

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS**

Baigiamasis darbas

**Mašininio mokymosi panaudojimas CD8+ limfocitų infiltracijos ir
klinikopatologinių parametrų koreliacijos nustatymui hepatoceliulinės
karcinomos chirurginei taktikai**

**Application of Machine Learning to Determine the Correlation Between
CD8+ Lymphocyte Infiltration and Clinicopathological Parameters for the
Surgical Strategy of Hepatocellular Carcinoma**

Agnė Grigonytė, VI kursas, 3 gr.

Klinikinės medicinos instituto Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinika

Darbo vadovas

Doc. dr. Aistė Kielaitė-Gulla

Konsultantas

Rokas Stulpinas

Klinikos vadovas

Prof. habil. dr. Kęstutis Strupas

2023-05-20

agne.grigonyte.2@mf.stud.vu.lt

TURINYS

SANTRAUKA	2
SUMMARY	3
ĮVADAS	4
TIRIAMIEJI IR METODAI	6
1.1. Tiriamieji.....	6
1.2. Tiriamojo darbo eiga.....	6
1.3. Statistinė analizė	6
REZULTATAI.....	7
1.1. Demografinė ir klinikopatologinė grupių charakteristika.....	7
1.2. Transplantuotų ir rezekuotų pacientų grupių laboratorinių rodiklių palyginimas	9
1.3. CD8+ limfocitų charakteristikų palyginimas tarp tiriamųjų grupių	10
1.4. CD8+ limfocitų įtaka visos kohortos išgyvenamumui	11
1.5. CD8+ limfocitų įtaka išgyvenamumui tiriamųjų grupių viduje.....	13
REZULTATŲ APTARIMAS	15
IŠVADOS	19
PASIŪLYMAI.....	19
LITERATŪROS SĄRAŠAS	20
PRIEDAI.....	23

SANTRAUKA

Tikslas: Įvertinti CD8+ limfocitų infiltracijos, klinikopatologinių ir kraujo laboratorinių rodiklių koreliacijas tarp skirtingų hepatoceliulinės karcinomos chirurginių taktikų.

Uždaviniai:

1. Palyginti demografinius, klinikopatologinius ir kraujo laboratorinius duomenis tarp pacientų, kuriems buvo atlikta kepenų transplantacija arba rezekcija dėl hepatoceliulinės karcinomos.
2. Ištirti ir palyginti CD8+ limfocitų tankio pasiskirstymą hepatoceliulinės karcinomos ir aplinkinės kepenų parenchimos srityse transplantuotų ir rezekuotų pacientų grupėse.
3. Nustatyti CD8+ limfocitų prognostinę reikšmę išgyvenamumui, visoje kohortoje ir atskirose transplantuotų ir rezekuotų pacientų grupėse.

Metodika: Į retrospektyvinį tyrimą buvo įtraukti 134 pacientai, sergantys hepatoceliuline karcinoma, kuriems 2007 – 2020 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose buvo atlikta kepenų transplantacija arba dalinė kepenų rezekcija. CD8+ imunohistocheminiai vaizdai buvo tiriami naudojant skaitmeninę vaizdų analizę. Išgyvenamumo prognostinė reikšmė buvo tiriama gautų CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių kontekste. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant Microsoft Excel 2021 ir statistinį paketą R (versija 3.5.1).

Rezultatai: Lyginant tiriamųjų grupes rasti statistiškai reikšmingi išgyvenamumo, hepatoceliulinės karcinomos atkryčių, patologinių radinių ir kraujo laboratorinių rodiklių skirtumai. Lyginant CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklius tarp tiriamųjų grupių, CD8+ limfocitų kiekis buvo statistiškai reikšmingai didesnis rezekuotų pacientų tarpe, nei transplantuotų. Didesnis CD8+ limfocitų tankis navikinio audinio stromoje bei perineoplastinės kepenų parenchimos epitelyje ir stromoje turėjo blogesnę prognostinę reikšmę visos kohortos pacientų išgyvenamumui. Didesnis CD8+ limfocitų tankis navikinio audinio epitelyje buvo susijęs su geresne, o navikinio ir perineoplastinio audinio stromoje – su blogesne išgyvenamumo prognoze rezekuotų pacientų grupėje.

Išvados: CD8+ ląstelių pasiskirstymo rodikliai kartu su klinikopatologiniais ir kraujo laboratoriniais duomenimis koreliuoja tarp hepatoceliulinės karcinomos chirurginių taktikų.

Raktažodžiai: Hepatoceliulinė karcinoma, CD8+ limfocitai, dalinė kepenų rezekcija, kepenų transplantacija.

SUMMARY

Objective: To assess the correlations of CD8+ lymphocyte infiltration, clinicopathological, and blood laboratory parameters between different surgical strategies of hepatocellular carcinoma.

Tasks:

1. To compare demographic, clinicopathological, and blood laboratory data among patients who underwent liver transplantation or resection for hepatocellular carcinoma.
2. To investigate and compare the density distribution of CD8+ lymphocytes in hepatocellular carcinoma and surrounding liver parenchyma in transplanted and resected patient groups.
3. To determine the prognostic value of CD8+ lymphocytes for survival, in the whole cohort and in separate groups of transplanted and resected patients.

Methodology: A retrospective study included 134 patients with hepatocellular carcinoma who underwent liver transplantation or partial liver resection between 2007 and 2020 at Vilnius University Hospital Santaros Clinics. CD8+ immunohistochemical images were examined using digital image analysis. The prognostic significance of survival was investigated in the context of the obtained CD8+ lymphocyte distribution indices. Statistical data analysis was performed using Microsoft Excel 2021 and the statistical package R (version 3.5.1).

Results: Statistically significant differences in survival, hepatocellular carcinoma recurrence, pathological findings, and blood laboratory indicators were found when comparing the study groups. When comparing the indicators of CD8+ lymphocyte distribution between the study groups, the amount of CD8+ lymphocytes was statistically significantly higher in resected patients than in transplanted patients. A higher density of CD8+ lymphocytes in the stroma of the tumor tissue and in the epithelium and stroma of the perineoplastic liver parenchyma had a worse prognostic value for the survival of patients in the entire cohort. A higher density of CD8+ lymphocytes in the epithelium of the tumor tissue was associated with a better prognosis and in the stroma of the tumor and perineoplastic tissue with a worse prognosis in the group of resected patients.

Conclusions: Indicators of CD8+ cell distribution together with clinicopathological and blood laboratory data correlate between surgical strategies of hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, CD8+ lymphocytes, partial liver resection, liver transplantation.

ĮVADAS

Hepatoceliulinė karcinoma (HCC) yra dažniausias pirminis kepenų navikas, sudarantis apie 75 % visų kepenų vėžio atvejų (1). Nepaisant mokslo pažangos HCC srityje, sergančiųjų prognozė tebėra prasta, o su vėžiu susijęs mirtingumas, šiuo metu esantis ketvirtoje vietoje pasaulyje, nepaliauja didėti daugelyje šalių (2,3). HCC patogenezė yra sudėtinga ir apima daugybę molekulinį mechanizmų, vykstančių dėl ligų predisponuojančių rizikos faktorių, tokių kaip virusiniai hepatitai B ir C, nealkoholinė suriebėjusių kepenų liga, alkoholio vartojimas ir kt. Nors ligos mechanizmas skiriasi priklausomai nuo pagrindinės etiologijos, įprasta seka yra kepenų pažeidimas, lėtinis uždegimas, fibrozė, cirozė ir HCC (2). Tikslingas pacientų, kuriems gresia HCC išsivystymas, sekimas leidžia nustatyti ankstyvą vėžio stadiją, kai dar gali būti įmanomos gydomosios intervencijos. Chirurgija, pakeičiant visas kepenis transplantacijos būdu arba pašalinant dalį kepenų rezekcijos būdu, išlieka pagrindinės ankstyvos stadijos HCC gydymo galimybės (4). Abiejų chirurginių galimybių taikymas gali turėti panašų išgyvenamumą po procedūros, tačiau HCC pasikartojimo dažnis labai skiriasi (5). Tyrimai rodo, kad kepenų transplantacija gali pasiūlyti mažiausią vėžio pasikartojimo dažnį ir didžiausią ilgalaikio išgyvenamumo galimybę (4). Kiti autoriai pastebi, kad transplantacija turi išgyvenamumo pranašumą, palyginti su rezekcija, tik gydant pacientus vėlesnėse HCC ligos stadijose (6). Tokius išgyvenamumo ir ligos pasikartojimo dažnio skirtumus gali nulemti su vėžiu susiję veiksniai (stadija, alfa fetoproteinas, mikro ar makrovaskulinė invazija), su pacientu susiję veiksniai (gretutinės ligos, amžius) bei taikyto gydymo deriniai (4). Visumoje, pacientai, kuriems numatoma taikyti transplantaciją arba rezekciją, dažnai skiriasi vėžio stadija ir esama kepenų funkcija, todėl dviejų gydymo būdų palyginimas išlieka sudėtingas (7).

Imuninė mikroaplinka HCC vaidina pagrindinį vaidmenį naviko progresavime ir ligos recidyvavime (8). Kadangi hepatokarcinogenezė ir pooperacinė prognozė priklauso ne tik nuo uždegiminio kepenų pažeidimo, bet ir nuo imuninės sistemos aktyvacijos bei išsekimo, buvo pradėta gilintis į naviką supančią imuninę aplinką ir naviką infiltruojančių limfocitų (NIL) pogrupius (9). Šaltinių duomenimis, šeiminingo imuninės ląstelės, tokios kaip NIL, gali pasitarnauti kaip HCC prognostinis veiksnys (10). Vienas pagrindinių NIL pogrupių, CD8+ limfocitai priklauso citotoksinėms T ląstelėms, kurios yra atsakingos už tikslinių ląstelių pašalinimą, ir yra laikomi pagrindiniais priešnavikinio imuniteto efektoriais (11,12). Metaanalizė, įvertinanti NIL prognostinę reikšmę sergant HCC, rodo, kad pacientų, kurių CD8+ NIL kiekis buvo didelis, bendras išgyvenamumas ir išgyvenimas be pasikartojimo buvo ilgesni, palyginti su pacientais, kurių NIL kiekis buvo mažesnis (11). Be to, CD8+ limfocitų infiltracijos audinyje erdvinis išsidėstymas yra itin svarbus, nes pacientų, kurių CD8+ ląstelių tankis yra didelis HCC

centre arba naviko pakraštyje, bendras išgyvenamumas gali būti geresnis (13). Imuninių ląstelių erdvinis išsidėstymas taip pat gali pasitarnauti atskiriant naviką infiltruojančias CD8+ ląsteles nuo aplinkinę kepenų parenchimą infiltruojančių CD8+ limfocitų. Viso to svarba gali būti paaiškinta tuo, kad CD8+ ląstelės gali dalyvauti ne tik minėtame priešnavikiniame atsake, bet tuo pačiu sukelti žalingą poveikį likusiai uždegiminei kepenų parenchimai, skatinant imuninį atsaką prieš kepenų patologiją sukėlusį etiologinį veiksnį (14).

