

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Corelații clinico-imunologice în evoluția hepatitelor acute virale

Doctorand **Melinda Milena Horvat**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Dumitru Cârstina**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Etiologia și patogenia hepatitelor acute virale A și B	17
1.1. Etiologia hepatitelor acute virale A și B	17
1.1.1. Virusul hepatitic A	17
1.1.2. Virusul hepatitic B	18
1.2. Patogenia hepatitelor acute virale A și B	19
1.2.1. Patogenia hepatitei acute virale A	19
1.2.2. Patogenia hepatitei acute virale B	20
2. Date epidemiologice, diagnostic clinic și de laborator în hepatitele acute virale A și B	25
2.1. Date epidemiologice în hepatitele acute virale A și B	25
2.1.1. Date epidemiologice în hepatita acută virală A	25
2.1.2. Date epidemiologice în hepatita acută virală B	26
2.2. Diagnosticul clinic al hepatitelor acute virale A și B	27
2.2.1. Diagnosticul clinic al hepatitei acute virale A	27
2.2.2. Diagnosticul clinic al hepatitei acute virale B	28
2.3. Diagnosticul de laborator al hepatitelor acute virale A și B	29
2.3.1. Diagnosticul de laborator al hepatitelor acute virale	29
2.3.2. Diagnosticul etiologic al hepatitei acute virale A	30
2.3.3. Diagnosticul etiologic al hepatitei acute virale B	31
3. Răspunsul imuno-inflamator în hepatitele acute virale A și B	33
3.1. Răspunsul imun – date generale	33
3.1.1. Răspunsul imun înăscut	33
3.1.2. Răspunsul imun adaptativ	34
3.2. Răspunsul imun în hepatita acută virală A	35
3.2.1. Răspunsul imun celular	36
3.2.2. Răspunsul imun umoral	37
3.3. Răspunsul imun în hepatita acută virală B	38
3.3.1. Răspunsul imun înăscut	39
3.3.2. Răspunsul imun adaptativ	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	51

3. Studiul 1 – Hepatita acută virală A – descrierea aspectelor epidemiologice, clinico – biologice și evolutive.	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	55
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	57
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 – Profilul citokinelor implicate în răspunsul imuno – inflamator în hepatita acută virală A.	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	71
4.3. Material și metodă	72
4.4. Rezultate	73
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	85
5. Studiul 3 – Hepatita acută virală B – descrierea aspectelor clinico – biologice și evolutive.	87
5.1. Introducere	87
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	87
5.3. Material și metodă	88
5.4. Rezultate	88
5.5. Discuții	98
5.6. Concluzii	100
6. Studiul 4 – Profilul citokinelor implicate în răspunsul imuno – inflamator în hepatita acută virală B.	103
6.1. Introducere	103
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	104
6.3. Material și metodă	104
6.4. Rezultate	105
6.5. Discuții	119
6.6. Concluzii	124
7. Concluzii generale (sinteză)	127
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	131
REFERINȚE	133

Cuvinte cheie – hepatită acută virală A, hepatită acută virală B, răspunsul imuno-inflamator, citokine, Luminox.

Introducere

Infecțiile cu virusurile hepatitice A (VHA) și B (VHB) reprezintă și în prezent la nivel mondial o importantă problemă de sănătate publică, determinând un spectru larg de manifestări clinice, care variază de la forme asimptomatice, subclinice de boală, la forme cu evoluție medie, severă sau chiar fulminantă cu insuficiență hepatică acută.

În cadrul infecției virale răspunsul imun are două componente, și anume un răspuns imun înăscut, nespecific, reprezentat de activarea celulelor natural killer (NK) precum și a celulelor T natural killer (NKT) cu producerea de citokine, și un răspuns imun specific viral celular și umoral. În patogeneza și evoluția clinică a infecțiilor cu VHA și VHB sunt implicate atât răspunsurile imune ale gazdei cât și factorii virali. Din interacțiunea dintre virusurile hepatitice și gazdă decurge evoluția hepatitelor acute virale, rolul esențial fiind deținut de către sistemul imun prin producția locală și sistemică de citokine, alături de răspunsurile imune înăscute și adaptative.

Citokinele, molecule polipeptidice care mediază comunicarea intercelulară, joacă un rol esențial în reglarea răspunsului imun al gazdei, atât direct prin inhibarea replicării virale, cât și indirect prin determinarea pattern-ului predominant al mecanismelor imunologice. Dezechilibrul acestor biomolecule precum și polimorfismul genetic al acestora dețin un rol important în promovarea reacțiilor inflamatorii răspunzătoare de leziunile hepatice masive din cadrul hepatitei fulminante. Citokinele, prin răspunsurile imune umorale și mediate celular, sunt implicate în imunopatogeneza precum și în activitatea antivirală, clearance-ul viral, persistența virală, apoptoză și fibrogenază.

