

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

DAN GHEBAN

**HEPATOPATII CRONICE LA COPIL
- REZUMAT -**

TEZA DE DOCTORAT

**PENTRU OBTINEREA TITLULUI ȘTIINȚIFIC DE
DOCTOR ÎN ȘTIINȚE MEDICALE
DOMENIUL MEDICINĂ**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROFESOR DR. PETRE FLORESCU**

2009

CUPRINS

Partea I-a – Baze teoretice

1. Dezvoltarea embriologică a ficatului
2. Structura microscopică a ficatului
3. Variante structurale ale ficatului
4. Examenul imunohistochimic al ficatului normal și patologic
5. Examinarea standard a biopsiei hepatice
6. Regenerarea ficatului

Partea II-a – Contribuții personale

1. Studiul creșterii normale a ficatului

- 1.1. Introducere
- 1.2. Analiza proliferării hepatocitare normale la copil prin metoda citometriei în flux
- 1.3. Analiza proliferării hepatocitare normale la copil cu ajutorul regiunilor organizatoare nucleolare
- 1.4. Analiza proliferării hepatocitare normale la copil Cu ajutorul markerului imunohistochimic Ki-67
- 1.5. Analiza apoptozei din ficatul normal de copil cu ajutorul tehnicii de hibridizare *in situ* „TUNEL”
- 1.6. Corelații între studiile efectuate pe ficat normal de copil

2. Hepatita virală cronică la copil în materialul bioptic al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj, pe perioada 1994-2008

- 2.1. Premize teoretice
- 2.2. Material și Metodă
- 2.3. Rezultate și Discuții
- 2.4. Concluzii

3. Particularitățile cirozei hepatice la copil

- 3.1. Premize teoretice
- 3.2. Material și Metodă
- 3.3. Rezultate și Discuții
- 3.4. Concluzii

4. Aplicarea tehnicilor moderne de morfometrie computerizată în studiul cirozei la copil

- 4.1. Morfometria nodulilor și septelor conjunctive
 - 4.1.1. Premize teoretice
 - 4.1.2. Metoda
 - 4.1.3. Material
 - 4.1.4. Rezultate și Discuții
- 4.2. Potențialul reversibil al cirozei copilului – studiu morfometric
 - 4.2.1. Premize teoretice
 - 4.2.2. Scopul
 - 4.2.3. Material și Metodă
 - 4.2.4. Rezultate și Discuții
- 4.3. Concluzii

5. CONCLUZII GENERALE

Cuvinte cheie: *creșterea ficatului, hepatite cronice, ciroze, pronostic, involuția cirozei, copil*

1. STUDIUL CREȘTERII NORMALE A FICATULUI

Scopul acestei lucrări este de a cerceta mecanismul prin care crește ficatul copilului pe perioada copilăriei și adolescenței. În această perioadă ficatul crește de la aproximativ 129,5 gr. la naștere până la aproximativ 1500 gr. la vârsta de 20 ani, după care, greutatea hepatică rămâne aproximativ constantă până la capătul vieții. Din câte cunoaștem noi, un asemenea studiu nu s-a făcut încă pentru nici un organ. Pentru atingerea acestui scop, am urmărit proliferarea hepatocitară utilizând mai multe tehnici, citometria în flux, tehnica AgNOR, imunohistochimia pentru anticorpul Ki-67 (MIB-1) precum și studiul moarții hepatocitare prin apoptoză utilizând marcarea celulelor apoptotice după principiul tehnicii TUNEL. Detaliez în continuare strict studiul ce a comparat proliferarea hepatocitară utilizând indexul de proliferare Ki-67 și apoptoza hepatocitară utilizând indexul apoptotic ApopTag.

Material și Metodă

Pentru atingerea scopului menționat, am luat în studiu un număr de 31 de fragmente hepatice normale, fixate și incluse în parafină, provenite de la copii cu vârsta cuprinsă între 0 și 21 de ani (din materialul Serviciului de Anatomie Patologică a C.H.U Rouen - Franța). Toate aceste fragmente au fost examinate în colorație H.E. pentru precizarea diagnosticului de normalitate histologică. Ulterior toate aceste fragmente au fost marcate cu anticorpul Ki-67, clona MIB-1 (pentru secțiuni la parafină), conform indicațiilor menționate în prospectul produsului livrat de firma DAKO. Un număr de 12 fragmente hepatice din cele 31 luate în studiu au fost marcate și cu kitul ApopTag™ livrat de firma Oncor Inc.®, conform metodei descrise în prospectul produsului. Rezultatele au fost obținute apreciind numărul de celule marcate / 1000 de celule pentru fiecare din cele 3 zone ale lobului hepatic, în final calculându-se media procentuală a celulelor marcate / lobul la fiecare caz în parte.

Rezultate:

Rezultatele obținute în urma aplicării metodologiei prezentate au fost grupate în 6 grupe, în funcție de vârstă și de caracteristicile ritmului de creștere ale perioadei de vârstă menționate. (tabelul nr. 1)

Tabelul nr. 1:

Valoarea indexului de proliferare și a indexului apoptotic în funcție de vârstă:

Grupa de vârstă (ritm de creștere a greutatei corporale)	Index de proliferare (Ki-67)	Index apoptotic (ApopTag™)
0-1 an (500 gr./lună)	0,28	0,04
1-3 ani (125 gr./lună)	0,23	-
3-10 ani (200 gr./lună)	0,1	0,01
10-16 ani (350 gr./lună) (perioada pubertară) ¹	0,53	0,08
16-20 ani (250 gr./lună)	0,21	0,13
> 20 ani (adult)	0,26 ²	0,2

Rezultatele prezentate în tabelul nr. 1 sunt reprezentate grafic în figura nr. 1

¹ a fost ales acest interval pentru a compensa diferențele legate de sex, inerente acestei perioade

² literatura menționează un index de proliferare mediu pentru adulți de $0,22 \pm 1$ (4)

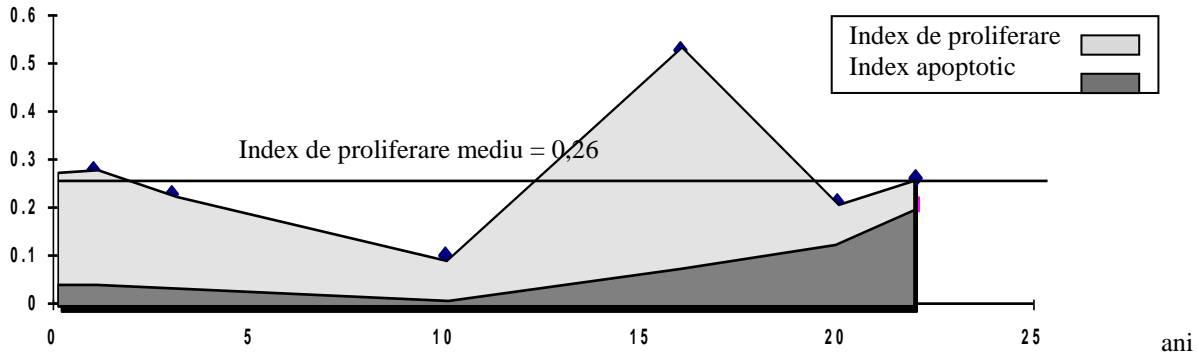


Fig.1: Variația indexului de proliferare și a indexului apoptotic în funcție de vârstă

Discuții:

Valoarea medie a indexului de proliferare hepatocitar obținut pentru perioada 0-20 ani (0,26) este foarte apropiată de cea raportată în literatură pentru vârsta de adult ($0,22 \pm 1$)(4), astfel încât se poate aprecia că valoarea indexului de proliferare a hepatocitelor este aproximativ constantă de-a lungul vieții. Variațiile față de medie ale indexului de proliferare hepatocitar sunt legate de perioada prepubertară și pubertară, fiind direct corelabile cu ritmul general de creștere a organismului în aceste perioade precum și cu profilul secretor al hormonului de creștere (GH) și a IGF-1, în funcție de vârstă.