Patologinė naviko analizė leidžia pažvelgti į naviko ir šeimininko sąveikos mikroaplinką bei gali padėti suprasti jos įtaką HCC pacientų prognozei. Skaitmeninė patologinių vaizdų analizė ir dirbtinio intelekto sistemos įgauna pagreitį ir yra nuolat įrodomos kaip naudingos tiek uždegiminėms, tiek navikinėms kepenų ligoms, tačiau jų kasdienis klinikinis pritaikymas išlieka labai ribotas (15). Skaitmeninė imunohistochemija pagrįstas metodas Immunoscore, kiekybiškai įvertinantis šeimininko priešnavikinį CD3+ ir CD8+ limfocitų atsaką invazinėje naviko riboje ir pačioje naviko šerdyje (17), iš pradžių buvo pasiūlytas prognozuoti gaubtinės žarnos vėžio pasikartojimą, o vėliau buvo pritaikytas ir kitiems solidiniams navikams (16). Kitas automatizuotas metodas, pagrįstas mikroskopinių vaizdų analize, nagrinėjantis imunogradientą naviko ir stromos sąsajos zonoje, buvo pritaikytas CD8 imunohistocheminiams chirurginiu būdu pašalintų krūties ir gaubtinės bei tiesiosios žarnos vėžio vaizdams, siekiant prognozuoti bendrą pacientų išgyvenamumą (17). Imunogradiento metodas taip pat buvo pritaikytas, norint įvertinti CD8+ limfocitų pasiskirstymo kepenų audinyje prognostinę reikšmę po atliktos dalinės kepenų rezekcijos dėl HCC (18). Skaitmeninės vaizdų analizės bei dirbtinio intelekto pritaikymas įvairiems solidiniams navikams, įskaitant HCC, skatina toliau tirti HCC naviko-šeimininko sąveiką imuninių ląstelių lygmenyje ir, pritaikant automatizuotus metodus, palyginti skirtingus gydymo metodus bei ieškoti geriausią rezultatą siūlančios gydymo taktikos.

Darbo tikslas: Įvertinti CD8+ limfocitų infiltracijos, klinikopatologinių ir kraujo laboratorinių rodiklių koreliacijas tarp skirtingų hepatoceliulinės karcinomos chirurginių taktikų.

Darbo uždaviniai:

1. Palyginti demografinius, klinikopatologinius ir kraujo laboratorinius duomenis tarp pacientų, kuriems buvo atlikta kepenų transplantacija arba rezekcija dėl hepatoceliulinės karcinomos.
2. Ištirti ir palyginti CD8+ limfocitų tankio pasiskirstymą hepatoceliulinės karcinomos ir aplinkinės kepenų parenchimos srityse transplantuotų ir rezekuotų pacientų grupėse.
3. Nustatyti CD8+ limfocitų prognostinę reikšmę išgyvenamumui, visoje kohortoje ir atskirose transplantuotų ir rezekuotų pacientų grupėse.

TIRIAMIEJI IR METODAI

1.1. Tiriamieji

Į retrospektyvinį tyrimą buvo įtraukti 134 pacientai, kuriems 2007–2020 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose (Vilnius, Lietuva) buvo atlikta dalinė kepenų rezekcija (106 pacientai) arba kepenų transplantacija (28 pacientai) dėl HCC. Audiniai paimti operacijos metu buvo archyvuojami ir saugomi Nacionaliniame patologijos centre (Vilnius, Lietuva). Visi klinikiniai, patologiniai ir laboratoriniai duomenys buvo renkami retrospektyviai. Tyrimui atlikti buvo gautas Vilniaus regiono bioetikos komiteto leidimas Nr. 2021/6-1354-843, išduotas 2021 m. birželio 29 d.

1.2. Tiriamojo darbo eiga

Darbui buvo naudojami Nacionaliniame patologijos centre paruošti ir suskaitmeninti hematokslininu ir eozinu dažyti bei to paties paciento CD8 imunohistochiminių reakcijų (IHC) hepatoceliulinės karcinomos ir aplinkinio kepenų audinio preparatai. HALO® AI (Indica Labs, JAV) skaitmeninių vaizdų analizės sistema prieš darbą buvo išmokyta segmentuoti audinį į hepatocitų, fibrovaskulinės stromos, fono/šiukšlių klases.

Atliekant tiriamąjį darbą, kiekviename skaitmeniniame kepenų preparato vaizde rankiniu būdu buvo pažymimos dvi dominančios sritys: viena sritis apėmė navikinį audinį su kapsule, antroji - perineoplastinę kepenų parenchimą. Šios dvi sritys buvo toliau analizuojamos atskirai, naudojant skaitmeninės mikroskopijos vaizdų analizę. CD8 teigiami limfocitai (ląstelės su rudu citoplazminiu IHC dažymu) buvo identifikuoti naudojant Multiplex IHC algoritmą (Indica Labs, JAV). Iš gautų duomenų apskaičiuoti rodikliai, atspindintys vidutinį CD8+ limfocitų tankį ir erdvinį CD8+ ląstelių pasiskirstymą, buvo nepriklausomai apskaičiuoti HCC (epitelyje ir stromoje) ir perineoplastinių kepenų (epitelyje ir stromoje) srityse, kad atspindėtų du atskirus procesus, kuriuos skatina CD8+ limfocitai.

1.3. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta R 3.5.1 ir MS Excel 2021 programomis. Analizuojamų požymių pasiskirstymui imtyje įvertinti taikyta aprašomoji duomenų statistika – absoliutūs (n) ir procentiniai dažniai (%). Kiekybiniais duomenims pateikti naudoti aritmetiniai vidurkiai su standartiniu nuokrypiu, nurodant jų mažiausias (min) ir didžiausias (max) reikšmes. Požymių ryšiai vertinti sudarant susijusių požymių lentelės, chi-kvadratu (χ^2) testas taikytas požymių priklausomybei nustatyti, kuomet duomenys aprašomi keturlaukėje (2x2) dažnių lentelėje, o esant nors vienam tikėtinam stebėjimų skaičiui mažiau penkių, papildomai apskaičiuotas tikslusis Fišerio (*Fisher's*) kriterijus. Kiekybinių duomenų normalumo vertinimui naudotas Kolmogorovo-Smirnovo testas. Lyginant dviejų nepriklausomų imčių parametrinių kintamųjų vidutines

reikšmes, naudotas Stjudento t – testas, lyginant dviejų nepriklausomų imčių neparametrinių kintamųjų vidutines reikšmes naudotas *Mann-Whitney U* testas.

Laisvai prieinama programa *Cutoff Finder* buvo naudojama CD8+ limfocitų rodikliams suskirstyti į ribines vertes pagal išgyvenamumo rezultata (19). Bendro išgyvenamumo pasiskirstymui palyginti buvo naudojamas *Kaplan-Meier* metodas kartu su *Log-rank* testu.

Požymių skirtumas laikytas statistiškai reikšmingu, kai reikšmingumo lygmuo $p \leq 0,05$.

Rezultatai pateikiami lentelėse ir paveiksluose.

REZULTATAI

1.1. Demografinė ir klinikopatologinė grupių charakteristika

Į retrospektyvinį tyrimą buvo įtraukti 134 tiriamieji, kuriems 2007–2020 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose buvo atlikta dalinė kepenų rezekcija arba kepenų transplantacija dėl HCC. Rezekuotų pacientų grupę sudarė 106 pacientai, jų vidutinis amžius buvo 64 ± 10.3 m., jauniausiam tiriamajam buvo 13 m., o vyriausiam – 82 m. Rezekuotų pacientų grupėje lyčių santykis buvo artimas 3:1, vyraujant vyrams (82 vyrai ir 24 moterys). Transplantuotų pacientų grupę sudarė 28 pacientai, vidutinis jų amžius buvo $52,5 \pm 8.8$ m., jauniausiam buvo 18 m., vyriausiam – 64 m. Transplantuotų pacientų grupėje lyčių santykis buvo artimas 2:1, vyraujant vyrams (19 vyrų ir 9 moterų). Abi grupės, lyginant jų lytis, statistiškai reikšmingai nesiskyrė, tačiau rasta, kad pacientų amžius tarp grupių skyrėsi statistiškai reikšmingai – transplantuoti pacientai operacijos metu buvo jaunesnio amžiaus, nei rezekuotų grupės pacientai. Demografinių duomenų palyginimas aprašytas 1 lentelėje.

Lentelė 1. Demografinių charakteristikų palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezekuotų pacientų grupė, N=106	Transplantuotų pacientų grupė, N=28	p - reikšmė
Amžius, metais*	64 ± 10.3 (13–82)	52.5 ± 8.8 (18–64)	$p < 0.001$
Lytis, n**			$p > 0.05$
Vyrai	82 (77.4%)	19 (68%)	
Moterys	24 (22.6%)	9 (32%)	

*Vidurkis \pm standartinis nuokrypis (min-max); **Absolūtus skaičius (procentinė išraiška).

Lyginant patologinius radinius tarp tiriamųjų grupių, rezekuotų pacientų grupėje stebėti statistiškai reikšmingai didesni (vidutinis naviko matmuo 4,54 cm lyginant su 2,71 cm), blogesnio diferenciacijos laipsnio (G3 naviko diferenciacijos laipsnis 19% lyginant su 3%) ir dažniau su jau esančia kepenų kraujagysline invazija (50% lyginant su 27%) navikai, nei transplantuotų pacientų tarpe. Transplantuotų pacientų patologinė T stadija buvo žemesnė (pT1-2 sudarė 100% lyginant su 92,5% rezekuotų grupėje), tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta. Patologinių duomenų palyginimas pateiktas 2 lentelėje.

Lentelė 2. Patologinių charakteristikų palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezektuotų pacientų grupė, N=106	Transplantuotų pacientų grupė, N=28	p - reikšmė
Didžiausiais naviko matmuo, cm*	4.54 ± 3.3 (0.8-19.0)	2.71 ± 1.3 (0.6-5.8)	p = 0.002
Patologinė T stadija (pT), n**			p > 0.05
pT1	38 (35.9%)	15 (53.6%)	
pT2	60 (56.6%)	13 (46.4%)	
pT3	7 (6.6%)	0	
pT4	1 (0.9%)	0	
Naviko diferenciacijos laipsnis (G), n**			p = 0.046
G1	8 (7%)	5 (19%)	
G2	78 (74%)	22 (78%)	
G3	20 (19%)	1 (3%)	
Kepenų kraujagyslinė invazija, n**			p = 0.007
Yra	53 (50%)	6 (27%)	
Nėra	53 (50%)	22 (73%)	

*Vidurkis ± standartinis nuokrypis (min-max); **Absolūtus skaičius (procentinė išraiška).

