható magas Beclin1 expresszió (IHC score > 6) (130). Mindezek azt mutatják, hogy a Beclin1 szintje változik a beteg szövetekben, és lehet, hogy nincs közvetlen kapcsolatban az autofágia indukciójával. Autofágia-szabályozó mellett a Beclin1 tumorszuppresszorként is funkcionál (127), különös tekintettel a sejtproliferáció gátlóként is viselkedhet, mivel egerekben a Beclin1 inaktiválása fokozta a tumorigenezist (131, 132). Így a HCC-ben a Beclin1 csökkent szintje előfordulhat a sejtproliferáció támogatása érdekében, ennek ellenére a jelen vizsgálatban nem találtak összefüggést a Ki-67 és a Beclin1 között. Ezenkívül az alacsony Beclin1 szint egy nem-kanonikus autofágia indukciót is jelezhet, mivel arról beszámoltak már, hogy az autofágia indukció Beclin1-től független módon is létrejöhet (133).

Egy korábbi tanulmányban mitokondriális diszfunkció okozta megemelkedett ROS szintet tártak fel HCC és iCC mintákban és összefüggésbe hozták a mitokondriális diszfunkciót a májsejtekben a kolangiokarcinogenezissel (134). A TOMM20 fehérje számos tumorban megemelkedett (135). A vizsgálataink során iCC esetében találtunk szintén emelkedett TOMM20 expressziót a környező nem daganatos területekhez képest. A pCC esetében is detektálható volt ez az emelkedés, azonban a szignifikancia szintet nem érte el. Mindkét tumor típusban a megnövekedett mitokondriális tömeg, TOMM20 expresszió az autofág iniciációját mutató markerekkel volt összefüggésben, ami egy mitokondriális autofágia indukcióra utalhat. A HCC mintákban a mitokondriális tömeg szoros összefüggést mutatott mitokondriális ATP termeléssel, vagyis a COX4 expressziójával, annak ellenére, hogy nem találtunk különbséget a különféle vizsgált daganatok COX4 expressziójában. A COX4 a mitokondriális légzési lánc terminális része és nélkülözhetetlen a megfelelő mitokondriális működéshez és az ezzel egyidejű ATP termeléshez (136). Bár a

mitokondriális ATP-termelés nem jellemző a HCC tumorban (137), egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy az oxidatív foszforiláció kevésbé romlott egy mérsékelten differenciált HCC sejtvonalban, mint a differenciálatlan HCC sejtvonalban (138). Vizsgálatunkban a HCC esetek 66,7%-a tartozott a mérsékelten differenciált csoportba.

A pCC esetében a mitokondriális tömeg, TOMM20 és az autofágiás markerek közti (LC3, p62) összefüggése mellett az LC3 és a tumor differenciáltsági fok közt is tapasztaltunk kapcsolatot. Eredményeinkhez hasonlóan Antonio Ieni és munkatársai immunhisztokémiaiilag detektálva emelkedett LC3, Beclin1 és AMBRA1 expressziót mutattak ki magasabb differenciáltságú humán gyomor tubuláris adenokarcinóma mintákon (139). Szintén tubuláris adenokarcinóma mintákon elektromikroszkóp segítségével megemelkedett autofágiás vakuólum detektáltak a magasabb fokozatú tumor esetében (51). Az irodalmi adatok és az eredményeik azt feltételezik, hogy a pCC-ben a tubuláris adenokarcinómához hasonlóan az autofágia szigorúan kapcsolódik a tumor differenciáltságához és a daganat progressziójához.

Eredményeink szerint az eCC-t altípusaira bontva, a dCC eltérő módon viselkedett az iCC-hoz, pCC-hoz és a HCC-hoz képest mind az autofágia, mind a mitokondriális funkció tekintetében. A dCC-ban a környező nem daganatos területekhez képest nem tapasztaltunk változást az autofágiával kapcsolatos fehérjék és a TOMM20 expressziójában, de a COX4 szintje csökkent. Továbbá a dCC a többi tumor típushoz (iCC, pCC, HCC) képest fokozott Ki-67 expressziót mutatott, amely összefüggést mutatott az LC3 és a p62 szintjeivel. Ezért a Ki-67, proliferációs index alapján felosztottuk a dCC tumorokat alacsony és magas proliferációt mutató esetekre és a két csoport közt a mitokondriális hálózat és az autofágia aktivitásban eltérést tapasztaltunk. A magas Ki-67 expressziót mutató tumorok esetén lecsökkent a Beclin1, LC3 és megemelkedett a p62 szintje az alacsony Ki-67 expressziójú tumorokhoz képest, amelyekben pedig a környező normál területekhez képest aktív autofágia figyelhető meg. A CC-ra jellemző számos genetikai mintázat (RAS, BRAF, ERBB2/HER2, EGFR és PIK3CA) MAPKináz aktiválással vagy p53 szupresszióval mTOR aktiválást képesek eredményezni (140), amely központi szerepet játszik a proliferációban és a sejtnövekedésben (140, 141), de az autofágia fő negatív szabályzó elemeként is ismert (35, 49, 141). Az mTOR aktivitása révén a magasan proliferáló tumorok képesek a glikolízis

energiatermelő folyamatra áttérni a mitokondriális ATP energiatermelésről, hogy a fokozott energiaigényt minél gyorsabban biztosítsák (142). Az anyagcsere átalakulása során, a mitokondriális ATP termelés leállítását követően az mitokondriális organellek funkcióikat veszítik (143), amelyet a megnövekedett TOMM20 és a csökkent COX4 expresszió alá is támaszt, mivel az autofágia károsodása révén a diszfunkcionáló mitokondriumok eliminálása sem történik meg. Egy nemrégiben publikált vizsgálatban máj sejtvonalon mutatták be, hogy a tumorsejt képes az autofágia gátlásával a glikolízis fokozására a proliferáció következtében létrejött energiaigény kapcsán, mert bebizonyították, hogy az aktív autofágia szelektív bomlással modulálhatja a glikolízis szintjét a sejtekben (144). Alacsony proliferációjú dCC esetében pedig a mitokondriális ATP termelés a preferált és az aktív autofágia a mitokondriumban zajló citrát ciklus számára a fehérjék lebontásával aminosavakat, a zsírok lebontásával pedig lipideket biztosíthat, ezzel támogatva a tumorsejt túlélését (142).

Egy korábbi publikációban vizsgálták a Ki-67 expresszióját CC mintákon és összefüggést találtak a betegség stádiumával és ajánlást tettek a Ki-67 expresszió prognosztikai faktorként való alkalmazására a CC vizsgálata során, azonban a tanulmányukban nem tértek ki a minták további osztályozására (145, 146). Ebben a tanulmányban nem találtunk összefüggést a Ki-67 expresszió és a CC között az alacsony Ki-67 index miatt az iCC-ben és a pCC-ben. Ennek ellenére azt találtuk, hogy az alacsonyabb Ki-67 szint és a Beclin1 magasabb expressziója a hosszabb medián túléléshez kapcsolódik a dCC-ben, ami arra utal, hogy a Ki-67-nek és a Beclin1-nek prognosztikai értéke van dCC-ben. Korábban arról számoltak be, hogy az alacsony Beclin1 expresszió kedvezőtlen teljes és progressziómentes túlélést jósolt az iCC-ben és az eCC-ben (130, 147), valamint más tumortípusokban is (131, 132). Azonban a Beclin1 mellett az autofágia más jellegzetes markereit, amelyek tükrözhetik a daganatokban az autofágia általános állapotát, nem fedezték fel (35).

Ebben a tanulmányban az autofágia vizsgálatát az iCC és az eCC sejtvonalakban is elvégeztük, és megfigyeltük, hogy az autofágia gátló, mTOR inhibitor (Rapamycin), valamint az 5-FU és a Sorafenib autofágia-indukáló szerek, mint másodvonalbeli kemoterápiák modulálják-e az autofágiát ezen sejtvonalakban. Vizsgálatok azt sugallták,

hogy a mitokondriális morfológia különbségei eltérő autofágia folyamatot fedhetnek fel (57), így az iCC-, eCC- és HCC-eredetű sejtvonalakban fluoreszcens Mitoview Green, Mitotracker Orange CMTMRos és MDC próbákkal detektáltunk a mitokondriális hálózatot és autofágás vakuólómkat. A Mitoview Green jel kialakulása független a membránpotenciáltól, ezért a megjelenése kizárólag a sejtek mitokondriális tömegéhez kapcsolódik. A Mitotracker Orange CMTMRos ezzel szemben egy membránpotenciálfüggő reakciót mutat, és így csak az élő sejtekben halmozódik fel. Eredményeink szakaszos, feldarabolt mitokondriális hálózatot tártak fel az iCC és az eCC sejtekben, amelyekről leírták, hogy jelzik mitokondriális fragmentáció hatására megjelenő mitofágia indukciót (57). Ennek ellenére azt tapasztaltuk a mitokondriális membránpotenciálon alapuló jelölés és mitokondriális tömeget detektáló reakció átfedése kapcsán, hogy az inaktív mitokondriumok jelei nagyobb mértékben jelentek meg az iCC-ben (HuH28), míg az eCC (TFK-1) sejtekben nem, ami arra utal, hogy a hibás mitokondriumok hatékonyabban eliminálódnak az eCC-sejtekben. Ezzel ellentétben, a HCC eredetű HepG2 sejtvonal meghosszabbított morfológiájú mitokondriumok hálózatát mutatta, amelyről kimutatták, hogy ezen morfológia által a mitokondriumok a sejtekben elkerülik a mitofágiát az ATP termelés fenntartása miatt, ezzel fizikai gátat képezve méretük miatt az autofagoszómák számára (56, 57). Ennek ellenére az inaktív mitokondriumok jelei a HepG2 sejtekben megjelentek a HuH28 sejtvonalhoz hasonlóan.

Az autofágiás vakuólómk MDC-vel történő megfestésével az autofagoszómák csak akkor jelentek meg az iCC-ben és az eCC-sejtekben, amikor az autofagoszómák lizoszómákkal történő fúzióját CQ-val gátoltuk, jelezve az aktív autofágia jelenlétét ezekben a sejtvonalakban (50, 148). Ezzel szemben a HepG2-ban minimális pontozott választ detektáltunk a kezeletlen sejtvonalban, amelyet a CQ nem tudott lényegesen növelni, ami arra utal, hogy ebben a sejtvonalban alacsonyabb az autofágia aktivitás. A kiindulási autofágia-aktivitás vizsgálata Western blot analízissel végeztük LC3 II/I és p62 szintekkel detektálva. Ismeretes, hogy az autofágia során az intracitoplazmatikus LC3 I szintjének redukcója LC3 II képződést hatására az LC3 II/I aránya megemelkedik, ami p62 expresszió csökkenést von maga után (50). Az eredményeink CQ jelenlétében az egyes sejtvonalakban aktív autofágia jelenlétét mutatták, amelyet jelzett a megnövekedett LC3 II/I arány a kontrollhoz képest, különösen az iCC és a HepG2 sejtekben (több, mint 50×-es növekedést).

Ennek ellenére a p62 expressziójának növekedése jóval alacsonyabb volt, mint az LC3 II/I, mivel az iCC és az eCC sejtvonalakban $1,5\times$ növekedés volt megfigyelhető; míg a HepG2-ben a p62 expressziójának emelkedése elmaradt. Ezek az eredmények autofágia aktivitást jeleznek az iCC és károsodott folyamatot eCC sejtekben. Az aktív autofágia jelenlétét a HepG2-ben nem lehetett egyértelműen kijelenteni, mert az emelkedett LC3 II/I arány csak emelkedett autofagoszóma kialakulásra utal.

Az eredményeink tükrében feltételezhető, hogy a fokozott autofágia-aktivitás hiánya a tumorsejtek számára védelmet nyújthat, de felvetődik a kérdés, hogy az észlelt minimális autofágia-aktivitás a sejtvonalakban indukálható, illetve tapasztalhatunk-e eltérést a sejtvonalak közt az autofágiás válaszban eredetük alapján. Mivel az mTOR működésének gátlása CC és HCC esetében kezelési stratégiai megközelítés is lehet, ezért egy ismert mTOR gátló, Rapamycinnel végeztük el a kísérletet (140, 141, 149). A Rapamycin olyan specifikus makrolid, amely megköti a FKBP12 fehérjét és molekuláris komplexet képezve gátolni képes az mTOR aktivitását, valamint autofágia indukciót vált ki. Ezt korábban már HBV-indukált HCC, neuroblasztóma és tüdő adenokarcinóma sejtvonalakban is kimutatták (59, 149–151). A CC-ra vonatkozóan azonban még nem rendelkezünk erre vonatkozóan adattal.

A vizsgálatunk során Rapamycin kezelést végeztük, illetve kombinációban autofágia inhibitor, CQ-t is alkalmaztunk HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalak esetében. TFK-1 esetében LC3 II/I aránya az indukált állapotban kiindulási autofágiához képest nem emelkedett meg, tulajdonképp az autofágia indukciót nem tapasztaltuk Rapamycin kezelés hatására. Egy korábbi tanulmányban 13 májsejtvonalat vizsgáltak és bemutatták, hogy a sejtek eltérő módon képesek reagálni a Rapamycin kezelésre, volt köztük olyan májsejtvonal, amely teljes rezisztenciát is mutatott (152). Amely alapján feltételezhető, hogy Rapamycin kezelés hatására az autofágia indukció is eltérő lehet sejttípusokként. Vizsgálataink kimutatták, hogy a Rapamycin hatékonyan növelte az LC3 II/I arányt és csökkentette a p62 expresszióját csökkenését okozta a kezeletlen HuH-28 és HepG2 sejtekhez viszonyítva. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Rapamycin képes az autofágia aktivitását a HepG2 és HuH-28 sejtekben szabályozni, amely akár a későbbiekben kezelési stratégia alapjául is szolgálhat.

Az autofágia kettős szerepe miatt a tumorsejtek az autofágiát alkalmazhatják adaptív mechanizmusként is, hogy túléljenek rendkívül stresszes körülmények között, így akár

növelve daganatellenes szerekkel szembeni rezisztencia mértékét (59). A CC genetikailag, klinikai megjelenését és progresszióját tekintve is kifejezetten heterogén tumor, azonban a kezelés során a cisplatin/gemcitabin alapú terápia dominál amellet, hogy nagymértékű javulást nem érhető el a kezeléssel és okozott mellékhatásai miatt a másodvonalbeli szerek alkalmazása már nem lehetséges (36). Ezért kiemelten fontosak a kezelésekkkel szembeni rezisztencia vizsgálatok CC esetében, annak érdekében, hogy a megfelelő kezelési stratégia megválasztása hatékonyabb túlélési időt eredményezzen CC betegekben.

A májtumorok kezelésénél használt számos szer esetében végeztek rezisztencia vizsgálatot, például 5-FU szemben kialakult rezisztencia estében is. A kutatás során sikeresen kimutatták mind HCC mind CC sejtvonalakban, hogy az 5-FU kezelés autofágia indukciót eredményezhet és a kemoterápia indukálta autofágia gátlását követően a sejtek nagyobb érzékenységet mutattak a 5-FU-s kezelésre (153, 154). A publikációk azonban arra nem térnek ki, hogy tapasztalhatunk-e eltérést az autofágiás válaszban ugyanazok szerek alkalmazásakor az intrahepatikus vagy az extrahepatikus tumorok közt.

Az 5-FU és az irodalomban CC kezelése során ígéretes eredményeket mutató Sorafenib kezelést végeztünk HuH-28, TFK-1 és HepG2 sejtvonalakon. A kiválasztott terápiás dózist irodalmi adatok alapján határoztuk meg és Western Blot analízissel detektáltuk az autofágia fehérjéket. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a sejtek proliferációs aktivitását, választ várva arra, hogy az autofágia inhibitorral kombinációban alkalmazva az egyes kemoterápiás szerek csökkenthetik-e az egyszeres kezeléshez képest a kezelésekk IC50 értékét. A Rapamycin kezeléshez hasonlóan eltérést tapasztaltunk a sejtvonalak között. Megfigyeltük, hogy HuH-28 esetében Sorafenib és 5FU, míg HepG2 esetében 5-FU kezelés váltott ki autofágia aktivitás, és a folyamat gátlása csökkentette a sejtek életképességét. A HepG2 Sorafenib kezelése nem váltott ki autofágia indukciót.

A Sorafenib kezelésre adott különböző válasz autofágia szempontjából nem példa nélküli az irodalomban. A kutatások szerint a Sorafenib az autofágiát többféleképpen képes szabályozni, ezért a kutatások többféle szerepet tulajdonítanak a Sorafenib elleni rezisztencia kialakításában (155). Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a Sorafenib képes indukálni a tumorsejt számára védő autofágiát a HCC sejtekben a STAT3/Beclin1/MCL1 útvonal révén, és így a folyamat gátlása akár farmakológiai inhibitorokkal, akár esszenciális autofágia gén

kiütése révén fokozta a Sorafenib citotoxicitását HCC sejtekben (155–157). A HuH-28 sejt vonal esetében tapasztalt eredmények ezt a lehetőséget erősítik. Ugyanakkor nem minden, a Sorafenib által indukált autofágia szolgál a túlélést elősegítő válaszként és más vizsgálatok ellentétes eredményeket mutattak ki (156). A Sorafenib képes volt egy időben AKT/mTOR, valamint a PERK/EIF2 szignál útvonalon keresztül is apoptózist és autofágiát indukálni, amellyel sejthalált idézett elő HCC eredetű sejt vonalban (155, 158, 159). A tumorsejtek - még pontosan nem tisztázott módon - számos fehérjével, illetve mikroRNS-el kapcsolatos útvonalat képesek felhasználni, amelyek befolyásolják az autofágia végső eredményét a Sorafenib kezelésre adott válaszban (155, 160, 161). Így például kimutatták a Sorafenib kezelés során, hogy a tumorsejt képes növelni a miR-21 expresszióját, ezáltal elnyomja az indukált autofágiát a PTEN útvonalon keresztül, előidézve ezzel a Sorafenib elleni rezisztencia kialakulását (110, 160). Így mindenképp elmondható, hogy további tanulmányokra van szükség az autofágia és a Sorafenib rezisztencia kapcsolatának tisztázására.

A HuH-28 és HepG2-val ellentétben a TFK-1 esetében egyik kezelés hatására sem tapasztaltunk emelkedett autofágia aktivitást. Feltételezéseink szerint az eredmény mögött a CC heterogenitása áll. Intrahepatikus és extrahepatikus típusai, még az extrahepatikus formán belül is, jelentősen különböznek a klinikai megjelenésben, a szabályzó molekuláris útvonalakban, illetve a tumorok alapját szolgáló genetikai profiljukban is (29, 162). A TFK-1 egy extrahepatikus forma és az intrahepatikus CC típussal, a HuH-28 sejt vonallal ellentétben fele akkora duplázódási idővel rendelkezik, tehát jobban proliferáló sejt vonal (163). A TFK-1 sajátossága, hogy fokozott ERBB2 és MUC1 termelés jellemző rá, illetve jobban reagál a Cetuximab kezelésre (162–164). Számos tanulmány igazolja, hogy ERBB2 expresszió jóval gyakoribb extrahepatikus CC formában az epehólyag tumorokhoz hasonlóan, azonban az eCC és iCC ugyanúgy gemcitabin/cisplatin alapú terápiával kezelik (31, 162, 165–167).

ERBB2 az EGFR család tagja és túlzott expressziója a PI3K/AKT és a MAPK1/3 utak rendellenes jelátvitelét eredményezi. Ennek révén a sejtek jobb túléléshez és fokozott sejtnövekedéshez juthatnak, ami rossz klinikai prognózist és a kemoterápiás kezelések elleni rezisztencia kialakításával társulhat. Nemrégiben bemutatták, hogy az ERBB2 képes gátolni

az autofágiát a Beclin1 komplexén keresztül, és összefüggést mutattak ki a genetikai Beclin1 vesztesség és az ERBB2 amplifikáció között humán duktális adenokarcinómákban (168, 169). Az ERBB2 túltermelése nem befolyásolja a bazális autofágiát, de stresszre válaszul elnyomja az autofágia indukcióját, így a kemoterápiás kezelésre adott autofágiás választ is képes lehet szabályozni. Bár emlődaganatokban trastuzumab az autofágia inhibitor együttesen használva csökkentette a sejtek életképességét a trastuzumab kezeléshez képest, azonban ezt más sejttípus és kezelés esetében nem vizsgálták még (168).

A TFK-1 tapasztalt eredményeink azt sugallják, hogy a bazális autofágia összehasonlítása a különböző releváns jelátviteli utakkal CC sejtek esetében hasznos lehet annak megértésében, hogy egyes gyakori jelátviteli mintázatok hogyan szabályozhatják az autofágia szerepét és mely tumorok altípusaiban lenne hatékonyabb az autofágia gátlása. Vizsgálataink megfelelő alapot szolgálhatnak az autofágia modulálásának használatára irányuló további tanulmányokhoz és esetleges klinikai relevanciák megállapításához CC esetében.

7 Következtetések

1. Elsőként azonosítottunk **eltérő autofágiás aktivitást** (LC3, p62) és eltérő **mitokondriális tömeget** (TOMM20) **a különböző etiológiájú - CHC és AIH - krónikus hepatitisben**, amely a két különböző kórokú krónikus hepatitis közti eltérő molekuláris patomechanizmust tükrözi.
2. Elsőként figyeltünk meg összefüggést autofagolizoszómális szinten **gátolt autofágia** (megnövekedett p62 expresszió) és a **nekroinflammáció között AIH-ben**, ami kiterjedt gyulladáshoz, túlzottan aktivált immunválaszhoz és fokozott nekrozishoz vezetett.
3. Összefüggést mutattunk ki a **mikroRNS szabályozás és CHC progressziója** között, mivel kapcsolatot találtunk a miR-224 szintje és a szteatózis mértéke, valamint a miR-155 expressziója és a fibrózis stádiuma között.
4. **Eltérő mikroRNS mintázatot mutattunk ki FNH, cirrózis és HCC mintákban.** A miR-21 és a miR-222 fokozott expresszióját cirrózisban és HCC-ben detektáltuk a FNH-hoz képest. A miR-34a és a miR-224 szintje cirrózisban, HCC-ben és FNH-ban is megnőtt, jelezve, hogy ezeknek a mikroRNS-eknek emelkedése összefüggésben lehet a máj a jóindulatú és a rosszindulatú proliferációs folyamataival.
5. **Az autofág és a mitokondriális fehérjék expressziós mintázata jobban jellemzi a CC újabban bevezetett - iCC, pCC, dCC – osztályozását, mint az intrahepatikus, extrahepatikus felosztást.** Az LC3 szint a tumor differenciáltsági fokával függött össze pCC minták esetében.
6. A károsodott autofágia jeleként emelkedett LC3 és p62 autofág fehérje szintet mutattunk ki iCC-ban és emelkedett p62 szintet pCC-ben a környező májhoz képest. A TOMM20 expressziója összefüggést mutatott a Beclin1 és LC3 expresszióval iCC, pCC esetében, ami a **mitokondriális károsodás és autofágia összefüggését** jelzi
7. Kimutattuk, hogy a **Ki67-tel detektált magasabb proliferációt és csökkent Beclin1** szintet mutató **dCC esetek túlélése rosszabb (OS), amely felveti ezen fehérjék prognosztikai markerként való felhasználását dCC-ben.**

8. Az in vitro végzett vizsgálatok során ***eltérő mitokondriális morfológiát és eltérő bazális autofágia*** tártunk fel az iCC, eCC és HCC eredetű sejtvonalakban.
9. Az mTOR gátlószer, ***Rapamycin kezeléssel autofágia indukciót értük el iCC és HCC eredetű sejtvonalakban.*** Megfigyeltük, hogy HuH-28 esetében Sorafenib és 5-FU, míg HepG2 esetében 5-FU kezelés váltott ki autofágia aktivitást és a folyamat gátlása csökkentette a sejtek életképességét. A TFK-1 sejtvonala Rapamycin és a kemoterápiás szerekre adott autofágia indukciója elmaradt, ami arra utal, hogy indokolt további CC sejtvonalakon vizsgálni az autofágia mintázatát és a jelátviteli utakkal kapcsolatos szerepét.