Analiza repartiției intralobulare a marcajului cu Ki-67, arată o predominanță a activității proliferative în zona I-a (periportală) și zona a II-a (intermediară), distribuție care de altfel a mai fost sesizată în literatură.

Deoarece valoarea medie a indicelui de proliferare hepatocitară are aproximativ aceeași valoare pe perioada copilăriei ca și ulterior în perioada adultă, suntem nevoiți de a considera că creșterea hepatică din perioada copilăriei, nu se datorează unui index de proliferare superior ci unui index apoptotic de aproximativ 10 ori mai scăzut pe perioada copilăriei spre deosebire de perioada adultă. (figura 1). Nivelul aproximativ constant al indexului de proliferare hepatocitară din perioada copilăriei și perioada adultă, obținut cu ajutorul anticorpului Ki-67 (MIB-1), a fost confirmat și de un studiu efectuat cu ajutorul citometriei în flux (date personale nepublicate) precum și de un studiu efectuat cu ajutorul metodei AgNOR.

Actualul studiu a mai putut observa faptul că activitatea proliferativă hepatică nu este un fenomen difuz în masa hepatică ci este un fenomen focal ce interesează doar anumiți lobuli în timp ce restul lobulilor (majoritatea) nu prezintă o activitate proliferativă semnificativă. Acest fenomen de focalitate al activității proliferative este concordant cu noțiunile nou introduse de lobul simplu și lobul complex, precum și cu noțiunile de heterogenitate locală, zonală și regională a ficatului.

Activitatea apoptotică care este foarte slabă în perioada copilăriei are și ea tendința de a de distribuție focală dar mai puțin evidentă. De asemenea aceasta are tendința de a se aglomera în zona a III-a (centrolobulară), fapt de altfel sesizat deja în literatură.

2. HEPATITA VIRALĂ CRONICĂ LA COPIL – ÎN MATERIALUL BIOPTIC AL SPITALULUI CLINIC DE URGENȚĂ PENTRU COPII CLUJ PE PERIOADA 1994 – 2008

Material și Metodă

Am extras din baza de date ce conține toate rezultatele bioptice elaborate de Laborator din 01.01.1994 până în prezent o nouă bază de date, selectivă, conținând doar cazurile de *hepatită cronică* a copilului (virală și nevirală). Această nouă bază de date a fost construită de asemenea manieră încât să permită stabilirea de corelații clinico-etiologicalo-patologice care vor fi prezentate în continuare ca rezultate ale acestei lucrări. Această bază de date este **cea mai mare de acest gen adunată până la ora actuală în România** și permite o semnificativă privire generală a hepatitelor virale la copii din zonă.

Rezultate și Discuții

În perioada 01.01.1994 – 01.01.2009, în Laboratorul de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Copii din Cluj-Napoca, după excluderea biopsiilor albe au fost trimise un număr de **632** de biopsii/puncții biopsii hepatice.

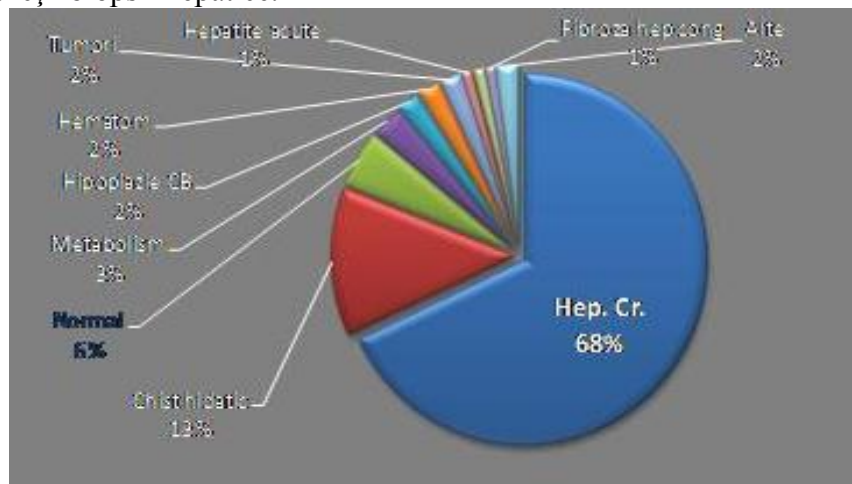


Fig.2: Prevalența diverselor entități patologice întâlnite în cele 632 de PBH/BH examinate în perioada 1994-2008.

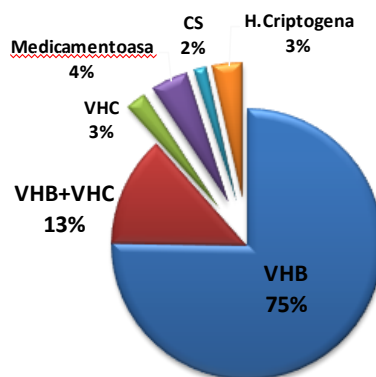


Fig.3. Etiologia celor 430 de hepatite cronice înregistrate

Am analizat separat cazurile care vaccinate fiind după 1996, au fost totuși depistate ca având hepatită cronică cu VHB.

17 cazuri

- Grad mediu = 1,8 (0-4)
 - 11.7% grad 4 (față de 2% în general)
- Stadiu mediu = 2,29 (1-3)
 - 0 ciroze (maxim 12 ani de evoluție)