Rezektuotų pacientų grupėje išgyvenamumas vidutiniškai siekė 48 (laiko ribos 0 –186), o transplantuotų – 53 (laiko ribos 0 – 146) mėnesius, skaičiuojant nuo atliktos operacijos datos. Lyginant grupes, išgyvenamumas statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Per visą stebėjimo laikotarpį tiriamųjų grupėse mirusių asmenų skaičius skyrėsi statistiškai reikšmingai – mirčių skaičius buvo didesnis po atliktos rezekcijos operacijos, 60 % mirčių rezektuotų pacientų grupėje, palyginti su 25 % – transplantuotų tarpe. Pirmą kartą diagnozuotos HCC gydymas, lyginant su recidyvo gydymu, operacijos metu buvo statistiškai reikšmingai dažnesnis tarp pacientų, kuriems taikyta kepenų rezekcijos operacija (pirmą kartą nustatyto naviko gydymas 86 % palyginti su 64 %). Per stebėjimo laikotarpį (nuo operacijos datos iki paskutinio apsilankymo pas gydytoją / mirties) užfiksuotas vienas HCC pasikartojimo atvejis po kepenų transplantacijos ir tai sudarė statistiškai reikšmingai mažesnę atkryčių procentą, nei tarp rezektuotų (4 % palyginti su 53 %). Išgyvenamumo ir HCC pasikartojimo duomenų palyginimas pateiktas 3 lentelėje.

Lentelė 3. Išgyvenamumo ir naviko pasikartojimo charakteristikų palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezektuotų pacientų grupė, N=106	Transplantuotų pacientų grupė, N=28	p - reikšmė
Išgyvenamumas nuo operacijos, mėn*	48 ± 39.6 (0-186)	53 ± 34.7 (0-146)	p > 0.05
Mirties atvejai, n**			p < 0.001
Gyvas	42 (40%)	21 (75%)	
Miręs	64 (60%)	7 (25%)	
Pirminio/atsikartojusio naviko atvejais, n**			p = 0.009
Pirmą kartą nustatytas navikas	91 (86%)	18 (64%)	
Atsikartojęs navikas	15 (14%)	10 (36%)	
Ligos atkryčiai, n**			p < 0.001
Atkrytis	56 (53%)	1 (4%)	
Be pasikartojimo	48 (47%)	27 (96%)	

*Vidurkis (min-max) ± standartinis nuokrypis; **Absolūtus skaičius (procentinė išraiška).

Lyginant operacinius ir hospitalizacijos duomenis (pateikta 4 lentelėje), buvo nustatyta, kad kepenų transplantacijos trukmė (vidutinė trukmė 459 min palyginti su 160 min), per operaciją netekto kraujo kiekis (vidutinis kiekis 2497 ml palyginti su 702 ml) ir laikas praleistas ligoninėje po operacijos (vidutinė trukmė 34 d. palyginti su 16 d.) buvo statistiškai reikšmingai didesni lyginant su kepenų rezekcijos duomenimis.

Lentelė 4. Operacijos ir hospitalizacijos duomenų palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezektuotų pacientų grupė, N=106	Transplantuotų pacientų grupė, N=28	p - reikšmė
Operacijos trukmė, min*	160 ± 62.2 (66-330)	459 ± 83.3 (309-720)	p = 0.006
Kraujo netekimas operacijos metu, ml*	702 ± 812.2 (0-4300)	2497 ± 2291.2 (100-9000)	p < 0.001
Hospitalizacijos trukmė, dienos*	16 ± 11.7 (4-70)	34 ± 33.3 (2-169)	p < 0.001

*Vidurkis ± standartinis nuokrypis (min-max).

1.2. Transplantuotų ir rezektuotų pacientų grupių laboratorinių rodiklių palyginimas

Norinti palyginti rezektuotų ir transplantuotų pacientų kraujo laboratorinius duomenis ir jų kitimą laike, buvo pasirinkta atskirai įvertinti ir palyginti paskutinių prieš operaciją, iškart po operacijos ir paskutinio sekimo metu atliktų kraujo laboratorinių tyrimų vertes. Tekste, aprašant rezultatus, skliausteliuose pateikiami laboratorinių tyrimų verčių aritmetinių vidurkių palyginimai tarp grupių. Statistiškai reikšmingų laboratorinių rodiklių verčių ir kintamųjų palyginimas pateiktas 5 lentelėje.

Lyginant su rezektuotais pacientais, transplantuotų pacientų priešoperaciniai laboratoriniai tyrimai parodė statistiškai reikšmingai aukštesnius kepenų funkciją atspindinčius (bendro bilirubino (57,19 μmol/l palyginti su 17,77 μmol/l), aspartataminotransferazės (AST) (98,64 U/l palyginti su 68,79 U/l), šarminės fosfatazės (ŠF) (162,89 U/l palyginti su 106,16 U/l), aktyvinto dalinio tromboplastino laiko (ADTL) (41,18 s palyginti su 36,11 s), tarptautinio normalizuoto santykio (INR) (1,57 palyginti su 1,25)) rodiklius, tačiau žemesnį albumino kiekį (30,16 g/l palyginti su 40,55 g/l) ir trombocitų skaičių ($113,54 \times 10^9/l$ palyginti su $171,42 \times 10^9/l$).

Pooperaciniai laboratoriniai tyrimai parodė, kad transplantuotų pacientų grupėje ADTL (53,30 s palyginti su 37,16 s), INR (1,77 palyginti su 1,33), AST (2194,11 U/l palyginti su 299,51 U/l), alaninaminotransferazė (ALT) (1900,93 U/l palyginti su 266,97 U/l), gama-gliutamilttransferazė (GGT) (192,54 U/l palyginti su 103,02 U/l), bendras bilirubinas (44,97 μmol/l palyginti su 21,10 μmol/l), C reaktyvus baltymas (CRB) (59,59 mg/l palyginti su 36,13 mg/l), kreatininas (115,07 μmol/l palyginti su 80,95 μmol/l) turėjo statistiškai reikšmingai aukštesnes vertes, nei rezektuotų tiriamųjų grupėje. Rezektuotų pacientų tarpe rasti statistiškai reikšmingai aukštesnes vertes turintys rodikliai buvo albuminas (30,62 g/l palyginti su 24,68 g/l) ir trombocitų skaičius ($161,50 \times 10^9/l$ palyginti su $83,37 \times 10^9/l$).

Paskutinio sekimo metu, transplantuoti pacientai turėjo statistiškai reikšmingai žemesnius AST (24,88 U/l palyginti su 81,43 U/l), ALT (22,24 U/l palyginti su 56,46 U/l), GGT (32,94 U/l palyginti su 107,30 U/l) ir bendro bilirubino (14,42 μ mol/l palyginti su 27,20 μ mol/l) laboratorinius kraujo rodiklius, nei pacientai po kepenų rezekcijos.

Lentelė 5. Statistiškai reikšmingų laboratorinių tyrimų kintamųjų palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezekuotų pacientų grupė N=106	Transplantuotų pacientų grupė N=28	p - reikšmė
Priešoperaciniai laboratoriniai tyrimai			
Aktyvinto dalinio tromboplastino laikas (ADTL), s*	36.11 (27.7-46.1)	41.18 (30.9-60.9)	p = 0.003
Tarptautinis normalizuotas santykis (INR)*	1.25 (0.87-10.10)	1.57 (1.00-3.15)	p < 0.001
Albuminas, g/l*	40.55 (31.6-48.55)	30.16 (15.7-48.5)	p < 0.001
Aspartataminotransferazė (AST), U/l*	68.79 (19-209)	98.64 (22-286)	p = 0.013
Trombocitai PLT, $\times 10^9/l^*$	171.42 (44-560)	113.54 (19-506.2)	p = 0.002
Šarminė fosfatazė (ŠF), U/l*	106.16 (34-298.6)	162.89 (85-346)	p < 0.001
Bendras bilirubinas, μ mol/l*	17.77 (5.1-52.8)	57.19 (6.2-269.9)	p < 0.001
Pooperaciniai laboratoriniai tyrimai			
Aktyvinto dalinio tromboplastino laikas (ADTL), s*	37.16 (28.4-54.3)	53.30 (32.8-107.7)	p < 0.001
Tarptautinis normalizuotas santykis (INR)*	1.33 (1.03-2.01)	1.77 (1.06-3.13)	p < 0.001
Albuminas, g/l*	30.62 (16.9-46.4)	24.68 (16.3-34.3)	p < 0.001
Alaninaminotransferazė (ALT), U/l*	266.97 (35-1292)	1900.93 (602-4638)	p < 0.001
Aspartataminotransferazė (AST), U/l*	299.51 (25-923)	2194.11 (175-6741)	p < 0.001
Gama-gliutamiltansferazė (GGT), U/l*	103.02 (29-644)	192.54 (41-817)	p < 0.001
Bendras bilirubinas, μ mol/l*	21.10 (4.5-120.8)	44.97 (12.7-142.4)	p < 0.001
C reaktyvus baltymas (CRB), mg/l*	36.13 (0.60-117.4)	59.59 (9.52-143.5)	p = 0.004
Kreatininas, μ mol/l*	80.95 (44-220)	115.07 (45-305)	p = 0.008
Trombocitai PLT, $\times 10^9/l^*$	161.50 (38-673)	83.37 (24-348)	p < 0.001
Paskutinio sekimo laboratoriniai tyrimai			
Alaninaminotransferazė (ALT), U/l*	56.46 (11-545)	22.24 (8-43)	p < 0.001
Aspartataminotransferazė (AST), U/l*	81.43 (18-413)	24.88 (14-48)	p < 0.001
Gama-gliutamiltansferazė (GGT), U/l*	107.30 (12-887)	32.94 (12-137)	p < 0.001
Bendras bilirubinas, μ mol/l*	27.20 (4.8-85.2)	14.42 (7.6-33.8)	p = 0.005

*Vidurkis (min-max)

1.3. CD8+ limfocitų charakteristikų palyginimas tarp tiriamųjų grupių

CD8+ limfocitų įvertinimui buvo apskaičiuoti rodikliai (ląstelių tankis), atspindintys erdvinį CD8+ ląstelių pasiskirstymą HCC (epitelyje ir stromoje) ir perineoplastinių kepenų (epitelyje ir stromoje) audinio srityse.

Lyginant tiriamųjų grupes, CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodikliai statistiškai reikšmingai skyrėsi tiek navikiniame audinyje, tiek aplinkinėje kepenų parenchimoje. Abejose tiriamosiose srityse CD8+ limfocitų tankis buvo didesnis rezekuotų pacientų tarpe, nei transplantuotų. Statistiškai reikšmingų CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių palyginimas tarp tiriamųjų grupių pateiktas 6 lentelėje.

Lentelė 6. CD8+ limfocitų tankio pasiskirstymo palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

	Rezekuotų pacientų grupė, N=106	Transplantuotų pacientų grupė, N=28	p - reikšmė
Navikinis audinys (HCC)			
CD8+ ląstelių tankis epitelyje, ląstelių skaičius/mm ² *	174.34 (7.75-1319.81)	103.28 (6.60-1088.41)	p = 0.042
CD8+ ląstelių tankis stromoje, ląstelių skaičius/mm ² *	571.35 (118.03-2353.48)	374.42 (79.41-1978.40)	p = 0.002
Aplinkinė kepenų parenchima			
CD8+ ląstelių tankis epitelyje, ląstelių skaičius/mm ² *	282.65 (66.10-1033.11)	141.33 (15.17-396.39)	p < 0.001
CD8+ ląstelių tankis stromoje, ląstelių skaičius/mm ² *	934.28 (182.81-2279.77)	574.06 (201.34-1078.62)	p < 0.001

*Vidurkis (min-max)

1.4. CD8+ limfocitų įtaka visos kohortos išgyvenamumui

Pasitelkus ribinių verčių identifikavimo programą *Cutoff Finder*, CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodikliams buvo priskirtos ribinės vertės, kurios rodiklius padėjo suskirstyti į skirtingas kategorijas – teigiamą arba neigiamą poveikį išgyvenamumui turinčias vertes.