8 Összefoglalás

A molekuláris mechanizmusok – kiemelten az autofágia és a mikroRNS expresszió - szabályzásának jobb megismerése a krónikus májbetegségek és a májdaganatok területén kiemelt fontosságú. Az erre vonatkozó növekvő ismeretek alapján fogalmaztuk meg célkitűzéseinket, melyek a krónikus hepatitis (CH) különböző formáinak – a krónikus hepatitis C (CHC) és az autoimmun hepatitis (AIH) - és az egyes fokális májléziók molekuláris alapjainak jobb megismerését célozta. Munkánk alapját emberi anyag – 63 tűbiopsziás minta és 216 sebészi rezekátum– képezte. Kolangiokarcinóma (CC) és hepatocelluláris karcinóma (HCC) - eredetű sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatokkal az autofágia és a terápiás válasz jobb megismerését céloztuk meg. Eredményeink eltérő autofágiát (LC3, p62) és mitokondriális tömeget (TOMM20) tártak fel a különböző etiológiájú CH-ben. Az autofág aktivitás csökkenése AIH-ben a gyulladás súlyosságához kapcsolódott. A mikroRNS szabályozás és CHC progressziója között kapcsolat volt, a miR-224 szintje és a szteatózis mértéke, valamint a miR-155 expressziója és a fibrózis stádiuma közötti összefüggés alapján. Eltérő mikroRNS mintázatot mutattunk ki fokális noduláris hiperpláziában (FNH), cirrózisban és HCC-ben. A miR-34a és a miR-224 szintje cirrózisban, HCC-ben és FNH-ban is emelkedett, jelezve, hogy ezek kapcsolatban lehetnek a máj benignus és a malignus proliferációs folyamataival. Igazoltuk, az eltérő autofág és a mitokondriális fehérje mintázatot a CC alcsoportjai – intrahepatikus (iCC), perihiláris (pCC) és disztális (dCC) –közt. A magasabb Ki-67 és csökkent Beclin1 szintű dCC esetek túlélése (OS) rosszabb volt, amely felveti ezen fehérjék prognosztikai szerepét dCC-ben. Az in vitro vizsgálatokkal eltérő mitokondriális morfológiát és bazális autofágia tártunk fel Western blottal az iCC, eCC és HCC eredetű sejtvonalakban. Az mTOR gátlószer, Rapamycin kezeléssel autofágia indukciót mutattunk ki iCC (HuH-28) - és HCC (HepG2) - eredetű sejtvonalakban. Megfigyeltük, hogy HuH-28 esetében Sorafenib és 5-FU, míg HepG2 esetében 5-FU kezelés váltott ki autofágia aktivitást és a folyamat gátlása csökkentette a sejtek életképességét. A TFK-1 (eCC eredet) sejtvonal Rapamycin és a kemoterápiás szerekre adott autofágia indukciója elmaradt, ami arra utal, hogy az autofágia jelátviteli útja eltérő a különböző eredetű CC sejtvonalakban

9 Summary

A better understanding of the molecular mechanism, especially the regulation of autophagy and microRNA, is of paramount importance in both chronic liver disease and liver tumors. Based on the growing knowledge in this regard, we have formulated our goals to better understand the molecular basis of the different forms of chronic hepatitis (CH) - chronic hepatitis C (CHC) and autoimmune hepatitis (AIH) - as well as each focal liver disease. Our work was initiated by human tissue - 63 biopsy specimens and 216 surgical resections. In vitro studies on cholangiocarcinoma (CC) and hepatocellular carcinoma (HCC) - derived cell lines aimed to better understand autophagy and therapeutic response. Our results revealed different autophagy (LC3, p62) and mitochondrial mass (TOMM20) in CH of different etiologies. Decreased autophagic activity in AIH was associated with the severity of inflammation. There was an association between microRNA regulation and CHC progression, based on the association between miR-224 levels and the degree of steatosis, and between miR-155 expression and fibrosis stage. Different microRNA patterns were detected in focal nodular hyperplasia (FNH), cirrhosis, and HCC. Levels of miR-34a and miR-224 were also increased in cirrhosis, HCC, and FNH, indicating that elevations in these microRNAs may be associated with benign and malignant proliferative processes in the liver. We verified the different autophagic and mitochondrial protein patterns according to the recently introduced classification between the subtypes of CC - intrahepatic (iCC), perihilar (pCC) and distal (dCC). The overall survival of dCC cases with higher Ki-67 and decreased Beclin1 levels was worse, which raises the prognostic role of these proteins in dCC.

In vitro studies revealed different mitochondrial morphology and basal autophagy by Western blot analysis in iCC, eCC and HCC-derived cell lines. Treatment with the mTOR inhibitor Rapamycin induced autophagy induction in iCC and HCC-derived cell lines. We observed that Sorafenib and 5-FU in HuH-28 and 5-FU in HepG2 induced autophagy activity and inhibition of the process reduced cell viability. Rapamycin and chemotherapeutic agents did not induce autophagy in the TFK-1 cell line, suggesting that the role of autophagy and signaling pathways in other CC cell lines should be further investigated.

10 Irodalomjegyzék

1. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS (2019) Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* 70:151–171
2. Jarvis H, Craig D, Barker R, Spiers G, Stow D, Anstee QM, Hanratty B (2020) Metabolic risk factors and incident advanced liver disease in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and observational studies. *PLOS Med.* 17:e1003100.
3. Jefferies M, Rauff B, Rashid H, Lam T, Rafiq S (2018) Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J. Clin. Cases.* 6:589–599
4. World Health Organization; Global Hepatitis Report, 2017 (2017) <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>
5. Guss D, Sherigar J, Mohanty SR (2018) Missed Diagnosis of Liver Cirrhosis Leads to Disparities in Care for Older Patients. *Gastroenterol. Res.* 11:333–339
6. Tavolari S, Brandi G, Khan SA (2019) Cholangiocarcinoma : Epidemiology and risk factors. *Liver Int.* 39:(Suppl.1) 19-31
7. Fares N, Péron J-M (2013) Epidemiology, Natural History, and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma. *La Rev. du Prat.* 63:216-217,220-222
8. Stickel F, Datz C, Hampe J, Bataller R (2017) Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease : Update 2016. *Gut Liver.* 11:173–188
9. Marra F, Lotersztajn S (2013) Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des.* 19:5250–69
10. Oo YH, Hubscher SG, Adams DH, Regulatory T, Lymphocytes ÁTÁ (2010) Autoimmune hepatitis : new paradigms in the pathogenesis , diagnosis , and management. *Hepatol Int.* 4:475–493
11. Farooq MO, Bataller R (2016) Pathogenesis and Management of Alcoholic Liver Disease. *Dig. Dis.* 27599:347–355
12. Lavallard VJ, Gual P (2014) Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomed Res. Int.* 2014:120179
13. Balogh J, Iii DV, Gordon S, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP jr. (2016) Hepatocellular

- carcinoma : a review. *J. Hepatocell. carcinoma.* 3:41–53
14. Li T, Yang Y, Zhou G, Tu Z (2019) Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease : A review. *World J. Gastroenterol.* 25:3527–3537
 15. Baranova A, Lal P, Bireddinc A, Younossi ZM (2011) Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol.* 11:91–106
 16. Rehermann B (2015) Pathogenesis of Chronic Viral Hepatitis: Differential Roles of T cells and NK cells. *Nat. Med.* 19:859–868
 17. Vescovo T, Refolo G, Romagnoli A, Ciccocanti F, Corazzari M, Alonzi T, Fimia GM (2014) Autophagy in HCV Infection : Keeping Fat and Inflammation at Bay. *Biomed Res. Int.* 2014:265353
 18. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I (2018) Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68:394–424
 19. Christen U, Hintermann E (2016) Immunopathogenic mechanisms of autoimmune hepatitis: How much do we know from animal models? *Int. J. Mol. Sci.* 17:E2007
 20. Liberal R, Vergani D, Mieli-vergani G (2015) Update on Autoimmune Hepatitis. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 3:42–52
 21. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF (2018) Global Cancer Observatory: Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today>
 22. Waller LP, Deshpande V, Pyrsopoulos N, Waller LP, Deshpande V, Pyrsopoulos N (2015) Hepatocellular carcinoma : A comprehensive review. *World J. Gastroenterol.* 7:2648–2663
 23. Mormone E, George J, Nieto N (2011) Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.* 193:225–231
 24. Roncalli M, Sciarra A, Tommaso L Di (2016) Benign hepatocellular nodules of healthy liver: focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *Clin. Mol. Hepatol.* 22:199–211
 25. Balabaud C, Al-Rabih WR, Chen P-J, Evason K, Ferrell L, Hernandez-Prera JC, Huang S-F, Longrich T, Park YN, Quaglia A, Schirmacher P, Sempoux C, Thung SN, Torbenson M, Wee A, Yeh MM, Yeh S-H, Le Bail B, Zucman-Rossi J, Bioulac-

- Sage P (2013) Focal Nodular Hyperplasia and Hepatocellular Adenoma around the World Viewed through the Scope of the Immunopathological Classification. *Int. J. Hepatol.* 2013:268.625
26. Verslype C, Rosmorduc O, Rougier P, Guidelines E, Group W (2012) clinical practice guidelines Hepatocellular carcinoma: ESMO – ESDO Clinical Practice clinical practice guidelines. *ESMO Updat. Clin. Pract. Guidel.* 23:vii41–vii48
 27. Schlageter M, Terracciano LM, D’Angelo S, Sorrentino P (2014) Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20:15955–15964
 28. Colagrande S, Regini F, Taliani GG, Nardi C, Inghilesi AL (2015) Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. *World J. Hepatol.* 7:1041–1053
 29. Lendvai G, Szekerczés T, Illyés I, Dóra R, Kontsek E, Gógl A, Kiss A, Werling K, Kovalszky I, Schaff Z, Borka K (2020) Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis. *Pathol. Oncol. Res.* 26:3–15
 30. Goral V (2017) Cholangiocarcinoma: New insights. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 18:1469–1473
 31. Macias RIR (2014) Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management, and Pharmacological Perspectives. *ISNR Hepatol.* 2014:828074
 32. Blechacz B (2017) Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver.* 11:13–26
 33. Vijgen S, Terris B, Rubbia-brandt L (2017) Pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *HepatoBiliary Surg. Nutr.* 6:22–34
 34. Klöppel G, Adsay V, Konukiewitz B, Kleeff J, Schlitter AM, Esposito I (2013) Precancerous lesions of the biliary tree. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27:285–297
 35. Perez-Montoyo H (2020) Therapeutic Potential of Autophagy Modulation in Cholangiocarcinoma. *Cells.* 9:614
 36. Jo JH, Jo H, Song SY (2018) Chemotherapy of Cholangiocarcinoma: Current Management and and Future Directions. in *Topics in the Surgery of the Biliary Tree*, pp. 35–52

37. Roy S, Benz F, Luedde T, Roderburg C (2015) The role of miRNAs in the regulation of inflammatory processes during hepatofibrogenesis. *HepatoBiliary Surg. Nutr.* 4:24–33
38. Kim MK, Kim SG (2014) Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases. *Arch. Pharm. Res.* 37:1097–116
39. Han W, Fu X, Xie J, Meng Z, Gu Y (2015) miR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury. *J. Mol. Med.* 93:1045–1055
40. Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18:504–511
41. Kałużna EM (2014) MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? *Rev. Med. Virol.* 24:169–185
42. Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, Szabo G (2016) The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J. Hepatol.* 64:1378–1387
43. Babuta M, Furi I, Bala S, Bukong TN, Lowe P, Catalano D, Calenda C, Kodys K, Szabo G (2019) Dysregulated Autophagy and Lysosome Function Are Linked to Exosome Production by Micro-RNA 155 in Alcoholic Liver Disease. *Hepatology.* 70:2123–2141
44. Gao K, Liu F, Guo H, Li J, Zhang Y, Mo Z (2018) miR-224 suppresses HBV replication posttranscriptionally through inhibiting SIRT1-mediated autophagy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11:189–198
45. Huang J, Chen H, Shih C (2016) MicroRNA miR-204 and miR-1236 inhibit hepatitis B virus replication via two different mechanisms. *Sci. Rep.* 6:34740
46. Schueller F, Roy S, Vucur M, Trautwein C, Luedde T, Roderburg C (2018) The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 19:261
47. Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Autophagy: New emerging functions and concepts. *Nat. Cell Biol.* 15:713–20
48. Czaja MJ, Ding W, Donohue TM, Friedman SL, Kim S, Komatsu M, Lemasters JJ, Lemoine A, Lin D, Ou JJ, Perlmutter DH, Randall G, Ratna B, Tsung A, Yin X, Czaja

- MJ, Ding W, Donohue TM, Friedman SL, Kim S, Komatsu M, Lemasters JJ, Lemoine A, Lin JD, Ou J, Perlmutter DH, Randall G, Ray RB, Tsung A, Yin X, Czaja MJ, Ding W, Donohue TM, Friedman SL, Kim J, Komatsu M (2013) Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy*. 9:1131–1158
49. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 132:27–42
 50. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena, Abraham Adeli K (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 8:445–544
 51. Caruso RA, Angelico G, Irato E, Sarro R de, Tuccari G, Ieni A (2018) Autophagy in Advanced Low- And High-Grade Tubular Adenocarcinomas of the Stomach: An Ultrastructural Investigation. *Ultrastruct Pathol*. 42:10–17
 52. Sarnyai F, Szekerczés T, Csala M, Sümegi B, Szarka A, Schaff Z, Mandl J (2020) BGP-15 protects mitochondria in acute, acetaminophen overdose induced liver injury. *Pathol. Oncol. Res*. 26:1797–1803
 53. Islam A, Sooro MA, Zhang P (2018) Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 19:E1405
 54. Lippai M, Péter L (2014) The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *Biomed Res. Int*. 2014:832704
 55. Ježek J, Cooper KF, Strich R (2018) Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics : The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 7:13
 56. Ding W-X, Yin X-M (2013) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem*. 393:547–564
 57. Gomes LC, Scorrano L (2013) Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 1833:205–212
 58. Narendra DP (2016) Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 12:9–14
 59. Cui J, Gong Z, Shen HM (2013) The role of autophagy in liver cancer: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1836:15–26

60. Zhang N, Li XL, Shen XX, Wu J (2019) Impaired mitophagy triggers NLRP3 inflammasome activation during the progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis. *Lab. Investig.* 99:749–763
61. Puleston D (2015) Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015:pdb.prot086298
62. Song Y, Du Y, Zou W, Luo Y, Zhang X, Fu J (2018) Involvement of impaired autophagy and mitophagy in Neuro-2a cell damage under hypoxic and / or high-glucose conditions. *Sci. Rep.* 8:3301
63. Ponsoda X, Bort R, Ferrer-lorente R, Prieto J, Leo M, Torres J (2016) Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat. Commun.* 7:11124
64. Cursio R, Colosetti P, Codogno P, Cuervo AM, Shen H (2015) The Role of Autophagy in Liver Diseases : Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Biomed Res. Int.* 2015:480508
65. Wang L, Ou J, Hsiung J (2015) Hepatitis C virus and autophagy. *Biol. Chem.* 396:1215–1222
66. Golbabapour S, Bagheri-Lankarani K, Ghavami S, Geramizadeh B (2019) Autoimmune Hepatitis and Stellate Cells; an Insight into the Role of Autophagy. *Curr. Med. Chem.*
67. Akkoç Y, Gözüaçık D (2018) Autophagy and liver cancer. *Turkish J. Gastroenterol.* 29:270–282
68. Poynard T, Bedossa P, Opolon P (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet.* 349:825–32
69. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Degroote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, Macsween R, Phillips M, Portmann B, Poulsen H, Scheuer P, Schmid M, Thaler H (1995) Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis. *J. Hepatol.* 22:696–699
70. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM Di, Neuschwander-tetri BA, Bacon BR (1999) Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions Elizabeth. *Am. J. Gastroenterol.* 94:2467–2474

71. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64:5245–5250
72. Balabaud C, Bedossa P, Scoazec JY, Chiche L, Dhillon AP, Ferrell L, Paradis V, Roskams T, Vilgrain V, Wanless IR (2007) Pathological diagnosis of liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia : Bordeaux update. *J. Hepatol.* 46:521–527
73. Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J. Pathol.* 226:255–273
74. Kim S, Syed GH, Khan M, Chiu W, Sohail MA, Gish RG (2014) Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:6413–6418
75. He G, Günther C, Kremer AE, Thonn V, Amann K, Poremba C, Neurath MF, Wirtz S, Becker C (2017) PGAM5-mediated programmed necrosis of hepatocytes drives acute liver injury. *Gut.* 66:716–723
76. Cho DH, Kim JK, Jo EK (2020) Mitophagy and innate immunity in infection. *Mol. Cells.* 43:10–22
77. Vescovo T, Romagnoli A, Perdomo AB, Corazzari M, Ciccocanti F, Alonzi T, Nardacci R, Ippolito G, Tripodi M, Garciamonzon C, Lo Iacono O, Piacentini M, Fimia GM (2012) Autophagy protects cells from HCV-induced defects in lipid metabolism. *Gastroenterology.* 142:644–653
78. Ni H-M, Chao X, Yang H, Deng F, Wang S, Bai Q, Qian H, Cui Y, Cui W, Shi Y, Zong W-X, Wang Z, Yang L, Ding W-X (2019) Dual Roles of Mammalian Target of Rapamycin in Regulating Liver Injury and Tumorigenesis in Autophagy-Defective Mouse Liver. *Hepatology.* 70:2142–2155
79. Ke P-Y (2018) The multifaceted roles of autophagy in flavivirus-host interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3940
80. Ke PY (2019) Diverse functions of autophagy in liver physiology and liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20:300
81. Song Y, Zhao Y, Wang F, Tao L, Xiao J, Yang C (2014) Autophagy in Hepatic

- Fibrosis. *Biomed Res. Int.* 2014:436242
82. Sasaki R, Sur S, Cheng Q, Steele R, Ray RB (2019) Repression of MicroRNA-30e by Hepatitis C Virus Enhances Fatty Acid Synthesis. *Hepatol. Commun.* 3:943–953
 83. Migita K, Komori A, Kozuru H, Jiuchi Y, Nakamura M (2015) Circulating microRNA Profiles in Patients with Type-1 Autoimmune Hepatitis. *PLoS One.* 10:e0136908
 84. Frankel LB, Wen J, Lees M, Høyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, Jäättelä M, Lund AH (2011) MicroRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J.* 30:4628–4641
 85. Song HU, Du C, Wang X, Zhang J, Shen Z (2019) MicroRNA-101 inhibits autophagy to alleviate liver ischemia/reperfusion injury via regulating the mTOR signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 43:1331–1342
 86. Shakera O, Alhelfa M, Morcosa G, Elsharkawy A (2017) miRNA-101-1 and miRNA-221 expressions and their polymorphisms as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Infect. Genet. Evol.* 51:173–181
 87. Lei Y, Wang Q lan, Shen L, Tao Y yan, Liu C hai (2019) MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by downregulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 43:575–584
 88. Lendvai G, Jármy K, Karácsony G, Halász T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T (2014) Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World J. Gastroenterol.* 20:15343–15350
 89. Gelley F, Zádori G, Nemes B, Fassan M, Lendvai G, Sárváry E, Doros A, Gerlai Z, Nagy P, Schaff Z, Kiss A (2014) MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for hepatitis C virus cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29:121–127
 90. Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halász J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, Kiss A (2014) microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virhows Arch.* 464:419–427
 91. Smedile A, Bugianesi E (2005) Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 9:291–5
 92. Blaya D, Aguilar-bravo B, Hao F, Casacuberta-serra S, Perea L, Graupera I, Pose E, Barquinero J, Cubero FJ, Sancho-bru P, Repair T (2019) Expression of microRNA-

- 155 in inflammatory cells modulates liver injury. *Hepatology*. 68:691–706
93. Szabo G, Bala S (2013) MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y)*. 10:542–552
 94. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 25:2537–2545
 95. Halász T, Horváth G, Pár G, Werling K, Kiss A, Schaff Z, Lendvai G (2015) miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. *World J. Gastroenterol*. 21:7814–7823
 96. Pineau P, Volinia S, Mcjunki K, Marchio A, Battiston C, Terris B (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 107:264–269
 97. Tian X, Ji F, Zang H, Cao H (2016) Activation of the miR-34a / SIRT1 / p53 Signaling Pathway Contributes to the Progress of Liver Fibrosis via Inducing Apoptosis in Hepatocytes but Not in HSCs. *PLoS One*. 11:e0158657.
 98. Yan G, Li B, Xin X, Xu M, Ji G, Yu H (2015) MicroRNA-34a Promotes Hepatic Stellate Cell Activation via Targeting ACSL1. *Med. Sci. Monit*. 21:3008–3015
 99. Sato Y, Harada K, Fijii H, Takahiko I, Sasaki M, Nakanuma YZY (2009) Hepatic stellate cells are activated around central scars of focal nodular hyperplasia of the liver—a potential mechanism of central scar formation. *Hum. Pathol*. 40:181–188
 100. Cheng J, Zhou L, Xie Q, Xie H, Wei X, Gao F, Shu-Sen, Xing C, Xu X, Li L, Zheng S (2010) The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Proteomics*. 10:1557–1572
 101. Ma D, Tao X, Gao F, Fan C, Wu D (2012) miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. *Oncol. Lett*. 4:483–488
 102. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZI, Toh HC, Chow P, Chung AYZ, Ooi LLPJ, Lee CGL (2013) MicroRNA-224 Targets SMAD Family Member 4 to Promote Cell Proliferation and Negatively Influence Patient Survival. *PLoS One*. 8:5–12
 103. Li Q, Ding C, Chen C, Zhang Z, Xiao H, Xie F, Lei L, Chen Y, Mao B, Jiang M, Li J, Wang D, Wang G (2014) miR-224 promotion of cell migration and invasion by

- targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y)*. 29:835–842
104. Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, Iaco R De, Meo PD de, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levrero M, Pediconi N (2011) Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFκB inflammatory pathways. *J. Hepatol.* 56:P855-861
 105. Huan L, Liang L-H, He X-H (2016) Role of microRNAs in inflammation-associated liver cancer. *Cancer Biol. Med.* 13:407–425
 106. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy K (2010) MiR-222 Overexpression Confers Cell Migratory Advantages in Hepatocellular Carcinoma through Enhancing AKT Signaling. *Clin. Cancer Res.* 16:867–876
 107. Iorio M V, Croce CM (2010) microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis.* 33:1126–1133
 108. Borel F, Konstantinova P, Jansen P (2012) Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56:P1371-1383
 109. Tumor O, Gene S, Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-rossi J (2008) MicroRNA Profiling in Hepatocellular Tumors Is. *Hepatobiliary Malig.*
 110. He C, Dong X, Zhai B, Jiang X, Dong D, Li B (2015) MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN / Akt pathway. *Oncotarget.* 6:28867
 111. Bao L, Yan Y, Xu C, Ji W, Shen S, Xu G, Zeng, Sun B, Qiana H, Chen L, Wu M, Su C, Chenb J (2013) MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. *Cancer Lett.* 337:226–236
 112. Yang Y, Wang F, Xiao J, Song Y, Zhao Y, Cao Y, Bei Y (2014) MiR-222 overexpression promotes proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by downregulating p27. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7:893–902
 113. Melnik BC (2015) MiR - 21:an environmental driver of malignant melanoma ? *J.*

Transl. Med. 13:202

114. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N (2012) MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut.* 11:1600–1609
115. Patel SH, Camargo FD, Yimlamai D (2017) Hippo signaling in the liver regulates organ size, cell fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 152:533–545
116. Kim Y, Jho E (2017) Deubiquitinase YOD1 : the potent activator of YAP in hepatomegaly and liver cancer. *BMB Rep.* 50:281–282
117. Liu L, Cai X, Liu E, Tian X, Tian C (2017) MicroRNA-18a promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting KLF4. *Oncotarget.* 8:68263–68269
118. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest ARR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM (2008) The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1 / S phase cell. *Genome Biol.* 9:R127
119. Wang M, Zhang J, Tong L, Ma X, Qiu X (2015) miR-195 is a key negative regulator of hepatocellular carcinoma metastasis by targeting FGF2 and VEGFA. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:14110–14120
120. Song L, Ma Y, Wu C, Wang C, Fang W, Liu S (2017) MicroRNA-195 Activates Hepatic Stellate Cells In Vitro by Targeting Smad7. *Biomed Res Int.* 2017:1945631
121. Tili E, Michaille J, Croce CM (2013) MicroRNA s play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol. Rev.* 253:167–184
122. Ivan M, Huang X (2014) miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Adv Exp Med Biol.* 772:205–227
123. Sasaki M, Nitta T, Sato Y, Nakanuma Y (2015) Autophagy may occur at an early stage of cholangiocarcinogenesis via biliary intraepithelial neoplasia. *Hum. Pathol.* 46:202–209
124. O’Dell MR, Huang J-L, Whitney-Miller CL, Deshpande V, Rothberg P, Grose V, Rossi RM, Zhu AX, Land H, Bardeesy N, Hezel AF (2012) KrasG12D and p53 mutation cause primary intra-hepatic cholangiocarcinoma. *Bone.* 72:1557–1567
125. Hou YJ, Dong LW, Tan YX, Yang GZ, Pan YF, Li Z, Tang L, Wang M, Wang Q,

- Wang HY (2011) Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma. *Lab. Investig.* 91:1146–1157
126. Chava S, Lee C, Aydin Y, Chandra PK, Dash A (2017) Chaperone-mediated autophagy compensates for impaired macroautophagy in the cirrhotic liver to promote hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 25:40019–40036
 127. Huang F, Wang BR, Wang YG (2018) Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 24:4643–4651
 128. Yang S, Yang L, Li X, Li B, Li Y, Zhang X, Ma Y, Peng X, Jin H, Li H (2019) New insights into autophagy in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic strategies. *Am. J. Cancer Res.* 9:1329–1353
 129. Al-Shenawy HA (2016) Expression of Beclin-1, an autophagy-related marker, in chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma and its relation with apoptotic markers. *APMIS*
 130. Wang T, Cao Q, Chen M, Xia Q, Fan X, Ma X, Jia C, Dong M, Ruan D, Lin Z, Wen J, Wei L, Li X, Chen H, Wang L, Wu X, Wan X (2013) Beclin 1 Deficiency Correlated with Lymph Node Metastasis , Predicts a Distinct Outcome in Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *PLoS One.* 8:e80317
 131. Qiu DM, Wang GL, Chen L, Xu YY, He S, Cao XL, Qin J, Zhou JM, Zhang YX, E Q (2014) The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. *BMC Cancer.* 14:1–13
 132. Li X, Yan J, Wang L, Xiao F, Yang Y, Guo X, Wang H (2013) Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in Miapaca2 pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int.* 13:1
 133. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 15:1318–1329
 134. Yuan D, Huang S, Berger E, Zender L, Haller D, Heikenwalder M, Simonavicius N (2017) Kupffer Cell-Derived Tnf Triggers Cholangiocellular Tumorigenesis through