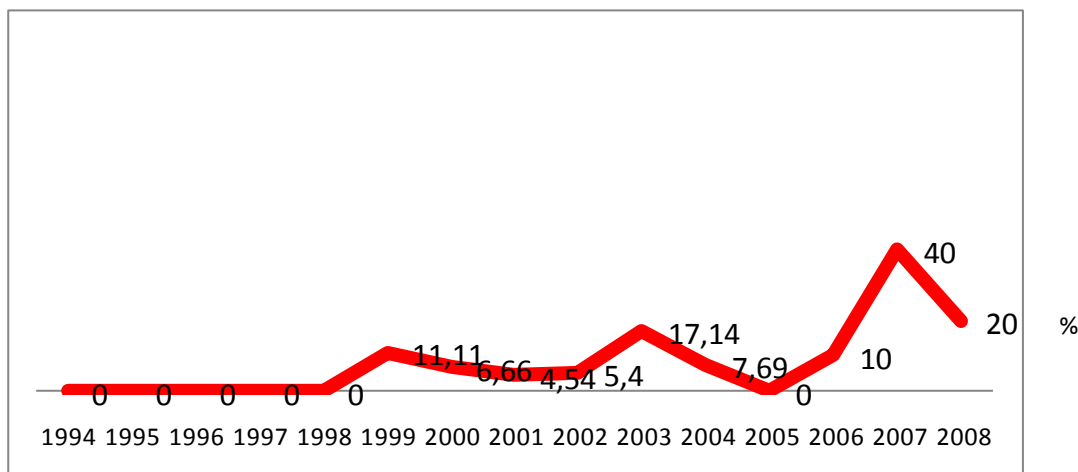


Fig. 4: Hepatita cronică cu VHB la vaccinați

Existența acestor cazuri arată că vaccinarea nu a avut o eficiență de 100%. Deși în genere aceste cazuri au prezentat în principiu o gravitate similară cu a cazurilor nevaccinate, se poate totuși remarca că gradul necroinflamator maxim a fost mult mai des întâlnit la aceste cazuri, sensibilizarea sistemului imun în urma vaccinării având acest efect, dar totuși nici un caz din acest lot, încă restrâns, nu a fost depistat în stadiul de ciroză.

3. PARTICULARITĂȚILE CIROZELOR HEPATICE LA COPIL

Studiu pe materialul autopsic și bioptic al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj

Material și metodă

Acest studiu a fost bazat pe analiza a 2 loturi de cazuri:

- **Lotul 1:** 27 de cazuri de copii decedați cu ciroză și autopsiați
- **Lotul 2:** 136 de cazuri de copii cu ciroză, biopsiați

Rezultate și Discuții

Statistică generală

Lotul 1

Cele 27 de cazuri autopsiate și diagnosticate cu ciroză în Laboratorul de Anatomie patologică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj, pe perioada 1974 – 2008, fac parte din cele 3850 de autopsii efectuate în această perioadă. Cu alte cuvinte, decesul prin ciroză la copil, este un eveniment rar (**0,71%**, adică, în medie **0,8 ciroze decedate/an**).

Lotul 2

Cele 138 de biopsii hepatice diagnosticate cu ciroză, provin de la copii cu vârsta cuprinsă între 1 lună și 17 ani (*medie 8,55 ani, mediana de 10,48 ani*, derivație standard de 10,07).

Etiologia cirozelor

Lotul 1

Etiologia cirozelor întâlnite în cazuistica noastră la copii decedați a fost:

1. *Ciroză postnecrotică/postinfecțioasă/toxică* – 11 cazuri (40%)
2. *Ciroza biliară* – 11 cazuri (40%)
3. *Ciroza metabolică* – 5 cazuri (20%)
4. *Ciroza vasculară* – 0 cazuri
5. *Ciroza criptogenică* – 0 cazuri

Lotul 2:

Etiologia cirozelor întâlnite în cazuistica noastră pe PBH a fost:

1. *Ciroză postnecrotică/postinfecțioasă/toxică* – 100 cazuri (75%)
2. *Ciroza biliară* – 16 cazuri (12%)
3. *Ciroza metabolică* – 7 cazuri (5%)
4. *Ciroza vasculară* – 0 cazuri
5. *Ciroza criptogenică* – 11 cazuri (8%)

4. APLICAREA TEHNICILOR MODERNE DE MORFOMETRIE COMPUTERIZATĂ ÎN STUDIUL CIROZEI LA COPIL

4.1. MORFOMETRIA NODULILOR ȘI SEPTELOR CONJUNCTIVE

4.1.3. Material

Lot de 10 de biopsii hepatice (nu PBH pentru a avea suprafață mare de examinare) sau fragmente hepatice autopsice, de cazuri cu ciroză hepatică. 5 biopsii hepatice cu ciroză, provenite din Spitalul Clinic de Copii Cluj, provin de la cazuri aflate în stare clinică compensată. Alte 5 fragmente hepatice au fost obținute de la autopsii în care cauza decesului a fost ciroza și complicațiile ei, provenite din Spitalul Clinic Județean sau Municipal de Adulți (ciroze avansate decompensate letal).

4.1.4. Rezultate și Discuții

Conform așteptărilor, cazurile provenite de la copii, s-au dovedit în urma măsurărilor micrometrice a fi încadrabile în categoria cirozelor cu septe subțiri și noduli mari.

Cazurile adulte, decedate cu ciroză s-au dovedit a fi încadrabile la cirozele cu septe groase și noduli mici, deși și în acest caz, dimensiunile nodulilor s-au dovedit a fi extrem de variabile.

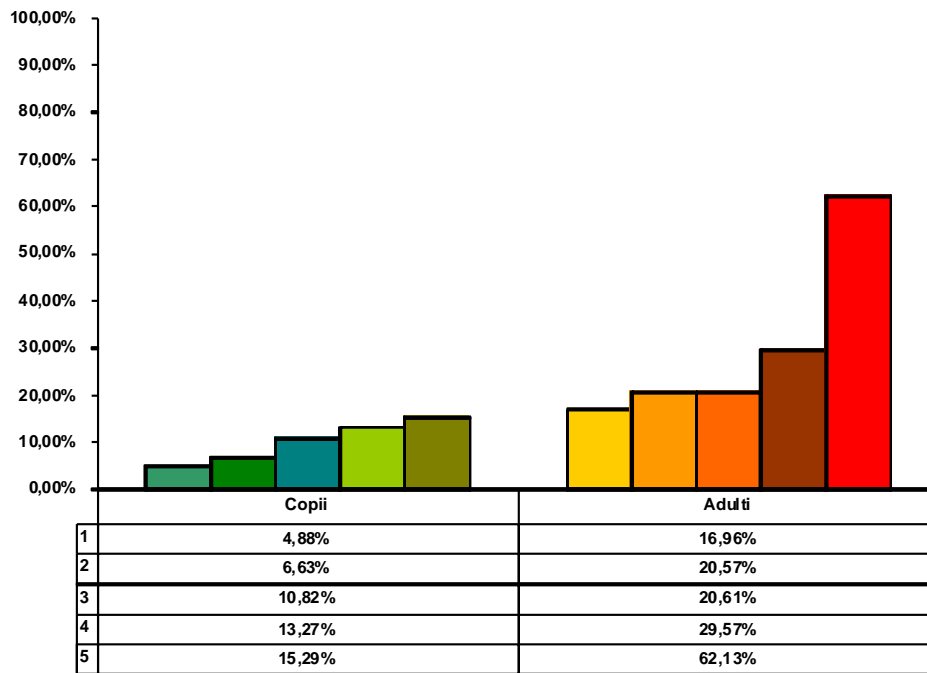


Fig.5: Spectru procentului de fibroză la cele 2 loturi studiate

4.2. POTENȚIALUL REVERSIBIL AL CIROZEI COPILULUI – STUDIU MORFOMETRIC

Scopul

1. Analiza diferențiată a colagenului matur și imatur este aplicată pentru stabilirea vârstei unui țesut conjunctiv fibrilar, cu cât acesta este mai bogat în colagen matur el este mai în vârstă și mai rezistent, dar și mai greu de resorbit în timp ce un țesut conjunctiv tânăr, bogat în colagen imatur este mai elastic, mai puțin rigid și rezistent dar și mai susceptibil de a fi resorbit de organism.
2. Demonstrarea printr-o tehnică cantitativă, de analiză de imagine, a faptului că o ciroză poate fi caracterizată nu doar cantitativ (procent țesut conjunctiv) ci și ca vechime/potențial de reversibilitate, prin banale tehnici histochemice.