Navikinio audinio stromoje apskaičiuotas CD8+ limfocitų tankis, didesnis nei nustatyta 835,7 ląst.sk./mm² ribinė vertė, turėjo blogesnę prognozę pacientų išgyvenamumui (Pav. 1). Suskirsčius tiriamuosius į dvi grupes, turinčias didesnę arba mažesnę CD8+ limfocitų tankį navikinio audinio stromoje pagal nustatytą ribinę vertę (835,7 ląst.sk./mm²), paaiškėjo, kad tiriamųjų, su didesniu CD8+ ląstelių tankiu šioje srityje, išgyvenamumo mediana siekė 33,5 mėn., kai tuo tarpu su mažesniu CD8+ ląstelių tankiu – 66,5 mėn.

Apskaičiavus CD8+ limfocitų vertes perineoplastinėje kepenų parenchimoje, rasta, kad CD8+ ląstelių tankis > 366,2 ląst.sk./mm² epitelyje (Pav. 2) bei tankis > 1053 ląst.sk./mm² stromoje (Pav. 3) buvo blogesnio išgyvenamumo rodikliai. Palyginus didesnio ir mažesnio CD8+ limfocitų tankio grupes (suskirstytas pagal ribines vertes: 366,2 ląst.sk./mm² epitelyje bei 1053 ląst.sk./mm² stromoje), rasta, kad tiriamųjų, su didesniu CD8+ ląstelių tankiu perineoplastinės kepenų parenchimos epitelyje ir stromoje, išgyvenamumo mediana siekė 40 mėn. ir 45 mėn. atitinkamai, kai su mažesniu CD8+ ląstelių tankiu – 66,5 mėn. ir 68 mėn. atitinkamai.

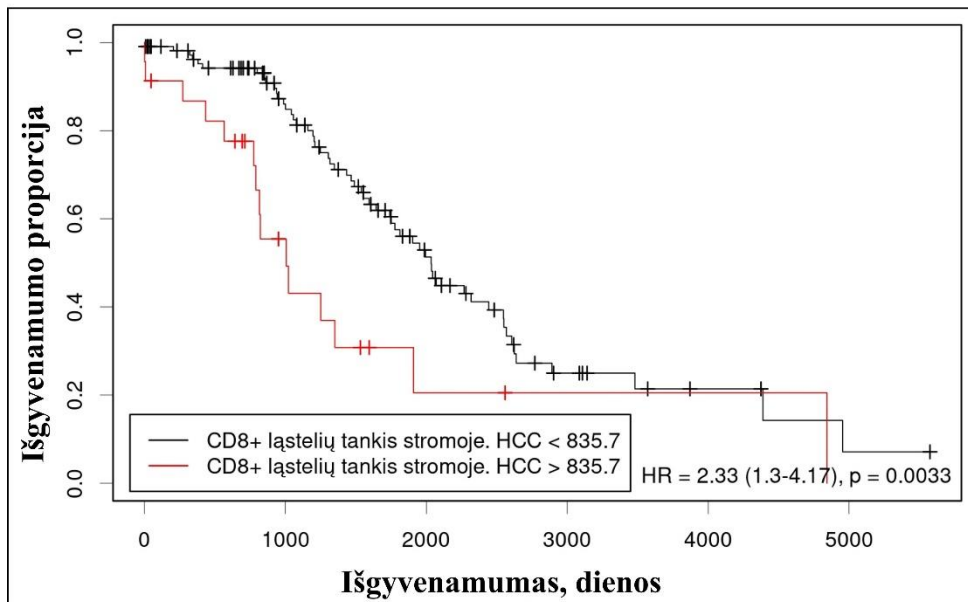
Kohortos išgyvenamumą lemiančios statistiškai reikšmingos CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių ribinės vertės, rizikos santykiai, pasikliautiniai intervalai ir p reikšmės, pateikiami 7 lentelėje.

CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių įtaka visos kohortos pacientų išgyvenamumui pavaizduota grafiškai *Kaplan-Meier* metodu kartu su *Log-rank* testu paveiksluose (1 – 3).

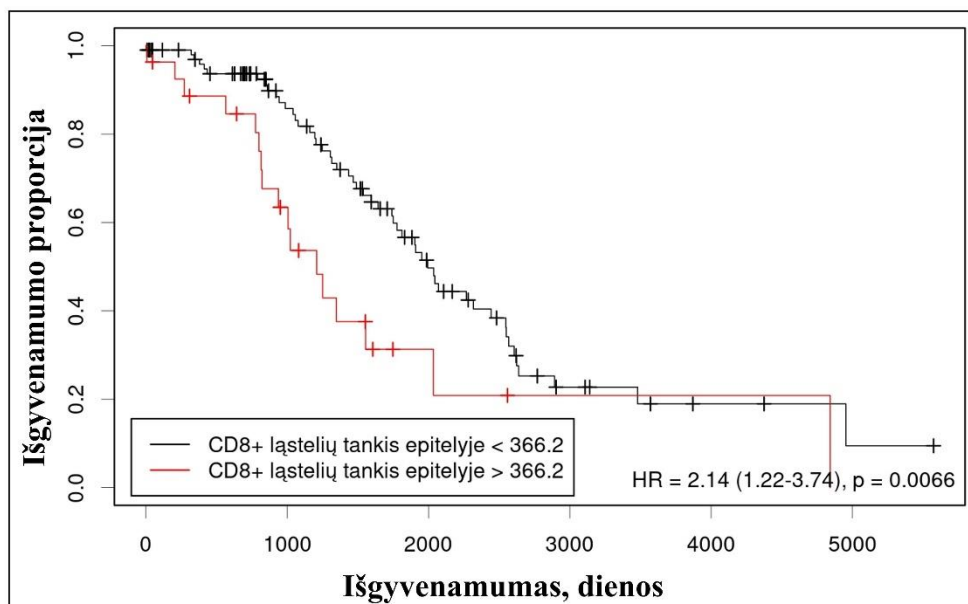
Lentelė 7. Kohortos išgyvenamumą lemiančios statistiškai reikšmingos CD8+ limfocitų tankio charakteristikos.

	Ribinė vertė	Rizikos santykis	95% PI*	p - reikšmė
Navikinis audinys (HCC)				
CD8+ ląstelių tankis stromoje, ląstelių skaičius/mm ²	835.7	2.33	1.30-4.17	p = 0.003
Aplinkinė kepenų parenchima				
CD8+ ląstelių tankis epitelyje, ląstelių skaičius/mm ²	366.2	2.14	1.22-3.74	p = 0.007
CD8+ ląstelių tankis stromoje, ląstelių skaičius/mm ²	1053	1.8	1.09-2.97	p = 0.020

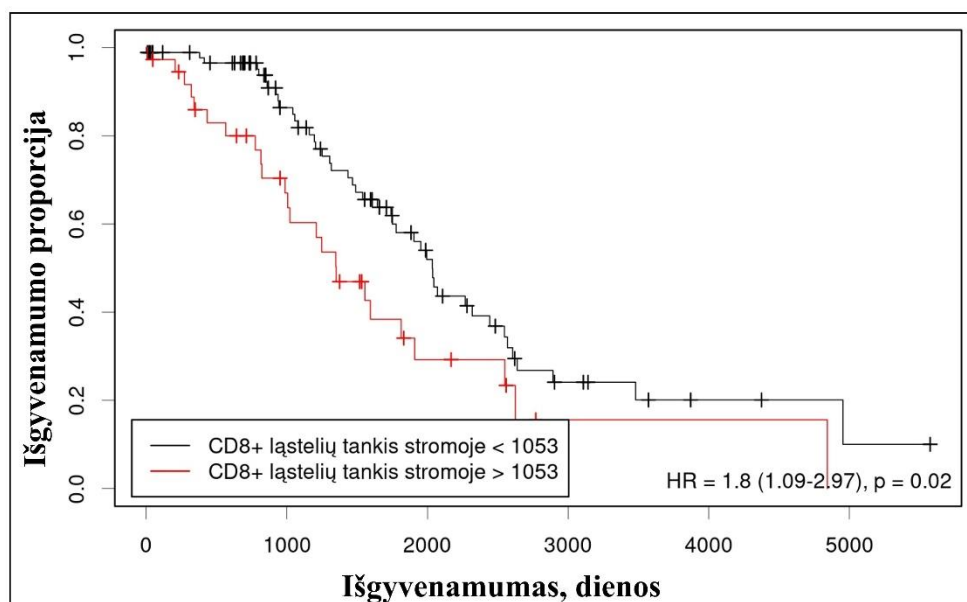
*95 % pasikliautinieji intervalai.



Pav. 1. CD8+ limfocitų tankio navikinio audinio stromoje įtaka tiriamos kohortos išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.



Pav. 2. CD8+ limfocitų tankio aplinkinės kepenų parenchimos epitelyje įtaka tiriamos kohortos išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.



Pav. 3. CD8+ limfocitų tankio aplinkinės kepenų parenchimos stromoje įtaka tiriamos kohortos išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.

1.5. CD8+ limfocitų įtaka išgyvenamumui tiriamųjų grupių viduje

Tiriant CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių įtaką transplantuotų pacientų išgyvenamumui statistiškai patikimų rezultatų rasta nebuvo.

Pacientų po kepenų rezekcijos operacijos grupės viduje, buvo rasti statistiškai patikimi rezultatai. CD8+ limfocitų tankis, didesnis nei nustatyta 44,54 ląst.sk./mm² ribinė vertė, navikinio audinio epitelyje buvo susijęs su geresne išgyvenamumo prognoze (Pav. 4). Navikinio audinio stromoje CD8+ limfocitų tankis, didesnis nei nustatyta 874,9 ląst.sk./mm² ribinė vertė, buvo blogesnės prognostinės reikšmės rodiklis (Pav. 5). Atitinkamai suskirsčius tiriamuosius į dvi grupes pagal CD8+ limfocitų tankio navikinio audinio epitelyje ribinę vertę (44,54 ląst.sk./mm²), didesnis CD8+ ląstelių tankis parodė geresnį tiriamųjų išgyvenamumą – išgyvenamumo mediana siekė 63,5 mėn., palyginus su 41,5 mėn., mažesnio CD8+ limfocitų tankio grupėje. Priešingas rezultatas gautas lyginant skirtingo CD8+ limfocitų tankio navikinio audinio stromoje grupes (pagal ribinę vertę 874,9 ląst.sk./mm²) – išgyvenamumo mediana siekė 33,5 mėn. didelio ir 58 mėn. mažo tankio grupėje.

