

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ – NAPOCA

Carmen-Daniela Neculoiu

**FENOMENE AUTOIMUNE UMORALE ȘI CELULARE
ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**PENTRU OBȚINEREA TITLULUI ȘTIINȚIFIC DE DOCTOR
ÎN ȘTIINȚE MEDICALE, DOMENIUL MEDICINĂ**

REZUMAT

**Conducător științific,
Prof. Dr. Mircea Grigorescu**

2009

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
SINTEZĂ BIBLIOGRAFICĂ.....	7
I. IMUNOPATOGENEZA HEPATITELOR CRONICE VIRALE	8
I.1 Mecanismele de apărare înnăscute.....	8
I.2 Răspunsul imun specific în infecția cu virusurile hepatitice B și C.....	10
II. CITOKINELE, CHEMOKINELE ȘI SELECTINELE ÎN RĂSPUNSUL IMUN LA INFECȚIA CU VIRUSUL HEPATITIC C	20
II.1 Citokinele	20
II.2 Chemokinele și patogeneza infecției cu VHC.....	25
II.3 Selectinele.....	28
III. AUTOIMUNITATEA ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE.....	32
III.1 Mecanisme patogenetice în autoimunitatea indusă viral	32
III.2 Manifestări extrahepatice serologice	34
III.3 Crioglobulinemia mixtă.....	39
IV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE	42
IV.1 Metode de diagnostic serologic.....	42
IV.2 Metode de diagnostic molecular	43
IV.3 Metode de explorare a imunității mediate celular prin flowcitometrie....	45
CERCETĂRI PERSONALE.....	48
I. OBIECTIVELE CERCETĂRII.....	49
II. PACIENȚI ȘI METODE.....	51
III. ROLUL NIVELELOR SERICE ALE CITOKINELOR ȘI RECEPTORILOR ÎN PATOGENEZA HEPATITEI CRONICE VIRALE C.....	55
III.1 Obiectivele cercetării.....	55
III.2 Pacienți și metode.....	56
III.3 Rezultate.....	59
III.3.1 Factorul de necroză tumorală- α și receptorul sTNFR-2.....	61
III.3.2 Interleukina-6 (IL-6) și receptorul solubil sIL-6R.....	68
III.3.3 Nivelele serice ale interleukinelor și receptorilor solubili la pacienții cu crioglobulinemie asociată infecției cronice cu VHC	78
III.4 Discuții.....	82
III.5 Concluzii generale citokine.....	95
IV. NIVELELE SERICE ALE CHEMOKINELOR ÎN HEPATITA CRONICĂ VIRALĂ C	97
IV.1 Obiectivele cercetării.....	97
IV.2 Pacienți și metode.....	98
IV.3 Rezultate.....	100
IV.3.1 Chemokina CXC ligand 10 (CXCL10).....	101
IV.3.2 Chemokina CC ligand 2 (CCL2)	109

IV.3.3 Chemokina CC ligand 21 (CCL21).....	115
IV.3.4 Nivelele serice ale chemokinelor și crioglobulinemia asociată infecției cronice cu VHC.....	120
IV.4 Discuții.....	121
IV.5 Concluzii generale chemokine.....	133
V. NIVELELE SERICE ALE SELECTINELOR ÎN HEPATITA CRONICĂ	
VIRALĂ C	135
V.1 Obiectivele cercetării.....	135
V.2 Pacienți și metode.....	135
V.3 Rezultate.....	137
V.3.1 Selectina-E	139
V.3.2 Selectina-P.....	149
V.4 Discuții.....	160
V.5 Concluzii generale selectine.....	168
VI. AUTO-ANTICORPII NESPECIFICI DE ORGAN ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE.	169
VI.1 Obiectivele cercetării.....	170
VI.2 Pacienți și metode.....	171
VI.3 Rezultate.....	174
VI.4 Discuții.....	183
VI.5 Concluzii.....	187
VII. DETERMINĂRI ALE IMUNITĂȚII MEDIATE CELULAR PRIN FLOWCITOMETRIE ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE	188
VII.1 Obiectivele cercetării.....	188
VII.2 Pacienți și metode.....	188
VII.3 Rezultate.....	191
VII.4 Discuții.....	196
VII.5 Concluzii.....	198
VIII. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	199
Bibliografie	204

Cuvinte cheie: hepatită cronică virală, citokine, chemokine, selectine, autoanticorpii nespecifici de organ, crioglobulinemia mixtă, citometria de flux.

INTRODUCERE

Hepatitele cronice virale reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, la nivel mondial, datorită incidenței crescute și a complicațiilor multiple, care apar în cursul evoluției afecțiunii hepatice.

Cele mai importante progrese în imunopatologia hepatitelor cronice au apărut în strânsă relație cu descoperirea unor markeri imunologici noi, implicați în răspunsul imun față de virusurile hepatice și a alternativelor terapeutice moderne.

Funcționalitatea celulelor sistemului imun poate fi apreciată prin diferite teste biologice *in vitro* sau *in vivo*. Gradul de activare al limfocitelor T la stimuli antigenici poate fi evaluat prin dozarea nivelului seric al citokinelor, chemokinelor și selectinelor secretate de diferite celule în cursul activării limfocitelor T, iar gradul de activare al limfocitelor B poate măsurat prin determinarea sintezei anticorpilor. Totodată celulele care participă la răspunsul imun față de virusuri pot fi analizate ca număr și funcționalitate prin intermediul citometriei de flux (flowcitometrie).

Fenomenele autoimune însoțesc deseori hepatitele cronice virale B și C. Autoanticorpii nespecifici de organ (NOSA, non-organ specific autoantibodies) sunt frecvent identificați la pacienții infectați cronic cu VHC și VHB, dar mecanismele patogenetice și semnificația clinică a NOSA, nu sunt complet elucidate.

Crioglobulinemia mixtă (CM) este un sindrom distinct, extrem de bine caracterizat clinic și biologic al cărui mecanism de producere rămâne în mare parte necunoscut. Implicarea factorilor reglatori ai răspunsului imun în acest sindrom este o problemă recent studiată, rămânând încă un subiect de dezbatere clinică.

Lucrarea de față și-a propus să desfășoare o cercetare complexă, care să cuprindă pe cât posibil aspecte ale proceselor imune și autoimune umorale și celulare în hepatitele cronice virale, să investigheze în profunzime unele modificări clinice și biologice legate de aceste aspecte și să evalueze implicarea lor în eficiența tratamentului antiviral.

Teza este alcătuită din partea generală, care realizează o sinteză a datelor din literatură și din partea specială, destinată cercetărilor personale.

SINTEZA BIBLIOGRAFICĂ

Sinteza bibliografică a lucrării este structurată în patru capitole. Sunt prezentate câteva aspecte legate de imunopatogeneza hepatitelor cronice virale, cu mecanismele de apărare înăscute și răspunsul imun specific în infecția cu virusurile hepatice B și C, subliniindu-se al rolul primordial al limfocitelor T CD8+ citotoxice în producerea leziunilor hepatice, precum și rolul limfocitelor T helper în patogeneza hepatitei B și C. Sunt redată de asemenea, elemente importante legate de rolul citokinelor TNF- α și receptorul TNFR-2, IL-6 și receptorul IL-6R, al chemokinelor CXCL10, CCL2, CCL21 și al selectinelor E și P, în coordonarea răspunsului sistemului imun față de virusul hepatitic C. Autoimunitatea în hepatitele cronice virale este discutată prin prisma mecanismelor patogenetice care o induc, precum și a manifestărilor extrahepatice serologice, care constau în apariția unor autoanticorpi nespecifici de organ (non organ specific autoantibodies, NOSA), și a crioglobulinemiei mixte (CM). CM este cea mai documentată manifestare extrahepatică, factorul cheie în patogeneza CM, asociată hepatitei cronice virale C, fiind reprezentat de inhibiția apoptozei limfocitelor B (LB) capabile să sintetizeze factor reumatoid, și acumularea progresivă a acestora. Prezența citokinelor Th1 sau Th2, în timpul diferențierii LB, determină izotipul de imunoglobuline secretate: profilul Th1 de citokine este asociat cu producerea preferențială a claselor de imunoglobuline IgG1 și IgG3.

Diagnosticul de laborator se realizează prin metode de diagnostic serologic și metode de diagnostic molecular, iar în ultima decadă, îmbunătățirea tehnicilor de biologie moleculară a dus la folosirea lor frecventă în diagnosticul hepatitelor virale.

Flowcitometria este o metodă de diagnostic utilizată în special pentru studiul populațiilor limfocitare sangvine, fiind importantă în definirea statusului imunologic al pacientului.

CERCETĂRI PERSONALE

Partea de cercetări personale este structurată pe 5 capitole și sunt prezentate rezultatele obținute mai multe loturi de studiu de pacienți.

Primele trei capitole analizează nivelul seric al citokinelor TNF- α , IL-6 și al receptorilor lor solubili: sTNFR-2 și sIL-6R, al chemokinelor inflamatoare CXCL10, CCL2 și al chemokinei homeostatice CCL21, al selectinelor solubile E și P, la un lot de 80 de pacienți cu hepatită cronică virală C. S-a stabilit puterea diagnostică a acestor sisteme pentru leziunile hepatice și s-au analizat corelațiile dintre nivelele serice și parametrii clinici, biologici și imunologici, cu investigarea unor mecanisme implicate în patogeneza crioglobulinemiei asociate hepatitei cronice virale C.

Capitolul al patrulea analizează prevalența auto-anticorpilor nespecifici de organ (NOSA) la pacienții cu hepatită cronică virală și impactul prezenței acestor autoanticorpi asupra eficienței terapiei antivirale, iar capitolul al cincilea evaluează populațiile limfocitare sangvine implicate în răspunsul imun celular, prin citometrie de flux, în hepatitele cronice virale.