- JNK due to Chronic Article Kupffer Cell-Derived Tnf Triggers Cholangiocellular Tumorigenesis through JNK due to Chronic Mitochondrial Dysfunction and ROS. *Cancer Cell*. 31:771–789
135. Park S, Lee A, Choi K, Joung S, Yoon J, Kim S (2019) TOMM20 as a potential therapeutic target of colorectal cancer. *BMB Rep*. 52:712–717
 136. Kogot-levin A, Saada A, Leibowitz G, Soiferman D, Douiev L, Raz I, Weksler-zangen S (2016) Upregulation of Mitochondrial Content in Cytochrome c Oxidase Deficient Fibroblasts. *PLoS One*. 11:e0165417
 137. Chiu DK, Tse AP, Law C, Xu IM, Lee D, Chen M, Lai RK, Yuen VW, Cheu JW, Ho DW, Wong C, Zhang H, Ng IO, Wong CC (2019) Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF / HEY1 / PINK1 pathway. *Cell Death Dis*. 10:934
 138. Domenis R, Comelli M, Bisetto E, Mavelli I (2011) Mitochondrial bioenergetic profile and responses to metabolic inhibition in human hepatocarcinoma cell lines with distinct differentiation characteristics. *J. Bioenerg. Biomembr*. 43:493–505
 139. Ieni A, Cardia R, Giuffr G, Rigoli L, Caruso RA, Tuccari G (2019) Immunohistochemical Expression of Autophagy-Related Proteins in Advanced Tubular Gastric Adenocarcinomas and Its Implications. *Cancers (Basel)*. 11:289
 140. Wu C, Chen M (2019) mTOR Inhibitors in Advanced Biliary Tract Cancers. *Int. J. Mol. Sci*. 20:500
 141. Paquette M, El-houjeiri L, Pause A (2018) mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)*. 10:18
 142. Kimmelman AC, White E (2017) Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab*. 25:1037–1043
 143. Ferro F, Servais S, Besson P, Roger S, Dumas J-F, Brisson L (2019) Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling. *Semin. Cell Dev. Biol*. 98:129–138
 144. Jiao L, Zhang H, Li D, Yang K, Tang J, Li X, Ji J, Yu Y, Wu R, Ravichandran S, Liu J, Chen M, Zeng Y, Deng R, Zhu X, Jiao L, Zhang H, Li D, Yang K, Tang J, Li X, Ji J (2018) Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2). *Autophagy*. 14:671–684

145. Sirachainan E, Trachau N, Larbcharoensub N, Rattanadech W, Detarkom S, Monnamo N, Kamprerasart K, Mun Tham D, Sukasem C, Reungwetwattana T (2017) Molecular alterations and clinical prognostic factors for cholangiocarcinoma in Thai population. *Onco. Targets. Ther.* 10:4955–4968
146. Zhao W, Zhang B, Guo X, Zhang X, Hu J, Hu X, Luo Y (2014) Expression of Ki-67, Bax and p73 in patients with hilar cholangiocarcinoma. *Cancer Biomarkers.* 14:197–202
147. Dong L, Hou YH, Tan Y, Tang L, Pan Y, Wang M, Wang H (2011) Prognostic significance of Beclin 1 in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Autophagy.* 7:1222–1229
148. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 140:313–326
149. Russo M, Russo GL (2018) Autophagy inducers in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 153:51–56
150. Lin X, Han L, Weng J, Wang K, Chen T (2018) Rapamycin inhibits proliferation and induces autophagy in human neuroblastoma cells. *Biosci. Rep.* 38:BSR20181822
151. Li Y, Liu F, Wang Y, Li D, Guo F, Xu L, Zeng Z, Zhong X (2016) Rapamycin-induced autophagy sensitizes A549 cells to radiation associated with DNA damage repair inhibition. *Thorac. Cancer.* 7:379–386
152. Jimenez RH, Boylan JM, Lee J, Francesconi M, Castellani G, Jennifer A, Gruppuso PA (2009) Rapamycin Response in Tumorigenic and Non- Tumorigenic Hepatic Cell Lines. *PLoS One.* 4:e7373
153. Hong Z, Zhao W, Yin Z, Xie C, Xu Y (2015) Capsaicin Enhances the Drug Sensitivity of Cholangiocarcinoma through the Inhibition of Chemotherapeutic-Induced Autophagy. *PLoS One.* 10:e0121538
154. Tang JC, Feng YL, Liang X, Cai XJ (2016) Autophagy in 5 - Fluorouracil Therapy in Gastrointestinal Cancer : Trends and Challenges. *Chin. Med. J. (Engl).* 129:456–63
155. Sun T, Liu H, Ming L (2017) Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* 44:716–727
156. Prieto-domínguez N, Ordóñez R, Fernández A (2016) Modulation of Autophagy by

- Sorafenib : Effects on Treatment Response. *Front. Pharmacol.* 7:151
157. Tai W, Shiao C, Chen H, Liu C, Lin C, Cheng A, Chen P, Chen K (2013) Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 4:e485
 158. Liu Z, Liu Q-L, Li F-J, Yang Z-F, Chen L, Zhang G (2019) Sorafenib induces autophagic cell death and apoptosis in hepatoma HepG2 cells via PERK/EIF2 α signaling pathway. *FASEB J.* 33:Supplement_1
 159. Hao H, Zhang D, Shi J, Wang Y, Chen L, Guo Y, Ma J, Jiang X, Jiang H (2016) Sorafenib induces autophagic cell death and apoptosis in hepatic stellate cell through the JNK and Akt signaling pathways. *Anticancer. Drugs.* 27:197–203
 160. Xu G, Zhang Y, Wei J, Jia W, Ge Z, Zhang Z, Liu X (2013) MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3. *BMC Cancer.* 13:468
 161. Lu S, Yao Y, Xu G, Zhou C, Zhang Y, Sun J, Jiang R, Shao Q, Chen Y (2018) CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 9:646
 162. Churi CR, Shroff R, Wang Y, Rashid A, Kang HC (2014) Mutation Profiling in Cholangiocarcinoma : Prognostic and Therapeutic Implications. *PLoS One.* 9:e115383
 163. Zach S, Birgin E (2015) Primary Cholangiocellular Carcinoma Cell Lines. *J. Stem Cell Res. Transplant.* 2:id1013
 164. Saijyo S, Kudo T, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Muto T, Fukuhara K, Suzuki T, Matsuno S (1995) Establishment of New Extrahepatic Bile Duct Carcinoma Cell Line, TFK-1. *Tooku J Exp. Med.* 177:61–71
 165. Xu L, Hausmann M, Dietmaier W, Kellermeier S, Pesch T, Stieber-gunckel M, Lippert E, Klebl F, Rogler G (2010) Expression of growth factor receptors and targeting of EGFR in cholangiocarcinoma cell lines. *BMC Cancer.* 10:302
 166. Yarlagadda B, Kamatham V, Ritter A, Shahjehan F, Kasi PM (2019) Trastuzumab and pertuzumab in circulating tumor DNA ERBB2-amplified HER2-positive refractory cholangiocarcinoma. *Precis. Oncol.* 3:19

167. Augustin J, Gabignon C, Scriva A, Menu L, Calmel C, Scatton O, Paye F, Fléjou J, Praz F, Cervera P, Wendum D (2020) Testing for ROS1 , ALK , MET , and HER2 rearrangements and amplifications in a large series of biliary tract adenocarcinomas. *Virhows Arch.* 477:33–45
168. Lozy F, Cai-mcrae X, Teplova I, Price S, Reddy A, Bhanot G, Ganesan S, Vazquez A, Karantza V (2014) ERBB2 overexpression suppresses stress-induced autophagy and renders ERBB2-induced mammary tumorigenesis independent of monoallelic *Becn1* loss. *Autophagy.* 10:662–676
169. Henson E, Chen Y, Gibson S (2017) EGFR Family Members' Regulation of Autophagy Is at a Crossroads of Cell Survival and Death in Cancer. *Cancers (Basel).* 9:27

11 Saját publikációk jegyzéke

Megjelent közlemények impakt faktora (Σ IF): 21,518

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

(Σ IF:8,478)

Szekerczés Tímea, Gógl Alíz, Illyés Ildikó, Mandl József, Borka Katalin, Kiss András, Schaff Zsuzsa, Lendvai Gábor, Werling Klára, Autophagy, Mitophagy and MicroRNA Expression in Chronic Hepatitis C and Autoimmune Hepatitis PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH DOI: 10.1007/s12253-020-00799-y, 9 p. (2020)

IF: 2,826*

Lendvai G¹, **Szekerczés T**¹, Illyés I. Dóra R, Kontsek E, Gógl A, Kiss A, Werling K, Kovalszky I, Schaff Z, Borka K., Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26: 1 pp. 3-15. (2020) ¹Megosztott első szerzők /Összefoglaló cikk/

IF: 2,826*²

²Az IF beszámításához a közlemény típusa miatt szükséges a közlemény szakmai vizsgálata

Lendvai Gábor³, **Szekerczés Tímea**³, Gyöngyösi Benedek, Schlachter Krisztina, Kontsek Endre, Pesti Adrián, Patonai Attila, Werling Klára, Kovalszky Ilona, Schaff Zsuzsa³, Kiss András³, MicroRNA Expression in Focal Nodular Hyperplasia in Comparison with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25: 3 pp. 1103-1109. (2019) ³Megosztott szerzők

IF: 2,826

11.2 Az értekezés témájától független közlemények

(Σ IF: 13,04)

Lendvai Gábor, **Szekerczés Tímea**, Kontsek Endre, Selvam Arun, Szakos Attila, Schaff Zsuzsa, Björnstedt Mikael, Kiss András, The Effect of Methylselenocysteine and Sodium Selenite Treatment on microRNA Expression in Liver Cancer Cell Lines PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH DOI: 10.1007/s12253-020-00870-8, 13 p. (2020)

IF: 2,826*

Szekerczés Tímea⁴, Galamb Ádám⁴, Varga Norbert, Benczik Márta, Kocsis Adrienn, Schlachter Krisztina, Kiss András, Ács Nándor, Schaff Zsuzsa, Jeney Csaba, Lendvai Gábor⁴, Sobel Gábor⁴, Increased miR-20b Level in High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH DOI: 10.1007/s12253-020-00852-w, 8 p. (2020) ⁴Megosztott szerzők

IF: 2,826*

Sarnyai Farkas⁵, **Szekerczés Tímea**⁵, Csala Miklós, Sümegi Balázs, Szarka András, Schaff Zsuzsa, Mandl József., BGP-15 Protects Mitochondria in Acute, Acetaminophen Overdose Induced Liver Injury PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26: 3 pp. 1797-1803. (2020) ⁵Megosztott első szerzők

IF: 2,826*

Szekerczés T⁶, Galamb A⁶, Kocsis A, Benczik M, Takacs T, Martonos A, Jaray B, Kiss A, Jeney C, Nyiri M, Schaff Zs, Sobel G., Dual-Stained Cervical Cytology and Histology with Claudin-1 and Ki67 PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25: 2 pp. 477-486. (2019) ⁶Megosztott első szerzők

IF: 2,826

Benczik M, Galamb A, Koiss R, Kovacs A, Jaray B, Szekely T, **Szekerczés T**, Schaff Z, Sobel G, Jeney C., Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 22: 1 pp. 179-188. (2016)

IF: 1,736

*Várható IF érték

12 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Mindazoknak, akik a Ph.D éveim alatt és értekezés elkészítésében is segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tímár Józsefnek és Prof. Dr. Kiss Andrásnak, hogy volt és jelenlegi igazgatókként a II. sz Patológiai Intézet keretein belül lehetőséget adtak kutatómunkám elvégzéséhez. Prof. Dr. Kiss Andrásnak külön köszönöm, hogy támogatta a Doktori Iskolába való jelentkezésemet és mindvégig odafigyeléssel követte a munkámat többször is a támogatását kifejezve.

Kifejezett hálával tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Schaff Zsuzsának, hogy már egyetemista éveimtől támogatta tudományos munkámat és lehetővé tette és segítette e munka létrejöttét. Köszönöm Professzor Asszonynak a tudást, amit Ph.D tanulóként szerezhettem és megtiszteltetés volt, hogy tőle tanulhattam a patológia tudományokról. Köszönöm a mindenre kiterjedő figyelmét, óvó tanácsait és hogy folyamatosan türelemmel irányult felém és mindig számíthattam rá. Külön köszönöm, hogy lehetőséget teremtett, hogy számos nivós belföldi és nemzetközi konferencián részt vehessek és tudományos eredményeimet prezentálhassam.

Szeretném megköszönni Dr. Lendvai Gábornak, hogy mérhetetlen türelemmel adta át alapos tudását, tapasztalatait és mindig motivált és tudományos gondolkodásra sarkalt. Köszönöm, hogy a molekuláris biológiai technikák elsajátítása során is egyenrangúként kezelt.

Köszönettel tartozom Dr. Lotz Gábor docens úrnak, hogy szakmai kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá és mindig precízen, türelmesen válaszolt. Köszönet Dr. Borka Katalin docens asszonynak a mérhetetlen kedvességéért, a Ph.D munkámban nyújtott óriási segítségéért és hogy odafigyelt, hogy mindig új dolgot tanítson patológia tudományterületéről.

Köszönet Dr. Werling Klára docens asszonynak, hogy a betegek klinikai adatait rendelkezéseimre bocsátották és a közös munkáért.

Szeretném megköszönni a szakmai támogatást és a támogató szavakat Dr. Sebestyén Annának és Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonynak.

Örök hálával tartozom Pekár Zoltánné, Magdinak és Kovács Erzsébetnek a fáradhatatlan segítségükért és a tanácsaikért, amelyekkel a munkámat támogatták. Köszönöm, hogy emberileg is ott voltak mellettem és bármikor számíthattam rájuk, számomra többet jelentenek, mint kollégák.

Szeretném megköszönni a fordítások, lektorálások, az adminisztratív teendők során kapott önzetlen segítséget és közvetlenséget Rigóné Kálé Elvirának.

Köszönet illeti az I. sz. és II. sz. Patológiai Intézetben dolgozó/dolgozott PhD hallgató társaimat, rezidens orvos kollégákat és tudományos munkatársakat – Vígh Esztert, Dóra Rékát, Kontsek Endrét, Dr. Illyés Ildikó, Dr. Gógl Alizt, Dr. Kocsmár Ildikót, Dr. Kocsmár Évát, Dr. Szabó Erzsébetet, Dr. Ács Balázst, Dr. Garay Tamást, Dr. Hegedűs Balázst, Dr. Molnár Esztert, Baranyai Marcellt, Dr. Rittler Dominikát, Papp Orsolyát, Dr. Rusz Orsolyát, Dr. Bilecz Ágnesnek, Dr. Budai Andrászt, Dr. Tőkés Anna-Máriát, Karászi Katalint, Reszegi Andreát –, akik mindig segítettek vizsgálataink kivitelezésekor és akik hasznos tanácsokkal láttak el, ha szükségem volt rá.

Szeretném megköszönni Dr. Katona Ramónának, Dr. Csengeri Milánnak és Tomán (Rác) Ágnesnek a TDK éveik alatt végzett kitartó munkájukat, amellyel az én Ph.D éveimet segítették.

Továbbá köszönet illeti Dr. Schlachter Krisztinát, hogy ma már barátomnak nevezhetem és sokszor osztozott a munkából fakadó nehézségekben, rengeteg tanáccsal látott el és szakmailag is bármikor fordulhattam hozzá.

Végül, szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a megértést és türelmüket.

Külön köszönöm férjemnek, Papp Tibornak a megértést, türelmét és a mindennap adott fáradhatatlan segítséget. Köszönöm, hogy végig mellettem állt, támogott, lelkesített és elviselte a munkával járó lemondást.



Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis

Gábor Lendvai¹ · Tímea Szekerczés¹ · Idikó Illyés¹ · Réka Dóra¹ · Endre Kontsek¹ · Alíz Gógl¹ · András Kiss¹ · Klára Werling² · Ilona Kovalszky³ · Zsuzsa Schaff¹ · Katalin Borka¹

Received: 3 January 2018 / Accepted: 10 October 2018 / Published online: 17 November 2018
© Arányi Lajos Foundation 2018

Abstract

Cholangiocarcinoma (CC) is the second most common tumor of the liver, originating from the biliary system with increasing incidence and mortality worldwide. Several new classifications review the significance of tumor localization, site of origin, proliferation and biomarkers in the intrahepatic, perihilar and distal forms of the lesion. Based on growth pattern mass-forming, periductal-infiltrating, intraductal, undefined and mixed types are differentiated. There are further subclassifications which are applied for the histological features, in particular for intrahepatic CC. Recognition of the precursors and early lesions of CC including biliary intraepithelial neoplasia (BillN), intraductal papillary neoplasm of the bile ducts (IPNB), biliary mucinous cystic neoplasm (MCNB) and the candidate precursors, such as bile duct adenoma and von Meyenburg complex is of increasing significance. In addition to the previously used biliary markers detected by immunohistochemistry, several new markers have been added to the differentiation of both the benign and malignant lesions, which can be used to aid in the subclassification in association with the outcome of CC. Major aspects of biliary carcinogenesis have been revealed, yet, the exact way of this diverse process is still unclear. The factors contributing to molecular cholangiocarcinogenesis include various risk factors, different anatomical localizations, multiple cellular origins, genetic and epigenetic alterations, tumor microenvironment, heterogeneity and clonal evolution. Driver mutations have been identified, implying that they are optimal candidates for targeted therapy. The most promising therapeutic candidates have entered clinical trials.

Keywords Cholangiocarcinoma · Liver cancer · Biliary markers · Stem cells · MicroRNA

Introduction

Cholangiocarcinoma (CC) is a malignant tumor of the epithelium lining of the biliary tree with very poor outcome,

Gábor Lendvai and Tímea Szekerczés equally contributed

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12253-018-0491-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Zsuzsa Schaff
schaff.zsuzsa@med.semmelweis-univ.hu

- ¹ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői út 93, Budapest H-1091, Hungary
- ² 2nd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest 1085, Hungary
- ³ 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest 1085, Hungary

showing an increase in incidence and mortality rate worldwide [1–4]. It is less common than hepatocellular carcinoma (HCC), however it is still the second most common primary liver cancer [5–8]. The incidence of CC is high in the Far East and much lower in the Western countries by reason of the different risk factors which are associated with ethnic, genetic and environmental predispositions [1]. Two-thirds of CCs derive from the extrahepatic bile ducts, one-third from the intrahepatic bile ducts and all cases are rarely diagnosed before the age of 40, the mean age being 50 (except for patients with primary sclerosing cholangitis), with a slight male predominance [3, 7, 9].

There are several excellent reviews that summarize the guidelines for the diagnostic criteria, prognosis, therapeutic approaches and molecular profiling of CC [1, 8, 10–12]. The heterogeneity of CC was previously recognized using a number of new expressional markers and clinical data. Several classifications were suggested based on the localization, histopathological appearance and molecular alterations detected

in CC [6, 10, 11, 13–16], which might reflect the differences in morphology and biological characteristics of the bile duct epithelium [11, 17–19]. The anatomic classification, the mixed HCC-CC cases (less than 1% of liver cancers), the epidemiology, the relation to cirrhosis, chronic hepatitis B (HBV) and C virus (HCV) infections [20], and to primary sclerosing cholangitis (PSC), the proliferative and inflammatory gene signatures in CC etc. have all been extensively discussed recently [1, 10, 13, 21].

Since CC has a very poor outcome, much effort has been made to disclose the mechanism of cholangiocarcinogenesis and progression of CC [4, 22–28]. The studies and experimental evidences have clarified certain aspects of biliary carcinogenesis, yet the exact way of how these processes occur are still unclear. Numerous factors have been hypothesized to be involved in biliary carcinogenesis, such as stem/progenitor cells, genetic and epigenetic alterations, tumor microenvironment and exposure to carcinogenic agents. All of which may collectively contribute to the heterogeneity observed between patients and within the same tumor.

The present review is provided from a pathological point of view, with focus mainly on *classification, histopathological diagnostic criteria, precursors and early lesions, factors of molecular cholangiocarcinogenesis.*

Classification of Cholangiocarcinoma and Histopathological Diagnostic Criteria

Several guidelines and classifications exist for the management of CC [8]. The most recent classification is based on the anatomical localization of the tumor and *intrahepatic (iCC), perihilar (pCC) and distal (dCC)* forms have been generally accepted (Table 1) [1, 3, 10, 15, 16], which have different epidemiology, pathogenesis and clinical presentations [1] (Fig. 1). The previously used term “Klatskin tumor” for *pCC* is discouraged [1].

Intrahepatic CC can be further divided into *large bile duct* and *peripheral iCC* (Table 1), the latter arising from the small bile ducts [6, 29]. The large bile ducts contain peribiliary glands (PBG) within their walls, in contrast to the small bile ducts which are connected with the bile ductules or canals of Hering [29]. *iCC* derives from the hepatic stem/progenitor cells, which are located either in the small bile ducts and ductules/canals of Hering or in the peribiliary glands of the

large bile ducts [6, 30]. This might explain why the characteristics of *iCCs* arising from different anatomical localizations vary from each other [29]. *iCC* can be further classified into mass-forming (60–80%), periductal-infiltrating (15–35%), intraductal (8–29%), undefined and mixed subtypes which are related to the prognosis (Table 2) [2, 10, 29]. (Fig. 2a–d). **Histologically**, *iCC* is an adenocarcinoma showing varying degree of differentiation from well-to-moderate and poor, with certain rare variants [5], (Table 3). *iCC* deriving from large bile ducts contains larger tubules or papillary growth with taller columnary cells (Fig. 3a,b). *iCC* of small duct type consists of cuboidal cells forming small tubular or trabecular structures.

Perihilar CC (pCC) and *distal CC (dCC)* have the morphology of exophytic and/or intraductal (endophytic) tumors, which might be periductal (the most common type) or nodular (Table 1). There are data suggesting that better prognosis is associated with the intraductal form [10]. **Histologically**, *pCC* and *dCC* have similar appearances as *iCC* deriving from the large bile ducts. The cells of origin of *pCC* and *dCC* have been proposed as mucin-producing cholangiocytes lining the large bile duct and/or the hepatic progenitor cells [3].

Immunohistochemical Typing and Biomarkers of CC

It might be a diagnostic challenge to **differentiate CC, especially *iCC* from metastasis** of the pancreas and other neoplasms with adenocarcinoma morphology with the help of immunohistochemistry (Supplementary Table 1).

More recently Fernández Moro et al. [32] established an integrative immunohistochemical classification of adenocarcinomas of the pancreatobiliary system. Cluster and differential expression analysis of an immunohistochemical panel of 38 antibodies resulted a characteristic profile for *iCC* and intestinal type adenocarcinoma that can distinguish them from metastatic and pancreatobiliary adenocarcinomas [32]. These authors proposed an immunohistochemical panel including CK19, CK20, MUC2, MUC5AC, CA19–9, mCEA, CA125 and SMAD4 for the differentiation [32]. Three subtypes, extrahepatic pancreatobiliary, intestinal and intrahepatic CC, were classified by immunohistochemistry “with differences in prognosis, biology and potentially in response to treatment” and according to the obtained results the diagnosis of *iCC* “no longer needs to be regarded as a diagnosis of exclusion” [32]. A combination of other markers (such as CK7, CK17, maspin, vimentin) might increase the diagnostic accuracy further [32]. (Fig. 4 and Supplementary Table 1).

The differentiation of *iCC* from HCC might necessitate additional markers, such as HepPar-1, Arginase-1, Glutaryl Synthetase (GS), Glypican 3, Heat Shock Protein 70 (HSP70) to help establish the diagnosis [33].

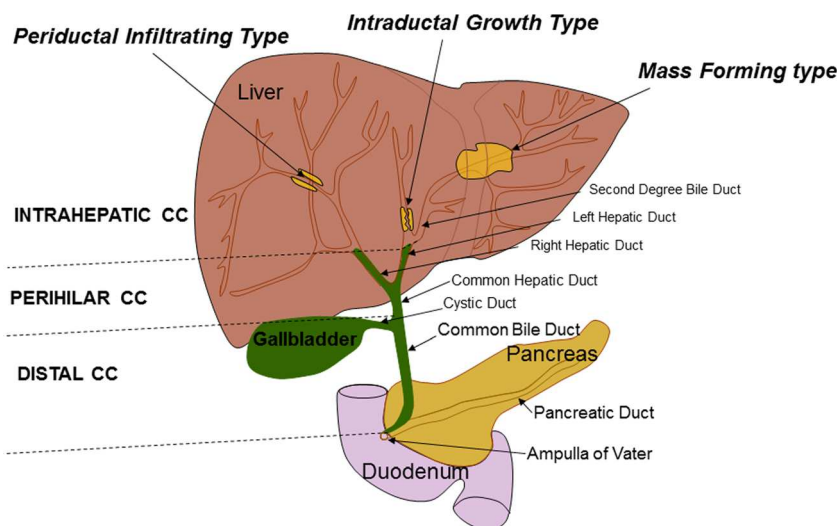
CCs show increased expression of tight junction proteins (TJ), such as claudins 1, 3, 4, 7, occludin etc. which is a

Table 1 Classification of cholangiocarcinoma (CC) based on anatomical localization *

Intrahepatic CC (iCC)
large bile duct type
small bile duct type (peripheral)
Perihilar CC (pCC)
Distal CC (dCC)

*Based on [3, 15, 29], AJCC and UICC

Fig. 1 Classification and growth patterns of cholangiocarcinoma (CC) based on anatomical localization



valuable tool for distinguishing CC from HCC, but not from pancreatic ductal carcinoma, which expresses similar claudin subtypes [34, 35]. By discriminant analysis, *iCC*, extrahepatic CC and gallbladder cancer could be differentiated from each other and from their normal sites of origin of the biliary tree based on TJ protein pattern [18, 19].

CC is predominantly diagnosed in an advanced clinical stage, when curative treatment is usually unsuccessful in the majority of cases and the prognosis is poor. This in part is due to the symptomless manifestation of the tumor in the early stage, especially in case of *iCC*, and in part to the lack of specific and sensitive biomarkers [21]. Several **biochemical markers** are used extensively in the diagnostic panel, such as aminotransferases, total bilirubin etc. and also certain tumor markers, such as carbohydrate associated antigen 19–9 (CA19–9), CA125, carcinoembryonic antigen (CEA), however all with variable diagnostic value.

Prognostic Factors

Several factors have been studied regarding the outcome of CC. Tumor size, anatomical localization, solitary vs multiplex tumors, lymph node status, tumor stage, surgical resection margins, vascular invasion, histopathological and immunohistochemical types/subtypes [32], biomarker (CA19–9 etc) levels were found to have varying values as independent predictors of survival in addition to the age and gender of patients [2]. (Supplementary

Table 2 Classification of cholangiocarcinoma (CC) based on growth pattern and gross (*)

Mass-forming (60–80%): nodular, exophytic
Periductal-infiltrating (15–35%)
Intraductal (8–29%): papillary, polypoid
Undefined
Mixed

*Based on [2, 10, 29, 31]

Table 1) In a recent survival analysis, extrahepatic pancreatobiliary type had the poorest overall survival in contrast to the intestinal type, which had a better prognosis [32].