Perineoplastinio audinio epitelyje CD8+ ląstelių tankis > 366,2 ląst.sk./mm² nurodė blogesnę išgyvenamumo prognozę (Pav. 6). Didelio CD8+ ląstelių tankio šioje srityje grupėje (didesnio nei 366,2 ląst.sk./mm² nustatyta ribinė vertė) išgyvenamumo mediana siekė 34 mėn., palyginti su mažo tankio grupėje – 60,5 mėn.

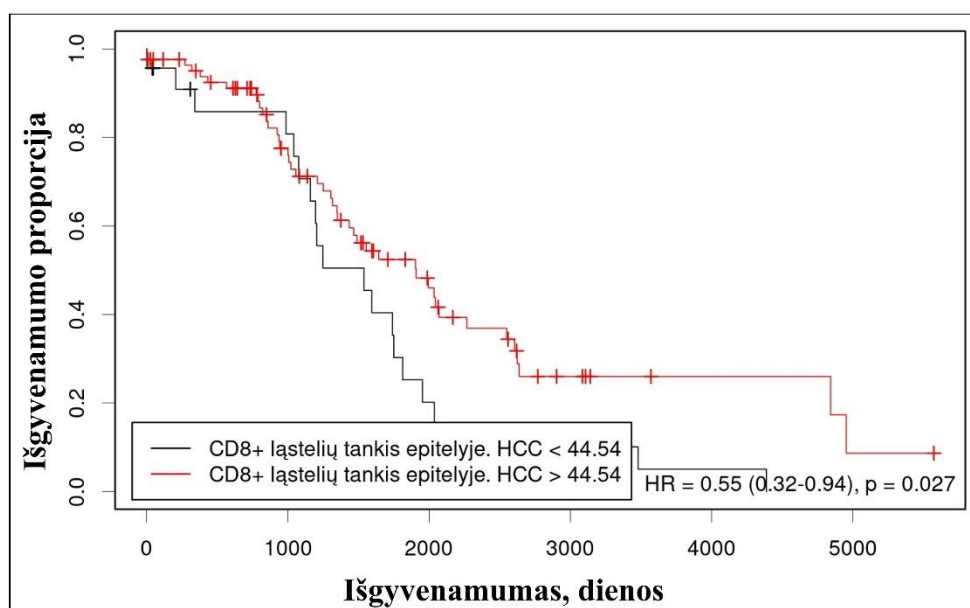
Rezektuotų pacientų grupės išgyvenamumą lemiančios statistiškai reikšmingos CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių ribinės vertės, rizikos santykiai, pasikliautiniai intervalai ir *p* reikšmės, pateikiami 8 lentelėje.

CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių įtaka rezekuotų pacientų išgyvenamumui pavaizduota grafiškai *Kaplan-Meier* metodu kartu su *Log-rank* testu paveiksluose (4 – 6).

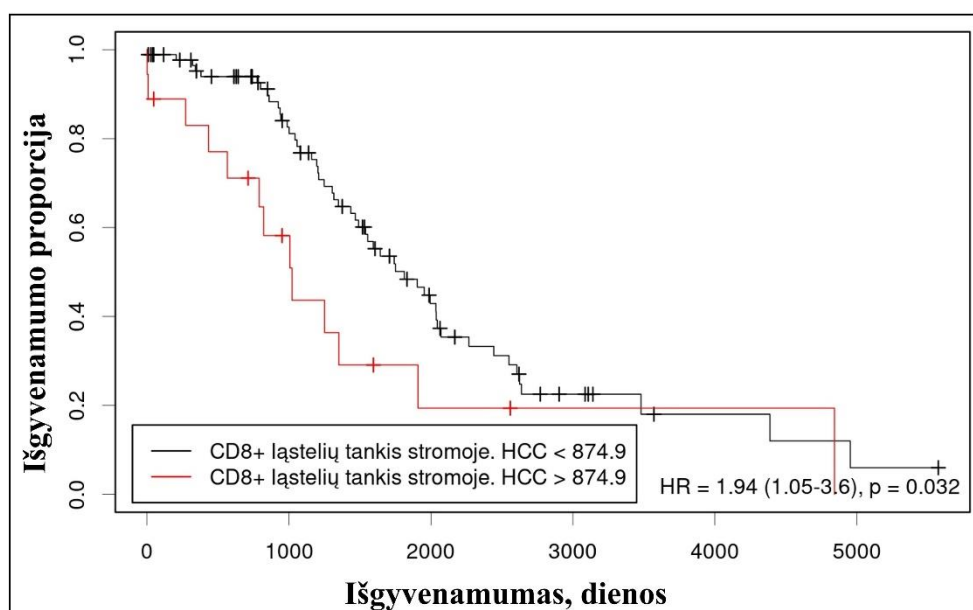
Lentelė 8. Rezekuotų pacientų išgyvenamumą lemiančios statistiškai reikšmingos CD8+ limfocitų tankio charakteristikos.

	Ribinė vertė	Rizikos santykis	95% PI*	p - reikšmė
Navikinis audinys (HCC)				
CD8+ ląstelių tankis epitelyje, ląstelių skaičius/mm ²	44.54	0.55	0.32-0.94	p = 0.027
CD8+ ląstelių tankis stromoje, ląstelių skaičius/mm ²	874.90	1.94	1.05-3.60	p = 0.032
Aplinkinė kepenų parenchima				
CD8+ ląstelių tankis epitelyje, ląstelių skaičius/mm ²	366.20	1.97	1.09-3.49	p = 0.021

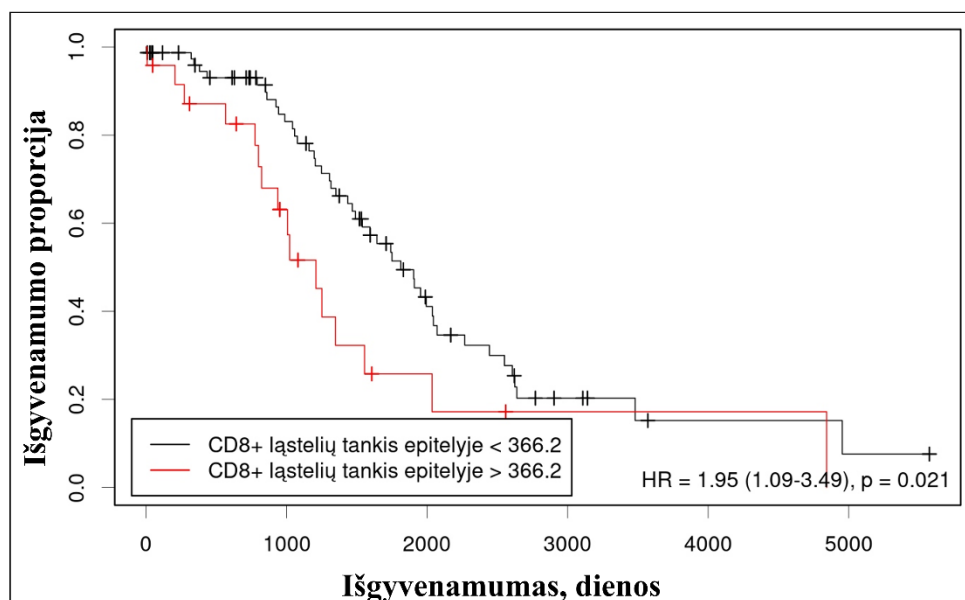
*95 % pasikliautinieji intervalai.



Pav. 4. CD8+ limfocitų tankio navikinio audinio epitelyje įtaka rezekuotų pacientų grupės išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.



Pav. 5. CD8+ limfocitų tankio navikinio audinio stromoje įtaka rezekuotų pacientų grupės išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.



Pav. 6. CD8+ limfocitų tankio aplinkinės kepenų parenchimos epitelyje įtaka rezekuotų pacientų grupės išgyvenamumui. HR – rizikos santykis, skliausteliuose nurodytas 95 % pasikliautinis intervalas.

REZULTATŲ APTARIMAS

Šio retrospektyvinio tyrimo imtį sudarė 134 pacientai, kuriems, dėl hepatoceliulinės karcinomos, 2007 – 2020 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose buvo atlikta kepenų transplantacija (28 pacientai) arba dalinė kepenų rezekcija (106 pacientai).

Rezekuotų pacientų grupę sudarė statistiškai reikšmingai vyresni pacientai, jų amžiaus vidurkis buvo 64 m., o transplantuotų pacientų – 52,5 m. Abejose lyginamose grupėse vyrų ir moterų lyčių pasiskirstymas statistiškai reikšmingai nesiskyrė, abejose grupėse vyravo vyriška lytis. Lyčių pasiskirstymas kohortoje ir pacientų amžius rezekuotų pacientų grupės viduje atitiko literatūroje aprašomus duomenis (20), o tiriamų transplantuotų pacientų amžius buvo jaunesnis, nei literatūroje pateikiamas 58,5 – 62 m. amžius (20,21).

Patologinių parametrų palyginimas parodė, kad rezekuotų pacientų grupėje statistiškai reikšmingai dažniau nustatyti blogesnio diferenciacijos laipsnio, didesnio diametro ir su jau esančia kepenų kraujagysline invazija navikai, nei transplantuotų pacientų tarpe. Atliktų kepenų transplantacijos ir rezekcijos dėl HCC lyginamųjų analizių duomenimis, kaip ir tiriamojoje kohortoje, tarp rezekuotų pacientų dažniau nustatomi blogesnės diferenciacijos (22) ir didesnio diametro navikai (20), o intravaskulinė invazija, skirtingai nei tirtoje kohortoje, dažniau stebima transplantuotų pacientų tarpe (22).

Tiriamos kohortos išgyvenamumo rodikliai buvo stebėti nuo operacijos datos iki paskutinės užfiksuotos paciento sekimo arba mirties datos. Kohortos maksimalus sekimo laikotarpis siekė 186 mėnesius, nors tiriamų grupių išgyvenamumas per šį laikotarpį statistiškai

reikšmingai nesiskyrė (rezekuotų pacientų grupėje vidutinis išgyvenamumas siekė 48, o transplantuotų – 53 mėnesius), stebėtas didesnis mirčių skaičius po atliktos rezekcijos operacijos, nei po transplantacijos. Per stebėjimo laikotarpį rezekuotų pacientų išgyvenamumas siekė 40 %, o transplantuotų – 75 %. Tyrime nustatyti išgyvenamumo procentai rezekuotų pacientų tarpe skyrėsi nuo literatūroje aprašomo optimistinio 5 metų išgyvenamumo, siekiančio 50 – 68 %, o transplantuotų tarpe sutapo su literatūroje aprašomu 4 – 5 metų išgyvenamumu, siekiančiu 61 – 75 % (5). Kita vertus, atlikto tyrimo rezultatai gali būti prilyginami panašaus pobūdžio studijai, kurioje išgyvenamumas po transplantacijos siekė 75,8 %, o po kepenų rezekcijos – 40,5 % (23).