Rolul nivelelor serice ale citokinelor și ale receptorilor lor în patogeneza hepatitei cronice virale C

Obiectivele cercetării: evaluarea nivelului seric al citokinelor TNF- α , IL-6 și al receptorilor sTNFR-2 și sIL-6R, cu stabilirea unor relații cu parametrii histologici, biochimici, demografici, antropometrici; evaluarea nivelelor serice ale interleukinelor și receptorilor solubili la pacienții cu crioglobulinemie asociată infecției cronice virale C.

Pacienți și metode: În studiu au fost incluși în studiu 80 de pacienți cu hepatită cronică virală C. Pacienții au fost comparați cu un grup de control de 14 persoane sănătoase. Nivelele serice ale TNF- α , sTNFR-2 și ale IL-6, sIL-6R au fost măsurate retrospectiv, prin metoda ELISA, cu kituri conținând anticorpi monoclonali față de variantele serice ale acestor molecule. Pentru determinarea crioglobulinemiei, serul a fost inspectat pentru prezența crioprecipitatului, care a fost apoi verificat prin redizolvare la 37 °C. Rezultatul emis a fost calitativ sub forma: crioglobuline prezente sau absente.

Caracteristicile pacienților au fost sumarizate folosind statistica descriptivă și s-au raportat ca medie \pm Deviație Standard pentru variabilele continue, și ca număr și procente pentru variabilele categoriale. Pentru a testa diferențele între grupuri, din punct de vedere statistic, s-a utilizat testul t-Student pentru variabilele continue și testul χ^2 pentru variabilele categoriale. Parametrii considerați semnificativi, au fost introduși în analiza multivariată, utilizând regresia logistică pentru variabilele categoriale și regresia multiplă pentru variabilele continue.

Sensibilitatea, specificitatea, curba ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) și calculul ariei de sub curbă (AUC) au fost obținute utilizând programul MedCalc 8.0 (Belgia).

Rezultate. Pacienții cu hepatită cronică virală C, nivelele serice ale TNF- α , sTNFR-2, IL-6 și sIL-6R sunt semnificativ mai mari, comparativ cu grupul de control. sTNFR-2 și sIL-6R au o putere diagnostică mare pentru hepatita cronică virală C, cu o AUC de 0,99 respectiv 0,977. Nivelul seric al sTNFR-2, IL-6, al sIL-6R se corelează cu gradul de activitate (METAVIR), valori semnificativ mai mari se observă la pacienții cu activitate severă (A3) comparativ cu cei cu activitate minimă (A1) sau cu activitate moderată (A2), $p < 0,05$.

Valorile serice ale sTNFR-2, IL-6 și sIL-6R la pacienții cu ciroză hepatică (F4), sunt semnificativ mai mari ($p < 0,001$) decât valorile acestor parametrii la pacienții cu hepatită cronică virală C (F0-F3), $p < 0,001$. În analiza univariată a corelațiilor cu parametrii biochimici, nivelele serice ale sTNFR-2 s-au corelat semnificativ pozitiv cu valorile ALAT, ASAT și bilirubina totală.

S-a obținut și o corelație pozitivă între nivelele IL-6 și cele ale sTNFR-2 și nivelele sIL-6R și cele ale sTNFR-2. Analiza de regresie liniară multiplă a demonstrat că nivelele serice ale sTNFR-2 se asociază independent de TNF- α , cu nivelele serice ale IL-6 și ale sIL-6R.

Lotul de pacienți cu hepatită cronică virală C a fost divizat pe baza prezenței sau absenței crioglobulinemiei. Analiza statistică nu a arătat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta pacienților, distribuția pe sexe, valorile parametrilor biochimici, cu excepția stadiului de fibroză F4, acesta fiind asociat mai frecvent cu prezența CM ($p < 0,001$). Valorile IL-6, sIL-6R, sTNFR-2 la pacienții CM pozitivi au fost semnificativ mai mari, decât la pacienții cu hepatită cronică virală C fără crioglobuline, $p < 0,001$. La analiza multivariată a factorilor asociați semnificativ cu prezența crioglobulinemiei, IL-6 și sIL-6R precum și sTNFR-2 s-au păstrat ca și variabile asociate independent cu prezența crioglobulinemiei.

Concluzii.

- Valorile medii ale citokinelor și ale receptorilor studiați sunt semnificativ mai mari la pacienții cu hepatita cronică virală C, comparativ cu lotul martor. Receptorii citokinelor au putere discriminativă mai mare pentru hepatita cronică virală C.
- Nivelul seric ale TNFR-2, IL-6 și al sIL-6R se corelează cu gradul activității necroinflamatoare. Ciroza hepatică indusă de VHC se asociază cu nivelele serice semnificativ mai mari ale TNFR-2, IL-6 și al sIL-6R.
- Asocierea dintre sTNFR-2 și IL-6 respectiv sIL-6R sugerează relațiile dintre TNF- α și IL-6 în procesele imunopatologice din hepatita cronică virală C.
- Crioglobulinemia asociată infecției cu VHC este mai frecventă la pacienții cu stadii avansate ale fibrozei hepatice. Nivelele serice crescute ale IL-6, sIL-6R TNFR-2 se corelează cu prezența crioglobulinemiei, fiind posibilă o implicare a răspunsului imun de tip Th1 în patogeneza crioglobulinemiei asociată infecției virale C.

Nivelele serice ale chemokinelor în hepatita cronică virală C

Obiectivele cercetării:

- evaluarea nivelului seric al chemokinelor inflamatorii CXCL10, CCL2 și a chemokinei homeostatice CCL21, la bolnavii cu hepatită cronică virală C;

- stabilirea unor relații între aceste chemokine și parametrii histologici, biochimici, demografici și antropometrici, precum și între chemokinele și citokinele proinflamatorii și receptorii lor studiați în această lucrare;
- evaluarea nivelului seric al acestor chemokine în funcție de prezența sau absența crioglobulinemiei mixte asociate infecției cronice virale C.

Pacienți și metode: În studiu au fost incluși în studiu 80 de pacienți cu hepatită cronică virală C, care au fost comparați cu un grup de control de 14 persoane sănătoase. Nivelul seric al chemokinelor CXCL10, CCL2 și CCL21 a fost determinat prin metoda imunoenzimatică ELISA, folosind kituri comerciale.

Rezultate. Pacienții cu hepatită cronică virală C, prezintă nivele serice ale CXCL10 ($2,44 \pm 1,59$ pg/ml) semnificativ mai mari, decât grupul de control ($1,21 \pm 0,43$ pg/ml), $p=0,02$. CXCL10 are o valoare diagnostică bună, cu o arie de sub curbă (AUC) de 0,980. Analiza statistică a arătat că CXCL10 are o putere discriminativă mare pentru fibroza septală, având aria de sub curbă $AUC = 0,709$. Nivelul seric al CXCL10 se corelează cu gradul de activitate, valori semnificativ mai mari se observă la pacienții cu activitate severă (A3) ($397,78 \pm 95,57$ pg/ml), comparativ cu cei cu activitate minimă (A1) ($242,57 \pm 152,84$ pg/ml), $p < 0,001$. CXCL10 s-a corelat semnificativ cu parametrii biochimici hepatici: ALAT, ASAT, și GGT, CXCL10 are un comportament foarte apropiat de cel al transaminazelor serice, având o putere diagnostică comparabilă cu a acestora, pentru diagnosticul leziunilor hepatice. Nivelele serice ale CXCL10 s-au corelat pozitiv cu nivelele serice ale sTNFR-2, această corelație s-a menținut și în analiza multivariată prin regresie multiplă.

CCL2 are un comportament asemănător cu CXCL10, în plus CCL2 s-a corelat semnificativ cu parametrii biochimici ai metabolismului lipidic: colesterolul total, colesterolul HDL și trigliceridele. În analiza univariată CCL2 s-a corelat pozitiv cu CXCL10. Analiza multivariată prin regresie lineară multiplă evidențiază vârsta, indicele de masă corporală, colesterolul total și trigliceridele, ca factori corelați independent cu CCL2. CCL21 se corelează pozitiv cu fibroza F4 și cu nivelele serice ale sTNFR-2 și CCL2.

S-au analizat nivelele serice ale CXCL10, CCL2 și CCL21 în funcție de prezența sau absența crioglobulinemiei. Valorile CXCL10, la pacienții pozitivi au fost semnificativ mai mari (media $499,88 \pm 120,35$ pg/ml) decât valorile CXCL10 la pacienții cu hepatită cronică virală C fără crioglobuline (media $281,89 \pm 119,80$ pg/ml, $p=0,01$).

În schimb CCL2 și CCL21 nu au avut nivele semnificativ mai mari (media $391,75 \pm 111,52$ pg/ml, respectiv $438,86 \pm 200,66$ pg/ml) față de pacienții CM negativi (media $328,93 \pm 83,84$ pg/ml, respectiv $418,21 \pm 223,43$ pg/ml).

Concluzii.

- Valorile medii ale chemokinelor au fost mai mari, la pacienții cu infecție cronică cu VHC, decât la grupul de control. Aceste chemokine au o putere discriminativă mare pentru hepatita cronică virală C.
- Nivelul seric al chemokinelor studiate se corelează, în parte cu caracteristicile histopatologice ale biopsiei hepatice, CXCL10 se corelează cu gradul de activitate, iar toate cele trei chemokine se corelează, în special cu stadiile mai avansate ale fibrozei hepatice.
- CXCL10 are o putere diagnostică similară cu cea a ALAT, ASAT.

- Există o asocieri independente între chemokinele studiate (CXCL10, CCL21) citokinele proinflamatoare (sTNFR-2), dar și între CCL21 și CCL2, care confirmă implicarea rețelei de citokine și chemokine în procesele fiziopatologice din hepatita cronică virală C.
- CXCL10 are nivele serice semnificativ crescute la pacienții cu crioglobulinemie și VHC.