Staging of CC

Staging systems are separately used for *iCC*, *pCC* and *dCC*, which are defined by the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Internationale Contre le Cancer (UICC) and the Liver Cancer Study Group of Japan, and are updated regularly in new editions. This reflects that with the extension of our knowledge and the introduction of new biomarkers, better discrimination has become available in the evaluation of prognostic factors [2].

Precursors and Early Lesions of CC

It is generally accepted that CC is a multistep process originating from transformed biliary epithelial cells or from stem cells [13]. Several lesions and entities have been described as precursors for the different subtypes of CC (Table 4).

The terms **biliary intraepithelial neoplasia (BillN)** and **intraductal papillary neoplasm of the bile ducts (IPNB)** were introduced for intrahepatic large duct, perihilar and distal CC [5, 41]. Invasive biliary adenocarcinomas were shown to be preceded by the „flat” (non-tumor-forming) BillN or the „papillary” (tumor-forming) types [36]. Several other possible premalignant candidate lesions, such as *bile duct adenoma (peribiliary gland hamartoma)*, *biliary fibroadenoma*, *von Meyenburg complex*, *ductal plate malformations*, *cystic and micropapillary epithelial changes of peribiliary glands* were recognized [6, 36, 37].

BillN has been accepted by the World Health Organization (WHO) as a specific entity, usually recognized microscopically, and has been further divided into grades 1, –2, –3 (low-, moderate- and severe dysplasia) based on the degree of

Fig. 2 Macroscopy of cholangiocarcinoma (CC). **a** Mass-forming type of intrahepatic CC, **b** periductal infiltrating type of CC (large bile duct type), **c** perihilar CC, **d** distal CC



structural differentiation and atypia (Fig. 5). It might be unrecognizable by macroscopy, or has a flat gross appearance, being less than 2–3 mm tall and can occur in the large intrahepatic or extrahepatic bile ducts and in the PBGs [41]. Microscopically, however, the „flat type” might have flat or micropapillary appearance [36, 37, 41]. The diagnostic criteria have been defined by an international consensus [42], based on the degree of cellular/nuclear atypia, nuclear pseudostratification, protruding nuclei to the apical surface and loss of cellular polarity [37]. Several authors emphasize that BilIN is a biliary counterpart of the pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) in the pancreas [37, 38].

There are several molecular markers that can be detected by immunohistochemistry in BilIN lesions. Biliary cytokeratins, such as CK7 and CK19 are usually strongly expressed [37], whereas P53, p21, cyclinD1 are

overexpressed [37]. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) has been shown to be overexpressed in CC [43] and p16 increases parallel with the grade of BilIN [44]. From the viewpoint of diagnostics, the immunohistochemical detection of S100P was shown to be useful, being mostly negative in reactive biliary lesions and increased in BilIN2, –3 and CC.

The preinvasive pancreatobiliary neoplasm includes the *IPNB*, which is a macroscopically visible exophytic intraductal papillary growth with low-, intermediate- and high grades, a counterpart of the similar tumor arising in the pancreas, the so called intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) [31, 39, 41, 45]. The papillary tumor fills the bile ducts leading to a fusiform dilatation sometimes associated with mucin-containing cyst formation [11, 36]. The tumor might arise in large intrahepatic or extrahepatic bile ducts as well as in PBGs. IPNBs might be multiple along the biliary tree and recurrence after surgery is common. The lesion has four histological subtypes: pancreatobiliary, intestinal, gastric and oncocytic [36, 40, 45–48], however, some tumors contain more than one subtype. MUC1 is mostly expressed in the pancreatobiliary, while MUC2 in the intestinal type [41]. MUC5AC is positive in all four types. Cytokeratin 20 is mainly positive in the intestinal type, but not in the gastric and oncocytic types [40]. High-grade IPNB or in situ carcinoma are both often associated with invasion according to Nakanuma et al. [41] at the time of surgical resection, especially those arising in the extrahepatic bile ducts. More recently IPNB has been classified into two subtypes [41, 45, 49]. The “pancreatic” (type I) is more similar to IPMN, mainly located in intrahepatic and/or hilar bile ducts with cystic dilatation. The “non-pancreatic” (type II) subtype can be detected mainly in the extrahepatic bile ducts with frequent high-grade dysplasia and is more aggressive. Some authors use the term “papillary cholangiocarcinoma” for this type of IPNB [50].

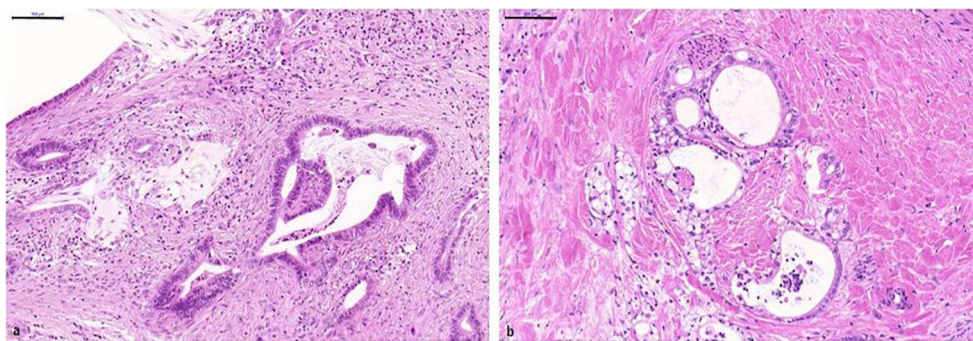
The *bile duct adenoma* (BDA, peribiliary gland hamartoma, intrahepatic bile duct adenoma) is a rare benign

Table 3 Classification of cholangiocarcinoma (CC) based on histological features (*)

Based on differentiation
well, moderately, poorly differentiated
Classification of intrahepatic CC (*)
Conventional type (bile duct type)
Small bile duct type (peripheral type)
Large bile duct type
Bile ductular type
Intraductal type
Combined CC/hepatocellular carcinoma
Rare variants
Squamous/adenosquamous type
Undifferentiated type
Lymphoepithelial type
Mucinous/signet ring, clear cell type
Others

*Based on [3, 31]

Fig. 3 Different types of intrahepatic cholangiocarcinoma. **a** large bile duct type (scale bar: 1000 μm), **b** large bile duct type (scale bar: 200 μm)



tumor, originating from the cholangiocytes, usually in subcapsular localization with a size of 1–20 mm in diameter [51, 52]. The tumor is composed of closely packed small ductules with varying degree of cellular atypia, usually no cystic dilatation and with intervening fibrotic stroma. Sometimes it might be problematic to distinguish BDA from the ductular reaction, a frequent finding in chronic liver diseases and from well differentiated CC, especially in intraoperative frozen sections [43, 52, 53]. The epithelial cells express CK7 and CK19, epithelial membrane antigen (EMA) and low proliferation activity detected by Ki67 immunoreaction [54].

Biliary adenofibroma (BAF) is a benign tumor similar to BDA with increased fibrotic stroma and glandular cystic dilatation.

The **von Meyenburg complex (VMC, biliary microadenoma)** is a congenital benign lesion composed of small bile ducts and ductules of varying sizes, forms and dilatations and occasionally the lesion contains bile. It is usually multiplex and as in case of BDA, is mainly subcapsular in localization (Fig. 6). There are reports, however, suggesting that the VMC is a precursor lesion for *iCC* of the peripheral subtype and is associated with *iCC* [55–57].

Cystic and Micropapillary (C-P) Epithelial Changes in Peribiliary Glands (PBGs) intramural and extramural PBGs are located along the extrahepatic and intrahepatic large bile ducts with mucin and/or serous secretion production [58]. By immunohistochemistry, C-P lesions were found to have increased mucin secretion and MUC5AC, cyclin D1 and S100P expressions as compared to cystic lesions [58]. These authors concluded that C-P lesions might be precursors of biliary neoplasms, especially of intraductal papillary neoplasm and mucin-producing CC [58]. Multipotent stem/progenitor cells were detected in PBGs, which have been suggested to participate in the carcinogenesis [30, 59, 60].

Molecular Cholangiocarcinogenesis

Several papers report that molecular cholangiocarcinogenesis is a complex multifactorial process, in which risk factors [24], persistent inflammation of the bile duct epithelium, genetic and epigenetic alterations, multicellular origin and tumor heterogeneity are involved [22, 61–63]. According to the classical belief, cholangiocarcinogenesis is promoted

Fig. 4 Positive immunostaining for cytokeratin7 (CK7), CK19, MUC1 and tight junction protein Claudin-4 (scale bars: 50 μm)

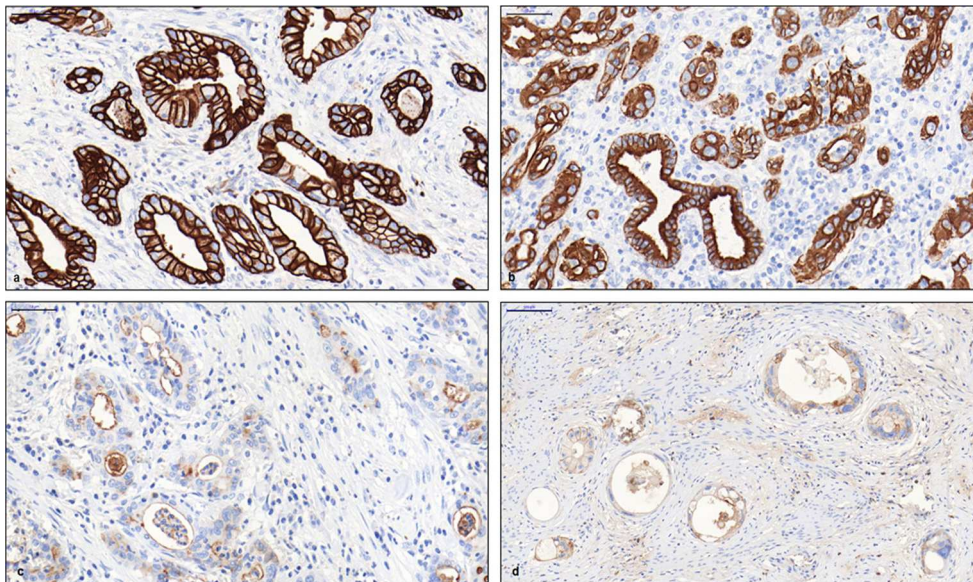


Table 4 Precursors and early lesions of cholangiocarcinoma

Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) [6, 11, 36–39]
BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3
Intraductal papillary neoplasms of the bile ducts (IPNB) [11, 36, 37, 39, 40]
Intraductal tubular (tubulopapillary) neoplasms of the bile ducts (ITPN-B)
low-, high-grade lesions
pancreatobiliary, intestinal, oncocytic, gastric phenotype
Biliary mucinous cystic neoplasms (MCNB)
Bile duct adenoma (BDA) (peribiliary gland hamartoma), biliary adenofibroma* [6]
von Meyenburg complexes (VMCs) (biliary microhamartoma)* [6]
*“candidate precursor” for peripheral CC

Based on [6, 11, 36–40]

by dysregulated reparative proliferation of cholangiocytes, which leads to DNA damage, overproduction of mitogenic factors (IL-6, TGF- β) and overactivation of proliferative intracellular signaling pathways (TGF- β , AKT, mTOR, MAPK, WNT, Hedgehog), and subsequently to activating mutations (KRAS, BRAF), overexpressed and silenced genes (EGFR, HGF and TP53, p16, respectively) [28, 61, 64].

Based on molecular alterations, biliary tract cancer-related biomarkers have also been suggested, e.g. Erb/HER family (Erb-1/EGFR, Erb-2/HER-2, ErbB/HER-3), vascular endothelial growth factor (VEGF), mitogen-activated protein kinase (MAPK), PIK/Pten/AKT/mTOR and several other biomarkers in serum and bile, such as CA19–9, matrix metalloproteinases (MMPs), serum CK19 fragment (CYFRA 21-1), SMAD family member 4, isocitrate dehydrogenase (IDHs) and microRNAs [21]. More recently, specific genomic profiling has provided new possibilities in the detection of CCs opening the path for targeted therapy [4, 13, 14, 65]. Nevertheless, no diagnostic biomarkers have been found to screen for

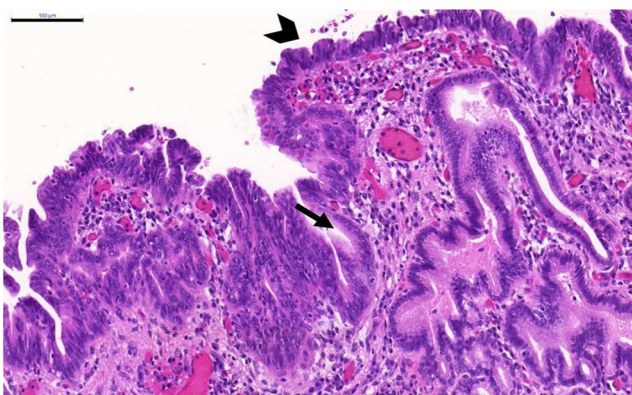


Fig. 5 Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) (arrow: BilIN 1, arrowhead: BilIN 2; scale bar: 100 μ m)

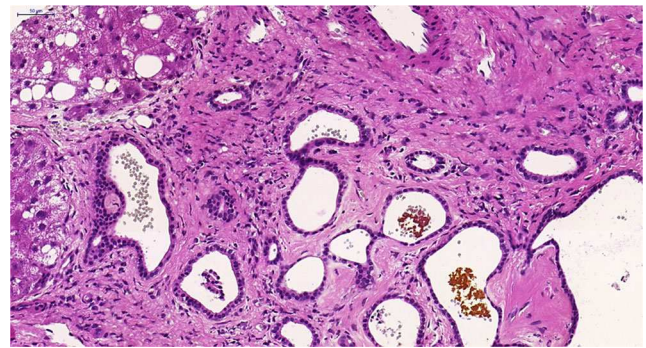


Fig. 6 Dilated and angulated bile ducts in fibrous stroma in von Meyenburg complex (scale bar: 50 μ m)

patients at higher risk of CC and to identify the disease at an early stage or pre-cancerous phase [13, 66].

Nevertheless, genome and exome sequencing studies have identified the predominant molecular alterations in CC [10, 13] and in early lesions of CC [67].

Cholangiocarcinoma-Related Genetic Alterations

In recent years, a great amount of effort has been put in to reveal the CC-associated genetic alterations and it turned out that numerous genes are affected by recurrent somatic alterations not only in CCs but in BilIN and IPNB, as well [9, 61, 68]. For example, KRAS mutations (codon 12) have been observed in 33% of BilIN and about 40% of IPNB lesions [61, 69] and in patients with hepatolithiasis, KRAS mutation is regarded as an early molecular event during the progression of iCC [70].

In CC, diverse types of genetic alterations (e.g. mutation, amplification, deletion, fusion and methylation) have been described [71]. These alterations affect various genes involved in different cellular processes ranging from cell cycle control, cytokine signaling, genomic stability and chromatin remodeling to DNA repair [12–14, 61, 65, 72–74] (Table 5). It has been observed that the frequencies of the genetic alterations varies in association with anatomic location (iCC, eCC) and etiologic exposure (e.g. liver fluke or non-liver fluke CC types) [9, 84, 87]. According to the summarized mutation frequencies published in the various articles, FGFR, IDH1, IDH2, BAP1, PBRM1, MCL1, CDKN2A, BRAF and BRCA1/2 genes seem to be more frequently altered in iCC, while TP53, KRAS, CDKN2B, SMAD4, ErbB2/HER2, CTNNB1 and MLH1 gene alterations are more frequent in eCC (Table 5). Similar data has been published in a handful of previous summaries [9, 14, 62, 65, 75, 84, 88, 89]. In addition, some of these mutations seem to be co-occurring, while others are mutually exclusive [61, 76, 84, 90].

Table 5 Number of patients found to harbor the actual genetic alteration in relation to the total number of examined iCC and eCC cases

Gene group	iCC	%	eCC	%	Reference
Genomic stability:					
TP53	189/779*	24.3	110/298	36.9	[4, 71, 75–83]
STK11	4/178	2.2	3/105	2.9	[77, 79–81]
MAPK signaling:					
KRAS	193/1108	17.4	117/372	31.5	[4, 71, 75–86]
NRAS	9/172	5.2	14/203	6.9	[75–79, 81, 82]
BRAF	32/672	4.8	3/170	1.8	[4, 77, 79, 80, 82, 85]
ErbB2/HER2	15/582	2.6	22/252	8.7	[4, 71, 75–77, 80]
ErbB3	2/28	7.1	–	–	[78]
ErbB4	2/105	1.9	0/95	–	[77, 79]
AKT/PI3K signaling:					
EGFR	8/356	2.2	2/131	1.5	[77, 79, 84, 85]
EGFR amplification	5/482	1.0	0/114	–	[4, 77]
MET	10/510	2.0	0/114	–	[4, 77, 78]
PI3KCA	38/724	5.2	11/171	6.4	[4, 76–81, 83]
PIK3C2A	7/137	5.1	5/95	5.3	[77, 79, 81]
PTEN	14/308	4.5	10/204	4.9	[75, 77–81, 83]
Angiogenesis:					
VEGFA	1/32	3.1	–	–	[81]
KDR	5/252	2.0	6/114	5.3	[76, 77, 79, 80, 83]
WNT signaling:					
WT1	1/28	3.6	–	–	[78]
CTNNB1	0/109	–	3/104	2.9	[76, 77, 79]
Cell cycle control:					
CDK6	2/28	7.1	–	–	[78]
CDKN2B	1/28	3.6	15/99	15.2	[75, 78]
CDKN2A	131/622	21.1	42/270	15.6	[4, 75–81]
CCND1	4/45	8.9	7/118	5.9	[75, 76, 80]
TGF- β signaling:					
SMAD4	7/266	2.6	32/223	14.3	[71, 75–77, 79, 83]
TGFBR2	5/137	3.6	6/95	6.3	[77, 79, 81]
DNA repair:					
MLH1	0/105	–	2/95	2.1	[77, 79]
MSH2	1/28	3.6	–	–	[78]
MSH6	1/28	3.6	–	–	[78]
BRCA1/2	4/69	5.8	–	–	[78, 80]
Epigenetic regulation:					
IDH1	163/1111	14.7	2/265	0.8	[4, 71, 76–86]
IDH2	17/320	5.3	1/105	0.9	[77–81, 85]
ARID1A	131/853	15.4	36/281	12.8	[4, 71, 75, 77–81, 83, 86]
BAP1	129/888	14.5	11/256	4.3	[4, 71, 77–81, 84, 86]
PBRM1	54/448	12.1	15/298	5.0	[71, 75, 77, 79–81, 84, 86]
MCL1	6/28	21.4	–	–	[78]
FGFR fusions:					
	121/764	15.8	0/141	–	[4, 78, 80, 81, 84, 85]

iCC: intrahepatic cholangiocarcinoma; eCC: extrahepatic cholangiocarcinoma

* Cases with mutation/total examined cases

Deep-sequencing studies also disclosed that the average genetic alteration per patient ranges from 1.3 to 3.6 in iCC and from 1.18 to 4.4 in eCC and the majority of CCs have at least one driver gene mutation [4, 71, 77–79]. In 5–22% of CCs, however, none of these main genetic alterations could be found [71, 77].

Additionally, methylation [91], mismatch repair gene-deficiency [78] copy number alterations [89, 92, 93] and microsatellite instability [94] have also been observed in CC. Genes frequently inactivated by methylation in CC may include MLH1, p16INK4/CDKN2A, RASSF1A, RUNX3, DAPK and SOCS-3 [91]. Furthermore, an intriguing DNA methylation assay analysis of bile fluid has identified a panel of 5 genes (CCND2, CDH13, GRIN2B, RUNX3, TWIST1) that detected CC cells with a sensitivity of 83% and a specificity of 100% [72].

Association between genetic alterations and patients' outcome has also been revealed. For example, KRAS, BRAF mutations, overexpression of EGFR, HER2, activation of oncogenic signaling pathways, DNA amplifications and deletions have been found to be associated with poor outcome [95, 96]; whereas iCCs characterized by activation of inflammatory signaling pathways, overexpression of cytokines and activation of STAT3 showed well differentiated cells and good survival [96].

Multicellular Origin of iCC

Histologic evidences, diverse cellular phenotypes and cell markers suggest that iCC cannot be originated only from transformed cholangiocytes [77, 89, 97] but from multiple types of cells, including (1) cholangiocytes or intrahepatic biliary epithelial cells (IBEC) in the large bile ducts, small intrahepatic bile ducts and PBGs, (2) hepatic progenitor cells (HPC) occurring in the canals of Hering, biliary tree stem/progenitor cells (BTSC) residing within the medium-large intrahepatic and extrahepatic bile ducts, and (3) mature hepatocytes [25, 61, 89, 98]. In murine experiments, transformed hepatocytes, hepatoblasts, and HPCs were capable of producing a broad spectrum of liver malignancies ranging from CC to HCC, which may occur due to cellular plasticity of liver cells [89, 98–100]. There are key pathways promoting and maintaining progenitor cell-like traits, such as Notch, Wnt/ β -catenin, Hedgehog, Hippo, PI3K/AKT/PTEN, IL-6/TGF- β and RAS/RAF/MEK/ERK, providing feasible targets for cancer therapy [26]. Additionally, a whole-exome sequencing study has revealed that similar substitution mutations are predominant in iCC and HCC [23].

Combined HCC-CC showing clinicopathological, morphological, and genetic characteristics typical of both HCC and iCC also suggests that HCC and iCC share a common cellular origin and may derive directly from HPC activation

and differentiation [25]. The stem-cell features type mixed iCC and CLC derive from the most peripheral biliary branches containing HPCs, with tumor cells showing intermediate histological features between hepatocytes and cholangiocytes [25, 27]. Nevertheless, the molecular analysis indicates that CLC is rather a distinct entity with a biliary molecular profile, low chromosomal instability, enrichment of TGF- β and immune-related signaling, which proposes a biliary committed precursor [27]. Thus, combined HCC-CC and stem-cell type mixed HCC-CC tumors seem to have a biphenotypic progenitor-like precursor but CLC stands alone as an independent biliary-derived entity, not sharing any of the molecular traits of HCC.

Alternatively, genetic mutations arising in mature cells may reprogram differentiated liver cells toward a progenitor-like state. For example, mutant IDH in genetically engineered mouse models have been found to inhibit hepatocyte differentiation causing the expansion of HPCs, while combined IDH and KRAS mutations have led to the development of premalignant biliary lesions and subsequent progression to iCC [89].

Mature hepatocytes can act as an alternative to HPCs capable of replacing their own cell population and giving rise to biliary lineage cells [101]. Kupffer cells seem to be also involved since, by differentially responding to hepatic injury, Kupffer cells may induce Notch in hepatocytes and Wnt in biliary lineage cells. The transdifferentiation of mature hepatocytes into iCC has been proven in mice by Notch-mediated conversion of the hepatocytes [61, 98]. In addition, aberrant Notch has been found to be present in 60% of iCCs [89].

Heterogeneity in CC

Tumor heterogeneity has been an important issue in tumor biology for many years as it affects patient outcome, treatment response and is needed to be considered for tumor profiling, as well [25, 102]. Accumulation of unrepaired stochastic mutations and randomly occurring genomic instability are particularly relevant in CC as the diagnosis is often made late when large macroscopic lesions have already developed and tumor cells have therefore undergone many cell divisions [103].

Both intertumoral (existing between patients) and intratumoral heterogeneity has been observed in CC [62]. A distinct heterogeneity has been associated with CC identifying for example 10% unique mutations between central and peripheral samples [104]. Recently, a high degree of spatial intratumoral heterogeneity (60.3%) has been described in iCC, which is higher than in other cancers (e.g. 39% in HCC) [23]. Further analysis revealed that 42.8% of the mutations were identified in the subclones with an average of 24.7 driver mutations. In the founder cells, in contrast, only 4.3 driver mutations could be observed and only a handful of

mutations was found to be clonal in all regions of the tumors. Additionally, genome doubling occurred before subclonal diversification but after acquisition of most of the early driver mutations [23].

Nevertheless, there are other factors that may play roles in the origin of CC-related heterogeneity. For example, multiple risk factors associated with CC, which are believed to be the largest among all human malignancies [103], considering both the established and putative risk factors ranging from biliary tract inflammation through hepatitis and cirrhosis to obesity and toxins. The diverse genetic alterations observed in association with different underlying liver diseases provide a support for this [65, 105].

Further contributing factors are the genetically distinct stem cell niches (HPCs and BTSCs) observed along the biliary tree, as these stem cells possess different susceptibility to risk factors [103, 106]. Tumor microenvironment and cancer treatment are also driving factors of heterogeneity as both may influence the architecture and genetic profile of the subclones, promoting selective growth with a survival advantage to certain subclones and eradicating those with less favorable survival advantage [26].

Cholangiocarcinogenesis-Related miRNAs

Dysregulation of microRNAs (miRNA) has been observed in cholangiopathies [25, 72, 107–110] and miRNAs are detectable not only in tissues but also in plasma and serum, which renders an easier access to miRNAs [111]. The most important cholangiocarcinogenesis-related miRNAs are summarized in Supplementary Fig. 1. The miRNAs showing dysregulation in CC are those that are mainly involved in the regulation of proliferation, tumor growth, cell cycle, angiogenesis, apoptosis, EMT, inflammation, DNA methylation and chemoresistance, suggesting that these miRNAs are linked to cholangiocarcinogenesis.

Targeted Therapy

For patients with advanced-stage or unresectable cholangiocarcinoma, the available systemic therapy includes gemcitabine and cisplatin treatment with less than 1 year median overall survival [22]. Biliary tract cancers are very heterogeneous tumors with respect to localization, pathological subtypes and various genetic defects, posing a challenge for effective treatment options. The identified driver mutations are believed to be optimal candidates for personalized targeted therapy and it has been suggested that 68% of the CC cases may have potentially drug actionable pathways [77].