Rolul citokinelor în infecția cu VHB este complex, între ele existând o interacțiune reciprocă, în care IFN- γ are un rol principal, determinând eliberarea de către celulele sistemului imun și a altor citokine, cu scopul ameliorării activității citotoxice mediate imun.

Datele din literatură sugerează faptul că în infecția cu VHB profilul citokinelor circulante se corelează atât cu nivelul de replicare al virusului cât și cu activitatea bolii hepatice, clearance-ul viral fiind mediat prin citokinele secretate în cadrul răspunsului imun înăscut și adaptativ. Cuantificarea nivelului de activare al celulelor T la stimulii antigenici virali poate fi evaluată prin dozarea concentrației serice a citokinelor și chemokinelor.

Interacțiunea în dinamică dintre virusurile hepatitice și răspunsul inflamator al gazdei, precum și impactul consecutiv al acestei interacțiuni asupra evoluției clinice a hepatitelor acute virale nu sunt încă pe deplin înțelese, așa cum nu sunt complet cunoscute motivele persistenței virale. Din acest motiv sunt necesare studii

suplimentare cu extinderea profilului serologic al citokinelor, precum și evaluarea în dinamică a acestor biomolecule în cadrul evoluției hepatitelor acute virale, pentru a putea identifica rolul acestora în diagnosticul precoce al formelor severe și fulminante de boală.

În teza de față ne-am propus să analizăm profilul serologic al unor citokine pro-inflamatorii și anti-inflamatorii în hepatita acută virală A (HVA) și respectiv hepatita acută virală B (HVB) la adult, prin raportare la un lot control, concentrațiile serice ale acestor biomolecule fiind de asemenea corelate cu formele de activitate și evoluție ale hepatitei.

CERCETAREA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru/obiective

Infecțiile cu virusurile hepatitice A (VHA) și B (VHB) sunt asociate cu o morbiditate și o mortalitate considerabile.

Diagnosticul hepatitelor acute virale A și B este esențial, având în vedere manifestările clinice și spectrul evolutiv extrem de variate al acestora. Astfel, infecția cu VHB determină un spectru larg de afecțiuni hepatice care poate varia de la purtători asimptomatici la hepatită acută autolimitată, hepatită fulminantă cu insuficiență hepatică și infecție cronică.

Cercetările efectuate în domeniul hepatologiei au permis descrierea mecanismelor patogenetice implicate în hepatitele acute virale, demonstrând efectul citopatogen redus al VHA și VHB, leziunile fiind induse predominant de răspunsul imunologic complex, înăscut și dobândit, celular și umoral. În ultimele decade s-au realizat progrese importante în descrierea imunopatogenezei bolii hepatice acute, corelate cu descoperirea unor noi markeri biologici implicați în răspunsul imun față de virusurile hepatitice, cu potențial impact terapeutic.

Evoluția HVA și HVB depinde de interacțiunea dintre virus și gazdă, fiind esențială competența sistemului imun conferită de către producția locală și sistemică de citokine, precum și de răspunsurile imune înăscute și adaptative. Deși citokinele modulează controlul asupra replicării virale, clearance-ul viral și protecția față de reinfecție este realizată prin răspunsul imun adaptativ.

Pacienții cu evoluție autolimitată a HVB dezvoltă un răspuns imun multispecific, policlonal al celulelor T citotoxice (CD8+) la antigenele virale mediat prin celulele T helper (CD4+). Limitarea precoce a replicării virale, maturarea răspunsului imun adaptativ, asociate cu o secreție a IFN- γ și TNF α în ficat determină rezoluția infecției acute cu VHB. Celulele T CD8+ specifice VHB sunt principalele celulele efectoare implicate în clearance-ul și controlul infecției cu VHB, aceste celule putând să inițieze și injuria hepatică.

În infecția cu VHB profilul citokinelor circulante este corelat atât cu nivelul de replicare al virusului cât și cu activitatea bolii hepatice. Clearance-ul viral este modulat prin citokinele secretate de celulele răspunsului imun înăscut și adaptativ.