Nivelele serice ale selectinelor în hepatita cronică virală C

Obiectivele cercetării.

- evaluarea nivelelor serice al selectinelor solubile E și P, la bolnavii cu hepatită cronică virală C și stabilirea unor relații între caracteristicile histologice, biochimice, virusologice și nivelele serice ale celor două selectine;
- stabilirea unei relații între nivelele serice ale celor două selectine și citokinele și chemokinele studiate în această lucrare.
- stabilirea unor relații între nivelele serice ale selectinelor, citokinelor, chemokinelor studiate în această lucrare și prezența sau absența autoanticorpilor nespecifici de organ.

Pacienți și metode: În studiu au fost incluși în studiu 80 de pacienți cu hepatită cronică virală C, care au fost comparați cu un grup de control de 14 persoane sănătoase. Nivelul seric al selectinelor solubile sE și sP a fost determinat prin metoda imunoenzimatică ELISA, folosind kituri comerciale. Determinările de auto-anticorpi s-au făcut retrospectiv, prin metoda imunofluorescenței indirecte.

Rezultate. Pacienții cu hepatită cronică virală C prezintă valori semnificativ mai crescute ale selectinei sE, comparativ cu grupul de martori. Selectina sE are o putere discriminativă mare pentru pacienții cu hepatita cronică virală C, având aria de sub curbă AUC=0,959.

Valorile medii ale selectinei sE sunt semnificativ mai mari la pacienții cu activitate A3 (n=30, valoarea medie=69,17±12,94 ng/ml) față de cei cu A1 respectiv A2 (n=15, valoarea medie=47,97±17,69 ng/ml respectiv n=35, valoarea medie=60,55 ±17,27 ng/ml), p<0,05. Totodată există diferențe semnificative statistic și între pacienții cu activitate A2 și cei cu activitate A1 (p<0,05).

S-a observat o corelație semnificativă a valorilor selectinei E cu valorile colesterolului total și cele ale glicemiei (r=0,33; p=0,01) la pacienții cu hepatită cronică, și cu valorile colesterolului total, trombocitelor și leucocitelor (p=0,03; p=0,02 respectiv p=0,02) în cazul cirozei hepatice.

Regresia lineară multiplă efectuată pentru selectina sE și parametrii biologici găsiți semnificativi în analiza univariată, arată că doar colesterolul total și glicemia sunt asociate semnificativ și independent cu valorile E selectinei (p=0,04 respectiv p=0,01).

S-a găsit o corelație semnificativă între valorile selectinei sE și valorile TNFR-2, atât la pacienții cu hepatita cronică C cât și la cei cu ciroză (p=0,01), și o corelație cu IL-6, CXCL10 doar la pacienții cu hepatită cronică. În analiza multivariată, valorile sTNFR-2 și CXCL10 sunt asociate semnificativ și independent cu valorile selectinei sE, la pacienții cu hepatita cronică virală C, asociere care se păstrează doar pentru sTNFR-2, în cazul pacienților cu ciroză hepatică.

Selectina sP are un comportament, diferit de cel al selectinei sE , se corelează semnificativ cu CCL2 și numărul de trombocite .

Pacienții cu hepatită cronică virală C au fost analizați în funcție de prezența sau absența autoanticorpilor nespecifici de organ (NOSA). Analiza statistică nu a arătat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta pacienților, distribuția pe sexe și valorile parametrilor biochimici, cu excepția viremiei, nivelele crescute ale viremiei fiind asociate mai frecvent cu prezența NOSA ($p < 0,0001$). Parametrii imunologici nu au avut nivele semnificativ mai mari la pacienții în funcție de absența sau prezența NOSA. În schimb valorile sE selectinei, la pacienții NOSA pozitivi au fost semnificativ mai mari (media $66,34 \pm 15,72$ pg/ml, $p = 0,04$) decât valorile serice la pacienții cu hepatită cronică virală C și NOSA absenți (media $58,46 \pm 17,84$).

Concluzii.

- Valorile medii ale selectinelor au fost mai mari, la pacienții cu infecție cronică cu VHC, decât la grupul de control. Selectinele studiate au o putere discriminativă mare pentru hepatita cronică virală C.
- Selectina sE are o putere discriminativă mare pentru gradul activității necroinflamatoare.
- Prezența unor asocieri între selectinele studiate și chemokine, care sugerează implicarea lor în mecanisme fiziopatologice intricate, în infecția cronică cu VHC.
- Selectina sE are nivele serice semnificativ crescute la pacienții VHC și cu autoanticorpi nespecifici de organ.

Autoanticorpii nespecifici de organ în hepatitele cronice virale.

Obiectivele cercetării.

-determinarea prevalenței NOSA la pacienții cu hepatită cronică virală C și B cu precizarea aspectului acestor autoanticorpi;

-evaluarea relației dintre prezența NOSA și activitatea biochimică și histologia hepatică;

-evaluarea impactului prezenței acestor autoanticorpi asupra eficienței terapiei antivirale combinate cu IFN-alfa pegilat și ribavirină, în hepatita cronică virală C.

Pacienți și metode:

Evaluarea prevalenței și a pattern-ului NOSA a fost efectuată pentru două loturi de pacienți: lotul I: 64 pacienți cu hepatită cronică virală C; lotul II: 28 pacienți hepatită cronică virală B, B+D. Determinările de autoanticorpi s-au fost făcute retrospectiv, prin metoda imunofluorescenței indirecte și prin metoda imunoenzimatică pentru tipizarea ANA.

Schema de tratament folosită a fost IFN- $\alpha 2b$ (Intron A, Schering Plough Mildenhall, Suffolk, Anglia) sau IFN- $\alpha 2a$ (Roferon A, Hoffman-LaRoche Cia S. A, Basel, Elveția) în doză de 3 megaunități de trei ori pe săptămână administrată subcutanat timp de 24 de săptămâni. La aceste preparate s-a adăugat Ribavirină (RBV) în doze variabile între 1000-1200mg/zi.

Rezultate. Prevalența autoanticorpilor în acest studiu a fost următoarea: 22 pacienți din 64 (34,3%) au avut cel puțin un autoanticorp (ANA , SMA, LKM, ANCA) la startul și în timpul tratamentului. Valorile la start ale ALAT și nivelul înalt al ARN-VHC au fost semnificativ mai mari la pacienții NOSA pozitivi ($p < 0,05$). Totodată prezența NOSA a fost asociată statistic cu un răspuns virusologic precoce și

un răspunsul virusologic la sfârșitul tratamentului mai reduse ($p < 0,05$). Titrul și aspectul autoanticorpilor la imunofluorescență: ANA a avut prevalența cea mai mare fiind prezent la 12 pacienți (18,%); ANA a avut în general aspect pătat, SMA a avut în toate cazurile un aspect de SMA-V, iar ANCA a avut aspect de atipic ANCA. S-a observat un aspect particular pentru infecția cronică cu VHC, cu colorarea citoplasmei celulei substrat Hep2. La tipizare, majoritatea ANA rămân netipizați. În cazul lotului II, de pacienți cu hepatită cronică virală B, prevalența NOSA a fost foarte mică, din 28 de pacienți doar 3 (10,7%) au avut autoanticorpi.

Concluzii.

- Prevalența autoanticorpilor nespecifici de organ este de 34,3%, la lotul de pacienți, luat în studiu, cu hepatită cronică virală C.
- S-a descris un aspect specific hepatitei cronice virale C, cu colorarea citoplasmei celulei de Hep2.
- Peste 65% din ANA nu sunt tipabili cu kiturile comerciale comune, și nu există o asociere între antigenul țintă și răspunsul virusologic la sfârșitul tratamentului.
- NOSA se asociază la începutul tratamentului cu valori serice mai mari ale ALAT și ale viremiei.
- Prezența NOSA a fost asociată statistic cu un răspuns virusologic precoce și un răspuns virusologic la sfârșitul tratamentului mai slab.
- Prevalența NOSA, asociați infecției cu virusul hepatitei B, este de 10,7% la lotul studiat, iar autoanticorpii aparțin tipului I de hepatită autoimună: ANA, ASMA.

Determinări ale imunității mediate celular prin flowcitometrie în hepatitele cronice virale.

Obiectivele cercetării:

-Analiza imunofenotipică a limfocitelor periferice din sângele pacienților cu hepatită cronică virală;

-Analiza raportului CD4/CD8 și implicarea acestuia în etiologia hepatitelor cronice virale ;

Pacienți și metode: În acest studiu au fost incluși 31 pacienți cu hepatita cronică virală, care au fost comparați cu un grup de control de 17 persoane sănătoase. Imunofenotipizarea limfocitelor s-a realizat prin citometrie în flux, prin analiza bicoloră și/sau monocoloră, pe un analizor de tip EPICS, (Coulter Electronic Laboratory, Hialeah, FL). Au fost calculate mediile, deviațiile standard (DS), eroarea medie (EM) a rezultatelor obținute privind procentajul și numărul absolut de limfocite (celule/mm³). Semnificațiile diferențelor dintre medii au fost determinate pe baza testului t-Student.

Rezultate. La analiza flowcitometrică a limfocitelor din sângele pacienților cu hepatită cronică virală față de martori, s-a constatat o creștere semnificativă a procentului limfocitelor T CD3+, de la 66,2% la 73,19% ($p < 0,03$), asociată cu scăderea semnificativă a subpopulației de LT helper CD4+ ($p < 0,02$), a limfocitelor T activate CD25+ ($p < 0,02$) și a raportului imun CD4/CD8 ($p < 0,01$).