The candidate molecules showing preclinical effectivity have been tested in clinical studies. The most promising

therapeutic candidates include tyrosine-kinase inhibitors for FGFR fusions, small-molecule inhibitors targeting chromatin-remodelling proteins such as mutant IDH1/2, HDAC, DNMT, and the ones targeting activating mutation of ERBB2/Her-2 protein kinase [22, 28]. Other mutations having a good possibility for targeted therapy may include CDKN2A/B, molecules downstream of KRAS (MEK, AKT, mTOR), MET/HGF, MCL-1, PRKACA/B and VEGFR [28, 63]. Targeting tumor stroma (apoptotic priming) and immunotherapy are also attractive [28]. Owing to the extensive inter- and intratumoral heterogeneity of CC, multiagent therapy has been foreseen as well.

In conclusion, the extensive use of imaging and endoscopic techniques has discovered lesions in the biliary system, which might be challenging in the differential diagnosis, but has prognostic and therapeutic significance. The main questions are usually the benign or malignant, the primary or metastatic nature of the lesion, and the exact site of the tissue of origin. The diagnosis should not be regarded as a “diagnosis of exclusion” in the adenocarcinomas of pancreatobiliary tumors [32]. This might not be easy due to the similarities in the histopathology, even in the immunohistochemistry of tumors of the pancreatobiliary system. To establish the correct diagnosis it is important to analyse the clinical data in addition to the extended histopathological evaluation and further molecular characterization of the lesions is also needed.

Many factors have been revealed to contribute to the molecular character of the developed CC, including several risk factors, different anatomical localizations, multiple cellular origins, genetic and epigenetic alterations, tumor microenvironment. These factors may also contribute to clinical and pathobiological heterogeneity, which influences tumor biology, drug responses and patient outcome and poses a challenge for targeted therapy. Two-thirds of patients may harbor genomic alterations that may be addressed using personalized targeted therapies [25]. Silenced genes established by different mechanisms seem to be a frequent event in CC. The mutated genes show both individual and subclonal variances and only a few mutations seem to be clonal in a tumor. Determining the types of genetic alterations in a sample is important in order to select an effective (combination) therapy [63, 77, 78, 88]. Nevertheless, the fact that certain CC cases fail to show any genetic alterations indicate that mechanisms different from intragenic mutations (amplifications, deletions, translocations, and epigenetic anomalies) may also be responsible for cholangiocarcinogenesis [77]. For example, the systemic evolutionary theory, according to which a systemic change at cellular level and a disharmony in management of energy and waste is the prime cause of neoplastic transformation and cancer, causing the gradual dedifferentiation of a differentiated but energy-restricted cell [112].

Funding This work was supported by grant #OTKA 108548 by the Hungarian National Research Foundation and grant #NVKP_16_1-2016-0004 by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, Pawlik TM, Gores GJ (2014) Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 60(6):1268–1289
- Dodson RM, Weiss MJ, Cosgrove D, Herman JM, Kamel I, Anders R, Geschwind JF, Pawlik TM (2013) Intrahepatic cholangiocarcinoma: management options and emerging therapies. *J Am Coll Surg* 217(4):736–750 e734
- Rizvi S, Gores GJ (2013) Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 145(6):1215–1229
- Javle M, Bekaii-Saab T, Jain A, Wang Y, Kelley RK, Wang K, Kang HC, Catenacci D, Ali S, Krishnan S, Ahn D, Bocobo AG, Zuo M, Kaseb A, Miller V, Stephens PJ, Meric-Bernstam F, Shroff R, Ross J (2016) Biliary cancer: utility of next-generation sequencing for clinical management. *Cancer* 122(24):3838–3847
- Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H (2010) Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2(12):419–427
- Nakanuma Y, Tsutsui A, Ren XS, Harada K, Sato Y, Sasaki M (2014) What are the precursor and early lesions of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma? *Int J Hepatol* 2014:805973
- Maemura K, Natsugoe S, Takao S (2014) Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21(10):754–760
- Cai Y, Cheng N, Ye H, Li F, Song P, Tang W (2016) The current management of cholangiocarcinoma: a comparison of current guidelines. *Biosci Trends* 10(2):92–102
- Marcano-Bonilla L, Mohamed EA, Mounajjed T, Roberts LR (2016) Biliary tract cancers: epidemiology, molecular pathogenesis and genetic risk associations. *Chin Clin Oncol* 5(5):61
- Razumilava N, Gores GJ (2014) Cholangiocarcinoma. *Lancet* 383(9935):2168–2179
- Nakanuma Y, Harada K, Sasaki M, Sato Y (2014) Proposal of a new disease concept "biliary diseases with pancreatic counterparts". Anatomical and pathological bases. *Histol Histopathol* 29(1):1–10
- Simbolo M, Fassan M, Mafficini A, Lawlor RT, Ruzzenente A, Scarpa A (2016) New genomic landscapes and therapeutic targets for biliary tract cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21:707–718
- Serafini FM, Radvinsky D (2016) The pathways of genetic transformation in cholangiocarcinogenesis. *Cancer Genet* 209(12):554–558
- Jain A, Kwong LN, Javle M (2016) Genomic profiling of biliary tract cancers and implications for clinical practice. *Curr Treat Options in Oncol* 17(11):58
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC (2010) *AJCC Cancer staging manual*, 7th edn. Springer, New York
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2009) *TNM classification of malignant tumors*, 7th edn. Wiley-Blackwell, Oxford
- Gandou C, Harada K, Sato Y, Igarashi S, Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y (2013) Hilar cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma share similar histopathologies, immunophenotypes, and development-related molecules. *Hum Pathol* 44(5):811–821
- Nemeth Z, Szasz AM, Somoracz A, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z (2009) Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers. *Pathol Oncol Res* 15(3):533–539
- Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Gyorffy H, Somoracz A, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z (2009) Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J Histochem Cytochem* 57(2):113–121
- Zhou Y, Zhao Y, Li B, Huang J, Wu L, Xu D, Yang J, He J (2012) Hepatitis viruses infection and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer* 12:289
- Hu J, Yin B (2016) Advances in biomarkers of biliary tract cancers. *Biomed Pharmacother* 81:128–135
- Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ (2018) Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 15(2):95–111
- Dong LQ, Shi Y, Ma LJ, Yang LX, Wang XY, Zhang S, Wang ZC, Duan M, Zhang Z, Liu LZ, Zheng BH, Ding ZB, Ke AW, Gao DM, Yuan K, Zhou J, Fan J, Xi R, Gao Q (2018) Spatial and temporal clonal evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 69(1):89–98
- Palmer WC, Patel T (2012) Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 57(1):69–76
- Wei M, Lu L, Lin P, Chen Z, Quan Z, Tang Z (2016) Multiple cellular origins and molecular evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 379(2):253–261
- Raggi C, Invernizzi P, Andersen JB (2015) Impact of microenvironment and stem-like plasticity in cholangiocarcinoma: molecular networks and biological concepts. *J Hepatol* 62(1):198–207
- Moeini A, Sia D, Zhang Z, Camprecios G, Stueck A, Dong H, Montal R, Torrens L, Martinez-Quetglas I, Fiel MI, Hao K, Villanueva A, Thung SN, Schwartz ME, Llovet JM (2017) Mixed hepatocellular cholangiocarcinoma tumors: Cholangiolocellular carcinoma is a distinct molecular entity. *J Hepatol* 66(5):952–961
- Mertens JC, Rizvi S, Gores GJ (2018) Targeting cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1864(4 Pt B):1454–1460
- Aishima S, Oda Y (2015) Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 22(2):94–100
- Carpino G, Cardinale V, Onori P, Franchitto A, Berloco PB, Rossi M, Wang Y, Semeraro R, Anceschi M, Brunelli R, Alvaro D, Reid LM, Gaudio E (2012) Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 220(2):186–199
- Nakanuma Y, Crurado MP, Franceschi S, Gores GJ, Paradis V, Sripa B, Tsui WMS, Wee A (2010) Intrahepatic cholangiocarcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds) *WHO classification of tumors of the digestive system*, 4th edn. IARC, Lyon, pp 217–224
- Fernandez Moro C, Fernandez-Woodbridge A, Alistair D'souza M, Zhang Q, Bozoky B, Kandaswamy SV, Catalano P, Heuchel R, Shtembari S, Del Chiaro M, Danielsson O, Bjornstedt M, Lohr JM, Isaksson B, Verbeke C, Bozoky B (2016) Immunohistochemical typing of adenocarcinomas of the Pancreatobiliary system improves diagnosis and prognostic stratification. *PLoS One* 11(11):e0166067

33. Lagana S, Hsiao S, Bao F, Sepulveda A, Moreira R, Lefkowitz J, Remotti H (2015) HepPar-1 and Arginase-1 immunohistochemistry in adenocarcinoma of the small intestine and Ampullary region. *Arch Pathol Lab Med* 139(6):791–795
34. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol* 19(3):460–469
35. Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch* 450(5):549–557
36. Kloppel G, Adsay V, Konukiewitz B, Kleeff J, Schlitter AM, Esposito I (2013) Precancerous lesions of the biliary tree. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(2):285–297
37. Sato Y, Sasaki M, Harada K, Aishima S, Fukusato T, Ojima H, Kanai Y, Kage M, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Hepatolithiasis Subdivision of Intractable Hepatobiliary Diseases Study Group of J (2014) Pathological diagnosis of flat epithelial lesions of the biliary tract with emphasis on biliary intraepithelial neoplasia. *J Gastroenterol* 49(1):64–72
38. Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y (2013) Histological characteristics of biliary intraepithelial neoplasia-3 and intraepithelial spread of cholangiocarcinoma. *Virchows Arch* 462(4):421–427
39. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (2010) WHO classification of tumors of the digestive system, 4th edn. IARC, Lyon
40. Ohtsuka M, Shimizu H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Tsuyuguchi T, Sakai Y, Yokosuka O, Miyazaki M (2014) Intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *Int J Hepatol* 2014(459091):1–10
41. Nakanuma Y, Uesaka K, Miyayama S, Yamaguchi H, Ohtsuka M (2017) Intraductal neoplasms of the bile duct. A new challenge to biliary tract tumor pathology. *Histol Histopathol* 32(10):1001–1015
42. Zen Y, Adsay NV, Bardadin K, Colombari R, Ferrell L, Haga H, Hong SM, Hytiroglou P, Kloppel G, Lauwers GY, van Leeuwen DJ, Notohara K, Oshima K, Quaglia A, Sasaki M, Sessa F, Suriawinata A, Tsui W, Atomi Y, Nakanuma Y (2007) Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol* 20(6):701–709
43. Hajosi-Kalcakosz S, Dezso K, Bugyik E, Bodor C, Paku S, Pavai Z, Halasz J, Schlachter K, Schaff Z, Nagy P (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol* 7:86
44. Sasaki M, Matsubara T, Kakuda Y, Sato Y, Nakanuma Y (2014) Immunostaining for polycomb group protein EZH2 and senescent marker p16INK4a may be useful to differentiate cholangiolocellular carcinoma from ductular reaction and bile duct adenoma. *Am J Surg Pathol* 38(3):364–369
45. Fukumura Y, Nakanuma Y, Kakuda Y, Takase M, Yao T (2017) Clinicopathological features of intraductal papillary neoplasms of the bile duct: a comparison with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas with reference to subtypes. *Virchows Arch* 471(1):65–76
46. Wan XS, Xu YY, Qian JY, Yang XB, Wang AQ, He L, Zhao HT, Sang XT (2013) Intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *World J Gastroenterol* 19(46):8595–8604
47. Nakanuma Y, Sato Y, Ojima H, Kanai Y, Aishima S, Yamamoto M, Ariizumi S, Furukawa T, Hayashi H, Unno M, Ohta T, Hepatolithiasis Subdivision of Intractable Hepatobiliary Diseases Study Group of J (2014) Clinicopathological characterization of so-called "cholangiocarcinoma with intraductal papillary growth" with respect to "intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB)". *Int J Clin Exp Pathol* 7(6):3112–3122
48. Zen Y, Fujii T, Itatsu K, Nakamura K, Minato H, Kasashima S, Kurumaya H, Katayanagi K, Kawashima A, Masuda S, Niwa H, Mitsui T, Asada Y, Miura S, Ohta T, Nakanuma Y (2006) Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 44(5):1333–1343
49. Nakanuma Y, Kakuda Y, Uesaka K, Miyata T, Yamamoto Y, Fukumura Y, Sato Y, Sasaki M, Harada K, Takase M (2016) Characterization of intraductal papillary neoplasm of bile duct with respect to histopathologic similarities to pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm. *Hum Pathol* 51:103–113
50. Fujikura K, Fukumoto T, Ajiki T, Otani K, Kanzawa M, Akita M, Kido M, Ku Y, Itoh T, Zen Y (2016) Comparative clinicopathological study of biliary intraductal papillary neoplasms and papillary cholangiocarcinomas. *Histopathology* 69(6):950–961
51. Aishima S, Tanaka Y, Kubo Y, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y (2014) Bile duct adenoma and von Meyenburg complex-like duct arising in hepatitis and cirrhosis: pathogenesis and histological characteristics. *Pathol Int* 64(11):551–559
52. Zimmermann A (2017) Tumors and tumor-like lesions of the hepatobiliary tract. General and surgical pathology. Vol. 1. Springer, Switzerland
53. Bertram S, Padden J, Kalsch J, Ahrens M, Pott L, Canbay A, Weber F, Fingas C, Hoffmann AC, Vietor A, Schlaak JF, Eisenacher M, Reis H, Sitek B, Baba HA (2016) Novel immunohistochemical markers differentiate intrahepatic cholangiocarcinoma from benign bile duct lesions. *J Clin Pathol* 69(7):619–626
54. Tsokos CG, Krings G, Yilmaz F, Ferrell LD, Gill RM (2016) Proliferative index facilitates distinction between benign biliary lesions and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 57:61–67
55. Song JS, Lee YJ, Kim KW, Huh J, Jang SJ, Yu E (2008) Cholangiocarcinoma arising in von Meyenburg complexes: report of four cases. *Pathol Int* 58(8):503–512
56. Orii T, Ohkohchi N, Sasaki K, Satomi S, Watanabe M, Moriya T (2003) Cholangiocarcinoma arising from preexisting biliary hamartoma of liver—report of a case. *Hepatogastroenterology* 50(50):333–336
57. O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, Deshpande V, Rothberg P, Grose V, Rossi RM, Zhu AX, Land H, Bardeesy N, Hezel AF (2012) Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 72(6):1557–1567
58. Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y (2014) Cystic and micropapillary epithelial changes of peribiliary glands might represent a precursor lesion of biliary epithelial neoplasms. *Virchows Arch* 464(2):157–163
59. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Mendel G, Alpini G, Gaudio E, Reid LM, Alvaro D (2012) The biliary tree—a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(4):231–240
60. Sutton ME, op den Dries S, Koster MH, Lisman T, Gouw AS, Porte RJ (2012) Regeneration of human extrahepatic biliary epithelium: the peribiliary glands as progenitor cell compartment. *Liver Int* 32(4):554–559
61. Gibiino G, Fabbri C, Fagioli S, Ianiro G, Fornelli A, Cennamo V (2017) Defining the biology of intrahepatic cholangiocarcinoma: molecular pathways and early detection of precursor lesions. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21(4):730–741
62. Walter D, Hartmann S, Waidmann O (2017) Update on cholangiocarcinoma: potential impact of genomic studies on clinical management. *Z Gastroenterol* 55(6):575–581
63. Valle JW, Lamarca A, Goyal L, Barriuso J, Zhu AX (2017) New horizons for precision medicine in biliary tract cancers. *Cancer Discov* 7(9):943–962

64. Wise C, Pилanthanonnd M, Perry BF, Alpini G, McNeal M, Glaser SS (2008) Mechanisms of biliary carcinogenesis and growth. *World J Gastroenterol* 14(19):2986–2989
65. Xie D, Ren Z, Fan J, Gao Q (2016) Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical implication in targeted therapy. *Am J Cancer Res* 6(3):577–586
66. Tshering G, Dorji PW, Chajjaroenkul W, Na-Bangchang K (2018) Biomarkers for the diagnosis of cholangiocarcinoma: a systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 98(6):1788–1797
67. Nakanuma Y, Sasaki M, Sato Y, Ren X, Ikeda H, Harada K (2009) Multistep carcinogenesis of perihilar cholangiocarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. *World J Hepatol* 1(1):35–42
68. Marks EI, Yee NS (2016) Molecular genetics and targeted therapeutics in biliary tract carcinoma. *World J Gastroenterol* 22(4):1335–1347
69. Sasaki M, Matsubara T, Nitta T, Sato Y, Nakanuma Y (2013) GNAS and KRAS mutations are common in intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *PLoS One* 8(12):e81706
70. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakanuma Y (2013) KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer* 119(9):1669–1674
71. Churi CR, Shroff R, Wang Y, Rashid A, Kang HC, Weatherly J, Zuo M, Zinner R, Hong D, Meric-Bernstam F, Janku F, Crane CH, Mishra L, Vauthey JN, Wolff RA, Mills G, Javle M (2014) Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One* 9(12):e115383
72. Nakaoka T, Saito Y, Saito H (2017) Aberrant DNA methylation as a biomarker and a therapeutic target of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci* 18(6):1111
73. Udali S, Guarini P, Moruzzi S, Ruzzenente A, Tammen SA, Guglielmi A, Conci S, Pattini P, Olivieri O, Corrocher R, Choi SW, Friso S (2015) Global DNA methylation and hydroxymethylation differ in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma and relate to survival rate. *Hepatology* 62(2):496–504
74. Chiang NJ, Shan YS, Hung WC, Chen LT (2015) Epigenetic regulation in the carcinogenesis of cholangiocarcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 67:110–114
75. Lee H, Wang K, Johnson A, Jones DM, Ali SM, Elvin JA, Yelensky R, Lipson D, Miller VA, Stephens PJ, Javle M, Ross JS (2016) Comprehensive genomic profiling of extrahepatic cholangiocarcinoma reveals a long tail of therapeutic targets. *J Clin Pathol* 69(5):403–408
76. Yoo KH, Kim NK, Kwon WI, Lee C, Kim SY, Jang J, Ahn J, Kang M, Jang H, Kim ST, Ahn S, Jang KT, Park YS, Park WY, Lee J, Heo JS, Park JO (2016) Genomic alterations in biliary tract Cancer using targeted sequencing. *Transl Oncol* 9(3):173–178
77. Simbolo M, Fassan M, Ruzzenente A, Mafficini A, Wood LD, Corbo V, Melisi D, Malleo G, Vicentini C, Malpeli G, Antonello D, Sperandio N, Capelli P, Tomezzoli A, Iacono C, Lawlor RT, Bassi C, Hruban RH, Guglielmi A, Tortora G, de Braud F, Scarpa A (2014) Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* 5(9):2839–2852
78. Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM, Lee HJ, Sheehan CE, Otto GA, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Morosini D, Hawryluk M, Catenacci DV, Miller VA, Churi C, Ali S, Stephens PJ (2014) New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* 19(3):235–242
79. Ruzzenente A, Fassan M, Conci S, Simbolo M, Lawlor RT, Pedrazzani C, Capelli P, D'Onofrio M, Iacono C, Scarpa A, Guglielmi A (2016) Cholangiocarcinoma heterogeneity revealed by multigene mutational profiling: clinical and prognostic relevance in surgically resected patients. *Ann Surg Oncol* 23(5):1699–1707
80. Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J (2017) Integrative genomic analysis of cholangiocarcinoma identifies distinct IDH-mutant molecular profiles. *Cell Rep* 18(11):2780–2794
81. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM (2013) Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* 45(12):1470–1473
82. Putra J, de Abreu FB, Peterson JD, Pipas JM, Mody K (2015) Molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma using next generation sequencing. *Exp Mol Pathol* 99(2):240–244
83. Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X (2014) Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 5:5696
84. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T (2015) Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 47(9):1003–1010
85. Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K (2015) Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 6:6087
86. Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y (2015) Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Commun* 6:6120
87. Rizvi S, Gores GJ (2017) Emerging molecular therapeutic targets for cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 67(3):632–644
88. Lee H, Ross JS (2017) The potential role of comprehensive genomic profiling to guide targeted therapy for patients with biliary cancer. *Ther Adv Gastroenterol* 10(6):507–520
89. Moeini A, Sia D, Bardeesy N, Mazzaferro V, Llovet JM (2016) Molecular pathogenesis and targeted therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 22(2):291–300
90. Chong DQ, Zhu AX (2016) The landscape of targeted therapies for cholangiocarcinoma: current status and emerging targets. *Oncotarget* 7(29):46750–46767
91. Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, Benedetti A, Marziani M (2013) The significance of genetics for cholangiocarcinoma development. *Ann Transl Med* 1(3):28
92. Dalmasso C, Carpentier W, Guettier C, Camilleri-Broet S, Borelli WV, Campos Dos Santos CR, Castaing D, Duclos-Vallee JC, Broet P (2015) Patterns of chromosomal copy-number alterations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 15:126
93. Arnold A, Bahra M, Lenze D, Bradtmoller M, Guse K, Gehlhaar C, Blaker H, Heppner FL, Koch A (2015) Genome wide DNA copy number analysis in cholangiocarcinoma using high resolution molecular inversion probe single nucleotide polymorphism assay. *Exp Mol Pathol* 99(2):344–353
94. Oliveira IS, Kilcoyne A, Everett JM, Mino-Kenudson M, Harisinghani MG, Ganesan K (2017) Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management. *Abdom Radiol (NY)* 42(6):1637–1649
95. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, Conner EA, Gillen MC, Roskams T, Roberts LR, Factor VM, Thorgeirsson SS (2012) Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 142(4):1021–1031 e1015
96. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, Peix J, Sole M, Tovar V, Alsinet C, Comella H, Klotzle B, Fan JB, Cotsoglou C, Thung SN, Fuster J, Waxman S, Garcia-Valdecasas JC, Bruix J, Schwartz ME, Beroukhi R, Mazzaferro V, Llovet JM (2013) Integrative molecular analysis of intrahepatic

- cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 144(4):829–840
97. Guest RV, Boulter L, Kendall TJ, Minnis-Lyons SE, Walker R, Wigmore SJ, Sansom OJ, Forbes SJ (2014) Cell lineage tracing reveals a biliary origin of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 74(4):1005–1010
 98. Kongpetch S, Jusakul A, Ong CK, Lim WK, Rozen SG, Tan P, Teh BT (2015) Pathogenesis of cholangiocarcinoma: from genetics to signalling pathways. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29(2):233–244
 99. Oikawa T (2016) Cancer stem cells and their cellular origins in primary liver and biliary tract cancers. *Hepatology* 64(2):645–651
 100. Vijgen S, Terris B, Rubbia-Brandt L (2017) Pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 6(1):22–34
 101. Terada M, Horisawa K, Miura S, Takashima Y, Ohkawa Y, Sekiya S, Matsuda-Ito K, Suzuki A (2016) Kupffer cells induce notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep* 6:34691
 102. Shibata M, Shen MM (2013) The roots of cancer: stem cells and the basis for tumor heterogeneity. *Bioessays* 35(3):253–260
 103. Brandi G, Farioli A, Astolfi A, Biasco G, Tavolari S (2015) Genetic heterogeneity in cholangiocarcinoma: a major challenge for targeted therapies. *Oncotarget* 6(17):14744–14753
 104. Walter D, Doring C, Feldhahn M, Battke F, Hartmann S, Winkelmann R, Schneider M, Bankov K, Schnitzbauer A, Zeuzem S, Hansmann ML, Peveling-Oberhag J (2017) Intratumoral heterogeneity of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 8(9):14957–14968
 105. Chan-On W, Nairismagi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, Lim KH, McPherson JR, Cutcutache I, Heng HL, Ooi L, Chung A, Chow P, Cheow PC, Lee SY, Choo SP, Tan IB, Duda D, Nastase A, Myint SS, Wong BH, Gan A, Rajasegaran V, Ng CC, Nagarajan S, Jusakul A, Zhang S, Vohra P, Yu W, Huang D, Sithithaworn P, Yongvanit P, Wongkham S, Khuntikeo N, Bhudhisawasdi V, Popescu I, Rozen SG, Tan P, Teh BT (2013) Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet* 45(12):1474–1478
 106. Cardinale V, Carpino G, Reid L, Gaudio E, Alvaro D (2012) Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol* 4(5):94–102
 107. Li Z, Shen J, Chan MT, Wu WK (2017) The role of microRNAs in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cell Mol Med* 21(1):177–184
 108. Wang N, Xia S, Chen K, Xiang X, Zhu A (2015) Genetic alteration regulated by microRNAs in biliary tract cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 96(2):262–273
 109. Esparza-Baquer A, Labiano I, Bujanda L, Perugorria MJ, Banales JM (2016) MicroRNAs in cholangiopathies: potential diagnostic and therapeutic tools. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 40(1):15–27
 110. Olaizola P, Lee-Law PY, Arbelaiz A, Lapitz A, Perugorria MJ, Bujanda L, Banales JM (2018) MicroRNAs and extracellular vesicles in cholangiopathies. *Biochim Biophys Acta* 1864(4 Pt B):1293–1307
 111. Loosen SH, Schueller F, Trautwein C, Roy S, Roderburg C (2017) Role of circulating microRNAs in liver diseases. *World J Hepatol* 9(12):586–594
 112. Mazzocca A, Ferraro G, Misciagna G, Carr BI (2016) A systemic evolutionary approach to cancer: Hepatocarcinogenesis as a paradigm. *Med Hypotheses* 93:132–137



Autophagy, Mitophagy and MicroRNA Expression in Chronic Hepatitis C and Autoimmune Hepatitis

Tímea Szekerczés¹ · Alíz Gógl¹ · Ildikó Illyés¹ · József Mandl² · Katalin Borka¹ · András Kiss¹ · Zsuzsa Schaff¹ · Gábor Lendvai¹ · Klára Werling³

Received: 8 November 2019 / Accepted: 11 February 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Although the role of autophagy has been implicated in several forms of chronic hepatitis, it is still not fully understood. Active autophagy eliminates damaged molecules and organelles (such as mitochondria) by lysosomal degradation. In the present study, we aimed to examine and compare autophagy activity in chronic hepatitis C (CHC) and autoimmune hepatitis (AIH) by detecting the expression of autophagy (LC3 and p62) and mitochondrion-related (TOMM20) proteins, as well as the levels of selected microRNAs (miR-101, -155, -204 and -224) known to be involved in the regulation of autophagy. In addition, the expression levels were related to pathohistological parameters. Liver biopsy samples, including 45 CHC and 18 AIH cases, were immunohistochemically stained for LC3, p62 and TOMM20 and the expression of miRNAs was determined using real-time PCR. We found elevated LC3 and p62 in AIH samples as compared with CHC ones, indicating an activated autophagy that is impaired in AIH as no degradation of p62 seemed to occur. Moreover, p62 showed strong correlation with necroinflammatory grades in the AIH group. The observed elevated levels of TOMM20 and p62 suggest a less efficient elimination of damaged mitochondria in AIH as opposed to CHC, in which autophagy seems to have a more active function. The level of miR-101 was increased in case of CHC as compared with AIH, however, miR-155, -204 and 224 resulted in no expression. Furthermore, miR-224 level correlated with steatosis and miR-155 expression with fibrosis stage in CHC. In conclusion, dissimilar autophagic activity was observed in CHC and AIH, suggesting a close association between impaired autophagy and severity of necroinflammation. This impairment may not be regulated by the analyzed miRNAs. Nevertheless, miR-224 and -155 seem to be associated with CHC progression.