Material și Metodă

Pentru atingerea scopului propus am efectuat preparate histologice din BH cu ciroză la adult (presupus bogat în țesut conjunctiv matur) și BH cu ciroză de la copii (presupus bogat în colagen imatur). Prelucrarea acestor piese a fost una standard (fixare, includere în parafină, secționare, colorare, montare) tehnicile de colorație histochemică fiind prezentate în studiul precedent.

Lotul de studiu

A fost același din studiul anterior deoarece pentru fiecare caz în parte era deja cunoscut, din studiul anterior, încadrarea în clasificarea Yale a severității histologice a cirozei.

Rezultate și Discuții

O primă observație, este faptul că **la adult** atât septele groase (preponderente) cât și cele subțiri sunt bogate în colagen matur în timp ce **la copil** cele două tipuri de colagen coexistă în proporții apropiate.

O a doua observație este faptul că în interiorul nodurilor hepatocitari cirofici, colagenul depus în cadrul așa numitei „capilarizări” a sinusoidelor este rezorbabil pentru cazurile infantile aflate în fază clinică compensată (incipientă) și nerezorbabil pentru cazurile adulte aflate în stadiu avansat clinic.

CONCLUZII GENERALE

1. Ficatul de copil este un organ în creștere. El crește datorită unei apoptoze fiziologice reduse și nu datorită unei proliferări celulare mai accentuate, acest aspect făcându-l diferit de ficatul de adult în reacția sa față de agresiuni etiologice diverse.
2. Imaturitatea imună specifică copilului favorizează cronicizarea infecțiilor cu virus hepatitic B și C, dar maturizarea imună postpubertară poate duce la oprirea spontană din evoluție (în orice stadiu fibrotic) a hepatitelor cronice, inclusiv în fază de ciroză.
3. Vaccinarea anti-hepatitică B obligatorie a nou-născuților, introdusă după 1996 a dus la reducerea treptată a prevalenței hepatitei cronice cu VHB la copil.
4. Deși prevalența infecției cronice cu VHC la copil nu a crescut cantitativ semnificativ, prin dispariția treptată a cazurilor infectate cronic cu VHB s-a ajuns la situația aparentei preponderențe a infecției cu VHC în populația infantilă locală, cel puțin pe materialul bioptic studiat de noi.
5. Evoluția până la stadiul de ciroză a hepatitelor cronice este posibilă și la copil (în special la băieți) dar ciroza devine arareori decompensată clinic și cauză de moarte la această categorie de pacienți.
6. Din cauza creșterii hepatice (mai ales în puseul de creștere pubertară), fibroza acumulată prin evoluția inflamației cronice are tendința de a se „dilua” treptat fapt ce permite dispariția cirozei eventual deja instalate în mica copilărie, odată cu creșterea și oprirea spontană din evoluție a cirozei prin maturizarea sistemului imun postpubertară (cel puțin la o parte din pacienți).
7. În plus, țesutul conjunctiv din structura cirozei infantile este imatur fapt ce favorizează resorbția acestuia în timp (în mod special a colagenului dispus în spațiul Disse) și implicit îmbunătățirea capacității funcționale a ficatului cirotic odată cu creșterea copilului.

CURRICULUM VITAE

Nume: GHEBAN

Prenume: Dan

Data și locul nașterii: 25.10.1962, Romania

Studii:

- Liceul de Științe ale Naturii, Cluj-Napoca – 1981
- IMF Cluj-Napoca, Facultatea de MG, Secția Pediatrie – 1988

Titluri academice:

2008- Șef de Lucrări, Catedra de Anatomie Patologică, UMF Cluj-Napoca
1994-2008 Asistent, Catedra de Anatomie Patologică, UMF Cluj-Napoca
1991-1994 Preparador Catedra de Anatomie Patologică, UMF Cluj-Napoca

Experiența profesională:

- 1999 Medic primar anatomopatolog
- 1997-1998 – AFSA, CHU Rouen, Franta
- 1994 Specialist anatomopatolog
- 1988 Medic

Căsătorit, 1 băiat de 19 ani

Articole originale publicate in jurnale ISI – 30:

1. **Normal hepatic growth: Study of the Proliferative Capacity and Apoptosis of the Normal Liver during Childhood; D.Gheban;** *Pediatric and Developmental Pathology* vol.3 pag. 70-72, ianuarie-februarie 2000

Articole originale publicate in jurnale naționale non-ISI

- **55 articole publicate în țară, din care 17 ca prim autor. 13 dintre acestea pe subiect legat de patologia hepatică**
1. Gheban Dan: **Studiul capacității proliferative a ficatului la copil, în condiții normale și patologice cu ajutorul metodei AgNOR**, *Jurnalul Român de Patologie*, vol.1 nr.1, pag.61-63, 1997
 2. Gheban Dan: **Normal Hepatic Growth: Study of the Proliferative Capacity and Apoptosis in the Normal Liver during Childhood**, *Pediatric and Developmental Pathology*, vol.3, pag. 70-72, 2000
 3. Gheban Dan: Adobe Photoshop ca program de analiză de imagine în anatomie patologică, *Jurnalul Roman de Patologie*, vol.8 nr.1/2, 2005
 4. Gheban Dan: **Capilarul sinusoid hepatic și celulele asociate lui**, *Jurnalul Român de Patologie*, nr.1 (vol.1) 1997 pag.32-40

5. Gheban Dan: **Moartea celulelor hepatice**, Jurnalul Român de Patologie, nr.2 (vol.1) 1997, pag. 25-29
6. Gheban Dan: **Fibrogeneza hepatică**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3 (vol.1) 1997, pag.34-43
7. Gheban Dan: **Hepatitele cronice. Aspecte tehnice în examinarea PBH și BH**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3 (vol.1) 1997, pag.90-93
8. Gheban Dan: **Aplicarea tehnicilor de hibridizare în patologie**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 2 (vol.2) august 1998, pag.141-150
9. Gheban Dan: **Matricea extracelulară hepatică**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.2) noiembrie 1998, pag.264-271
10. Gheban Dan: **Microvascularizația ficatului**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.4) decembrie 2000, pag.264-271
11. Gheban Dan: **Ciroza. Reversibilă?**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.4) decembrie 2000
12. Gheban Dan, Florescu Petre: **Regenerarea hepatică la răspântie de concepții**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.6) 2002, pag. 317-324
13. Gheban Dan: **Hepatitele virale cronice ale copilului**, Pediatru.ro, anul III, nr.7/2007, pag.6-14

11 lucrări prezentate în Congrese Internaționale și 34 de lucrări prezentate în Congrese sau Mese Rotunde Naționale