În hepatita cronică virală C s-a remarcat o creștere a procentului LT CD8+ ($p = 0,009$) cu scăderea limfocitelor T activate CD25+ ($p = 0,03$) și a raportului CD4/CD8 ($p = 0,002$). În cazul hepatitei cronice virale B aspectul este diferit:

scăderea marcată a subpopulației de LT CD4+ ($p=0,005$). La bolnavii cu infecție virală dublă, VHC și VHB, procentul LT CD3+ a fost mult mai mare decât cel al martorilor sănătoși ($p=0,03$).

În cazul pacienților cu infecție cronică dublă, comparativ cu cei VHC pozitivi, se remarcă o creștere marcată a numărului absolut de LT CD4+ ($p<0,05$), precum și a procentului și a numărului absolut de LT activate CD25+ ($p<0,02$, respectiv $p<0,008$), care sunt mai mari decât cele ale subiecților cu infecție cronică cu VHB ($p<0,02$; respectiv $p<0,006$).

Pacienții au fost grupați pe baza raportului imun, în trei categorii distincte: cu raportul imun inversat; cu raportul imun normal și/sau crescut și cu raportul imun scăzut, dar nu inversat. La toate cele trei grupe de pacienți nu s-au constatat diferențe semnificative la nivelul procentelor și/sau a numărului absolut de limfocite.

Concluzii. Prin imunofenotipizarea limfocitelor din sângele periferic provenit de la bolnavii cu hepatite cronice virale B, C și duble, s-a constatat aspectul neomogen al populațiilor limfocitare și al subpopulațiilor de LT CD4+ și LT CD8+. Repartizarea bolnavilor în cele trei categorii, pe baza raportului imun CD4/CD8, nu este dependentă de natura agentului etiologic (HBV, HCV sau dublă infecție).

CURRICULUM VITAE

Nume: Neculoiu

Prenume: Carmen-Daniela

Data și locul nașterii: 14 iunie 1967, Turda

Locul de muncă actual: Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov, Calea București 25-26, Brașov, jud. Brașov, 500326, România

Studii:

1981-1985: Liceul Emil Racoviță, Cluj-Napoca

1985-1991: Facultatea de Medicină Generală, IMF Cluj-Napoca

Experiența profesională:

1991-1993: medic stagiar, Spitalul Clinic Județean Cluj, Cluj-Napoca

1994-1997: medic rezident laborator clinic, Spitalul Clinic Județean Cluj, Cluj-Napoca

1998: medic specialist laborator clinic, Spitalul Studentesc Cluj, Cluj-Napoca

1998-2000: medic specialist laborator clinic, Spitalului Clinic Județean Cluj, Cluj-Napoca

2000-2003: medic specialist laborator clinic, coordonator laborator, Institutul Clinic de Urologie și Transplant Renal Cluj-Napoca

2004-2005: medic primar medicină de laborator, Spitalul Clinic de Adulți Cluj-Napoca

2005-prezent: medic primar medicină de laborator, medic șef laborator, Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov

Membru al asociațiilor profesionale:

Societatea Româna de Medicină de Laborator (SRML)
Asociația de Citometrie din Romania
Asociația ROMTRANSPLANT

Specializări și calificări:

1. International Training Course Biomembranes and Molecular Medicine”, 12 zile, Cluj-Napoca, Romania, 1998
2. HLA-DNA Typing Course”, 3 zile, Dreieich, Germania, 1998
3. Curs de „Micologie medicală”, 2saptamani, Cluj-Napoca, România, 2000
4. Curs de „Actualitati in rezistenta bacteriana la antibiotice”, 2 sapt. , Cluj-Napoca, România, 2000
5. John Humphrey International Course of Immunology on Self-Tolerance and Self-Recognition”, 5 zile, Sinaia, România, 2001
6. Basic Immunology Course, Porto , Septembrie 2008.
7. Managementul Serviciilor de Sănătate Publică, Cluj-Napoca, 2009.

Experiența acumulată în programe naționale/internaționale:

1. A Study of Valcyte (Valganciclovir) for Prevention of Cytomegalovirus Disease (CMV) in Kidney Allograft Recipients ; Study ID Numbers: NT18435, coinvestigator, 2006
2. A Study of Induction Dosing With PEGASYS® (Peginterferon Alfa-2a (40KD)) Plus Copegus in Treatment-Naive Patients With Chronic Hepatitis C. Study ID Numbers: NV18210, coinvestigator, 2006
3. Comparing Efficacy & Safety of Steroid Withdrawal With Tacrolimus, MMF With Induction in Children After Kidney Transplantation. Study ID Numbers: FG-506-02-43 (TWIST), coinvestigator, 2006

Lucrări elaborate și / sau publicate**Monografii publicate - în colaborare:**

1. “Manual de transplant renal” – sub redacția Mihai Lucan, Ed. Clusium Cluj-Napoca & Celsius București 1999, Cap. II. Imunobiologia transplantului renal; teste de histocompatibilitate - Daniela Neculoiu, M. Lucan, G. Persijn, H. D. Volk, P. Reinike, ISBN 973-555-207-8 (Clusium); ISBN 973-.98531-2-9 (Celsius).
2. „Tratat de Imunoterapie” – sub redacția Doru Dejica, Ed. MEGA Cluj-Napoca, 2006, Cap. 13: Imunointervenții în transplantare, Doru Dejica, Daniela C. Neculoiu, ISBN 973-7867-45-9

Lucrări științifice publicate - în colaborare/prim autor:

1. Lucan M, Ghervan L, Neculoiu M, Rotariu P, **Neculoiu D**, Lapusan C, Burghilea C. Suplement Medical Update. 2000 noiembrie; 6-8.
2. Dejica D, Grigorescu M, Dejica V, Radu C, **Neculoiu D**. Serum levels of soluble intercellular-1 and vascular cell-1 adhesion molecules in chronic hepatitis C and the influence of interferon-alpha + ribavirin therapy. Rom J Gastroenterol. 2002 Dec;11(4):277-83.

3. Lucan M, Rotariu P, **Neculoiu D**, Iacob G. Kidney Exchange Program: A Viable Alternative in Countries with Low Rate of Cadaver Harvesting. *Transplantation Proceedings*. 2003 May;35(3):933-4.
4. Radu C, Dejica D, Grigorescu M, Zaharie T, **Neculoiu D**. Correlation of sICAM-1 and sVCAM-1 level with biochemical, histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon-alpha + ribavirin therapy. *Rom J Gastroenterol*. 2003 Jun;12(2):91-5.
5. Lazar C, Grigorescu-Sido P, Manasia R, Mirestean S, Skorka C, **Neculoiu D**, Molnar G, Cocean S
Evaluation of viral replication in children with chronic hepatitis B with and without interferon treatment. *Rom J Gastroenterol*. 2005 Sep;14(3):219-24.
6. **Neculoiu D**, Neculoiu M., Stanila O. Rolul istoric al transplantarii in dezvoltarea imunologiei. *Studii Iatroscopecice de Medicina Universala*. 2006 mai;16:26-31
7. Neculoiu M, **Neculoiu D**, Pascut D. Analiza de urina : trecut, prezent si viitor. *Studii Iatroscopecice de Medicina Universala*. 2006 mai;16:54-60.
8. Grigorescu M, Rusu M, **Neculoiu D**, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2007 Mar;16(1):31-7.
9. Grigorescu M, Radu C, Crişan D, Grigorescu MD, Serban A, **Neculoiu D**, Rusu M, Acalovschi M. Metabolic syndrome, insulin resistance and adiponectin level in patients with chronic hepatitis C. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2008 Jun;17(2):147-54.
10. **Neculoiu D**, Moleavin I, Anghel M, Neculoiu M. Patterns of immunofluorescence in chronic hepatitis. *Jurnalul Medical Braşovean*. 2008;4:32-38.
11. **Neculoiu D**, Moleavin I, Anghel M, Cristea A. Non-Organ Specific Autoantibodies and the Response to the Therapy in Chronic Hepatitis C. *Bulletin of Transilvania University Brasov*. 2008;1(50):47-54.

Lucrări științifice comunicate:

1. Corelația rejeț- compatibilitate imunologică în transplantul renal". Lucan M, Neculoiu M, **Neculoiu D**, Ispas G, Bugov L. *Zilele Medicale "Novartis"*, Bucuresti, noiembrie 1997.
2. Tipizarea HLA ; experienta Centrului de Ttransplant Cluj. **Neculoiu D**, Lucan M. *Congresul International Romtransplant 1998, Cluj- Napoca, octombrie 1998*.
3. Tramentul crizei de rejeț acut si iterativ. M. Lucan, **Neculoiu D**, Bizo A, Bugov L. *Congresul International Romtransplant 1998, Cluj- Napoca, octombrie 1998*.
4. Sensibilizarea pacienților IRC de pe lista de așteptare pentru transplant renal comparativ cu pacienții în hemodializă cronică din Transilvania; condiții de sensibilizare. **Neculoiu D**, Lucan M. *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000*.
5. Selectarea informatizată a primitorilor cu cel mai bun matching în funcție de antigenele de histocompatibilitate ale donatorului. **Neculoiu D**, Lucan M, Lăpușan C *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000*.
6. Fenotiparea HLA a pacienților cu insuficiență renală cronică aflați pe lista de așteptare : avantaje și limite; necesitatea standardizării la nivel național. **Neculoiu**