Keywords Chronic hepatitis · autophagy · mitophagy · microRNA · immunohistochemistry

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the main health problems affecting 71 million people worldwide [1]. Despite the remarkable healing effect of the newly introduced direct-

acting antivirals (DAAs), several issues are still not resolved or are under dispute [2, 3]. One of these is the role autophagy may play in the pathogenesis of chronic hepatitis C (CHC), which has been in the focus of several recent studies [4–6].

Autophagy, this evolutionarily conserved cellular catabolic process, is responsible for the elimination of predominantly damaged molecules and organelles via delivering them to lysosomes for degradation. Cell growth, development and homeostasis are the major processes in which autophagy is involved in order to maintain the balance between synthesis, degradation, and subsequent recycling of cellular products [7]. Several stress factors, including viral infection and autoimmunity, are known to activate autophagy [4, 8, 9]. Selective mitochondrial autophagy, termed mitophagy is particularly important in the elimination of mitochondrial dysfunction arising from aging and damage, thus, mitophagy plays crucial role in the reduction of oxidative stress and maintenance of cellular homeostasis [4, 6, 10–12].

Gábor Lendvai and Klára Werling contributed equally to the study.

✉ Gábor Lendvai
lendvai.gabor@med.semmelweis-univ.hu

¹ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Üllői 93, 1091 Budapest, Hungary

² Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, 1094 Budapest, Hungary

³ 2nd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, 1088 Budapest, Hungary

An activated autophagy process is described as being beneficial for the replication and life cycle of HCV, since it protects the persistence of the virus in multiple ways. As it is known, intracellular membrane-associated virus replication and production of structural and non-structural HCV proteins lead to endoplasmic reticulum (ER)-stress and unfolded protein response (UPR), by which HCV indirectly induces autophagy through the activation of the UPR-induced signaling pathway [8, 13, 14]. ER-stress causes mitochondrial injury and leads to mitophagy [13, 15] as demonstrated in HCV infection [10]. In addition, HCV-induced autophagy is capable of suppressing the innate immune response and thus interferon (IFN) production, too [3, 13]. All these maintain the persistence of HCV infection and the pathogenesis of CHC without causing direct cytopathic effect on hepatocytes [3].

Autoimmune hepatitis (AIH) is another form of chronic hepatitis with an unknown etiology. Activated immune cells, involving cytokines and macrophages, characterize the disease [16], however, overall knowledge about autophagy in AIH is limited. Autophagy is known to be involved in the activation of adaptive immunity, promoting the direct elimination of pathogens and simultaneous antigen processing and presentation to T cells [17]. Autophagy is therefore believed to be linked with the immune response seen in AIH, with involvement of several autophagy-related genes and various pathways via mechanisms that are still unresolved [9].

The process of autophagy involves formation of phagophores, closure of autophagosomes and fusion of lysosomes with autophagosomes, in which the sequestered cargo is digested by acidic hydrolases [8, 13]. Proteins found to be indicative of autophagy include LC3 (microtubule-associated protein light chain 3 α) and p62 (or SQSTM1, sequestosome-1). LC3 becomes associated with the newly formed phagophore and interacts with p62, leading to the closure of the phagophore cargo (autophagosome) [8, 13]. TOMM20 is a protein in the outer mitochondrial membrane, responsible for recognizing and sorting precursor proteins for the biogenesis of mitochondria. Its expression is indicative of the available mitochondria in the cell, either damaged or active, and may correlate with mitophagy [18–20].

Several microRNAs (miRNAs) have been implicated in the regulation of autophagy by interfering with gene expression at post-transcriptional level. For example, miR-155 induces the formation of autophagophores via downregulating mTOR signaling but it impairs lysosomal degradation, as shown in alcoholic liver disease (ALD) [21]. miR-101 is thought to be a key regulator of the autophagy process and is a potent inhibitor of rapamycin-induced autophagy [22, 23]. miR-204 attenuates tumor autophagy in hepatocellular carcinoma (HCC) [24]. Additionally, autophagy itself may also regulate the expression of certain miRNAs, for example, the degradation of miR-224 in HCC [25]. Relationship between miRNAs and autophagy may be important in the pathogenesis of liver diseases [22].

In light of the above, our aim was to compare the expression of autophagy and mitochondrion-related proteins, and the levels of selected miRNAs in liver biopsy samples taken from patients with CHC and AIH. Moreover, we related the data to steatosis, fibrosis stage and necroinflammatory grade of the chronic hepatitis samples.

Material and Methods

Patient Characteristics

Liver biopsy samples from patients with CHC (45 cases) and AIH (18 cases) were taken for diagnostic purposes and analysed retrospectively before any treatment had been started. All samples derived from the archives of the 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest with approval from the National Ethics Committee (45727-2/2013/EKU). The study was performed according to the Declaration of Helsinki. Patients were between 18 and 73 years of age at the time of biopsy with average age of 48.8 years for CHC and 43.4 years for AIH cases. The CHC group consisted of 31 males and 14 females, the AIH group comprised 5 males and 13 females. Chronic hepatitis cases of mixed etiology (alcohol consumption, hepatitis B virus (HBV) or other viral infections, metabolic liver diseases, advanced cirrhosis, tumors, and drug treatments) were excluded.

Histology

Liver core biopsy samples taken with Menghini needle were fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). Hematoxylin-eosin (H&E) stained sections of 3–4 μ m thickness were analyzed to establish the diagnosis, necroinflammatory grade (according to the Ishak modification of the Knodell histology activity index [26]) and fibrosis stage (using the METAVIR scoring system [27]). Picrosirius red staining was applied to highlight connective tissue fibers. Necroinflammatory grades were scored from 0 to 18 and fibrosis stages from F0 to F4. The degree of steatosis was assessed as percentage of lipid droplets-containing hepatocytes and scored 0 (under 5%), 1 (5–33%), 2 (34–66%) and 3 (above 66%) [28].

Immunohistochemistry

Immunohistochemical reactions were carried out on 3–4- μ m-thick FFPE sections with Ventana Benchmark XT automated immunohistochemical staining system (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ) using HRP multimer based, biotin-free detection technique according to the protocol provided by the manufacturers. Briefly, antigen retrieval for 30 minutes at 95 °C was followed by incubation with specific primary antibodies for 30 minutes at 42 °C. The primary antibodies

were directed against LC3 (polyclonal rabbit, NB-100-2331, Novus Biologicals, Abingdon UK, dilution 1:200), p62 (monoclonal mouse, ab56416; AbCam Cambridge UK, dilution 1:1000) and TOMM20 (monoclonal mouse, F-10 sc-17764, Santa Cruz Biotechnology Inc., Oregon USA, dilution 1:200). Indirect biotin streptavidin system (iVIEW DAB Detection Kit, Ventana) was used for visualization of reactions. For negative controls, the specific primary antibodies were omitted and replaced by the antibody diluent. Cervical carcinoma tissues served as positive controls for LC3 and TOMM20, and alcohol-induced HCC samples for p62 as recommended by the manufacturers of the antibodies.

Evaluation of the immunohistochemical reactions was performed using semiquantitative analysis. Each reaction was given a score according to the intensity of staining (0 – no, 1 – minimal, 2 – weak, 3 – moderate, 4 – intensive and 5 – very intensive), as well as the degree of cell staining [(0) < 6%, (1) 6–20%, (2) 21–40%, (3) 41–60%, (4) 61–80% and (5) > 81%]. Finally, the scores for intensity and percentage were summarized (IHC score).

RNA Isolation

Total RNA was isolated from 5 µm thick FFPE sections using RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) according to the instructions of the manufacturer with modifications for co-purification of miRNAs [29]. Traces of genomic DNA were eliminated by DNase digestion (Turbo DNA-free kit, Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The concentration of RNA was measured using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Life Technologies of Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Reverse Transcription (RT) and Quantitative Real Time PCR (qPCR)

The list of the 6 selected miRNAs is presented in Table 1, along with the ID codes for the TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies brand of Thermo Fisher Scientific Inc.) used for measuring the expression of these miRNAs as instructed by the manufacturer. RT reaction was carried out using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem brand

by Thermo Fisher Scientific Inc.) in a total volume of 7.5 µl containing 20 ng RNA preparation. The qPCR was performed using TaqMan Universal Master Mix II no UNG (Applied Biosystem brand by Thermo Fisher Scientific Inc.) in a final volume of 7.5 µl containing 0.65 µl of the RT product. The amplification reaction was run in triplicates on a LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Relative expression was calculated by the $2^{\Delta\Delta Cq}$ (where $\Delta Cq = Cq_{Ref} - Cq_{miR}$) formula, using the average of miR-140 and RNU6B as the most stable reference determined by NormFinder application [30].

Statistical Analysis

All figures and statistical analyses were created using GraphPad Prism (version 5.01; California, USA) and Statistic v.13 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA) software. A *p*-value of 0.05 was set as the threshold for statistical significance. The differences between CHC and AIH in relation to steatosis, fibrosis stage and necroinflammatory grade were examined by non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance and Mann-Whitney U test. Correlation of steatosis, fibrosis stage and necroinflammatory grade with IHC scores and miRNA expression was performed using non-parametric Spearman rank correlation test.

Results

Histology

The established pathohistological parameters for the samples are listed in Table 2. No steatosis was present in 12 (26.7%) samples with CHC and in 14 (77.8%) samples with AIH; whereas liver steatosis could be detected in 33 (73.3%) CHC cases and 4 (22.2%) AIH cases. Fibrosis stage was found to be low (F1-F2) in 31 (68.9%) CHC and 7 (38.9%) AIH cases, whereas high (F3-F4) in 14 (31.1%) CHC and 11 (61.1%) AIH cases. Finally, mild necroinflammation was diagnosed in 25 (55.6%) CHC cases, whereas 11 (61.1%) AIH samples showed severe necroinflammation.

Evaluation of Immunohistochemical Reactions

LC3 and p62 stainings were rather diffuse, occasionally showing granular-focal cytoplasmic reaction with varying density both in hepatocytes and cholangiocytes, while TOMM20 exhibited brownish granular cytoplasmic reaction (Fig. 1). Altogether 42 CHC and 18 AIH samples provided evaluable immunohistochemical reaction for LC3, p62 and TOMM20.

Table 1 List of selected microRNAs

Assay ID	miRNA
002099	hsa-miR-224-5p
002253	hsa-miR-101-3p
002623	hsa-miR-155-5p
000508	hsa-miR-204-5p
001187	hsa-miR-140-3p
001093	RNU6B

Table 2 Pathohistology of biopsy samples: steatosis, fibrosis stages and necroinflammatory grades

	CHC (n = 45)	AIH (n = 18)
<i>Average years of age</i>	48.88	43.4
<i>Gender (M/F)</i>	31/14	5/13
<i>Steatosis</i>		
negative (0 = under 5%)	12	14
mild (1 = 5–33%)	14	2
moderate (2 = 34–66%)	14	2
high (3 = above 66%)	5	0
<i>Fibrosis stage (F)</i>		
F1 (F1-F2)	18 (31)	3 (7)
F2	13	4
F3 (F3-F4)	3 (14)	10 (11)
F4	11	1
<i>Necroinflammatory grade</i>		
mild (under score 6)	25	4
moderate (7–12)	18	3
severe (13–18)	2	11

CHC: chronic hepatitis C, AIH: autoimmune hepatitis, M: male, F: female

Overall, AIH cases showed elevated LC3 ($p < 0.01$), p62 ($p < 0.0001$) and TOMM20 ($p < 0.0001$) levels as compared to CHC cases (Fig. 2a). When calculating ratios, the average LC3/TOMM20 ratios for the AIH and CHC groups were 0.76 and 0.80, respectively, while the average p62/TOMM20 ratio turned out to be 0.85 for the AIH and 0.26 for the CHC group.

No differences in the IHC scores of these proteins were observed when cases with or without steatosis were compared in either CHC or AIH samples (Fig. 2b). Nevertheless, decreased p62 could be found in the steatotic group of CHC samples as compared with the nonsteatotic group, however, the difference did not reach the set threshold for significance. Further, no association could be observed between fibrosis stages and LC3, p62, TOMM20 levels.

In regard to necroinflammatory grade, the level of p62 was significantly elevated ($p < 0.0001$) in severe grades of AIH as compared to mild grades (Fig. 2c). In addition, p62 showed strong correlation with necroinflammatory grade ($r = 0.84$; $p < 0.0001$) in AIH cases (Table 3) but no correlation was detectable in CHC samples ($r = -0.03$; $p = 0.8445$). Moreover, no association was observed between the levels of LC3, TOMM20 and necroinflammatory grade in relation to the two etiological groups.

Fig. 1 Representative images of low and high levels of LC3 (a, b), p62 (c, d) and TOMM20 (e, f) detected by immunohistochemistry (40x magnification).

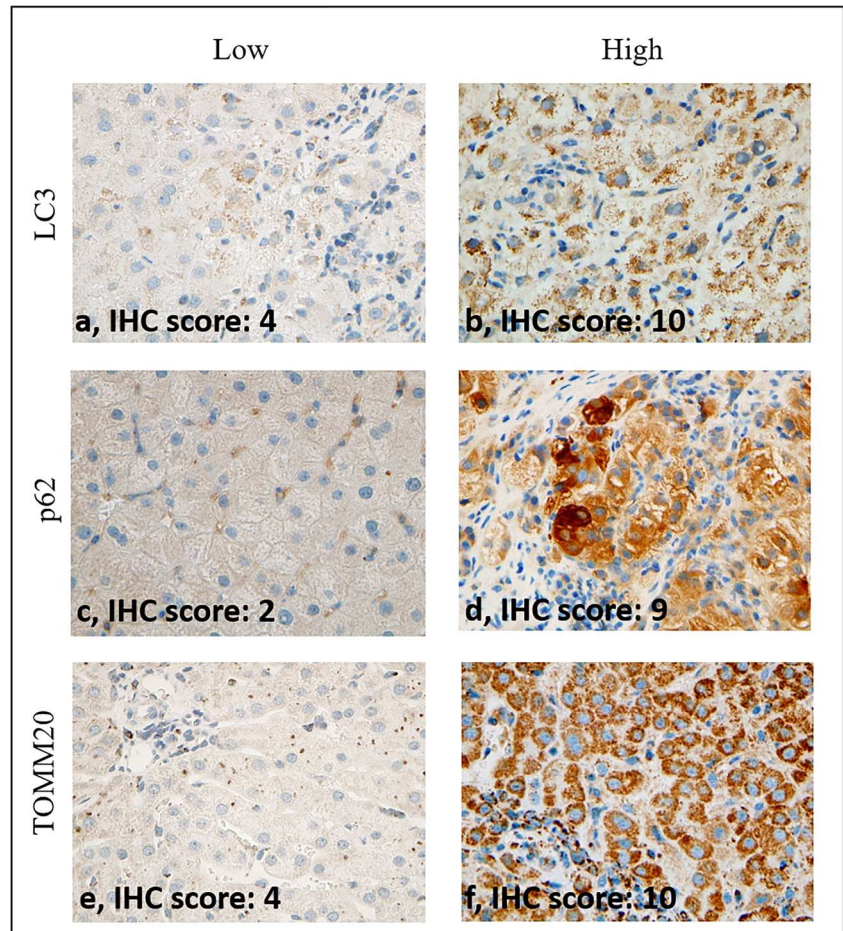
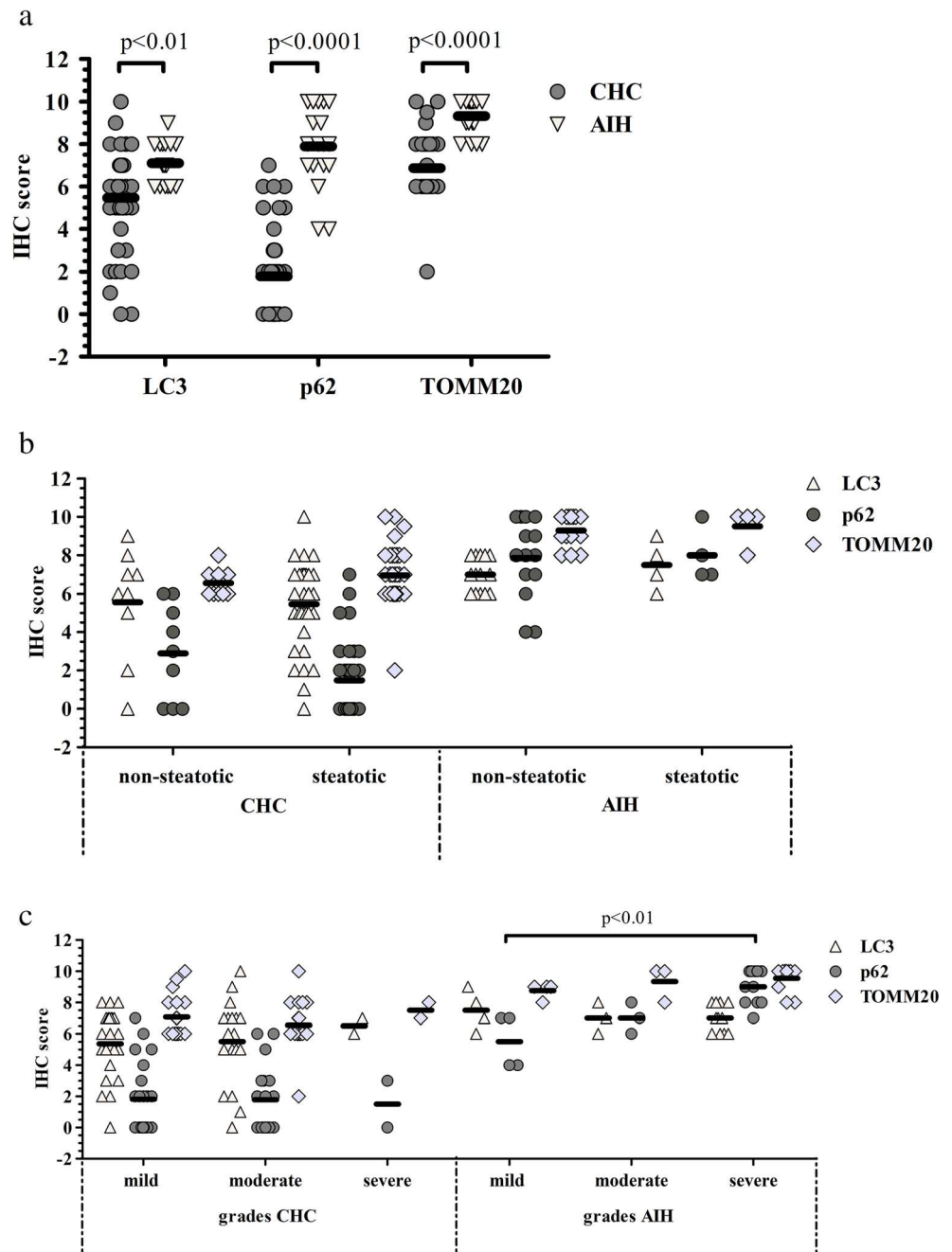


Fig. 2 Semiquantitative evaluation of LC3, p62 and TOMM20 immunohistochemical reactions (a) and their association with steatosis (b) and necroinflammatory grade (c) in CHC and AIH.



miRNA Expression

The levels of miRNAs could be determined in 24 CHC and 18 AIH samples. Expression of miR-224, -155 and -204 was not statistically different between the CHC and AIH groups. On the

contrary, an elevated level of miR-101 was observed in CHC as compared with AIH samples ($p < 0.0001$) (Fig. 3a).

No statistically different miRNA levels were found in either the CHC or AIH group when data were analyzed with regard to steatosis and non-steatosis cases. Nevertheless, the miR-224 level

Table 3 Correlations of p62 and miRNAs with pathohistological parameters

Sample group	Measured protein/miRNA	Pathohistological parameters	r	p
AIH	p62	Necroinflammatory grades	0.84	< 0.0001
CHC	miR-224	Steatosis	0.42	< 0.05
	miR-155	Fibrosis stage	0.56	< 0.01

CHC: chronic hepatitis C, AIH: autoimmune hepatitis

correlated with steatosis in CHC samples ($r = 0.42$; $p < 0.05$) (Table 3.) but not in AIH ones.

When miRNA expression was compared with the low (F1-F2), high (F3-F4) or separately with each (F1-F4) stage of fibrosis, no differences were found regarding miR-224, -101, -204 in either the CHC or AIH group or in case of miR-155 in the AIH group, but an elevated level of miR-155 ($p < 0.05$) was observed in the high as compared to the low stage of fibrosis in case of CHC (Fig. 3b). Furthermore, in the CHC group miR-155 level showed statistical difference between stages F1 and F4 ($p < 0.05$, data not shown) and miR-155 expression exhibited correlation with fibrosis stage as well ($r = 0.56$; $p < 0.01$) (Table 3.). Finally, no correlation was observable between miRNA expression and necroinflammatory grades in the CHC and AIH samples.

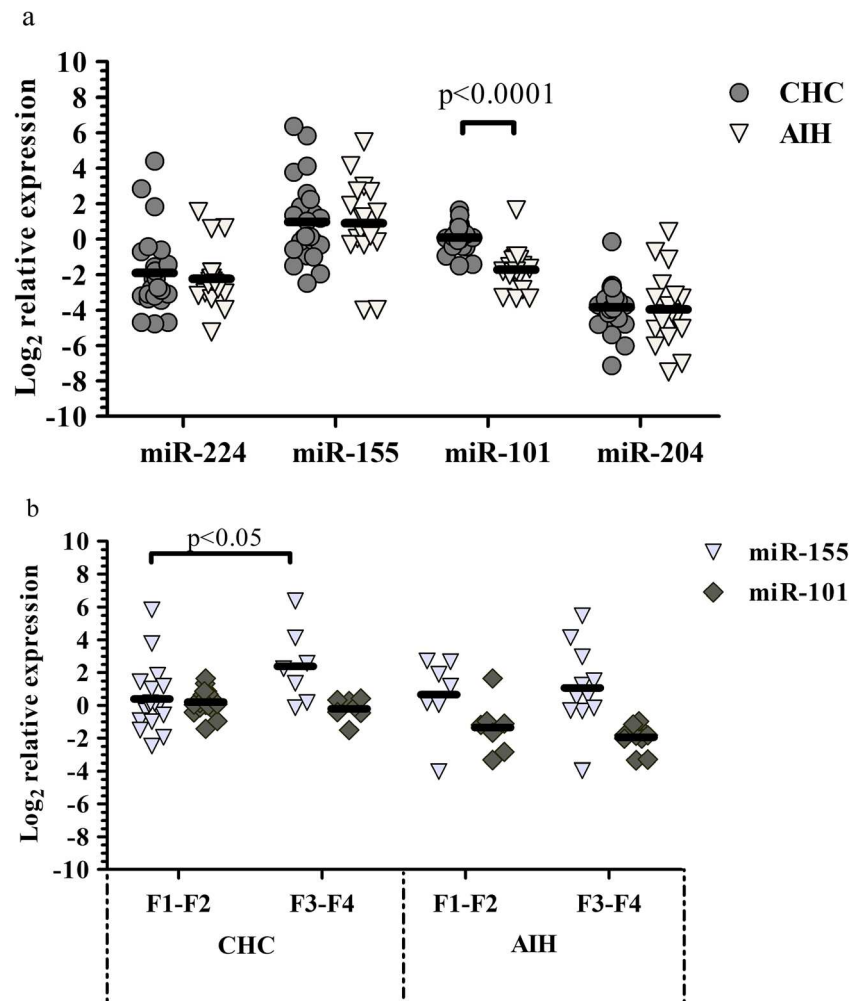
Discussion

Autophagy acts as a bodyguard to protect cells, which involves concerted action to promote cell survival, for example in a state

of stress when the cells are starved of nutrients or in case of a viral infection [5, 10]. The importance of autophagy has been emphasized in case of CHC, since it promotes HCV persistence and suppresses the activated immune response [15]. A possible link between autophagy and AIH has also been suggested [9], in which case however its role is not fully understood.

Upon examining LC3 and p62 as indirect indicators of autophagy function, the present study revealed increased levels of these proteins in AIH as compared with CHC. The level of LC3 *per se* indicates that autophagy is initiated, but may not reflect upon whether autophagy has proceeded or become impaired [21, 31]. A proceeding autophagy implies a low level of p62 since this protein becomes degraded together with the cargo in the autophago-lysosome [32]. Thus, increased LC3 and p62 in AIH suggest that autophagosome formation has occurred without an increase in lysosomal degradation, as has been demonstrated in case of p62 in a recent study [33]. Like further supported by Babuta and co-workers, increased levels of p62 and LC3 were found as the result of chronic alcohol intake in ALD, leading to disruption of autophagy function at lysosome level (impaired autophagic flux) [21].