Pirmą kartą diagnozuotos HCC gydymas, lyginant su recidyvo gydymu operacijos metu buvo statistiškai reikšmingai dažnesnis tarp pacientų, kuriems taikyta kepenų rezekcijos operacija. Straipsniai, pateikiantys duomenis apie pirmąkart nustatytą ar po atkryčio gydomų navikų statistiką, stebi panašią tendenciją, kuomet planuojamų transplantuoti pacientų tarpe dažiau yra taikomos intervencijos, norint sunaikinti arba sumažinti jau egzistuojantį naviką prieš planuojamą transplantaciją (20). Tuo tarpu tokios procedūros prieš rezekcijos operaciją taikomos rečiau ir dažniau rezekuojamas pirmą kartą nustatytas navikas (20).

Per stebėjimo laikotarpį užfiksuotas statistiškai reikšmingai mažesnis HCC atkryčių procentas transplantuotų pacientų grupėje, nei tarp rezekuotų (4% palyginti su 53%). Kohortoje fiksuoti atkryčiai gali būti sulyginami su literatūroje aprašomu HCC pasikartojimo dažniu 5 metų laikotarpyje tarp rezekuotų pacientų, kuris siekia apie 50–70%, ir tarp transplantuotų, kuris siekis – 17 %. Lyginant tyrimo metu užfiksuotų HCC recidyvų dažnį su panašaus pobūdžio publikacijų rezultatais, rasta studija, kuri per panašų pacientų sekimo laikotarpį užfiksavo beveik identišką HCC atkryčio procentą tarp transplantuotų pacientų – 3,6 %, o tarp rezekuotų, kiek mažesni – 36,8 procentą (20). Tuo pačiu, lyginami chirurginiai metodai skiriasi savo apimtimi ir nuo to priklausančia rizika. Kepenų transplantacija sumažina pasikartojimo dažnį, siūlydama didžiausią įmanomą naviko rezekcijos ribą, kartu pašalinant ligos pažeistas kepenis (7). Dėl pažangos chirurgijos srityje, pooperacinio valdymo ir multimodalinio gydymo strategijų kūrimo pagerėjo ir rezekuotų pacientų rezultatai. Tačiau, pažymima, kad po dalinės kepenų rezekcijos likutinėse kepenyse gali atsirasti intrahepatinės metastazės, be to, tokios kepenys gali būti imlesnės *de novo* mutacijoms (7).

Remiantis operacijos protokolo ir hospitalizacijos duomenimis, lyginant su rezekcijos operacija, transplantacija truko reikšmingai ilgesnį laiką, procedūros metu netekta daugiau kraujo, o vidutinis pooperacinių lovadienių skaičius daugiau nei dvigubai lenkė rezekuotų pacientų lovadinius. Šiuos radinius galima sieti su skirtingu šių chirurginių metodų sudėtingumu, apimtimi, pooperacinių komplikacijų dažniu ir sveikimo laikotarpiu (24).

Norint palyginti rezekuotų ir transplantuotų pacientų kraujo laboratorinių rodiklių pokyčius laike, buvo atskirai palygintos paskutinių prieš operaciją, iškart po operacijos ir paskutinio sekimo metu atliktų kraujo laboratorinių tyrimų vertės.

Remiantis priešoperaciniais laboratoriniais tyrimais, transplantuotų tiriamųjų kepenų funkcija buvo statistiškai reikšmingai prastesnė, nei rezekuotų. Transplantuotų pacientų labiau sutrikusią kepenų sintetinę funkciją nurodė prailgėjęs ADTL, INR bei mažesnis albumino kiekis. Didesnę hepatocitų ir kepenų parenchimos pažaidą transplantuotųjų grupėje indikavo aukštesnės bendro bilirubino ir AST vertės. Aukštesnis cholestazės rodiklis, ŠF, ir stebėta trombocitopenija nurodė labiau pažengusią kepenų ligą transplantuotų pacientų tarpe. Palyginti tiriamos kohortos grupių priešoperaciniai rodikliai nurodė, kad kepenų rezekcija atliekama pacientams, kurių kepenų funkcija yra geresnė, nei tų pacientų, kuriems numatoma transplantacija. Gauti rezultatai atitinka literatūroje aprašomą chirurginio metodo pasirinkimo taktiką, paremtą priešoperacine kepenų funkcija, kuomet gera kepenų funkcija laikoma indikacija rezekcijos metodo pasirinkimui (25).

Lyginant pooperacinius laboratorinius rodiklius, rasta, kad transplantuotų pacientų grupėje ADTL, INR, AST, ALT, GGT, bendras bilirubinas ir CRB turėjo statistiškai reikšmingai aukštesnes, o albuminas ir trombocitų skaičius žemesnes vertes, nei rezekuotų tiriamųjų grupėje. Literatūroje, pooperaciniu laikotarpiu neįprastai aukščiau normos ribų esantys kepenų tyrimų rezultatai, uždegiminiai rodikliai ir prastesnė kepenų sintetinė funkcija paaiškinami kepenų transplantaciją lydiniu išemijos ir reperfuzijos pažeidimu, tačiau pažymima, kad paprastai šie pokyčiai išnyksta per pirmąją savaitę po operacijos (26).

Analizuojant paskutinio sekimo metu užfiksuotas laboratorinių tyrimų vertes, transplantuotų pacientų tarpe stebėta žemesnių kepenų funkcijos rodiklių (AST, ALT, GGT, bendras bilirubinas) tendencija, nei tarp pacientų po kepenų rezekcijos. Toks laboratorinių verčių pasikeitimas tarp grupių galėjo būti sąlygotas to, kad pacientams po kepenų rezekcijos buvo stebimas dažnesnis ligos progresavimas, o transplantuotų tarpe, nepaisant ankstyvų mirčių dėl transplantato atmetimo, pašalinus visas ligos pažeistas kepenis – recidyvavimo procentas buvo mažas, o kepenų funkcija atstatyta, kas sutampa su literatūroje aptiktais duomenimis (7).

Lyginant CD8⁺ limfocitų pasiskirstymo rodiklius tarp tiriamųjų grupių, tiek navikiniame audinyje, tiek aplinkinėje kepenų parenchimoje CD8⁺ limfocitų tankis buvo statistiškai reikšmingai didesnis rezekuotų pacientų tarpe, nei transplantuotų. Gauti rezultatai gali būti paaiškinti išsekusia transplantuotų pacientų kepenų funkcija prieš operaciją, lyginant su rezekuotų pacientų kepenimis. Literatūroje aprašoma, kad pažeista kepenų funkcija ir pažengusi kepenų ligos stadija gali sąlygoti labiau imunosupresuotą ir išsekusią HCC mikroaplinką (12).

Pasitelkus apskaičiuotas ribines vertes ir CD8⁺ limfocitų pasiskirstymo rodiklius padalinus į teigiamą arba neigiamą poveikį išgyvenamumui turinčias kategorijas, buvo rasta, kad

didesnis CD8+ limfocitų tankis navikinio audinio stromoje bei perineoplastinės kepenų parenchimos epitelyje ir stromoje turėjo blogesnę prognostinę reikšmę visos kohortos pacientų išgyvenamumui. Pacientų, su didesniu CD8+ ląstelių tankiu minėtose srityse, išgyvenamumo mediana siekė 33,5 mėn., 40 mėn. ir 45 mėn. atitinkamai, kai tuo tarpu su mažesniu CD8+ ląstelių tankiu – 66,5 mėn., 66,5 mėn. ir 68 mėn. atitinkamai. Tyrimo metu rasti rezultatai patvirtina CD8+ limfocitų išsidėstymo svarbą išgyvenamumo prognozės nustatymui. Kaip buvo aptarta įvado dalyje, CD8+ limfocitai gali sukelti žalingą poveikį aplinkinei kepenų parenchimai, skatinant imuninį atsaką prieš kepenų patologiją sukėlusį etiologinį veiksni (14). Pasak šaltinių, tiriant CD8+ ląstelių prognostinę reikšmę su hepatitu C susijusiai HCC, buvo nustatyta, kad didesnis CD8+ ląstelių tankis aplinkinėje cirotinių kepenų parenchimoje buvo siejamas su uždegiminiu atsaku, kuris gali prisidėti prie karcinogenezės ir blogesnės pacientų prognozės (27). Nors aktyvuoti CD8+ T limfocitai vaidina svarbų vaidmenį HCC patogenezėje, dėl gebėjimo atpažinti ir citotoksiškai veikti navikines ląsteles, savo ruožtu HCC ląstelės taip pat gali sukelti CD8+ ląstelių disfunkciją (12). Šiuo CD8+ ląstelių išsekimo fenomenu gali būti paaiškinta, kodėl didesnis CD8+ limfocitų tankis naviko stromoje galėjo neturėti apsauginio poveikio tirtose kohortose. CD8+ limfocitų disfunkcijai ir išsekimui yra būdinga imunomoduliuojančių molekulių, pavyzdžiui, PD-1, TGF- β , ekspresija, kurios slopina CD8+ T limfocitų aktyvaciją (12). Dėl nuolatinio slopinimo naviko mikroaplinkoje gali rasti CD8+ limfocitai, negebantys naikinti navikinių ląstelių (12).

Tiriant CD8+ limfocitų pasiskirstymo rodiklių įtaką išgyvenamumui pacientų grupių viduje, statistiškai patikimi rezultatai rasti tik rezekuotų pacientų grupėje. Didesnis CD8+ limfocitų tankis navikinio audinio epitelyje buvo susijęs su geresne išgyvenamumo prognoze, kuomet didesnę CD8+ ląstelių tankį turinčių rezekuotų pacientų išgyvenamumo mediana siekė 63,5 mėn., palyginus su 41,5 mėn. mažesnio CD8+ limfocitų tankio grupėje. Priešingai, didesnis CD8+ limfocitų tankis navikinio ir perineoplastinio audinio stromoje buvo susijęs su blogesne prognoze – didelį CD8+ ląstelių tankį turinčiose rezekuotų pacientų grupėse išgyvenamumo mediana siekė 33,5 mėn. (navikinio audinio stromoje) ir 34 mėn. (perineoplastinio audinio stromoje), o mažą tankį turinčiose grupėse – 58 mėn. (navikinio audinio stromoje) ir 60,5 mėn. (perineoplastinio audinio stromoje). Rezekuotų pacientų grupėje gauti rezultatai dar kartą įrodo, CD8+ limfocitų erdvinio išsidėstymo svarbą ir atitinka literatūroje aprašomo didelio CD8+ ląstelių tankio HCC centre arba naviko pakraštyje sąsają su geresniu bendru išgyvenamumu (13,28). Šie duomenys įrodo, kad CD8+ limfocitai, esantys navikinio audinio epitelyje, veikia kaip priešnavikinio atsako ląstelės (11,12). Kiti grupės viduje rasti rezultatai sutampa su visoje kohortoje rastais duomenimis ir CD8+ pasiskirstymo prognostine reikšme.