- D, Lucan M.** *Congresul International Romtransplant 2000 , Bucuresti, octombrie 2000.*
7. Eficiența utilizării Zenapax-ului pe o serie redusă în cadrul transplantului renal de la donator viu neînrudit. Lucan M, Ghervan L, **Neculoiu D**, Campean D. *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000.*
 8. Teste de hisocompatibilitate in transplantul renal - 10 ani de experienta in domeniul la Cluj”- **Neculoiu D**, Lucan M. Simpozionul "10 ani de transplant renal in Centrul Universitar Cluj- Napoca", iunie 2001.
 9. Evaluation and Selection Criteria of the Living Donor. Lapusan C, **Neculoiu D**, Muntean A , Sarbu S. *Congresul International Romtransplant 2002, Targu-Mures, 2002*
 10. Immunological Follow-up of Efficacy of the Induction Therapy. **Neculoiu D**, Sarbu S, Lapusan C, Muntean A. *Congresul International Romtransplant 2002, Targu-Mures, 2002*
 11. Modern Alternatives to Increase the Rate OF Living Kidney Donation. Lucan M, Ghervan L, Rotariu P, Barbos A, **Neculoiu D**, Sirbu S, Burghilea C, Lapusan C, Muntean A, Neculoiu M. *Congresul International Romtransplant 2002, Târgu-Mureș, 2002*
 12. 10 ani de transplant renal. Experiența Institutului Clinic de Urologie și Transplant Renal Cluj-Napoca. Lucan M, Ghervan L, Rotariu P, **Neculoiu D**, Iacob G, Bizo A, Neculoiu M, Lucan C, Magurean O. *Al XXI-lea Congres National de Chirurgie, Sinaia, 15-17 mai 2002*
 13. Plasmapheresis and IVIG Protocols. Lucan M, **Neculoiu D**, Rotariu P, Iacob G . *International Symposium on Living Donor Organ Transplantation, June 6-7, 2002 , Essen, Germany*
 14. Paired Kidney Exchange. A Viable Alternative in Countries with Low Rate of Cadaver Harvesting. Lucan M, **Neculoiu D**, Rotariu P. *International Symposium on Living Donor Organ Transplantation, June 6-7, 2002 , Essen, Germany*
 15. Teste moleculare în diagnosticul hepatitelor cronice virale. **Neculoiu D**. *Al 4-lea Simpozion National de Medicina de Laborator, Cluj-Napoca, noiembrie 2004*
 16. Correlation of sICAM-1 and VCAM-1 level with biochemical histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon –a + ribavirin therapy. Radu C, Dejica D, Grigorescu M, Zaharie T, **Neculoiu D**, Damian D. *7-th International Symposium on Cytokines and Chemokines, Montreal, Quebec, September 8-9, 2005*
 17. Autoanticorpții nespecfici de organ și răspunsul la terapia antivirală în hepatita cronică virală C. **Neculoiu D**, Damian D, Cristea A, Anghel M. *Al II-lea Simpozion Acad. Nicolae Cajal ,, Actualitati in Virusologie si Imunologie Medicala” , Bucuresti, 29-30 martie, 2006*
 18. Rolul istoric al transplantării în dezvoltarea imunologiei. **Neculoiu D**, Neculoiu M, Stanila O. *A XXXVIII Reuniune Nationala de Istoria Medicinii, Brasov, 5-7 mai 2006*
 19. Analiza de urina: trecut , prezent si viitor. Neculoiu M, **Neculoiu D**, Pascut D. *A XXXVIII Reuniune Nationala de Istoria Medicinii, Brasov, 5-7 mai 2006*
 20. Crossmatch techniques used in renal transplantation. **Neculoiu D**, Neculoiu M. *Al V-lea Congres Romtransplant, Cluj-Napoca, 28 iunie-1 iulie, 2006*

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ – NAPOCA

Carmen-Daniela Neculoiu

**HUMORAL AND CELLULAR AUTOIMMUNE
ASPECTS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS**

PhD Thesis

SUMMARY

Scientific advisor

Prof. Dr. Mircea Grigorescu

2009

CONTENTS

INTRODUCTION	4
OVERVIEW	7
I. IMMUNOPATHOGENESIS OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS	8
I.1 Innate defense mechanism.....	8
I.2 Specific immune response to hepatitis B and C viruses infection.....	10
II. CYTOKINES, CHEMOKINES AND SELECTINES IN THE IMMUNE RESPONSE TO INFECTION WITH HEPATITIS C VIRUS	20
II.1 Cytokine	20
II.2 Chemokines and pathogenesis of VHC infection.....	25
II.3 Selectines.....	28
III. AUTOIMMUNITY IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS	32
III.1 Pathogenic mechanisms in viral induced autoimmunity	32
III.2 Serologic extrahepatic manifestations	34
III.3 Mixed Cryoglobulinemia.....	39
IV. LABORATORY DIAGNOSIS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS	42
IV.1 Serologic diagnosis methods.....	42
IV.2 Molecular diagnosis methods... ..	43
IV.3 Methods of exploring cellular mediate immunity through flowcytometry	45
PERSONAL RESEARCH	48
I. AIM OF STUDY	49
II. PATIENTS AND METHODS	51
III. THE SERUM LEVEL OF CYTOKINES AND RECEPTORS ROLE IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C	55
III.1 Aim of study.....	55
III.2 Patients and methods.....	56
III.3 Results.....	59
III.3.1 Tumoral Necrosis Factor - α and sTNFR-2 receptor.....	61
III.3.2 Interleukin-6 (IL-6) and sIL-6R soluble receptor.....	68
III.3.3 Serum levels of interleukins and soluble receptors in patients with cryoglobulinemia associated with chronic HCV infection.....	78
III.4 Discussion.....	82
III.5 Cytokines general conclusions.....	95
IV. CHEMOKINES SERUM LEVELS OF IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS	97
IV.1 Aim of study.....	97
IV.2 Patients and methods.....	98
IV.3 Results.....	100
IV.3.1 Chemokine CXC ligand 10 (CXCL10).....	101
IV.3.2 Chemokine CC ligand 2 (CCL2)	109
IV.3.3 Chemokine CC ligand 21 (CCL21).....	115
IV.3.4 3 Serum levels of chemokines și cryoglobulinemia in chronic HCV infection.....	120

IV.4 Discussion.....	121
IV.5 Chemokines general conclusions.....	133
V. SELECTIN SERUM LEVELS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS C	135
V.1 Aim of study.....	135
V.2 Patients and methods.....	135
V.3 Results.....	137
V.3.1 Selectin E	139
V.3.2 Selectin P	149
V.4 Discussion.....	160
V.5 Selectin general conclusions.....	168
VI. NON-ORGAN SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS.	169
VI.1 Aim of study.....	170
VI.2 Patients and methods.....	171
VI.3 Results.....	174
VI.4 Discussion.....	183
VI.5 Conclusions.....	187
VII. CELLULAR MEDIATE IMMUNITY DETERMINATIONS THROUGH FLOWCYTOMETRY IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS.....	188
VII.1 Aim of study.....	188
VII.2 Patients and methods.....	188
VII.3 Results	191
VII.4 Discussion	196
VII.5 Conclusions.....	198
VIII. GENERAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTION.....	199
Bibliography.....	204

Key words: chronic viral hepatitis, cytokines, chemokines, selectins, non-organ specific autoanitbodies, mixed cryoglobulinemia, flowcytometry.

INTRODUCTION

Chronic viral hepatitis represent a global major health problem, due to the increased incidence and multiple complications, which appear during the evolution of the hepatic affection.

The most important progress in chronic hepatitis immunopathology appeared in tied correlation with the discovery of some new immunologic markers, involved in the immune response towards the hepatic viruses and of modern therapeutic alternatives.

The functionality of the immune system cells can be appreciated by different *in vivo* or *in vitro* biological tests. The activation degree of the T lymphocyte at antigenic stimuli can be evaluated by dosage of the serum level of cytokine, chemokine and selectine secreted by different cells during the activation of the T lymphocyte. The activation degree of the B lymphocyte can be measured by the determination of the antibodies synthesis. In the same time the cells that participate at the immune response towards viruses can be analyzed as number and functionality through flowcytometry.

The autoimmune phenomena frequently accompany chronic viral hepatitis B and C. The non-organ specific autoantibodies (NOSA) are frequently identified at chronic infected patients with HCV and HBV, but the pathogenic mechanisms and the clinical significance of NOSA are not completely elucidated.

Mixed cryoglobulinemia (MC) is a distinct syndrome, extremely well clinical and biological characterised, the producing mechanism of which, mostly, remains unknown. The involvement of the immune response regulator factors in this syndrome is a recent studied problem, still remaining a subject of clinical debate.

The aim of this paper is to develop a complex research, which will include, as possible, aspects of cellular and humoral immune and autoimmune processes in chronic viral hepatitis, to investigate deeply some clinical and biological modifications tied to this aspects and to evaluate their implication in the efficiency of the antiviral treatment.

The thesis is composed from the general part, which realized a synthesis of data from literature and the special part, dedicated to personal research.

OVERVIEW

The overview section of the paper is structured in four chapters. Several aspects of chronic viral hepatitis immunopathogenesis, with the innate defense mechanisms and the specific immune response in the infection with hepatitis B and C viruses, underlining the primordial role of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes in the hepatic lesions, as well as the role of helper T lymphocytes in the pathogenesis of hepatitis B and C are shown. Important elements tied to the role of TNF- α cytokine and TNFR-2 receptor, IL-6 and IL-6R receptor of CCL21, CCL2, CXCL10 chemokine and E and P selectin, in the coordination of the immune response towards the hepatitis C virus are also presented.

Autoimmunity in chronic viral hepatitis is discussed through the view of the pathogenesis mechanisms that induce it, as from the serologic extrahepatic manifestations, represented by the apparition of some non-organ specific autoantibodies (NOSA) and of Mixed cryoglobulinemia (MC) CM is the most documented extrahepatic manifestation, the key factor in CM pathogenesis, associated to chronic viral hepatitis C, represented by the inhibition of the B lymphocytes apoptosis, capable to syntheses rheumatoid factor, and its progressive accumulation. The presence of Th1 or Th2 cytokine, during The LB differentiation, determines the izotype of immunoglobulins secreted: Th1 cytokine profile is associated with the preferential secretion of IgG1 and IgG3 immunoglobulin subclasses.