Fig. 3 Relative miRNA expression (a) and the association of miR-155 and -101 levels with fibrosis stages (b) in CHC and AIH



Decreased level of p62 was observed in CHC contrary to AIH, suggestive of an autophagic function occurring at a much higher rate. This is supported by the observation that the level of p62 decreased within 3–6 days following HCV infection in Huh7.5 cells due to an increase in the autophagy response, which was indicated by an elevated level of LC3 [34].

Increased TOMM20 was detected in AIH as compared with CHC, which might suggest an increase in the number of active mitochondria and also the accumulation of damaged mitochondria not eliminated by autophago-lysosomes [18]. The latter is reported to imply an increased level of p62 in a nonalcoholic steatohepatitis (NASH) study [33]. Thus, the detected high TOMM20 and p62 might indicate that injured mitochondria are most likely not as effectively eliminated in AIH as in CHC.

According to the above mentioned NASH study, enhanced mitophagic level is characterized by elevated LC3/TOMM20 and decreased p62/TOMM20 ratios as the result of palmitic acid administered to mouse primary hepatocytes [33]. As regards the present study, the average LC3/TOMM20 ratios for AIH and CHC were found to be similar, but the average p62/TOMM20 ratio was three times higher in AIH than in CHC. This further signifies the presence of impaired mitophagy in AIH. The fact that Dynamin-related protein 1 (Drp1, a protein associated with mitochondrial dysfunction) was found to be colocalized with TOMM20 indicates that mitochondrial fission is involved in AIH, suggesting a link to hepatic necrosis [35]. It is intriguing that in the present study not only the expression of p62 increased but the necroinflammatory grades were also higher in AIH as compared with CHC, since we observed a strong correlation between p62 expression and necroinflammatory grade. This suggests that decreasing autophagic activity is linked to severity of inflammation; i.e. the more the cellular function becomes compromised due to an extensive inflammation, the less autophagy is capable of rescuing the cells, which may subsequently undergo necrosis. Dysregulated autophagy is reported to contribute to hepatic inflammatory injury and to enhance pro-inflammatory cytokine expression [36]. Stimulation of mTOR, a central issue in autoimmune disorders, also seems to contribute to inflammation in dysfunctional autophagy [37]. The fact that mTOR *per se* is an inhibitor of autophagy may explain the use of rapamycin as an mTOR inhibitor to treat AIH in the advanced stage [7, 9].

In CHC, the decreased p62/TOMM20 ratio along with the observed decreased level of p62 (one fourth of the expression observed in AIH) and reduced TOMM20 level (1.4 times less than in AIH) are indicative of a more active and proceeding autophagy process. This is supported by a study in which HCV was found to promote mitochondrial fission within 2 days following infection in Huh7 cells, where the damaged organelles were eliminated by mitophagy [38].

Altered lipid metabolism is linked to the life cycle of HCV considering that virions coated with lipoproteins facilitate hepatocyte entry via lipoprotein receptors, however, the HCV-induced ER-stress leads to steatosis [3]. Intracellular lipid droplets being

in excess in the cells are degraded by an autophagy process called lipophagy [3–5, 22]. Vescovo et al. reported that autophagy acts against the alterations in lipid metabolism induced by HCV and steatosis may develop when autophagy is disrupted [39]. In the present study, no difference was observed in the expression of LC3 and p62 between steatotic or nonsteatotic chronic hepatitis samples (neither in CHC nor in AIH). Nevertheless, the level of p62 seemed to decrease in steatotic CHC as compared with nonsteatotic CHC, but the level did not reach the threshold for statistical significance.

Analysis of autophagy-associated miRNA expression may provide further knowledge about autophagic activity. Several miRNAs are known to downregulate autophagic activity (miR-101, -155 and 204) [21, 22] or their expression is known to be regulated by autophagy (miR-224) [25]. Autophagy-regulating miRNAs have been studied in HCV infection [40] but, to the best of our knowledge, no data is available on how these miRNAs are expressed in AIH.

In the present study, elevated miR-101 was found in CHC samples as compared with AIH cases, which raises concern as miR-101 is an autophagy inhibitor. Suppressed autophagy on the account of miR-101 is reported in breast cancer (targeting RAB5A, STMN1 and ATG4D), HCC (through EZH2) [22, 23] and in ischemic liver (via activating mTOR signaling pathway) [41]. Nevertheless, the levels of LC3 and p62 observed in the present study support the activation and not the inhibition of autophagy in CHC. Intriguingly, increased serum miR-101 expression has been found in HCV as compared with HCC [42]. Moreover, miR-101 has recently been reported to have an antifibrotic effect, most probably via downregulating the PI3K/Akt/mTOR pathway [43]. In the present study, association between miR-101 and fibrosis stage could not be observed in either CHC or AIH, however, when all of the CHC and AIH samples were combined into one group, miR-101 was found to correlate negatively with fibrosis stage ($r=-0.36$, $p<0.05$) and necroinflammatory grade ($r=-0.47$, $p<0.01$). It is to be taken into consideration, however, that the majority of CHC cases (68.9%) displayed low fibrosis stage, whereas the majority of AIH cases (61.1%) showed higher fibrosis stages. Additionally, higher miR-101 expression was found in CHC cases showing low fibrosis stage (F1, F2). Thus, we hypothesize that the relatively higher level of miR-101 might be enough for cells to avoid advanced fibrosis, but not enough to stop autophagy from happening. Further, miRNAs are known to exert their regulatory effect on a number of target genes, influencing several biological processes simultaneously; on the contrary, miR-101 may not be the only miRNA that simultaneously exerts an inhibitory effect on autophagy.

According to our findings, no association could be observed between miR-224 and autophagy. Nevertheless, the level of miR-224 correlated with steatosis in case of the CHC samples, but not in those of AIH. In a previous study, elevated level of miR-224 was found in steatotic CHC in comparison to

nonsteatotic CHC [44]. Another study reported miR-224 to be elevated in the event of HCV recurrence in comparison to normal liver and also after administration of interferon/ribavirin treatment as compared with samples taken before treatment [45]. In addition, miR-224 is a predictive factor in the overall survival of hepatoblastoma [46]. miR-224 is a known oncomiR, described to promote proliferation in HCC. In this regard, the correlation of miR-224 with steatosis can be explained by the fact that steatotic CHC is one of the risk factors of HCC [13, 47].

In case of CHC, we found not only increased miR-155 expression in the higher fibrosis stages as compared with the lower stages, but also a correlation between miR-155 and fibrosis stage. In agreement with this, miR-155 knock-out mice were observed to be protected from early and advanced fibrosis in a CCl₄ treatment model [48]. Regarding another regulatory aspect, miR-155 was not only found to initiate autophagy in ALD via downregulating mTOR, but also to impair the fusion of autophagosome with lysosome, leading to increased LC3 and p62 levels [21]. Our investigation is partly in agreement with this since high miR-155 expression (which was highest among the miRNAs) was observed in both CHC and AIH samples, but the levels of LC3 and p62 pointed to an impaired autophagy in case of AIH but not in CHC. Nevertheless, a marked increase in miR-155 expression was reported in HCV-infected patients, which seems to be involved in the regulation of antiviral immune response, promoting replication and persistence of HCV [49]. Further data on miR-155 in AIH is scarce, however, this miRNA may have a different role in inflammatory cell recruitment and liver damage [50].

As a summary, the different levels of LC3, p62, TOMM20 observed in the CHC and AIH cases indicate autophagy initiation in the examined samples of chronic hepatitis of different etiology. The increased p62 expression and its correlation with necroinflammatory grade observed in case of AIH suggest an autophagy process which is inhibited at the level of autophagolysosomal degradation and is associated with extensive inflammation and overactivated immune response, leading to necrosis [51]. In relation to CHC, however, our findings provide further support for the evidence of a functioning autophagy process which seems beneficial for the persistence of HCV in hepatocytes and the pathogenesis of CHC so as to avoid a direct cytopathic effect on the host cells [3]. In our present study, we found no indication that the examined miRNAs had an inhibitory effect on autophagy in regard to either CHC or AIH cases. Instead, the miRNA levels correlated with steatosis (miR-224) and fibrosis (miR-155) in the CHC samples, which could possibly be associated with CHC progression.

Acknowledgements The authors thank Mrs. Erzsébet Kovács for the technical assistance and Mrs. Elvira Kálé Rigóné for the English proofreading.

Funding Information Open access funding provided by Semmelweis University (SE). This work was supported by grants OTKA 108548; OTKA 128881 from the Hungarian National Research Foundation, NVKP_16_1-2016-0004 from the Hungarian National Research,

Development and Innovation Office and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 from Semmelweis University.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Jefferies M, Rauff B et al (2018) Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J Clin Cases* 6:589–599. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i13.589>
2. Ríos-Ocampo WA, Navas MC et al (2019) The cellular stress response in hepatitis C virus infection: a balancing act to promote viral persistence and host cell survival. *Virus Res* 263:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.12.013>
3. Vescovo T, Refolo G et al (2014) Autophagy in HCV infection: keeping fat and inflammation at bay. *Biomed Res Int* 2014: 265353. <https://doi.org/10.1155/2014/265353>
4. Ke P-Y (2018) The multifaceted roles of autophagy in flavivirus-host interactions. *Int J Mol Sci* 19:3940. <https://doi.org/10.3390/ijms19123940>
5. Ke PY (2019) Diverse functions of autophagy in liver physiology and liver diseases. *Int J Mol Sci* 20:300. <https://doi.org/10.3390/ijms20020300>
6. Jassey A, Liu C-H et al (2019) Hepatitis C virus non-structural protein 5A (NS5A) disrupts mitochondrial dynamics and induces mitophagy. *Cells* 8:290. <https://doi.org/10.3390/cells8040290>
7. Rautou P-E, Mansouri A et al (2010) Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* 53:1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.006>
8. Chan ST, Ou JHJ (2017) Hepatitis C virus-induced autophagy and host innate immune response. *Viruses* 9:E224. <https://doi.org/10.3390/v9080224>
9. Golbabapour S, Bagheri-Lankarani K et al (2019) Autoimmune hepatitis and stellate cells; an insight into the role of autophagy. *Curr Med Chem - In Press* <https://doi.org/10.2174/0929867326666190402120231>
10. Czaja MJ, Ding W et al (2013) Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy* 9:1131–1158. <https://doi.org/10.4161/auto.25063>
11. Galluzzi L, Pietrocola F et al (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34:856–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>
12. Eid N, Ito Y et al (2016) Triggering of Parkin mitochondrial translocation in mitophagy: implications for liver diseases. *Front Pharmacol* 7:100. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00100>
13. Wang L, Ou J et al (2015) Hepatitis C virus and autophagy. *Biol Chem* 396:1215–1222. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0172>

14. Ke P-Y, Chen SS-L (2011) Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* 121:37–56. <https://doi.org/10.1172/JCI41474DS1>
15. Dash S, Chava S et al (2016) Hepatitis C virus infection induces autophagy as a prosurvival mechanism to alleviate hepatic ER-stress response. *Viruses* 8:E150. <https://doi.org/10.3390/v8050150>
16. Christen U, Hintermann E (2016) Immunopathogenic mechanisms of autoimmune hepatitis: how much do we know from animal models? *Int J Mol Sci* 17:E2007. <https://doi.org/10.3390/ijms17122007>
17. Sridhar S, Botbol Y et al (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol* 226:255–273. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
18. Ott M, Norberg E et al (2007) The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome C release. *J Biol Chem* 282:27633–27639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703155200>
19. Sarnyai F, Szekerczés T et al (2019) BGP-15 protects mitochondria in acute, acetaminophen overdose induced liver injury. *Pathol Oncol Res - In Press*
20. Martinez-Outschoorn UE, Curry JM et al (2013) Oncogenes and inflammation rewire host energy metabolism in the tumor microenvironment RAS and NFkB target stromal MCT4. *Cell Cycle* 12: 2580–2597. <https://doi.org/10.4161/cc.25510>
21. Babuta M, Furi I et al (2019) Dysregulated autophagy and lysosome function are linked to exosome production by micro-RNA 155 in alcoholic liver disease. *Hepatology - In Press*. <https://doi.org/10.1002/hep.30766>
22. Kim MK, Kim SG (2014) Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases. *Arch Pharm Res* 37:1097–1116. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0439-9>
23. Frankel LB, Wen J et al (2011) MicroRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J* 30:4628–4641. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.331>
24. Li X, Liu J (2019) LncRNA NEAT1 promotes autophagy via regulating miR-204/ATG3 and enhanced cell resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J Cell Physiol - In Press*. <https://doi.org/10.1002/jcp.29230>
25. Lan S, Wu SY et al (2014) Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology* 59:505–517. <https://doi.org/10.1002/hep.26659>
26. Ishak K, Baptista A et al (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22:696–699. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80226-6](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80226-6)
27. Poynard T, Bedossa P et al (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349:825–832. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)07642-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)07642-8)
28. Kleiner DE, Makhlof HR (2016) Histology of NAFLD and NASH in adults and children. *Clin Liver Dis* 20:293–312. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.011.Histology>
29. Doleshal M, Magotra AA et al (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagnostics* 10: 203–211. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070153>
30. Andersen CL, Jensen JL et al (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
31. Klionsky DJ, Abdalla FC et al (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445–544. <https://doi.org/10.4161/auto.19496>
32. Islam A, Sooro MA et al (2018) Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 19:E1405. <https://doi.org/10.3390/ijms19051405>
33. Zhang N, Li XL et al (2019) Impaired mitophagy triggers NLRP3 inflammasome activation during the progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis. *Lab Invest* 99:749–763. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0177-6>
34. Panigrahi R, Chandra PK et al (2015) Persistent hepatitis C virus infection impairs ribavirin antiviral activity through clathrin-mediated trafficking of equilibrative nucleoside transporter 1. *J Virol* 89:626–642. <https://doi.org/10.1128/jvi.02492-14>
35. He G, Günther C et al (2017) PGAM5-mediated programmed necrosis of hepatocytes drives acute liver injury. *Gut* 66:716–723. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311247>
36. Zhang X, Wu WKK et al (2017) C-X-C motif chemokine 10 impairs autophagy and autolysosome formation in non-alcoholic steatohepatitis. *Theranostics* 7:2822–2836. <https://doi.org/10.7150/thno.19068>
37. Ni H-M, Chao X et al (2019) Dual roles of mammalian target of rapamycin in regulating liver injury and tumorigenesis in autophagy-defective mouse liver. *Hepatology - In Press* <https://doi.org/10.1002/hep.30770>
38. Kim S, Syed GH et al (2014) Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:6413–6418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321114111>
39. Vescovo T, Romagnoli A et al (2012) Autophagy protects cells from HCV-induced defects in lipid metabolism. *Gastroenterology* 142:644–653. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.033>
40. Sasaki R, Sur S et al (2019) Repression of microRNA-30e by hepatitis C virus enhances fatty acid synthesis. *Hepatol Commun* 3: 943–953. <https://doi.org/10.1002/hep4.1362>
41. Song HU, Du C et al (2019) MicroRNA-101 inhibits autophagy to alleviate liver ischemia / reperfusion injury via regulating the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med* 43:1331–1342. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4077>
42. Shakeria O, Alhelfa M et al (2017) miRNA-101-1 and miRNA-221 expressions and their polymorphisms as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol* 51:173–181. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.030>
43. Lei Y, Wang Q, lan et al (2019) MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by downregulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 43:575–584. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.02.003>
44. Lendvai G, Jármy K et al (2014) Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World J Gastroenterol* 20:15343–15350. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15343>
45. Gelley F, Zádori G et al (2014) MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for hepatitis C virus cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 29:121–127. <https://doi.org/10.1111/jgh.12362>
46. Gyugos M, Lendvai G et al (2014) microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virhows Arch* 464: 419–427. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1549-y>
47. Smedile A, Bugianesi E (2005) Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 9:291–295
48. Bala S, Csak T et al (2016) The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol* 64:1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.035>
49. Kałużna EM (2014) MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? *Rev Med Virol* 24: 169–185. <https://doi.org/10.1002/rmv.1785>
50. Blaya D, Aguilar-Bravo B et al (2018) Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury. *Hepatology* 68: 691–706. <https://doi.org/10.1002/hep.29833>
51. Tiniakos DG, Brain JG et al (2015) Role of histopathology in autoimmune hepatitis. *Dig Dis* 33:53–64. <https://doi.org/10.1159/000440747>

Supplementary Table 1 The regulatory effect of the significantly/noticeably altered microRNAs analyzed in the study

miRNA	Type	Targeted genes, pathways, functions	Biologic effect	Reference
miR-21	OncomiR	PTEN – an inhibitor of PI3K/Akt pathway PDCD4 – inhibitor of a translation initiator, TIMP3 – inhibitor of EMC degradation	Cell proliferation, tumor growth	[1] [2]
miR-222	OncomiR	CDKN1B – cell cycle inhibitor PPP2R2A → Akt activation	Cell growth, proliferation	[3] [4]
miR-34a	OncomiR/tumor suppressor	SIRT1 → TP53 activation HNF-4 α – inhibitor of cyclin D1 ACSL1 → promotes lipogenesis in HSCs	Cell survival, regeneration, fibrosis	[5] [6] [7]
miR-224	OncomiR	PPP2R1B – inhibitor of PI3K/Akt pathway, strengthened effect of TGF- β and NF- κ B, SMAD4 – member of TGF- β pathway HOXD10 → promotes MMP-9 expression	Inflammation-associated proliferation and migration, Promotion of cell proliferation Remodeling of ECM	[8] [9] [10]
miR-17-5p	OncomiR	MAPK9 – inhibitor of JUN, stabilizes TP53	Proliferation	[11]
miR-18a	OncomiR	KLF4 – inhibits cell cycle if DNA is damaged	Proliferation, migration	[12]
miR-195	Tumor suppressor	FGF2 and VEGFA – angiogenic factors SMAD7 – inhibitor of TGF- β pathway	Suppressed angiogenesis and migration HSC activation, proliferation	[13] [14]
miR-210	Tumor suppressor	FGFRL1 – prevents cell cycle arrest	Reduced cell proliferation	[15]

ACSL1: acyl-CoA synthetase long chain family member 1; AKT: AKT serine/threonine kinase; CDKN1B: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; ECM: extracellular matrix; FGF2: fibroblast growth factor 2; FGFRL1: fibroblast growth factor receptor-like 1; HNF-4 α : hepatocyte nuclear factor α ; HOXD10: Homeobox D10; HSC: hepatic stellate cell; JUN: Jun proto-oncogen, AP-1 transcription factor subunit; KLF4: Kruppel like factor 4; MAPK9: mitogen-activated protein kinase 9; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; NF- κ B: nuclear factor kappa B subunit; PDCD4: programmed cell death 4; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PI3K:phosphoinositide 3-kinase; PPP2R2A: protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha; PPP2R1B: protein phosphatase

2 scaffold subunit Abeta; PTEN: phosphatase and tensin homolog; SIRT1: sirtuin 1; SMAD4: SMAD family member 4; SMAD7: SMAD family member 7; TGF- β : transforming growth factor-beta; TP53: tumor protein 53; TIMP3: tissue metalloproteinase inhibitor 3; VEGFA: vascular endothelial growth factor A

1. He C, Dong X, Zhai B, Jiang X, Dong D, Li B, Jiang H, Xu S, Sun X. (2015). MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. *Oncotarget* 6:28867-81.
2. Melnik BC. (2015). MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *J Transl Med* 13:202.
3. Yang YF, Wang F, Xiao JJ, Song Y, Zhao YY, Cao Y, Bei YH, Yang CQ. (2014). MiR-222 overexpression promotes proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by downregulating p27. *Int J Clin Exp Med* 7:893-902.
4. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. (2010). MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 16:867-75.
5. Tian XF, Ji FJ, Zang HL, Cao H. (2016). Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 Signaling Pathway Contributes to the Progress of Liver Fibrosis via Inducing Apoptosis in Hepatocytes but Not in HSCs. *PLoS One* 11(7):e0158657.
6. Gougelet A, Sartor C, Bachelot L, Godard C, Marchiol C, Renault G, Tores F, Nitschke P, Cavard C, Terris B, Perret C, Colnot S. (2016). Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with β -catenin-mutations. *Gut* 65(6):1024-34.
7. Yan G, Li B, Xin X, Xu M, Ji G, Yu H. (2015). MicroRNA-34a Promotes Hepatic Stellate Cell Activation via Targeting ACSL1. *Med Sci Monit.* 21:3008-15.
8. Ma, D., X. Tao, et al. (2012). miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. *Oncol Lett* 4(3): 483-488.
9. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZ, Toh HC, Chow P, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. (2013). MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. *PLoS One* 8:e68744.
10. Li Q, Ding C, Chen C, Zhang Z, Xiao H, Xie F, Lei L, Chen Y, Mao B, Jiang M, Li J, Wang D, Wang G. (2014). miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 29(4):835-42.
11. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM. (2008). The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* 9(8):R127.

12. Liu L, Cai X, Liu E, Tian X, Tian C. (2017). MicroRNA-18a promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting KLF4. *Oncotarget* 8(40):68263-68269.
13. Wang M, Zhang J, Tong L, Ma X, Qiu X. (2015). MiR-195 is a key negative regulator of hepatocellular carcinoma metastasis by targeting FGF2 and VEGFA. *Int J Clin Exp Pathol* 8(11):14110-20.
14. Song LY, Ma YT, Wu CF, Wang CJ, Fang WJ, Liu SK. (2017). MicroRNA-195 Activates Hepatic Stellate Cells In Vitro by Targeting Smad7. *Biomed Res Int* 2017:1945631.
15. Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, Shimada Y, Tanaka E, Sakai Y, Shimizu K, Tsujimoto G. (2011). MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). *J Biol Chem* 286(1):420-8.



MicroRNA Expression in Focal Nodular Hyperplasia in Comparison with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma

Gábor Lendvai¹ · Tímea Szekerczés¹ · Benedek Gyöngyösi¹ · Krisztina Schlachter² · Endre Kontsek¹ · Adrián Pesti¹ · Attila Patonai³ · Klára Werling⁴ · Ilona Kovalszky⁵ · Zsuzsa Schaff¹ · András Kiss¹

Received: 23 May 2018 / Accepted: 29 October 2018 / Published online: 9 November 2018
© Arányi Lajos Foundation 2018

Abstract

The liver disease focal nodular hyperplasia (FNH) has several histological features that resemble hepatic cirrhosis. Since cirrhosis may develop further into hepatocellular carcinoma (HCC) contrary to FNH, the aim of the present study was to identify microRNAs (miRNA), which, by their altered expression levels, may be associated with the benign, tumor-like nature of FNH. Altogether 106 surgically removed formalin-fixed paraffin-embedded liver samples were selected, including 22 FNH, 45 cirrhosis, 24 HCC and 15 normal liver tissues. Etiology of the cases of cirrhosis and HCC includes hepatitis C and alcoholism and the HCC cases developed in cirrhotic livers. Relative expression levels of 14 miRNAs were determined using TaqMan MicroRNA Assays. In comparison to normal liver, the levels of miR-34a and miR-224 were elevated not only in FNH but also in cirrhosis and HCC, while the expression of miR-17-5p, miR-18a and miR-210 was decreased in FNH. Further, the levels of miR-21 and miR-222 were increased in cirrhosis and HCC but were decreased in FNH and the expression of miR-17-5p, miR-18a, miR-195 and miR-210 was decreased in FNH as compared with cirrhosis and/or HCC. In conclusion, the elevation of miR-34a and miR-224 may be associated with both benign and malignant proliferative processes, nevertheless the increased expression of oncomiRs miR-21 and miR-222 in cirrhosis and HCC but not in FNH may be related to malignant processes of the liver. The decreased levels of miR-18a, miR-195 and miR-210 may further differentiate FNH from cirrhosis, reflecting the different pathogenesis of these two entities contrary to some histologically similar features.

Keywords Focal nodular hyperplasia · Hepatic cirrhosis · Hepatocellular carcinoma · microRNA · Chronic hepatitis C

Gábor Lendvai, Tímea Szekerczés, Zsuzsa Schaff and András Kiss contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12253-018-0528-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gábor Lendvai
lendvai.gabor@med.semmelweis-univ.hu

¹ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Ulloi 93, Budapest H-1091, Hungary

² Department of Pathology, National Institute of Oncology, Budapest 1122, Hungary

³ Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University, Budapest 1082, Hungary

⁴ 2nd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest 1088, Hungary

⁵ 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest 1085, Hungary

Introduction

Histologically, hepatic cirrhosis is characterized by rearrangement of the parenchyma into nodules, excess deposition of extracellular matrix and production of fibrotic tissues [1, 2]. The histologic appearance of focal nodular hyperplasia (FNH) may look very similar to a part of cirrhosis under the microscope [3, 4]; however, by gross examination, FNH appears as a tumor-like hepatic lesion that develops in noncirrhotic liver [5, 6]. Thus, FNH never progresses into hepatocellular carcinoma (HCC), whereas cirrhosis is regarded as a premalignant lesion preceding HCC. The pathogenesis of FNH is unclear, yet FNH is hypothesized to result from congenital or acquired vascular abnormalities leading to either arterial or portal venous thrombosis [3, 7, 8]. In contrast, the most common etiology of cirrhosis includes chronic viral hepatitis (predominantly hepatitis B and hepatitis C viruses), alcoholic liver disease (ALD), metabolic disorders (non-alcoholic steatohepatitis) and autoimmune liver diseases [9, 10].

MicroRNAs (miRNA) are short regulating noncoding RNA molecules that negatively modulate gene expression at the posttranscriptional level by binding to the 3' untranslated region of mRNAs, leading to reduced or prevented protein synthesis [1, 11]. miRNAs are essential for fine-tuning the expression of genes involved predominantly in normal cellular processes, such as development, differentiation and proliferation [12, 13]. Over 2500 miRNAs are expressed from the human genome [14], which create a complex regulatory network, since not only miRNAs have multiple target genes but each mRNA may be regulated by several miRNAs. The fact that deregulated miRNA expression compared to the normal state has been observed in many disorders, including inflammatory liver diseases and primary liver cancers [15–19], assigns an important role to miRNAs in liver diseases, which among others may explain the benign or malignant nature of liver diseases. Therefore, the aim of the present study was to detect miRNA expression levels in FNH, cirrhosis, HCC and normal liver for comparison, which could characterize non-tumorous, pre-malignant and malignant hepatic lesions.