Lista detaliată a lucrărilor de diplomă finalizate îndrumate

1. Marcu Gabriel: "Studiul capacității proliferative a ficatului de copil în condiții normale și patologice, cu ajutorul metodei AgNOR" – 1996
2. Câmpian Simina: "Hepatitele cronice ale copilului" 1998
3. Ioana Șerban: "Tumorile benigne ale glandelor salivare" 1999
4. Sandu Ileana: "Biopsia renală în materialul Laboratorului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Copii, Cluj" 1999
5. Mihaela Leordean: "Diverticolul Meckel" 1999
6. Carceie Simona Alina: "Patologie osoasă netumorală a copilului" 2000
7. Fechete Anamaria: "Patologia osoasă tumorală a copilului" 2000
8. Bunda Radu-Cristian: "Biopsia gastrică și duodenală la copil" 2002
9. Iulia Balbach Tuleu: "Nefropatia asociată VHB" 2004
10. Teodora Paul: "Analiza morfometrică a fibrozei hepatice" 2005
11. Câmpean Teodora Anca: "Ciroza hepatică a copilului în materialul autopsic" 2005
12. Tudor Bucur: "Ciroza hepatică a copilului în materialul bioptic" 2005
13. Neamț Ana-Maria: "Pattern-ul imunohistocolorației antigenelor VHB în hepatita cronică a adultului" 2007
14. Naumenco Adina: "Caracterizarea fibrozei hepatice din ciroză" 2007
15. Ciț Irina: "Cuantificarea cantitativă a colagenului tânăr și vechi cu ajutorul programului Adobe Photoshop, 2006
16. Iulia Duminică: "Corelații morfo-funcționale ale activității Kupfferiene hepatice, 2008

17. Filip Ramona: Tumora cu celulele gigante a osului, 2008
18. Viorica Sireteanu, Studii experimentale de inginerie tisulară: Histopatologia osteogenezei induse, 2009

Limbi străine cunoscute: engleza, franceza

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

DAN GHEBAN

**CHRONIC HEPATOPATHIES IN CHILDREN
- RESUME -**

DOCTORATE THESIS

**FOR ATTAINING THE SCIENTIFIC TITLE OF
DOCTOR IN MEDICAL SCIENCE
MEDICAL SPECIALTY**

**Scientific coordinator:
PROFESSOR DR. PETRE FLORESCU**

2009

CONTENTS

Part 1 – Theoretical structure

7. Embryonic growth of the liver
8. The microscopic structure of the liver
9. Structural variants of the liver
10. Immunohistochemical exam of the normal and pathological liver
11. Standard examination of the hepatic biopsy
12. Liver regeneration

Part 2 – Personal contributions

1. Study of normal liver growth

- 1.1. Introduction
- 1.2. Analysis of normal child hepatocyte proliferation through flux cytometry method
- 1.3. Analysis of normal child hepatocyte proliferation with the help of nuclear organiser regions
- 1.4. Analysis of normal child hepatocyte proliferation with the help of the immunohistochemistry Ki-67 marker
- 1.5. Analysis of normal children liver apoptosis with *in situ* „TUNNEL” hybridisation technique.
- 1.6. Connections between studies made on normal child livers.

2. Chronic viral child hepatitis in the bioptic material at the Children’s Emergency Hospital Cluj, during 1994-2008

- 2.1. Theoretical premises
- 2.2. Method and materials
- 2.3. Results and discussions
- 2.4. Conclusions

3. Particularities of child hepatic cirrhosis

- 3.1. Theoretical premises
- 3.2. Method and materials
- 3.3. Results and discussions
- 3.4. Conclusions

4. Appliance of modern computerized morphometry technique in the computerized study of child cirrhosis

- 4.1. Morphometry of conjunctive nodules and septas
 - 4.1.1. Theoretical premises
 - 4.1.2. Method
 - 4.1.3. Material
 - 4.1.4. Results and discussions
- 4.2. Potential of reversing child cirrhosis – morphometric study
 - 4.2.1. Theoretical premises
 - 4.2.2. Objective
 - 4.2.3. Method and materials
 - 4.2.4. Results and discussions
- 4.3. Conclusions

5. GENERAL CONCLUSIONS

2. STUDY OF NORMAL LIVER GROWTH

The aim of this study consist of researching the mechanism that leads to the child's liver growing through the adolescence. In this period the liver grows from approximately 129.5 gr. at birth to approximately 1.500 gr. at 20 years of age; after that the hepatic weight rests approximately at a constant value till the end of life. We kept track of the hepatocyte proliferation by using Ki-67 antibody (MIB-1) as well as hepatocyte death caused by apoptosis, by marking the apoptotic cells, according to the principle of TUNEL techniques.

Material and Method: We studied 31 normal liver fragments from children aged 0 to 21 years (from the material of the Pathology Department of C.H.U. Rouen - France), formalin fixed and paraffin processed conventionally. All these fragments were examined with hematoxilin and eosin staining to confirm the diagnosis of histologic normality. Sections were then marked with Ki-67 antibody, MIB-1 clona (for paraffined sections), in conformity with the directions written in the booklet of the product by DAKO. 21 liver fragments out of 31 included in the study were also marked with Apoptag™ Kit, by Oncor® Inc., according to the method written in the product booklet. The results were obtained assessing the number of the marked cells / 1,000 cells for each of the 3 zones of the hepatic lobule, finally calculating the percentage average in the marked cells / lobule for each separate case.

Results: The results obtained after performing the presented methodology were divided into 6 groups as a function of age and features of growth rate for the period of mentioned age. (Table 1)

Table 1: Value of the proliferation and apoptotic index as a function of age.

Age Groups (body weight growth rate)	Proliferation index (Ki-67 antibody)	No. cases	Apoptotic index (Apoptag™ Kit)	No. cases	Proliferation/ apoptosis rate
0 - 1 year (500 gr. / month)	0.28	19	0.04	6	7
1 - 3 year (125 gr. / month)	0.23	3	-	-	-
3 - 10 years (200 gr. / month)	0.1	1	0.01	1	10
10 - 16 years; puberty ³ (350 gr. / month)	0.53	5	0.08	2	6.6
16 - 20 years (250 gr. / month)	0.21	2	0.13	2	1.6
> 20 years (adult)	0.26 ⁴	1	0.2	1	1.3

The proliferation/apoptosis ratio as function of age is graphically represented in Fig. 1. Supplementary we have the occasion to observe a predominance of the Ki-67 marking in the 1st and 2nd zone and the predominance of apoptosis in the 3rd zone of the hepatic lobule. An important observation is the fact that the proliferative and apoptotic index are distributed mostly focal in the hepatic mass, these two phenomena being localized, especially at the level of simple lobules predominantly in a subcapsular position.

Discussions: The average value of the proliferation index in the liver obtained for 0-20 years (0.26) is very close to that reported in literature for the adult age (0.22 ± 1). (4) So

³ This interval has been chosen to compensate the differences related to sex

⁴ In the literature(4) the average proliferation index for adults is 0.22 ± 1

one can assess that the index value of hepatocytes proliferation is approximately constant during life. The variation of the proliferative index towards the average value are related to the pre- and puberty periods, connected directly with the general growth rate of the body during these physiological periods as well as with the secretion profile of the growing hormones (GH) and IGF-1, as a function of age.

The analysis of intralobular repartition of Ki-67 marking has shown a predominance of the proliferation activity in the 1st (periportal) and 2nd (intermediary) zones, a distribution that has already been noticed in the literature.