The laboratory diagnosis is made by serologic diagnosis methods and molecular diagnosis methods, and in the last decade, the improvement of molecular biology technique led to their frequent use in the diagnosis of viral hepatitis. Flowcytometry is a diagnosis method mainly used for the study of peripheral lymphocyte populations, which is important in the defining of the patients immunologic status.

PERSONAL RESEARCH

The specific section is structured in five chapters and the presented results are obtained on several study groups of patients.

The first three chapters analyses the serum level of TNF- α cytokine, IL-6 and their soluble receptors: sTNFR-2 and sIL-6R, of CXCL10 inflammatory chemo-cytokine, CCL2 and CCL21 homeostatic chemo-cytokine and E and P soluble selectines, on a study group of 80 patients with chronic viral hepatitis C. It was proven the diagnosis power of these systems for the hepatic lesions and were analyzed correlations between serum levels and clinical, biological and immunological parameters, with the investigation of some mechanisms involved in cryoglobulinemia pathogenesis associated to chronic viral hepatitis C.

The fourth chapter analysis the non-organ specific autoantibodies (NOSA) prevalence at patients with chronic viral hepatitis and the autoantibodies presence impact on the efficacy of the antiviral therapy, and the fifth chapter evaluates peripheral lymphocyte populations involved in the cellular immune response, through flowcytometry in chronic viral hepatitis

The role of cytokines serum levels and their receptors in chronic viral hepatitis C pathogenesis

Aim of study: evaluation of IL-6, TNF- α cytokines and sIL-6R and sTNFR-2 receptors serum levels, with establishing of correlations with biochemical, histological, demographic, anthropometric parameters; evaluation of soluble receptors and interleukines serum levels at patients with cryoglobulinemia associated to chronic viral C infection.

Patients and methods: 80 patients with chronic viral hepatitis C were included in the study. Patients were compared with a control group of 14 healthy persons. The TNF- α , sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum levels were measured retrospective, through ELISA method, with kits containing monoclonal antibodies as of the serum variant of these molecules. For the determination of cryoglobulinemia the serum was inspected for the presence of the cryoprecipitate, which was than verified through redissolving at 37 °C. the issued result was qualitative as follows under the form: cryoglobulines present or absent.

Patients characteristic were summarized using descriptive statistics and was reported as medium \pm Standard Deviation for continue variables, and number and percent for categorical variables. For testing the differences between groups, from a statistical point of view, t-Student test was used for continue variables and chi² test for categorical variables. The parameters considered significant, were introduced in the multivariate analysis, using logistic regression for categorical variables and multiple regression for continue variables.

The sensibility, the specificity, the ROC curve (*Receiver Operating Characteristic Curve*) and the area under the curve calculus (AUC) were obtained using MedCalc 8.0 software (Belgium).

Results: Patients with chronic viral hepatitis C, TNF- α ,sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum levels are significantly increased, comparative with the control group. sTNFR-2 and sIL-6R have a major diagnosis power for chronic viral hepatitis C,

with a AUC of 0,99 , or 0,977. sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum level correlates with the activity degree (METAVIR), significant increased values are observed on patients with sever activity (A3) comparative to those with minimum activity (A1) or moderate activity (A2), $p < 0,05$.

The sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum level at patients with hepatic cirrhosis (F4), are significantly increased ($p < 0,001$) than those of the patients with chronic viral hepatitis C (F0-F3), $p < 0,001$. In the univariate analysis of the correlations with the biochemical parameters, sTNFR-2 serum levels correlated significantly positive with total bilirubin and ASAT, ALAT values.

There was obtained a positive correlation between sTNFR-2 and IL-6 levels and sTNFR-2 sIL-6R levels. The multiple linear regression analysis proved that sTNFR-2 serum levels correlate independently from TNF- α , with IL-6 and sIL-6R serum levels

The study group of patients with chronic viral hepatitis C was divided on the basis of cryoglobulinemia presence or absence. The statistic analysis did not show significant differences regarding patients ages, sex distribution, biochemical parameters values, with the exception of F4 fibrosis, this being more frequently associated with the presence of CM ($p < 0,001$). sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R values at CM positive patients were significantly increased, than those of the patients with chronic viral hepatitis C without cryoglobulins, $p < 0,001$. The multivariate analysis of the factors significantly associated with the presence of cryoglobulinemia , IL-6 and sIL-6R as also sTNFR-2 were kept as independent associated variables with cryoglobulinemia presence.

Conclusions:

- The medium values of cytokines and receptors studied are significantly increased at patients with chronic viral hepatitis C, comparative with the control group. Cytokines receptors, have an increased discriminative power for chronic viral hepatitis C.
- The sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum level correlates with necroinflammation activity degree. Hepatic cirrhosis induced by VHC associates with significantly increased sTNFR-2 and IL-6, sIL-6R serum levels.
- The association between sTNFR-2 and IL-6 as also sIL-6R suggests the relations between TNF- α and IL-6 in the immunopathologic processes in chronic viral hepatitis C.
- cryoglobulinemia associated to the infection with VHC is more frequent at patients in advanced stadium of hepatic fibrosis. Increased serum levels of IL-6, sIL-6R TNFR-2 correlate with the presence of cryoglobulinemia, a possible involvement of Th1 immune response in the pathogenesis of cryoglobulinemia associated to viral C infection may occur.

Chemokines seric leves in chronic viral hepatitis C

Aim of study:

- The evaluation of CXCL10, CCL2 inflammatory chemokines and CCL21 homeostatic chemokine seric level at patients with chronic viral hepatitis.
- Establishing a relation between these chemokines and the biologic, histological, biochemical, demographic and anthropometric parameters, as also

between proinflammatory chemokines and cytokines and their receptors studied in this paper.

- The evaluation of these chemokines serum level conditioned by the presence or absence of mixed cryoglobulinemia, associated with viral C infection.

Patients and methods: 80 patients with chronic viral hepatitis C were included in the study. Patients were compared with a control group of 14 healthy persons. CXCL10, CCL2 and CCL21 chemokines serum level was determined by ELISA immunoenzymatic method, using commercial kits.

Results: Patients with chronic viral hepatitis C present CXCL10 serum levels ($2,44 \pm 1,59$ pg/ml) significantly increased, than those of the control group ($1,21 \pm 0,43$ pg/ml), $p=0,02$. CXCL10 has good diagnosis value, with and under curve value (AUC) of 0,980. Statistic analysis showed that CXCL10 has a great discriminative value for septal fibrosis, having an under curve area $AUC = 0,709$. The serum level of CXCL10 correlates with the activity degree, significantly increased values are notable at patients with sever activity (A3) ($397,78 \pm 95,57$ pg/ml), compared to those with minimum activity (A1) ($242,57 \pm 152,84$ pg/ml), $p < 0,001$. CXCL10 significantly correlates with hepatic biochemical parameters: ALAT, ASAT, and GGT, CXCL10 has a very similar behavior to that of serumtransaminases, with a diagnosis power comparable to that of serum transaminases, for the diagnosis of hepatic lesions, CXCL10 serum levels positively correlated to sTNFR-2 serum levels, correlation with was maintained in the multivariate analysis through multiple regression.

CCL2 has a similar behavior to CXCL10, more than that of CCL2 significantly correlated with biochemical parameters of the lipid metabolism: total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides. In multivariate analysis, CCL2 positively correlated with CXCL10. Multivariate analysis through multiple linear regression highlights the age, body mass index, total cholesterol and triglycerides, as factors independently correlated with CCL2. CCL21 positively correlates with F4 fibrosis and with sTNFR-2 and CCL2 serum levels.

CXCL10, CCL2 and CC21 serum levels were analyzed depending on the presence or absence of cryoglobulinemia. CXCL10 values, at positive patients were significantly increased (media $499,88 \pm 120,35$ pg/ml) than those of the patients with chronic viral hepatitis C without cryoglobulines (media $281,89 \pm 119,80$ pg/ml, $p=0,01$).

CCL2 and CCL21 did not have significantly increased levels (media $391,75 \pm 111,52$ pg/ml, as also $438,86 \pm 200,66$ pg/ml) than those of CM negative patients (media $328,93 \pm 83,84$ pg/ml, as also $418,21 \pm 223,43$ pg/ml).

Conclusions:

- Medium values of chemokines were increased at patients with chronic VHC infection, than those of the control group. These chemokines have a great discriminative power for chronic viral hepatitis C.
- Studied chemokines serum level correlates, in part with the histopathological characteristics of hepatic biopsy, CXCL10 correlates with the activity degree, and all the three chemokines correlate, especially with the advanced stadium of hepatic fibrosis.
- CXCL10 has a similar diagnosis power to ALAT, ASAT.

- There is an independent association between studied chemokines (CXCL10, CCL21) and proinflammatory cytokines (sTNFR-2), and also between CCL21 and CCL2, which underline the involvement of the chemokines and cytokines network in the pathologic processes in chronic viral hepatitis C .
- CXCL10 serum levels are significantly increased at patients with cryoglobulinemia and VHC.

Selectine serum levels in chronic viral hepatitis C

Aim of study:

- Evaluation of E and P soluble selectins serum levels, at patients with chronic viral hepatitis C and establishing some correlations between biochemical, histological, virusologic, characteristics and the two selectins serum levels.
- To establish a relation between the two selectins serum levels and the cytokines and chemokines studied in this paper.
- The establishment of some relations between chemokines, cytokines, selectins serum levels studied in this paper and the presence or absence of non-organ specific autoantibodies.

Patients and methods: 80 patients with chronic viral hepatitis C were included in the study. Patients were compared with a control group of 14 healthy persons. sE and sP soluble selectins seric level was determined by ELISA immunoenzymatic method, using commercial kits. Autoantibodies determinations were made retrospective, through indirect immunofluorescence method.