Materials and Methods

Patients

Altogether 106 liver samples were analyzed retrospectively with the permission of the National Medical Ethical Committee (45727–2/2013/EKU). The samples were selected from the archives of 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research as well as 2nd Department of Pathology of Semmelweis University, Budapest, including formalin-fixed paraffin-embedded samples of 22 FNH, 45 hepatic cirrhosis (of which 30 were infection-related cirrhosis and 15 were tumor-surrounding cirrhosis from the studied HCC cases) and 24 HCC cases along with 15 normal liver samples. Patients were between 23 and 82 years of age with an average of 49.5 years, showing a male/female ratio of 40/36. The clinicopathological summary of the patients is shown in Table 1. The cirrhosis samples were obtained from patients upon orthotopic liver transplantation carried out due to vascular and/or parenchymal decompensated cirrhosis. All HCC cases developed in cirrhotic livers and, according to histological grading, they showed a low/high grade tumor ratio of 14/10. Etiology of the cirrhotic and HCC cases included HCV infection, alcohol intake or the combination of these two. Altogether 28 patients with HCV infection had received antiviral treatment; whereas treatment could not be initiated in eight cases of cirrhosis owing to deteriorated state of health, and treatment information was unknown in five cases.

Table 1 Clinicopathological summary of the patients

	Cirrhosis	HCC	FNH
Number of cases:	45	24	22
Gender			
Male	31	20	1
Female	14	4	21
Average years of age:	53.3	61.5	37.2
(min/max)	(27/81)	(42/82)	(23/66)
Etiology:			
HCV infection	27	8	
HCV infection + alcohol	5	1	
Alcohol intake	9	6	
Unknown	4	9	
Antiviral HCV treatment:			
Received	21	7	
Not received	8		
Unknown	3	2	
End-stage cirrhosis characteristics:			
CHILD A	6		
CHILD B	16		
CHILD C	8		
Ascites	14		
HCC:			
Low grade		14	
High grade		10	

HCC hepatocellular carcinoma, *FNH* focal nodular hyperplasia, *HCV* hepatitis C virus, *CHILD* Child-Turcotte-Pugh Score

Normal liver samples were obtained from deceased patients after organ donation, just prior to ligation of the abdominal aorta and reperfusion.

Histology

Tissue samples were processed according to routine pathology procedures. In brief, the small, 1–3 cm long resected samples were submerged in 10% neutral buffered formalin (in PBS, pH 7.0) and fixed for 24 h at room temperature. Following dehydration in a series of ethanol and xylene, the formalin-fixed samples were embedded in paraffin (FFPE samples). The paraffin embedded samples were cut into 3 to 4 μ m thick sections and stained with haematoxylin and eosin.

RNA Isolation

RNA was isolated from several 3 to 4 μ m thick FFPE sections using RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) according to the instructions of the manufacturer with modifications for co-purification of miRNAs [20]. Traces of genomic

DNA were eliminated using Turbo DNase digestion (TURBO DNA-free kit, Ambion, Austin, TX, USA).

Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction

Selection of miRNAs to be detected was based on the literature [15, 18, 21–23]. Expression of individual miRNAs was determined using the following TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies of Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, USA): miR-17-5p (ID:000393), miR-18a (ID:002422), miR-21 (ID: 000397), miR-34a (ID:000426), miR-122 (ID:002245), miR-140 (ID:000462), miR-195 (ID:000494), miR-210 (ID:000512), miR-214 (ID:002306), miR-221 (ID:000524), miR-222 (ID:002276), miR-223 (ID:002295), miR-224 (ID:002099) and miR-328 (ID:000543). Reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were performed according to the instructions of the manufacturer. Briefly, RT reaction was carried out using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit in a final volume of 7.5 μ L containing 10 ng total RNA. The qPCR was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG in a final volume of 10 μ L containing 0.65 μ L RT product. The amplification reaction was run in triplicates on a LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formula, applying the average of miR-140 and miR-328 as the most stable reference determined by the NormFinder application [24] and normalized to the median ΔCq value of normal liver samples.

Statistical Analysis

The differences in miRNA expression between normal liver, cirrhosis, HCC and FNH samples were analyzed by means of non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance and median test using STATISTICA software, version 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). A *p* value of 0.05 was set as the threshold for statistical significance.

Results

Histology

The FNHs in the present study showed tumor-like appearances by gross examination, with typical central scarring and nodular architecture (Fig. 1a) in contrast to the diffuse nodularization observed in cirrhosis (Fig. 1b). Histologically, the FNH cases were of the classic type based on the Bordeaux classification [25]: nodules of varying sizes, fibrous septa and ductal reaction could be

demonstrated (Fig. 1c), which were apparently similar to structural alterations seen in cirrhosis (Fig. 1d).

miRNA Expression in FNH, Cirrhosis and HCC as Compared with Normal Liver

The relative miRNA expression levels determined in FNH, cirrhosis, HCC and normal liver samples are shown on Fig. 2. When compared to normal liver, the levels of miR-34a and miR-224 were increased in each diseased samples, FNH, cirrhosis and HCC ($p < 0.001$); while 5 miRNAs showed decreased expression. Namely, miR-17-5p, miR-18a and miR-210 were decreased in FNH ($p < 0.03$), miR-17-5p and miR-221 in cirrhosis ($p < 0.01$) and miR-223 in HCC ($p < 0.0001$).

miRNA Expression in FNH as Compared with Cirrhosis and HCC

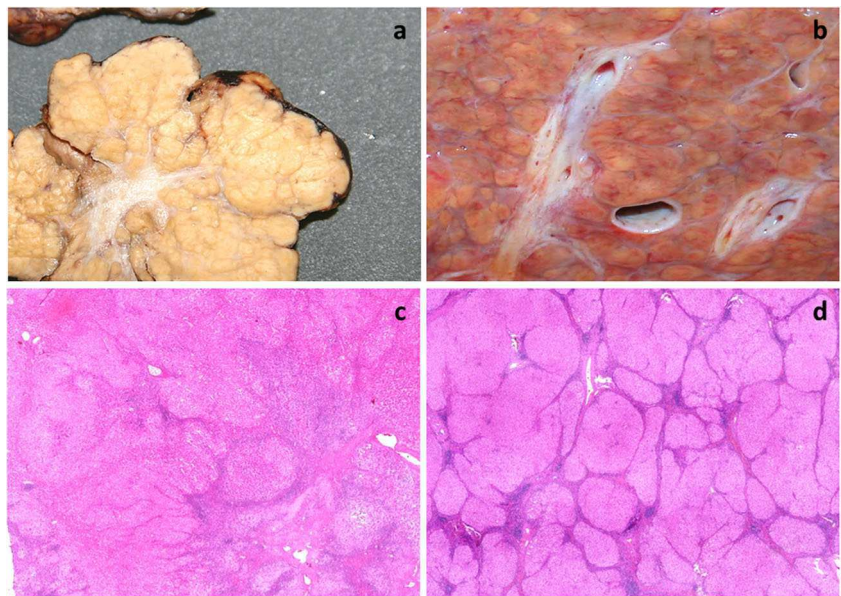
In FNH, intriguingly, the levels of miRNAs were reduced in comparison to cirrhosis and/or HCC (Fig. 2). Expression of miR-18a, miR-21 and miR-222 was decreased in FNH as compared with both cirrhosis and HCC ($p < 0.01$); while miR-195, miR-210 were decreased as compared with cirrhosis ($p < 0.04$) and miR-17-5p, miR-221 were decreased as compared with HCC ($p < 0.04$). The level of miR-195 was increased and the expression of miR-221 was decreased in cirrhosis when compared with HCC ($p < 0.02$). In addition, the levels of miR-18a, miR-21 and miR-222 were also decreased in FNH when compared only to HCV infection-related cirrhosis samples ($p < 0.04$, data not shown).

Discussion

Hepatic cirrhosis and FNH share certain similar histological features, however FNH is a tumor-like focal lesion in a noncirrhotic liver, which, in contrast to cirrhosis, never progresses to HCC. The nodular structure within FNH is the result of malformed vessels and a pathologic blood supply featuring fibrous septa and ductular proliferation [26], where the nodular hyperplastic parenchyma is completely or incompletely surrounded by fibrous septa and the hepatocytes retain their normal phenotype. In contrast, the morphology of cirrhosis results from a complex process involving wound-healing reaction, oxidative stress-related molecular mechanisms, tissue hypoxia, an anaerobic proinflammatory environment and epigenetic modification with the contribution of hepatic stellate cells and other extracellular matrix producing cells [27].

Since altered miRNA expression has been reported in hepatic fibrosis [11, 18, 19, 28, 29] and miRNAs have been suggested to play important role in liver carcinogenesis [15, 18, 21–23], the miRNA expression pattern may provide clues

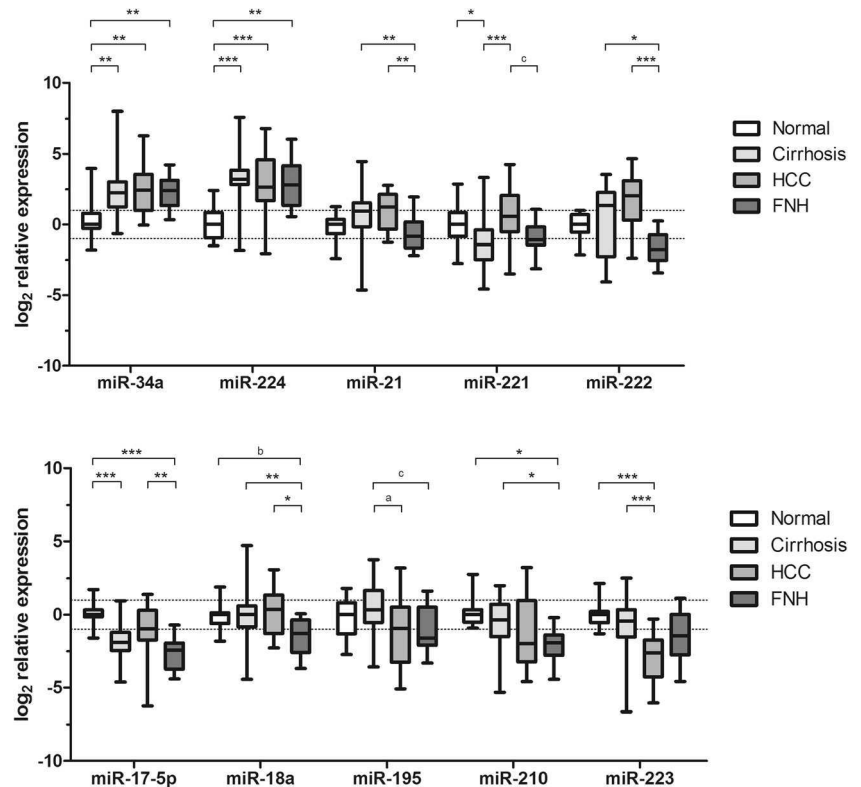
Fig. 1 Characteristics of focal nodular hyperplasia (FNH) in comparison to cirrhosis observed by gross examination (a–b) and by histology (c–d). **a** FNH with central scarring and nodular architecture; **b** cirrhosis showing diffuse nodularization; **c** FNH with nodules of varying sizes, fibrous septa and ductular reaction, apparently resembling cirrhosis **d** by histology (H&E $\times 150$)



to biological processes involved in the diseases. In the present study, we aimed to detect alterations in miRNA expression that may indicate the benign proliferation characteristic of FNH contrary to cirrhosis and HCC.

The detected miRNAs showed a predominance of decreased levels. However, miR-34a and miR-224 were increased not only in FNH but also in cirrhosis and HCC in comparison to normal liver. This is in accordance with the

Fig. 2 Relative miRNA expression detected in normal liver, cirrhosis, hepatocellular carcinoma (HCC) and focal nodular hyperplasia (FNH). The upper dotted line indicates two-fold expressional elevation; the lower dotted line signifies a one-half reduction on expression. Thin black lines designate statistical differences analyzed using a non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance and median test: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, ^a $p < 0.02$, ^b $p < 0.03$, ^c $p < 0.04$



literature since expression of both miR-34a and miR-224 has been reported to be elevated in liver diseases including fibrosis, HCV infection, cirrhosis, alcoholic and nonalcoholic liver diseases and HCC [30–32]. One of the activators of miR-34a is TP53, resulting in apoptosis of hepatocytes and activation of hepatic stellate cells (HSC) [30]. Nevertheless, suppressed expression of miR-34a leads to decreased proliferation of cholangiocarcinoma cells [33]. Additionally, miR-34a seems to have role in liver fibrosis since it is found upregulated in HSCs and when the expression of miR-34 is silenced the levels of alpha smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen and desmin are found to be lower [34]. Further, it has been shown that HSCs are also activated in FNH as the oxidative stress originating from the arterial hyperperfusion may activate HSCs in the central scar [35]. Thus, it seems that miR-34a helps to enhance cell survival as suggested earlier in HCC cell cultures [36], contributing to both liver tissue repair and fibrosis.

It has been found that miR-224 promotes proliferation, migration and invasion by activating AKT [37] and transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) [38] signaling pathways, as well as by promoting the expression of MMP-9 [39]. The fact that p65/NF- κ B has been identified as a direct transcriptional regulator of miR-224 links this miRNA to inflammation and cell migration, and on that account, to HCC development and progression [15, 40]. It is therefore likely that miR-224 aids proliferation during liver injuries. Supportive of this assumption is the increasing number of data reporting on the presence of elevated miR-224 in chronic liver diseases, such as chronic viral hepatitis and liver cirrhosis [15, 23], hepatic fibrosis [19], chronic hepatitis with steatosis and hepatitis C virus negative steatosis [16]. Further, the increase of miR-224 has been found to be associated with increased progression-free and overall survival in HCC patients receiving sorafenib treatment [41].

In our study, the miRNAs showing decreased expression in FNH included miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-195, miR-210, miR-221 and miR-222 as compared with cirrhosis, HCC and/or normal liver. Regarding FNH, the decreased levels of miR-21, miR-222, miR-17-5p, miR-18a are intriguing findings since these miRNAs target genes that inhibit cell proliferation and cell cycle progression (Supplementary Table 1). Elevated miR-21 and miR-222 have been found in various types of cancers, including HCC [21, 42, 43]; whereas statistically lower miR-21 and miR-222 expression has been detected in benign liver tumors, such as hepatocellular adenoma and FNH [22]. miR-21 targets phosphatase and tensin homolog (PTEN), the negative regulator of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway [44], leading to cellular proliferation, migration and tumor growth [45]. miR-222 targets

cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B, p27Kip1) [46] and protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha (PPP2R2A, an inhibitor of AKT phosphorylation) [43], which are two negative controls of cell cycle and cell growth. Our observations that miR-21 and miR-222 are elevated in cirrhosis and HCC but not in FNH seem to support the involvement of these miRNAs in hepatocarcinogenesis. Indeed, the targets of miR-21 affect major processes of cancer biology [47] and miR-21 in conjunction with NF- κ B helps maintain a transformed state [48]. The level of miR-222 correlates with the level of collagen type 1 alpha 1 (Col1A1), smooth muscle actin alpha 2 (ACTA2, α -SMA) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in HCV infection-related advanced fibrosis [49]. By contrast, a low level of miR-21 may also initiate proliferation through activating the inhibitor of the Hippo pathway, allowing therefore the transcriptional co-activator YAP to initiate gene expression [50, 51]. This might explain our observation according to which proliferation in FNH is also enabled even if the levels of miR-21 are low, but is certainly manifested under a regulation different from the situation when the expression of miR-21 is high.

The targets of miR-17-5p and miR-18a are also cell cycle inhibitors [52, 53]. Nevertheless, it has been reported that both high and low levels of miR-17-5p could promote proliferation. In a dominantly proliferation-promoting system, miR-17-5p may stabilize the pro-proliferative signal by removing the proliferation-inhibitors; however, in a dominantly proliferation-inhibiting system, decreased expression of miR-17-5p may lead to the increase of proliferation-promoters [52]. Thus, low levels of miR-17-5p detected in FNH and cirrhosis may support proliferation but under different circumstances than when miR-17-5p expression is high.

In contrast to the previous oncogenic miRNAs, miR-195 has a tumor suppressor function since it inhibits proliferation and suppresses angiogenesis [54]. This might account for the low miR-195 expression observed in FNH and HCC in comparison to cirrhosis, indicating ongoing proliferation. Nevertheless, miR-195 may activate HSCs, resulting in elevated α -SMA and reduced Smad7 levels [55], which might explain why miR-195 is elevated in cirrhosis since the $TGF-\beta$ /Smad pathway is pivotal in promoting liver fibrosis, where Smad7 is the negative regulator. miR-210 is a multifaceted miRNA, which is predominantly involved in surviving hypoxia [48]. Nevertheless, it has been reported that overexpression of miR-210 leads to cell cycle arrest and inhibition of miR-210 accelerates cell cycle progression [56]. This might elucidate the observed low levels of miR-210 in FNH and HCC as compared with cirrhosis.

In summary, our study revealed elevated expression of miR-21 and miR-222 in cirrhosis and HCC but not in FNH,

which may be related to malignant processes of the liver. Nevertheless, miR-34a and miR-224 were increased not only in cirrhosis and HCC but also in FNH, indicating that elevation of these miRNAs may be associated with both benign and malignant proliferative processes of the liver. The decreased expression of miR-18a, miR-195 and miR-210 may further differentiate FNH from cirrhosis, which might reflect the different pathogenesis of these two entities contrary to their histologically similar features.

Acknowledgements The authors thank Mrs. Elvira Kálé Rigóné for the English proofreading.

Funding This study was funded by grants from OTKA K101435 and K108548 from the National Scientific Research Fund.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Chen SL, Zheng MH, Shi KQ, Yang T, Chen YP (2013) A new strategy for treatment of liver fibrosis: letting MicroRNAs do the job. *BioDrugs* 27(1):25–34
- Mormone E, George J, Nieto N (2011) Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 193(3):225–231
- Roncalli M, Sciarra A, Tommaso LD (2016) Benign hepatocellular nodules of healthy liver: focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *Clin Mol Hepatol* 22(2):199–211
- Balabaud C, Al-Rabih WR, Chen PJ, Evason K, Ferrell L, Hernandez-Prera JC, Huang SF, Longrich T, Park YN, Quaglia A, Schirmacher P, Sempoux C, Thung SN, Torbenson M, Wee A, Yeh MM, Yeh SH, Le Bail B, Zucman-Rossi J, Bioulac-Sage P (2013) Focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma around the world viewed through the scope of the Immunopathological classification. *Int J Hepatol* 2013:268625
- Kondo F, Fukusato T, Kudo M (2014) Pathological diagnosis of benign hepatocellular nodular lesions based on the new World Health Organization classification. *Oncology* 87(Suppl 1):37–49
- Sempoux C, Balabaud C, Bioulac-Sage P (2014) Pictures of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenomas. *World J Hepatol* 6(8):580–595
- Venturi A, Piscaglia F, Vidili G, Flori S, Righini R, Golfieri R, Bolondi L (2007) Diagnosis and management of hepatic focal nodular hyperplasia. *J Ultrasound* 10(3):116–127
- Nahm CB, Ng K, Lockie P, Samra JS, Hugh TJ (2011) Focal nodular hyperplasia—a review of myths and truths. *J Gastrointest Surg* 15(12):2275–2283
- Sohrabpour AA, Mohamadnejad M, Malekzadeh R (2012) Review article: the reversibility of cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 36(9):824–832
- Liou IW (2014) Management of end-stage liver disease. *Med Clin North Am* 98(1):119–152
- Murakami Y, Kawada N (2017) MicroRNAs in hepatic pathophysiology. *Hepatol Res* 47(1):60–69
- Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB (2015) miR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* 62(2):448–457
- Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S (2012) MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* 3(5):364–371
- Lee CH, Kim JH, Lee SW (2014) The role of microRNAs in hepatitis C virus replication and related liver diseases. *J Microbiol* 52(6):445–451
- Huan L, Liang LH, He XH (2016) Role of microRNAs in inflammation-associated liver cancer. *Cancer Biol Med* 13(4):407–425
- Lendvai G, Jarmay K, Karacsony G, Halasz T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T, Schaff Z, Kiss A (2014) Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World J Gastroenterol* 20(41):15343–15350
- Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, Schlachter K, Halasz J, Nagy P, Garami M, Jakab Z, Schaff Z, Kiss A (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch* 464(4):419–427
- Szabo G, Bala S (2013) MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(9):542–552
- Halasz T, Horvath G, Par G, Werling K, Kiss A, Schaff Z, Lendvai G (2015) miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. *World J Gastroenterol* 21(25):7814–7823
- Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 10(3):203–211
- Borel F, Konstantinova P, Jansen PL (2012) Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 56(6):1371–1383
- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J (2008) MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 47(6):1955–1963
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25(17):2537–2545
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15):5245–5250
- Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bedossa P, Scoazec JY, Chiche L, Dhillon AP, Ferrell L, Paradis V, Roskams T, Vilgrain V, Wanless IR, Zucman-Rossi J (2007) Pathological diagnosis of liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia: Bordeaux update. *J Hepatol* 46(3):521–527
- Maillette de Buy Wenniger L, Terpstra V, Beuers U (2010) Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: epidemiology and pathology. *Dig Surg* 27(1):24–31
- Pinzani M (2015) Pathophysiology of liver fibrosis. *Dig Dis* 33(4):492–497
- He Y, Huang C, Zhang SP, Sun X, Long XR, Li J (2012) The potential of microRNAs in liver fibrosis. *Cell Signal* 24(12):2268–2272
- Roderburg C, Luedde T (2014) Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. *J Hepatol* 61(6):1434–1437
- Tian XF, Ji FJ, Zang HL, Cao H (2016) Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the Progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs. *PLoS One* 11(7):e0158657

31. Ding J, Li M, Wan X, Jin X, Chen S, Yu C, Li Y (2015) Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARalpha expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 5:13729
32. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1):264–269
33. Han Y, Meng F, Venter J, Wu N, Wan Y, Standeford H, Francis H, Meiningner C, Greene J Jr, Trzeciakowski JP, Ehrlich L, Glaser S, Alpini G (2016) miR-34a-dependent overexpression of Per1 decreases cholangiocarcinoma growth. *J Hepatol* 64(6):1295–1304
34. Yan G, Li B, Xin X, Xu M, Ji G, Yu H (2015) MicroRNA-34a promotes hepatic stellate cell activation via targeting ACSL1. *Med Sci Monit* 21:3008–3015
35. Sato Y, Harada K, Ikeda H, Fujii T, Sasaki M, Zen Y, Nakanuma Y (2009) Hepatic stellate cells are activated around central scars of focal nodular hyperplasia of the liver—a potential mechanism of central scar formation. *Hum Pathol* 40(2):181–188
36. Cheng J, Zhou L, Xie QF, Xie HY, Wei XY, Gao F, Xing CY, Xu X, Li LJ, Zheng SS (2010) The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Proteomics* 10(8):1557–1572
37. Ma D, Tao X, Gao F, Fan C, Wu D (2012) miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. *Oncol Lett* 4(3):483–488
38. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZ, Toh HC, Chow P, Chung AY, Ooi LL, Lee CG (2013) MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. *PLoS One* 8(7):e68744
39. Li Q, Ding C, Chen C, Zhang Z, Xiao H, Xie F, Lei L, Chen Y, Mao B, Jiang M, Li J, Wang D, Wang G (2014) miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 29(4):835–842
40. Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, de Meo D'Onorio P, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levvero M, Pediconi N (2012) Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFkappaB inflammatory pathways. *J Hepatol* 56(4):855–861
41. Gyongyosi B, Vegh E, Jaray B, Szekely E, Fassan M, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A (2014) Pretreatment MicroRNA level and outcome in Sorafenib-treated hepatocellular carcinoma. *J Histochem Cytochem* 62(8):547–555
42. Iorio MV, Croce CM (2012) microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33(6):1126–1133
43. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N (2010) MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 16(3):867–875
44. He C, Dong X, Zhai B, Jiang X, Dong D, Li B, Jiang H, Xu S, Sun X (2015) MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. *Oncotarget* 6(30):28867–28881
45. Bao L, Yan Y, Xu C, Ji W, Shen S, Xu G, Zeng Y, Sun B, Qian H, Chen L, Wu M, Su C, Chen J (2013) MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. *Cancer Lett* 337(2):226–236
46. Yang YF, Wang F, Xiao JJ, Song Y, Zhao YY, Cao Y, Bei YH, Yang CQ (2014) MiR-222 overexpression promotes proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by downregulating p27. *Int J Clin Exp Med* 7(4):893–902
47. Melnik BC (2015) MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *J Transl Med* 13:202
48. Tili E, Michaille JJ, Croce CM (2013) MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol Rev* 253(1):167–184
49. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N (2012) MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 61(11):1600–1609
50. Kim Y, Jho EH (2017) Deubiquitinase YOD1: the potent activator of YAP in hepatomegaly and liver cancer. *BMB Rep* 50(6):281–282
51. Patel SH, Camargo FD, Yimlamai D (2017) Hippo signaling in the liver regulates organ size, cell fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology* 152(3):533–545
52. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM (2008) The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* 9(8):R127
53. Liu L, Cai X, Liu E, Tian X, Tian C (2017) MicroRNA-18a promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting KLF4. *Oncotarget* 8(40):68263–68269
54. Wang M, Zhang J, Tong L, Ma X, Qiu X (2015) MiR-195 is a key negative regulator of hepatocellular carcinoma metastasis by targeting FGF2 and VEGFA. *Int J Clin Exp Pathol* 8(11):14110–14120
55. Song LY, Ma YT, Wu CF, Wang CJ, Fang WJ, Liu SK (2017) MicroRNA-195 activates hepatic stellate cells in vitro by targeting Smad7. *Biomed Res Int* 2017:1945631
56. Ivan M, Huang X (2014) miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Adv Exp Med Biol* 772:205–227