IŠVADOS

1. Lyginant demografinius, klinikopatologinius ir kraujo laboratorinių tyrimų duomenis tarp pacientų, kuriems buvo atlikta kepenų transplantacija arba rezekcija dėl hepatoceliulinės karcinomos, nustatyta, kad:

- rezekuotų pacientų grupėje tiriamieji buvo statistiškai reikšmingai vyresni, dažniau gydyti dėl pirmą kartą diagnozuotos hepatoceliulinės karcinomos, turėjo trumpesnį išgyvenamumą ir dažnesnius naviko atkryčius, lyginant su transplantuotais pacientais.
- patologinio tyrimo metu buvo statistiškai reikšmingai dažniau nustatomi blogesnės diferenciacijos, didesnio diametro ar su jau esančia kepenų kraujagysline invazija navikai rezekuotų pacientų tarpe, lyginant su transplantuotų pacientų ėminiais.
- lyginant kraujo laboratorinių rodiklių pokyčius laike, priešoperaciniai ir iškart po operacijos atlikti tyrimai parodė statistiškai reikšmingai prastesnę, o paskutinio sekimo metu geresnę kepenų funkciją transplantuotų pacientų grupėje, lyginant su pacientais po rezekcijos.

2. Lyginant CD8⁺ limfocitų pasiskirstymo rodiklius tarp tiriamųjų grupių, CD8⁺ limfocitų kiekis tiek navikiniame audinyje, tiek aplinkinėje kepenų parenchimoje buvo statistiškai reikšmingai didesnis rezekuotų pacientų tarpe, nei transplantuotų.

3. Didesnis CD8⁺ limfocitų tankis navikinio audinio stromoje bei perineoplastinės kepenų parenchimos epitelyje ir stromoje turėjo blogesnę prognostinę reikšmę visos kohortos pacientų išgyvenamumui. Didesnis CD8⁺ limfocitų tankis navikinio audinio epitelyje buvo susijęs su geresne, o navikinio ir perineoplastinio audinio stromoje – su blogesne išgyvenamumo prognoze rezekuotų pacientų grupėje.

PASIŪLYMAI

1. CD8⁺ limfocitų tankio ir erdvinio išsidėstymo rodikliai galėtų būti panaudojami klinikinėje praktikoje, norint įvertinti paciento išgyvenamumo prognozę po atliktos kepenų rezekcijos ar transplantacijos dėl hepatoceliulinės karcinomos.

2. Reikalingas detalesnis CD8⁺ limfocitų pasiskirstymo tyrimas, sąsajoje su kitais klinikopatologiniais ir laboratoriniais kraujo rodikliais, norint tiksliau prognozuoti pacientų išgyvenamumą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. Vol. 73, Hepatology. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 4–13.
2. Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, Sarkar D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res.* 2021 Jan 1;149:1–61.
3. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2019 Jan 1;156(2):477-491.e1.
4. Wu L, Swan P, McCall J, Gane E, Holden A, Merrilees S, et al. Intention-to-treat analysis of liver transplantation, resection and thermal ablation for hepatocellular carcinoma in a single centre. *HPB.* 2018 Oct 1;20(10):966–76.
5. Sugawara Y, Hibi T. Surgical Treatment Of Hepatocellular Carcinoma. *Biosci Trends.* 2021;15(3):138–41.
6. Zhang K, Chen R, Gong X, Gao Y. Survival outcomes of liver transplantation versus liver resection among patients with hepatocellular carcinoma: A SEER-based longitudinal study. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2019 Apr 1;118(4):790–6.
7. Beumer BR, de Wilde RF, Metselaar HJ, de Man RA, Polak WG, Ijzermans JNM. The treatment effect of liver transplantation versus liver resection for hcc: A review and future perspectives. Vol. 13, *Cancers.* MDPI; 2021.
8. Fu Y, Liu S, Zeng S, Shen H. From bench to bed: The tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. Vol. 38, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* BioMed Central Ltd.; 2019.
9. Schoenberg MB, Li X, Li X, Han Y, Hao J, Miksch RC, et al. The predictive value of tumor infiltrating leukocytes in Hepatocellular Carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology.* 2021 Oct 1;47(10):2561–70.
10. Hsiao YW, Chiu LT, Chen CH, Shih WL, Lu TP. Tumor-Infiltrating Leukocyte Composition and Prognostic Power in Hepatitis B- and Hepatitis C-Related Hepatocellular Carcinomas. *Genes (Basel).* 2019 Aug 20;10(8).
11. Yao W, He JC, Yang Y, Wang JM, Qian YW, Yang T, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Vol. 7, *Scientific Reports.* Nature Publishing Group; 2017.
12. Schoenberg MB, Li X, Li X, Han Y, Börner N, Koch D, et al. The interactions between major immune effector cells and Hepatocellular Carcinoma: A systematic review. Vol. 101, *International Immunopharmacology.* Elsevier B.V.; 2021.

13. Ding W, Xu X, Qian Y, Xue W, Wang Y, Du J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma A meta-analysis. Vol. 97, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018.
14. Singh AK, Kumar R, Pandey AK. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. *Curr Chem Genom Transl Med*. 2018 Jul 10;12(1):9–26.
15. Nam D, Chapiro J, Paradis V, Seraphin TP, Kather JN. Artificial intelligence in liver diseases: Improving diagnostics, prognostics and response prediction. Vol. 4, *JHEP Reports*. Elsevier B.V.; 2022.
16. Angell HK, Bruni D, Barrett JC, Herbst R, Galon J. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clinical Cancer Research*. 2020 Jan 15;26(2):332–9.
17. Rasmusson A, Zilenaite D, Nestarenkaite A, Augulis R, Laurinaviciene A, Ostapenko V, et al. Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection. *American Journal of Pathology*. 2020 Jun 1;190(6):1309–22.
18. Stulpinas R, Zilenaite-Petrulaitiene D, Rasmusson A, Gulla A, Grigonyte A, Strupas K, et al. Prognostic Value of CD8+ Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma and Perineoplastic Parenchyma Assessed by Interface Density Profiles in Liver Resection Samples. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 1;15(2).
19. Budczies J, Klauschen F, Sinn B V., Gyroffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. *PLoS One*. 2012 Dec 14;7(12).
20. Akcam AT, Saritas AG, Ulku A, Rencuzogullari A. Oncological Outcomes of Hepatic Resection vs Transplantation for Localized Hepatocellular Carcinoma. *Transplant Proc*. 2019 May 1;51(4):1147–52.
21. Goldberg D, Mantero A, Newcomb C, Delgado C, Forde KA, Kaplan DE, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma using the LiTES-HCC score. *J Hepatol*. 2021 Jun 1;74(6):1398–406.
22. Li W, Xiao H, Wu H, Xu X, Zhang Y. Liver Transplantation Versus Liver Resection for Stage I and II Hepatocellular Carcinoma: Results of an Instrumental Variable Analysis. *Front Oncol*. 2021 May 26;11.
23. Pinna AD, Yang T, Mazzaferro V, De Carlis L, Zhou J, Roayaie S, et al. Liver Transplantation and Hepatic Resection can Achieve Cure for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg*. 2018 Nov;268(5):868–75.

24. Ahn KS, Kang KJ. Appropriate treatment modality for solitary small hepatocellular carcinoma: Radiofrequency ablation vs. resection vs. transplantation? Vol. 25, *Clinical and Molecular Hepatology*. Korean Association for the Study of the Liver; 2019. p. 354–9.
25. Eilard MS, Naredi P, Helmersson M, Hemmingsson O, Isaksson B, Lindell G, et al. Survival and prognostic factors after transplantation, resection and ablation in a national cohort of early hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2021 Mar 1;23(3):394–403.
26. Henson JB, Muir AJ. Evaluation of an Abnormal Liver Panel After Liver Transplantation. *Clin Liver Dis*. 2023 Feb;27(1):103–15.
27. Ramzan M, Sturm N, Decaens T, Bioulac-Sage P, Bancel B, Merle P, et al. Liver-infiltrating CD8+ lymphocytes as prognostic factor for tumour recurrence in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Liver International*. 2016 Mar 1;36(3):434–44.
28. Gabrielson A, Wu Y, Wang H, Jiang J, Kallakury B, Gatalica Z, et al. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell densities associated with relapse-free survival in HCC. *Cancer Immunol Res*. 2016 May 1;4(5):419–30.

PRIEDAI

Prieduose pridedamos su tiriamuoju darbu susijusių studento mokslinės publikacijos ir tarptautinėse konferencijose bei kongresuose pristatytų mokslinių darbų tezių kopijos, kaip baigiamojo darbo aktualumo įrodymas:

Priedas Nr. 1:

Stulpinas, R.; Zilenaite-Petrulaitiene, D.; Rasmusson, A.; Gulla, A.; Grigonyte, A.; Strupas, K.; Laurinavicius, A. Prognostic Value of CD8+ Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma and Perineoplastic Parenchyma Assessed by Interface Density Profiles in Liver Resection Samples. *Cancers* **2023**, *15*, 366. <https://doi.org/10.3390/cancers15020366>

Priedas Nr. 2:

Agnė Grigonytė, Jovita Patricija Druta, Aistė Kielaitė – Gulla, Rokas Stulpinas, Arvydas Laurinavičius, Kęstutis Strupas, "Case Report: Prognostic Significance of CD8+ Lymphocyte Density in Hepatocellular Carcinoma", 2nd International Medical Students' Conference Surgery in Clinical Practice 2021, 2021.

Priedas Nr. 3:

Agnė Grigonytė, Rokas Stulpinas, Arvydas Laurinavičius, Kęstutis Strupas, Aistė Kielaitė-Gulla, "Association of CD8+ Cell Infiltration and Clinicopathological Parameters in Hepatocellular Carcinoma", 17th Annual Academic Surgical Congress, 2022, Orlando, FL.

Priedas Nr. 4:

Agnė Grigonytė, Rokas Stulpinas, Arvydas Laurinavicius, Kestutis Strupas, Aiste Kielaitė-Gulla, "Characteristics and Outcomes of Patients Undergoing Transplantation vs Hepatic Resection for Hepatocellular Carcinoma", 16th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists, 2022, Bialystok, Poland.

Article

Prognostic Value of CD8+ Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma and Perineoplastic Parenchyma Assessed by Interface Density Profiles in Liver Resection Samples

Rokas Stulpinas ^{1,2,*}, Dovile Zilenaite-Petruaitiene ^{1,2}, Allan Rasmusson ^{1,2}, Aiste Gulla ^{3,4}, Agne Grigonyte ⁵, Kestutis Strupas ³ and Arvydas Laurinavicius ^{1,2}

¹ Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Vilnius University, 03101 Vilnius, Lithuania

² National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Clinics, 08406 Vilnius, Lithuania

³ Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Vilnius University, 03101 Vilnius, Lithuania

⁴ Department of Surgery, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

⁵ Faculty of Medicine, Vilnius University, 03101 Vilnius, Lithuania

* Correspondence: rokas.stulpinas@vpc.lt

Citation: Stulpinas, R.; Zilenaite-Petruaitiene, D.; Rasmusson, A.; Gulla, A.; Grigonyte, A.; Strupas, K.; Laurinavicius, A. Prognostic Value of CD8+ Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma and Perineoplastic Parenchyma Assessed by Interface Density Profiles in Liver Resection Samples. *Cancers* **2023**, *15*, 366. <https://doi.org/10.3390/cancers15020366>

Academic Editors: Elisabetta Ferretti and Marco Tafani

Received: 24 November 2022

Revised: 28 December 2022

Accepted: 4 January 2023

Published: 5 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: In this study, we present the overall survival and recurrence-free survival models based on CD8 profiles in hepatocellular carcinoma (HCC) and peritumoral liver tissue, including other clinical and pathological variables. We extracted CD8 distribution profiles from the digitized immunohistochemistry slides containing the HCC-stroma interface and the perineoplastic liver parenchyma-stroma interface using the computational method of interface zone immunogradient. The prognostic value of the CD8+ cell spatial distribution indicators from both interfaces as well as clinical, laboratory, and pathology data was assessed. A three-tier prognostic scoring system is proposed to predict overall survival in patients with HCC.