Results: Patients with chronic viral hepatitis C present significantly increased sE selectine values, than those of the control group. sE selectin has a great discriminative power for patients with chronic viral hepatitis C, having the area under the curve AUC = 0,959.

Medium values of sE selectin are significantly increased at patients with activity A3 (n=30, medium value=69,17±12,94 ng/ml) than those with A1 or A2 (n=15, medium value=47,97±17,69 ng/ml as also n=35, medium value=60,55 ±17,27 ng/ml), p<0,05. In the same time there are significant statistic differences between patients with A2 and those with A1 activity (p<0,05).

It was noticed a significant correlation of E selectin values with the values of total cholesterol and glycemia (r=0,33; p=0,01) at patients with chronic hepatitis, and with the values of total cholesterol, thrombocytes and leucocytes (p=0,03; p=0,02 respectiv p=0,02) in the case of hepatic cirrhosis.

The multiple linear regression made for sE selectin and the biologic parameters found significant in the univariate analysis show that only total cholesterol and glycemia are significantly and independently associated with E selectin values (p=0.04 as also p=0,01).

A significant correlation was found between sE selectin values and sTNFR-2 values, at patients with chronic hepatitis C and also at those with cirrhosis (p=0,01), and a correlation with IL-6, CXCL10, but only at patients with chronic hepatitis. In the Multivariate analysis sTNFR-2 and CXCL10 values are significantly and independently associated with sE selectin values, at patients with chronic viral hepatitis C, association which also maintains for sTNFR-2, in the case of patients

The behavior of sP sE lectin is different from that of sE selectin, and it significantly correlates with CCL2 and the number of thrombocytes.

Patients with chronic viral hepatitis C were analyzed dependent of the presence or absence of non-organ specific autoantibodies (NOSA). The statistic analysis did not show significant differences regarding patients age, sex distribution and biochemical parameters values, with the exception of viremia, increased levels of viremia being more frequently associated with the presence of NOSA ($p < 0,0001$). Immunologic parameters did not have significantly increased levels at patients dependent on the absence or presence NOSA. We can not say the same thing for sE selectine values which were significantly increased (media $66,34 \pm 15,72$ pg/ml, $p = 0,04$) at patients NOSA positive than those of the patients with chronic viral hepatitis C and NOSA negative (media $58,46 \pm 17,84$).

Conclusions: Medium values of selectines were increased, at patients with chronic VHC infection, than those of the control group. Studied selectines have a great discriminative power for chronic viral hepatitis C.

- sE selectine has a great discriminative power for the degree of necroinflammation activity.
- The presence of some associations between studied selectins and chemokines, suggests their implication in the intricate, fiziopathologic mechanisms, in the chronic VHC infection.
- sE selectine has serum levels significantly increased at VHC patients with non-organ specific autoantibodies.

Non-organ specific autoantibodies in chronic viral hepatitis

Aim of study:

- Determination of NOSA prevalence at patients with chronic viral hepatitis C and B and with showing the aspect of these autoantibodies.
- Evaluating the relation between the presence of NOSA and the biochemical activity and hepatic histology.
- Evaluating the impact of the presence of these autoantibodies on the efficiency of antiviral therapy combined with pegylated IFN-alfa și ribavirin, in chronic viral hepatitis C.

Patients and methods:

The evaluation of NOSA prevalence and pattern was made on two groups of patients: grup I: 64 patients with chronic viral hepatitis C; grup II: 8 patients with chronic viral hepatitis B, B+D. Autoantibodies determinations were made retrospective, through indirect immunofluorescence method and immunoenzymatic method for ANA typing.

The used treatment scheme was IFN- $\alpha 2b$ (Intron A, Schering Plough Mildenhall, Suffolk, Anglia) or IFN- $\alpha 2a$ (Roferon A, Hoffman-LaRoche Cia S. A, Basel, Elveția) in dose of 3 megaunits three times a week administrated subcutaneous for 24 weeks. To this was added Ribavirin (RBV) in variable doses between 1000-1200 mg/day.

Results: autoantibodies prevalence in this study was as follows: 22 patients from 64 (34%) had at least one autoantibody (ANA, SMA, LKM, ANCA) at the beginning and during the treatment. The beginning values of ALAT and the high level

of the ARN-VHC were significantly increased at NOSA positive patients ($p < 0,05$). In the same time NOSA presence was statistical associated with an early virusologic response and a reduced virusologic response at the end of the treatment, $p < 0,05$. The Titre and the aspect of the autoantibodies at immunofluorescence: ANA had the major prevalence, being present at 12 patients (18%), ANA, generally, had a spotted aspect, SMA had in all the cases a SMA-V aspect, and ANCA had an atypical ANCA aspect. A particular aspect was observed for the chronic VHC infection, with the color of the cytoplasm of the substrat cell Hep2. At typing, most of ANA remain antyping. For the study group II of patients with chronic viral hepatitis B, NOSA prevalence was very reduced, from 28 patients only 3 (10,7%) had autoantibodies.

Conclusions:

- Non-organ specific autoantibodies prevalence is 34,3 %, at the study group with chronic viral hepatitis C.
- A specific aspect of chronic viral hepatitis C was described, with the color of the cell cytoplasm Hep2.
- Over 65% from ANA are not typing with the commune commercial kits, and there is no association between the target antigen and the virusologic response at the end of the treatment
- NOSA associates at the beginning of the treatment with increased serum levels of ALAT and viremia.
- NOSA presence was statistical associated with an early virusologic response and a reduced virusologic response at the end of the treatment.
- NOSA prevalence, associated with hepatitis B virus infection, is 10,7% from the study group, and the autoantibodies belong to type I of autoimmune hepatitis: ANA, ASMA.

Cellular mediate immunity determinations through flowcytometry in chronic viral hepatitis

Aim of study:

- immunophenotyping analysis of peripheral lymphocyte from the blood of the patients with chronic viral hepatitis
- CD4/CD8 ratio analysis and its involvement in the etiology of chronic viral hepatitis

Patients and methods: 31 patients with chronic viral hepatitis were included in this study. Patients were compared with a control group of 17 healthy persons. Lymphocytes immunophenotyping was accomplished through flowcytometric analysis, through bicolor and/or monicolor analysis, on a EPICS analyzer (Coulter Electronic Laboratory, Hialeah, FL). Medium values, Standard Deviations (SD), medium error (ME) was calculated, of the obtained results regarding the percentage and the absolute lymphocytes number (cells/mm³). The signification of the values difference were determined on the basis of t-Student test.

Results. At the flowcytometric analysis of lymphocytes from the patients blood with chronic viral hepatitis compared to the control group, was established a significant increase of CD3+ T lymphocytes percentage from 66,2 % to 73,19% ($p < 0,03$), associated with the significant decrease of CD4+ helper LT subpopulation ($p < 0,02$), CD25+ activate T lymphocytes ($p < 0,02$) and of the immune CD4/CD8 ratio ($p < 0,01$).

In chronic viral hepatitis C was noticed an increase of the CD8+ LT percentage (p=0,009) with the decrease of CD25+ activate T lymphocytes (p=0,03) and of CD4/CD8 (p=0,002) ratio. In the case of chronic viral hepatitis B the aspect is different: the marking decrease of CD4+ LT subpopulation (p=0,005). At patients with double VHC and VHB viral infection, CD3+ LT percentage was remarkable increased than that of the control group, p=0,03).

In the case of the patients with double chronic infection, compared with those VHC positive, it is noticed a marking increase of CD4+ LT absolute number (p<0,05), and also of the percentage and absolute number of active CD25+ LT (p<0,02, as also p<0,008), which are increased than those of the patients with chronic VHB infection (p<0,02, as also p<0,006).

Patients were grouped on the basis of the immune ratio, into three distinct classes: with inverse immune ratio, with normal and/or high immune ratio and with low, but not inverse immune ratio. In all the three groups of patients were not established significant differences in the percentage level and/or absolute number of lymphocytes.

Conclusions: through lymphocytes immunophenotyping from the peripheral blood from patients with chronic viral hepatitis B, C and double, was established the non homogenous aspect of lymphocytes populations and CD8+ and CD4+ LT subpopulations. The distribution of patients into the three classes, on the basis of the CD4/CD8 immune ratio, it is not dependent on the nature of the etiologic agent (HBV, HCV or double infection).

CURRICULUM VITAE

Name: Neculoiu

Surname: Carmen-Daniela

Date and place of birth: 14 iunie 1967, Turda

Work place: Clinical County Hospital of Emergency Brasov , Calea Bucuresti 25-26, Brasov, Brasov, 500326, Romania

Education and Training :

1981-1985: Emil Racoviță High School, Cluj-Napoca

1985-1991: University of Medicine and Pharmacy “ Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca - general medicine

Professional Experience:

1991-1993: Postgraduate stage, Clinical County Hospital Cluj, Cluj-Napoca

1994-1997: Resident Physician in Clinical Laboratory, Clinical County Hospital Cluj, Cluj-Napoca

1998: Specialist Physician Clinical Laboratory, Clinical Student Hospital Cluj, Spitalul Studentesc Cluj-Napoca

1998-2000: Specialist Physician Clinical Laboratory, Clinical County Hospital Cluj, Cluj-Napoca

2000-2003: Specialist Physician Clinical Laboratory/ Laboratory Coordinator,

Clinical Institute of Urology and Renal Transplant, Cluj-Napoca
2004-2005: Senior Physician- Laboratory Medicine/ Immunology Department,
Clinical Adults' Hospital, Cluj-Napoca
2005- current: Senior Physician- Laboratory Medicine/ Laboratory Coordinator,
Clinical County Hospital of Emergency Brasov

Member of Professional Asociations:

Societatea Româna de Medicină de Laborator (SRML)

Asociația de Citometrie din Romania

Asociația ROMTRANSPLANT

Other documents evidencing experience or expertise:

1. International Training Course Biomembranes and Molecular Medicine, 12 days, Cluj-Napoca, Romania, 1998
2. HLA-DNA Typing Course, 3 days, Dreieich, Germania, 1998
3. Curs de „Micologie medicală”, 2 weeks, Cluj-Napoca, România, 2000
4. Curs de „Actualitati in rezistenta bacteriana la antibiotice”, 2 weeks, Cluj-Napoca, România, 2000
5. John Humphrey International Course of Immunology on Self-Tolerance and Self-Recognition, 5 days, Sinaia, România, 2001
6. Basic Immunology Course, Porto , Septembrie 2008.
7. Managementul Serviciilor de Sănătate Publică, Cluj-Napoca, 2009.