Because the average value of the proliferation index in the liver has shown approximately the same value through out childhood as well as in the adult period, we conclude that hepatic growth during childhood is not due to a high proliferation index but an approximately 10 times lower apoptotic index. Compared with the adult apoptotic index (see figure 1). The approximate constant level of the hepatocyte proliferation index during childhood and adult period obtained with Ki-67 antibody (MIB-1), was also confirmed by a study carried out by flow cytometry (published personal data) as well as by a study utilizing the AgNOR method.

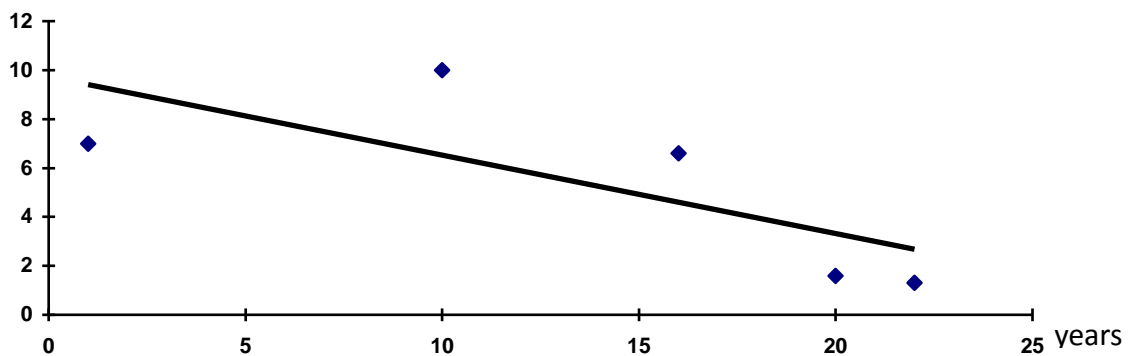


Fig.1: Proliferation / apoptotic ratio as function of age

The present study also found that hepatic proliferation activity is not a diffuse phenomena, but a focal phenomena, which is found only in certain lobules, while the rest of lobules (most of them) do not show significant activity of proliferation. This phenomenon of focal proliferation supports the recently introduced concept of simple and complex lobule, as well as the concept of local, zonal and regional heterogeneity of the liver anatomy.

The apoptotic activity which is very low during childhood, also has the trend to show a focal distribution, but less evidently. Also this activity tends to agglomerate in the 3rd (centrolobular) zone, a fact that has already been documented in literature.

In conclusion, this study reveals the fact that the liver growing in children is not linked to a high proliferation index but to a very low apoptotic index, compared with that in adults. The proliferation and apoptotic activity are mostly focal phenomena in the hepatic mass. Within the hepatic lobule the proliferation activity has the trend to place it self to the peripheral zone (1st zone) and the apoptotic activity to the central zone (3rd zone) of lobule.

2. CHRONIC VIRAL HEPATITIS AT CHILDREN – IN THE BIOPTIC MATERIAL OF THE CHILDREN’S EMERGENCY HOSPITAL CLUJ BETWEEN 1994-2008

Method and Material

I’ve extracted from the database that contains all the bioptic results made from the Laboratory from 01.01.1994 until present, a new database, selective, containing only the cases of chronic hepatitis in children (viral and non-viral). This new database was built in such manner that it allows the establishment of clinical-ethological-pathological connections to be made and presented afterwards as results of these operations. This database is **the largest of the kind until now to be gathered in Romania** and it allows a significant general aspect of the viral children hepatitis in the area.

Results and Discussions

During the period of 01.01.1994 – 01.01.2009, in the Laboratory of Pathologic Anatomy of the Children’s Hospital in Cluj Napoca, after excluding the white biopsies, there was a number of **632** hepatic biopsies sent.

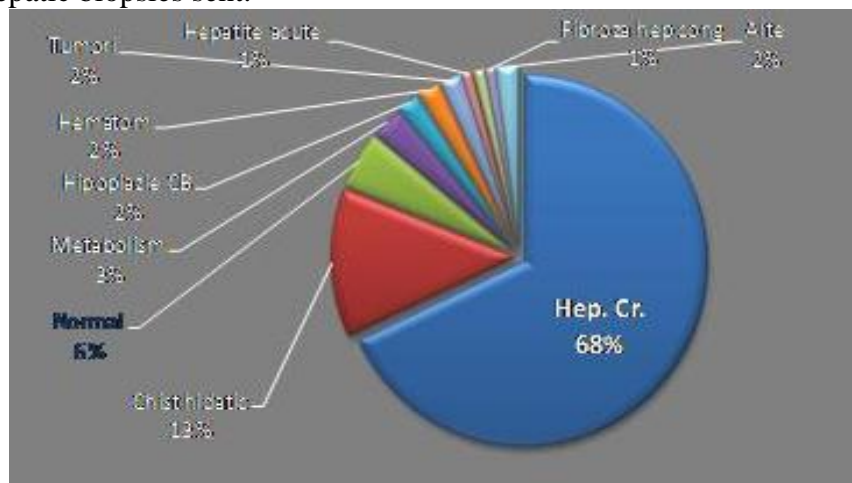


Fig.2: Prevalence of diverse pathologic entities in the 632 cases of PBH/BH examined during 1994-2008.

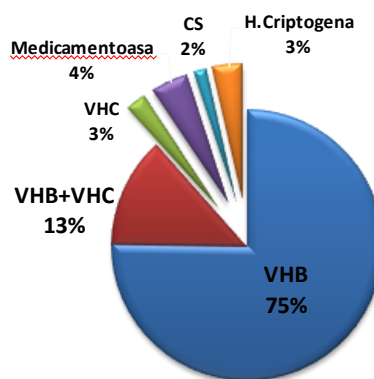


Fig.3. Etiology of the 430 cases of chronic hepatitis registered

I've separately analyzed the cases vaccinated after 1996, they were traced to have had VHB chronic hepatitis.

17 cases

- Average Grade = 1,8 (0-4)
 - 11.7% grade 4 (unlike 2% in general)
- Average Stage = 2,29 (1-3)
 - 0 cases of cirrhosis (maximum 12 years of evolution)

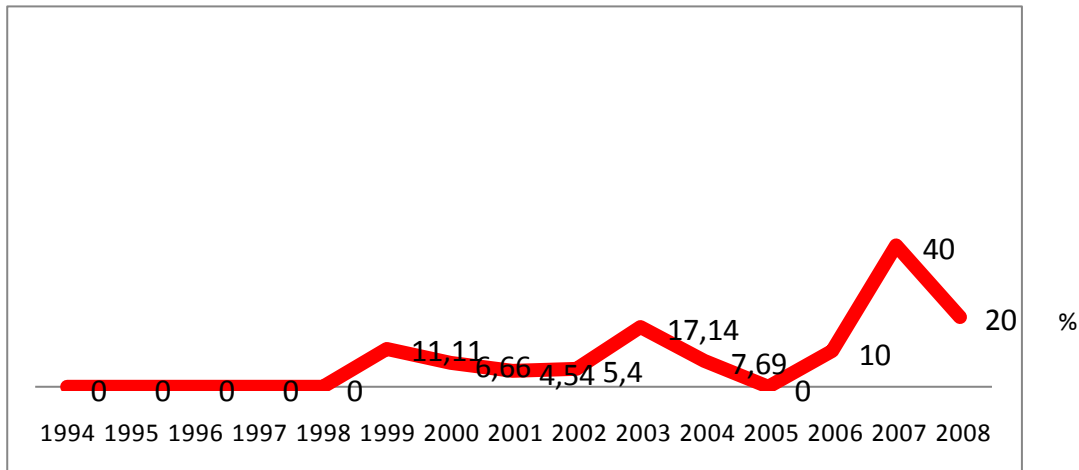


Fig. 4: VHB Chronic hepatitis in vaccinated patients

The existence of these cases shows that the vaccination was not 100% efficient. Although in general these cases presented a similar gravity with the non-vaccinated cases, it can be said however that maximum necro-inflammatory percentage was a lot more often detected in these cases, sensibilising the immune system after vaccination having this effect, but in no case from this study set, still restrained, wasn't traced in cirrhotic state.