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) often emerges in the setting of long-standing inflammatory liver disease. CD8 lymphocytes are involved in both the antitumoral response and hepatocyte damage in the remaining parenchyma. We investigated the dual role of CD8 lymphocytes by assessing density profiles at the interfaces of both HCC and perineoplastic liver parenchyma with surrounding stroma in whole-slide immunohistochemistry images of surgical resection samples. We applied a hexagonal grid-based digital image analysis method to sample the interface zones and compute the CD8 density profiles within them. The prognostic value of the indicators was explored in the context of clinicopathological, peripheral blood testing, and surgery data. Independent predictors of worse OS were a low standard deviation of CD8+ density along the tumor edge, high mean CD8+ density within the epithelial aspect of the perineoplastic liver-stroma interface, longer duration of surgery, a higher level of aspartate transaminase (AST), and a higher basophil count in the peripheral blood. A combined score, derived from these five independent predictors, enabled risk stratification of the patients into three prognostic categories with a 5-year OS probability of 76%, 40%, and 8%. Independent predictors of longer RFS were stage pT1, shorter duration of surgery, larger tumor size, wider tumor-free margin, and higher mean CD8+ density in the epithelial aspect of the tumor-stroma interface. We conclude that (1) our computational models reveal independent and opposite prognostic impacts of CD8+ cell densities at the interfaces of the malignant and non-malignant epithelium interfaces with the surrounding stroma; and (2) together with pathology, surgery, and laboratory data, comprehensive prognostic models can be constructed to predict patient outcomes after liver resection due to HCC.

CASE REPORT: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CD8+ LYMPHOCYTE DENSITY IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Authors: *Agnė Grigonytė*¹, *Jovita Patricija Druta*¹

Scientific research supervisors: *Aistė Kielaitė – Gulla*^{2,3} MD, PhD; *Rokas Stulpinas*^{4,5} MD, PhD candidate; *Arvydas Laurinavičius*^{4,5} MD, PhD; *Kęstutis Strupas*^{2,3}, MD, PhD

¹ *Vilnius University, Faculty of Medicine, Lithuania*

² *Faculty of Medicine, Vilnius University, Institute of Clinical Medicine, Vilnius, Lithuania*

³ *Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Center of Abdominal and Oncology Surgery, Vilnius, Lithuania*

⁴ *National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania*

⁵ *Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University, Vilnius, Lithuania*

Keywords. CD8+ lymphocytes; HCC.

Introduction. The most common form of liver cancer is hepatocellular carcinoma (HCC) and over 90% of its cases occur in a background of chronic liver disease such as cirrhosis caused by chronic HCV infection. Immune tolerance and activation are balancing the anti-tumoral immunity and have an important role in the pathogenesis, progression, and therapy of HCC. CD8+ cells may be a key player in anti-tumoral immunity as multiple studies have shown that high density of CD8+ lymphocytes correlated with better disease-free and overall survival.

Case report. We present 2 patients with chronic HCV infection treated for HCC, further patient A and patient B. Patient A aged 54 underwent surgical liver resection for HCC. 10 months later he presented with intrahepatic HCC metastasis what resulted in additional resection. For patient B aged 72 surgical treatment was performed for HCC. In follow-up examinations 2 months after liver resection, a second HCC nodule was detected. Targeted therapy using sorafenib was initiated for patient B, but had to be discontinued due to further increase in the size of the HCC nodule which was further resected surgically. In follow-up examinations, multiple tumor foci in liver segments, as well as HCC metastasis in the lungs, were found. Palliative treatment was administered following patient B's refusal of surgical treatment. In patient's A case pathological examination of resected liver tissue revealed an increase in CD8+ cell counts in a specimen from the center of the tumor and tumor margin comparing first and second resection, meanwhile, patient's B samples revealed a decrease in density of CD8+ lymphocytes.

Conclusions. High density of CD8+ tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes in the resected samples of HCC might serve as a prognostic biomarker for better outcomes of the disease, but their predictive role in HCC immunotherapy should be further explored.



2022 Abstract
Submissions

ASC20220843

Abstract ID

Title

Association of CD8+ Cell Infiltration and Clinicopathological Parameters in Hepatocellular Carcinoma

Authors
and
Affiliations

Primary Author - **Agnė Grigonytė**, BS, medical student ¹
 Additional Author - **Rokas Stulpinas**, MD ^{2,3}
 Additional Author - **Arvydas Laurinavičius**, MD,Ph.D. ^{2,3}
 Additional Author - **Kęstutis Strupas**, MD,Ph.D. ^{4,5}
 Senior Author - **Aistė Kielaitė-Gulla**, MD,Ph.D. ^{4,5}

1. Vilnius University
Faculty Of Medicine
Vilnius, Lithuania
2. National Center of Pathology
Affiliate Of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos
Vilnius, Lithuania
3. Faculty Of Medicine, Institute Of Biomedical Sciences, Vilnius University
Department Of Pathology, Forensic Medicine And Pharmacology
Vilnius, Lithuania
4. Faculty Of Medicine, Vilnius University
Institute Of Clinical Medicine
Vilnius, Lithuania
5. Vilnius University Hospital Santaros Klinikos
Center Of Abdominal And Oncology Surgery
Vilnius, Lithuania

Classifications

Type	Clinical/Outcomes
Clinical Area	Hepatopancreatobiliary
Scientific Area	Patient-Centered Outcomes

Conflict of
Interest
Declarations

Off Label Use: No

Introduction: A major driving force of local tumor-host tissue interactions are inflammatory and immune cell infiltrates. Understanding the role of CD8+ cells in the immune response against cancer can contribute to an accurate prognosis and a more successful choice of treatment. This study aims to compare the number of CD8+ lymphocytes between HCV-related vs. non-HCV hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore possible associations of CD8+ cell counts with surgical, laboratory, and pathological findings.

Abstract

Methods: CD8+ lymphocytes in a test cohort were visualized by means of immunohistochemistry on HCV-related HCC, non-HCV HCC, and control non-neoplastic liver formalin-fixed paraffin-embedded tissue. CD8+ cells were manually counted at high magnification (400x) in three hot-spots in each of the areas: core tumor center, invasive margin, and surrounding liver tissue.

Results: 62 HCC and 10 control samples were selected from patients who underwent liver resection or transplantation at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos between January 2009 and September 2020. Most of the patients (60%) were males and the median age at the time of operation was 61 years old. 49/62 (79%) HCC samples were associated with HCV infection. There was no significant difference in CD8+ lymphocytes count in the tumor center (HCV-related HCC vs. non-HCV HCC $p < 0.659$), at the invasive margin (HCV-related HCC vs. non-HCV HCC $p = 1$), in surrounding parenchyma (HCV-related HCC vs. non-HCV HCC $p < 0.180$). However, there was a statistical difference between the groups in METAVIR score (HCV-related HCC vs. non-HCV HCC $p < 0.002$) and Ishak score (HCV-related HCC vs. non-HCV HCC $p < 0.003$), most of the cases got a higher score in the HCV-related HCC group in both scoring systems. In surrounding parenchyma, higher numbers of CD8+ lymphocytes were associated with elevated ALT ($p < 0.036$), normal total bilirubin before surgery ($p < 0.001$), resection type of surgery ($p < 0.012$) groups in normal parenchyma; in the invasive margin, with elevated ALT ($p < 0.044$) and AFP ($p < 0.011$) before surgery. The quantity of CD8-positive cells in the center of the tumor strongly correlated with CD8+ cells in the invasive margin ($r = 0.861$, $p < 0.001$).

Conclusion: There was no significant association between the number of CD8-positive lymphocytes in different tissue compartments and other pathological findings or viral status of HCC. Numbers of CD8+ cells correlated in the tumor center and invasive margin compartments and were associated with laboratory values before surgery and resection type of liver surgery. The more advanced approach using digital microscopy image analytics will be further applied to generate comprehensive liver tissue microenvironment indicators of local interactions of cancer and immune cells based on CD8 and other IHC biomarker expression on lymphocytes and various tissue compartments.

Title: CHARACTERISTICS AND OUTCOMES OF PATIENTS UNDERGOING TRANSPLANTATION VS HEPATIC RESECTION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Author(s): Agnė Grigonytė¹, Rokas Stulpinas MD, PhD student^{4,5}, Arvydas Laurinavičius MD, PhD^{4,5}, Kęstutis Strupas MD, PhD^{2,5}

Tutor(s): Aistė Kielaitė-Gulla MD, PhD^{2,3}

Affiliation(s):

¹Vilnius University, Faculty of Medicine, Lithuania

²Faculty of Medicine, Vilnius University, Institute of Clinical Medicine, Vilnius, Lithuania

³Georgetown University Hospital, Department of Surgery, Washington DC, USA

⁴National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania

⁵Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

⁶Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Center of Abdominal and Oncology Surgery, Vilnius, Lithuania

INTRODUCTION: Hepatic resection (HR) and liver transplantation (LT) are the most common curative treatment options for hepatocellular carcinoma (HCC). Still, there are limited data to shed light on what characterizes patients who underwent HR or LT and which type of surgery has better outcomes for HCC.

AIM OF THE STUDY: This study aims to compare the characteristics of patients undergoing LT vs HR for HCC and determine in which group the outcomes are better.

MATERIALS AND METHODS: Clinical, surgical and laboratory data of selected patients with HCC who underwent hepatic resection or liver transplantation at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos between May 2007 and November 2020 were collected. In this correlational study, we used the Wilcoxon rank-sum test, chi-square, and Fischer exact tests of independence to compare HR vs LT.

RESULTS: A total of 136 selected patients who went through HR (n=108) or LT (n=28) were analysed. Most of the patients (75%) were males and the median age at the time of operation was 63 years old. The median survival among the groups was over 40 months and the LT group had significantly better overall survival compared to the HR group (p=0.003), and disease-free survival was also significantly higher in the transplant group (p<0.001). Primary cancer (first time vs recurrence of HCC, p=0.018) and recurrence of this case (p<0.001), were significantly higher in patients who underwent HR compared to LT for HCC. Compared with HR, patients who underwent LT had better laboratory findings such as TBIL, GGT, AST, ALT on the last follow-up (p<0.05).

CONCLUSIONS: There were significant differences between surgical and laboratory findings in liver transplantation vs resection cohorts. Liver transplantation may be associated with better overall and disease-free survival, a non-recurrent tumour and better liver function on the last follow-up.