Previous participation in clinical trials:

1. A Study of Valcyte (Valganciclovir) for Prevention of Cytomegalovirus Disease (CMV) in Kidney Allograft Recipients ; Study ID Numbers: NT18435, coinvestigator, 2006
2. A Study of Induction Dosing With PEGASYS® (Peginterferon Alfa-2a (40KD)) Plus Copegus in Treatment-Naive Patients With Chronic Hepatitis C. Study ID Numbers: NV18210, coinvestigator, 2006
3. Comparing Efficacy & Safety of Steroid Withdrawal With Tacrolimus, MMF With Induction in Children After Kidney Transplantation. Study ID Numbers: FG-506-02-43 (TWIST), coinvestigator, 2006

Scientific papers:

Chapters in books:

1. “Manual de transplant renal” – sub redacția Mihai Lucan, Ed. Clusium Cluj-Napoca & Celsius București 1999, Cap. II. Imunobiologia transplantului renal; teste de histocompatibilitate - Daniela Neculoiu, M. Lucan, G. Persijn, H. D. Volk, P. Reinike, ISBN 973-555-207-8 (Clusium); ISBN 973-.98531-2-9 (Celsius).
2. „Tratat de Imunoterapie” – sub redacția Doru Dejica, Ed. MEGA Cluj-Napoca, 2006, Cap. 13: Imunointervenții în transplantare, Doru Dejica, Daniela C. Neculoiu, ISBN 973-7867-45-9

Articles:

1. Lucan M, Ghervan L, Neculoiu M, Rotariu P, **Neculoiu D**, Lapusan C, Burghelca C. Suptiment Medical Update. 2000 noiembrie; 6-8.

2. Dejica D, Grigorescu M, Dejica V, Radu C, **Neculoiu D**. Serum levels of soluble intercellular-1 and vascular cell-1 adhesion molecules in chronic hepatitis C and the influence of interferon-alpha + ribavirin therapy. *Rom J Gastroenterol*. 2002 Dec;11(4):277-83.
3. Lucan M, Rotariu P, **Neculoiu D**, Iacob G. Kidney Exchange Program: A Viable Alternative in Countries with Low Rate of Cadaver Harvesting. *Transplantation Proceedings*. 2003 May;35(3):933-4.
4. Radu C, Dejica D, Grigorescu M, Zaharie T, **Neculoiu D**. Correlation of sICAM-1 and sVCAM-1 level with biochemical, histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon-alpha + ribavirin therapy. *Rom J Gastroenterol*. 2003 Jun;12(2):91-5.
5. Lazar C, Grigorescu-Sido P, Manasia R, Mirestean S, Skorka C, **Neculoiu D**, Molnar G, Cocean S
Evaluation of viral replication in children with chronic hepatitis B with and without interferon treatment. *Rom J Gastroenterol*. 2005 Sep;14(3):219-24.
6. **Neculoiu D**, Neculoiu M, Stanila O. Rolul istoric al transplantării în dezvoltarea imunologiei. *Studii Iatroscopecice de Medicina Universala*. 2006 mai;16:26-31
7. Neculoiu M, **Neculoiu D**, Pascut D. Analiza de urină: trecut, prezent și viitor. *Studii Iatroscopecice de Medicina Universala*. 2006 mai;16:54-60.
8. Grigorescu M, Rusu M, **Neculoiu D**, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2007 Mar;16(1):31-7.
9. Grigorescu M, Radu C, Crișan D, Grigorescu MD, Serban A, **Neculoiu D**, Rusu M, Acalovschi M. Metabolic syndrome, insulin resistance and adiponectin level in patients with chronic hepatitis C. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2008 Jun;17(2):147-54.
10. **Neculoiu D**, Moleavin I, Anghel M, Neculoiu M. Patterns of immunofluorescence in chronic hepatitis. *Jurnalul Medical Brașovean*. 2008;4:32-38.
11. **Neculoiu D**, Moleavin I, Anghel M, Cristea A. Non-Organ Specific Autoantibodies and the Response to the Therapy in Chronic Hepatitis C. *Bulletin of Transilvania University Brasov*. 2008;1(50):47-54.

Communicated papers:

1. Corelația rejeț- compatibilitate imunologică în transplantul renal". Lucan M, Neculoiu M, **Neculoiu D**, Ispas G, Bugov L. *Zilele Medicale "Novartis"*, Bucuresti, noiembrie 1997.
2. Tipizarea HLA ; experienta Centrului de Ttransplant Cluj. **Neculoiu D**, Lucan M. *Congresul International Romtransplant 1998, Cluj- Napoca, octombrie 1998*.
3. Tramentul crizei de rejeț acut și iterativ. M. Lucan, **Neculoiu D**, Bizo A, Bugov L. *Congresul International Romtransplant 1998, Cluj- Napoca, octombrie 1998*.
4. Sensibilizarea pacienților IRC de pe lista de așteptare pentru transplant renal comparativ cu pacienții în hemodializă cronică din Transilvania; condiții de sensibilizare. **Neculoiu D**, Lucan M. *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000*.

5. Selectarea informatizată a primitorilor cu cel mai bun matching în funcție de antigenele de histocompatibilitate ale donatorului. **Neculoiu D**, Lucan M, Lăpușan C *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000.*
6. Fenotiparea HLA a pacienților cu insuficiență renală cronică aflați pe lista de așteptare : avantaje și limite; necesitatea standardizării la nivel național. **Neculoiu D**, Lucan M. *Congresul International Romtransplant 2000 , Bucuresti, octombrie 2000.*
7. Eficiența utilizării Zenapax-ului pe o serie redusă în cadrul transplantului renal de la donator viu neînrudit. Lucan M, Ghervan L, **Neculoiu D**, Campean D. *Congresul International Romtransplant 2000, Bucuresti, octombrie 2000.*
8. Teste de hisocompatibilitate in transplantul renal - 10 ani de experienta in domeniu la Cluj”- **Neculoiu D**, Lucan M. Simpozionul "10 ani de transplant renal in Centrul Universitar Cluj- Napoca", iunie 2001.
9. Evaluation and Selection Criteria of the Living Donor. Lapusan C, **Neculoiu D**, Muntean A , Sarbu S. *Congresul International Romtransplant 2002, Targu- Mures, 2002*
10. Immunological Follow-up of Efficacy of the Induction Therapy. **Neculoiu D**, Sarbu S, Lapusan C, Muntean A. *Congresul International Romtransplant 2002, Targu- Mures, 2002*
11. Modern Alternatives to Increase the Rate OF Living Kidney Donation. Lucan M, Ghervan L, Rotariu P, Barbos A, **Neculoiu D**, Sirbu S, Burghelea C, Lapusan C, Muntean A, Neculoiu M. *Congresul International Romtransplant 2002, Târgu-Mureș, 2002*
12. 10 ani de transplant renal. Experiența Institutului Clinic de Urologie și Transplant Renal Cluj-Napoca. Lucan M, Ghervan L, Rotariu P, **Neculoiu D**, Iacob G, Bizo A, Neculoiu M, Lucan C, Magurean O. *Al XXI-lea Congres National de Chirurgie, Sinaia, 15-17 mai 2002*
13. Plasmapheresis and IVIG Protocols. Lucan M, **Neculoiu D**, Rotariu P, Iacob G . *International Symposium on Living Donor Organ Transplantation, June 6-7, 2002 , Essen, Germany*
14. Paired Kidney Exchange. A Viable Alternative in Countries with Low Rate of Cadaver Harvesting. Lucan M, **Neculoiu D**, Rotariu P. *International Symposium on Living Donor Organ Transplantation, June 6-7, 2002 , Essen, Germany*
15. Teste moleculare în diagnosticul hepatitelor cronice virale. **Neculoiu D**. *Al 4-lea Simpozion National de Medicina de Laborator, Cluj-Napoca, noiembrie 2004*
16. Corelation of sICAM-1 and SVCAM-1 level with biochemical histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon –a + ribavirin therapy. Radu C, Dejica D, Grigorescu M, Zaharie T, **Neculoiu D**, Damian D. *7-th International Symposium on Cytokines and Chemokines, Montreal, Quebec, September 8-9, 2005*
17. Autoanticorpii nespecifici de organ și răspunsul la terapia antivirală în hepatita cronică virală C. **Neculoiu D**, Damian D, Cristea A, Anghel M. *Al II-lea Simpozion Acad. Nicolae Cajal ,, Actualitati in Virusologie si Imunologie Medicala” , Bucuresti, 29-30 martie, 2006*
18. Rolul istoric al transplantării în dezvoltarea imunologiei. **Neculoiu D**, Neculoiu M, Stanila O. *A XXXVIII Reuniune Nationala de Istoria Medicinii, Brasov, 5-7 mai 2006*

19. Analiza de urina: trecut , prezent si viitor. Neculoiu M, **Neculoiu D**, Pascut D. A XXXVIII Reuniune Nationala de Istoria Medicinii, Brasov, 5-7 mai 2006
- 20 .Crossmatch techniques used in renal transplantation. **Neculoiu D**, Neculoiu M. Al V-lea Congres Romtransplant, Cluj-Napoca, 28 iunie-1 iulie, 2006