3. CHILDREN HEPATIC CIROSIS PARTICULARITIES

Study on the autopsic and bioptic material of the Emergency Children Hospital Cluj.

Material and Method

This study was based on the analysis of 2 case sets:

- **Set 1:** 27 cases of deceased children with cirrhosis and autopsied
- **Set 2:** 136 cases of cirrhotic children, biopsied

Results and Discussions

General Statistic

Set 1

The 27 autopsied and diagnosed cases of cirrhosis in the Laboratory of Pathologic Anatomy of the Emergency Children Hospital Cluj, during 1974-2008, are part of the 3850 autopsies made in this period. In other words, cirrhotic death of a child, is a rare happening (0.71%, means, in average 0.8 cirrhosis cases deceased per year).

Set 2

The 138 cases of diagnosed cirrhotic hepatic biopsies, come from children between the age of 1 month and 17 years (in average 8.55 years, median of 10.48 years, standard derivation of 10.07).

Cirrhotic etiology

Set 1

The cirrhotic etiology met in our cases of deceased children was:

6. Post-necrotic/Post-infectious/Toxic Cirrhosis – 11 cases (40%)
7. Biliary Cirrhosis – 11 cases (40%)
8. Metabolic Cirrhosis – 5 cases (20%)
9. Vascular Cirrhosis – 0 cases
10. Cryptogenic Cirrhosis – 0 cases

Set 2:

The cirrhotic etiology met in our cases of PBH was:

6. Post-necrotic/Post-infectious/Toxic Cirrhosis –100 cases (75%)
7. Biliary Cirrhosis – 16 cases (12%)
8. Metabolic Cirrhosis – 7 cases (5%)
9. Vascular Cirrhosis – 0 cases
10. Cryptogenic Cirrhosis – 11 cases (8%)

4. APPLIANCE OF MODERN TECHNIQUES OF COMPUTERISED MORPHOMETRY IN THE STUDY OF CHILD CIROSIS

4.1. NODULE AND CONJUNCTIVE SEPT MORPHOMETRY

4.1.3. Material

A set of 10 hepatic biopsies (non PBH to have a wider examination surface) or hepatic autopsy fragments, of cases with hepatic cirrhosis. 5 hepatic biopsy cases, coming from the Emergency Children Hospital Cluj, come from cases in compensated clinical state. Other 5 hepatic fragments have been obtained from autopsies in which the death cause was cirosis and it's complications, coming from the Country Clinical Hospital or Municipal Adult Hospital (advanced cirrhosis lethally decompensated).

4.1.4. Results and Discussions

According to expectations, cases coming from children, proved after the micrometric counting to be peaceable in the thin septa and big nodule cirrhotic category.

Adult cases, cirrhotic deceased proved to be particular to the large septa and small nodule cirrhosis type, although in this case also, the sizes of the nodules seemed to be extremely variable.

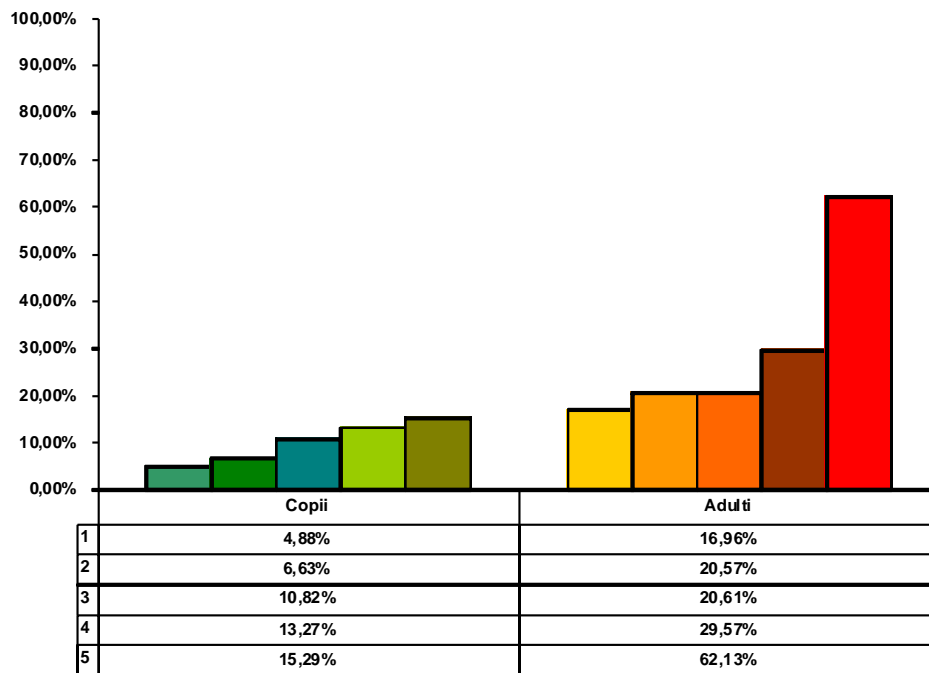


Fig.5: Fibrosis percentage spectrum in the 2 studied sets

4.2. CHILDREN CIROSIS REVERSIBLE POTENTIAL – MORPHOMETRIC STUDY

Objective

- Differential analysis of the mature and immature collagen is applied to establishing the age of a fibrillary conjunctive tissue, the richer in collagen it is the older and more resistant it is, but also harder to be reabsorbed while a young conjunctive tissue, rich in immature collagen is more elastic, less rigid and resistant and also more susceptible to be reabsorbed by the organism.
- Demonstration through quantitative technique, of image analysis, of the fact that a cirosis can be described not only quantitatively (conjunctive tissue percentage) but also as age and reversible potential, through simple histochemical techniques.

Method and Material

For reaching the proposed objective we've made histological preparations from BH with cirrhosis in adult (supposed rich in mature conjunctive tissue) and BH with children cirosis (supposed rich in immature collagen). Manufacturing these pieces was a standard procedure (fixation, paraffin inclusion, sectioning, coloring, mounting) the histochemical coloration techniques being presented in the precedent study.

Study lot

It was the same as the study before because in each case partly it was known the inclusion of the Yale classification of histological severity of cirrhosis.

Results and Discussions

One first observation, is the fact that **at adults**, both the large septa (preponderant) and the thin ones are rich in mature collagen while **at child** the two types of collagen coexist in close proportions.

The second observation O is the fact that inside the cirrotic hepatocitary nodules, the collagen deposited in the so called „capillarizations” of the sinusoids is reabsorbable for the infantile cases situated in compensated (starting) clinical phase and unabsorbable for the adult cases situated in the advanced clinical stage.

GENERAL CONCLUSIONS

8. A child's liver is a growing organ. It grows because of a reduced physiological apoptosis and not because of a more intense cellular proliferation this aspect making it different than the adult liver in its reaction towards the diverse etiological aggressions.
9. Immunity immaturity specific to the child favorites' the chronic infections with hepatitis virus B and C, but the postpubertary immune maturation may lead to spontaneous evolutionary stop (in any fibrotic stage) of the chronic hepatitis, including the cirrhotic phase.
10. Anti-hepatic B vaccination, a must on new born children, introduced after 1996 led to the steady discount of VHB chronic hepatitis prevalence in children.
11. Although the VHC chronic infection prevalence at children didn't grow significantly in quantity, through the steady disappearance of chronic infection cases of VHB it reached the point of apparent preponderant situation of VHC infection in the local infantile population, at least on the bioptic material studied by us.
12. Evolution until the state of cirrhosis of the chronic hepatitis is possible at child also (especially at boys) but cirrhosis rarely gets clinically decompensated and cases death at this patient category.
13. Because of hepatic growth (especially in pubertary growth), the accumulated fibrosis through chronic inflammatory evolution has a tendency of „diluting” steadily which in fact permits the disappearance of cirrhosis, eventually already installed in young childhood, once with growth and spontaneous stop of evolution of cirrhosis through the maturation of the postpubertary immune system (at least in part of the patients).
14. In addition, conjunctive tissue in the infantile cirrhotic structure is immature, fact that favorites' its resorption in time (especially of the collagen deposited in the Disse space) and implicitly the better functionality of the functional cirrhotic liver capacity once with child growth.

CURRICULUM VITAE

First Name: Dan

Name: GHEBAN

Date and birth place: 25.10.1962, Romania

Education background:

- Natural Sciences High School, Cluj-Napoca – 1981
- Institute of Medicine and Pharmacology Cluj-Napoca – 1988

Academic Titles:

2008- Professor assistant, Pathology Department, UMF Cluj-Napoca

1994-2008 Assistant, Pathology Department, UMF Cluj-Napoca

1991-1994 Research assistant, Pathology Department, UMF Cluj-Napoca

Professional experience:

- 1999 – Senior Pathologist
- 1997-1998 – *AFSA, CHU Rouen, France*
- 1994 - Junior Pathologist
- 1988 - doctor

Married, 1 boy 19 yrs old

ISI – 30 Published articles:

2. **Normal hepatic growth: Study of the Proliferative Capacity and Apoptosis of the Normal Liver during Childhood; D.Gheban;** *Pediatric and Developmental Pathology* vol.3 pag. 70-72, ianuarie-februarie 2000

non-ISI Published articles:

- **55 published articles in Romanian Journals, from which 17 as first author, 13 being related with liver pathology**
14. Gheban Dan: **Studiul capacității proliferative a ficatului la copil, în condiții normale și patologice cu ajutorul metodei AgNOR**, *Jurnalul Român de Patologie*, vol.1 nr.1, pag.61-63, 1997
 15. Gheban Dan: **Normal Hepatic Growth: Study of the Proliferative Capacity and Apoptosis in the Normal Liver during Childhood**, *Pediatric and Developmental Pathology*, vol.3, pag. 70-72, 2000
 16. Gheban Dan: **Adobe Photoshop ca program de analiză de imagine în anatomie patologică**, *Jurnalul Roman de Patologie*, vol.8 nr.1/2, 2005
 17. Gheban Dan: **Capilarul sinusoid hepatic și celulele asociate lui**, *Jurnalul Român de Patologie*, nr.1 (vol.1) 1997 pag.32-40

18. Gheban Dan: **Moartea celulelor hepatice**, Jurnalul Român de Patologie, nr.2 (vol.1) 1997, pag. 25-29
19. Gheban Dan: **Fibrogeneza hepatică**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3 (vol.1) 1997, pag.34-43
20. Gheban Dan: **Hepatitele cronice. Aspecte tehnice în examinarea PBH și BH**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3 (vol.1) 1997, pag.90-93
21. Gheban Dan: **Aplicarea tehnicilor de hibridizare în patologie**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 2 (vol.2) august 1998, pag.141-150
22. Gheban Dan: **Matricea extracelulară hepatică**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.2) noiembrie 1998, pag.264-271
23. Gheban Dan: **Microvascularizația ficatului**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.4) decembrie 2000, pag.264-271
24. Gheban Dan: **Ciroza. Reversibilă?**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.4) decembrie 2000
25. Gheban Dan, Florescu Petre: **Regenerarea hepatică la răspântie de concepții**, Jurnalul Român de Patologie, nr. 3/4 (vol.6) 2002, pag. 317-324
26. Gheban Dan: **Hepatitele virale cronice ale copilului**, Pediatru.ro, anul III, nr.7/2007, pag.6-14

11 papers presented in International Congresses and 34 papers in National Congresses

The list with coordinated license thesis:

19. Marcu Gabriel: "Studiul capacității proliferative a ficatului de copil în condiții normale și patologice, cu ajutorul metodei AgNOR" – 1996
20. Câmpian Simina: "Hepatitele cronice ale copilului" 1998
21. Ioana Șerban: "Tumorile benigne ale glandelor salivare" 1999
22. Sandu Ileana: "Biopsia renală în materialul Laboratorului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Copii, Cluj" 1999
23. Mihaela Leordean: "Diverticolul Meckel" 1999
24. Carceie Simona Alina: "Patologie osoasă netumorală a copilului" 2000
25. Fechete Anamaria: "Patologia osoasă tumorală a copilului" 2000
26. Bunda Radu-Cristian: "Biopsia gastrică și duodenală la copil" 2002
27. Iulia Balbach Tuleu: "Nefropatia asociată VHB" 2004
28. Teodora Paul: "Analiza morfometrică a fibrozei hepatice" 2005
29. Câmpian Teodora Anca: "Ciroza hepatică a copilului în materialul autopsic" 2005
30. Tudor Bucur: "Ciroza hepatică a copilului în materialul bioptic" 2005
31. Neamț Ana-Maria: "Pattern-ul imunohistocolorației antigenelor VHB în hepatita cronică a adultului" 2007
32. Naumenco Adina: "Caracterizarea fibrozei hepatice din ciroză" 2007
33. Ciț Irina: "Cuantificarea cantitativă a colagenului tânăr și vechi cu ajutorul programului Adobe Photoshop, 2006
34. Iulia Duminiță: "Corelații morfo-funcționale ale activității Kupfferiene hepatice, 2008
35. Filip Ramona: "Tumora cu celulele gigante a osului, 2008

36. Viorica Sireteanu, Studii experimentale de inginerie tisulară: Histopatologia osteogenezei induse, 2009

Foreign languages: English, French