Deși studii numeroase din ultimii ani susțin rolul citokinelor în imunopatogeneza HVA și HVB, nu există încă până în prezent concluzii unitare. Aprofundarea cercetărilor privind imunopatogeneza HVB va permite în viitor dezvoltarea unor strategii imunomodulatoare cu scopul obținerii unui răspuns imun eficient anti-VHB. În acest sens în prezentul studiu ne-am propus să cuantificăm concentrațiile serice al unor citokine pro-inflamatorii și anti-inflamatorii în HVA și HVB prin raportare la un lot control, analizând totodată și profilul acestor biomolecule raportat la formele de activitate ale hepatitei.

Obiectivele propuse în partea de cercetare personală au fost structurate în patru studii, desfășurate pe o perioadă de patru ani (2008-2011) în cadrul Spitalului Clinic de Boli Infecțioase Cluj-Napoca.

Studiile 1 și 3 cuprind o descriere a datelor demografice, clinico-biologice și evolutive la pacienții cu HVA și HVB, precum și o analiză a parametrilor bioumorali cu scopul identificării unor markeri sugestivi pentru evoluția severă a bolii, prin compararea formelor medii și severe de hepatită acută.

În studiile 2 și 4 s-au determinat concentrațiile serice ale unor citokine pro și anti-inflamatorii, cu scopul evaluării rolului acestor biomarkeri ai răspunsului imuno-inflamator în imunopatogeneza HVA și HVB. S-a evaluat de asemenea profilul citokinelor în funcție de forma clinică de evoluție a bolii hepatice, cu scopul identificării unor biomarkeri caracteristici formelor severe de boală. Analiza corelațiilor dintre concentrațiile serice ale acestor biomolecule cu valorile parametrilor bioumorali caracteristici formelor medii și severe de boală, precum și implicarea acestora în realizarea clearance-ului viral în cadrul infecției cu VHB, pot reprezenta date cu posibilă valoare prognostică pentru formele severe de hepatită acută virală, cu posibil impact pentru viitoarele terapii imunomodulatoare.

Metodologie generală

Protocolul de studiu a fost aprobat de către Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, în concordanță cu declarația de la Helsinki.

În prezentele studii au fost incluși pacienți cu vârstă peste 18 ani, diagnosticați cu HVA și HVB conform definițiilor de caz, și anume: simptomatologie clinică sugestivă, care asociază icter și valori crescute ale alaninaminotransferazei, precum și prezența în HVA a AcIgM anti-VHA și respectiv a AcIgM-antiHBc pentru HVB. Au fost excluși pacienții cu infecție HIV, coinfectații cu VHD, VHC precum și cei cu infecție acută cu CMV și VEB.

Pe baza indicelui de protrombină (IP), INR-ului, timpului Quick (TQ), prezenței/absenței semnelor clinice neurologice s-a realizat o stratificare a pacienților

în două loturi: pacienți cu formă severă de hepatită, cu valori ale IP < 50%, INR > 1.5 și TQ > 16 secunde cu sau fără manifestări neurologice; pacienți cu formă medie de hepatită, cu valori ale IP > 50%, ale INR < 1.5 și TQ < 16 secunde, fără manifestări neurologice.

S-au determinat prin tehnica xMAP Multiplex (Luminex) concentrațiile serice ale unor citokine pro și anti-inflamatorii implicate în răspunsul imun: interleukina 6 (IL-6), factorul de necroză tumorală α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukina 1 beta (IL-1 β), antagonistul receptorului IL-1 (IL-1Ra) și interleukina 10 (IL-10). Grupul de control, la care s-au determinat concentrațiile serice ale acestor citokine a constat din 14 voluntari sănătoși. Pentru analiza statistică și descrierea datelor s-a utilizat programul SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

Studiu 1. Hepatita acută virală A – analiza aspectelor epidemiologice, clinico – biologice și evolutive

Introducere

Din punct de vedere epidemiologic hepatita acută virală A (HVA) înregistrează largi variații în ceea ce privește endemicitatea, vârsta la momentul producerii infecției și frecvența bolii. Evoluția clinică a bolii poate fi influențată de vârstă și de statusul imun al gazdei, variind de la infecție asimptomatică la hepatită fulminantă.

Ipoteza de lucru

Studiul își propune o analiză a aspectelor demografice, clinico-evolutive și de laborator ale HVA la adult, pe o perioadă de 4 ani, într-un areal geografic din Nord-Vestul României, țară în care vaccinarea împotriva VHA nu este obligatorie. Un alt obiectiv al studiului a constat în identificarea unor parametrii bioumorali sugestivi pentru evoluția potențial severă a bolii, prin compararea formelor medii și severe de HVA.

Material și metodă

Prezentul studiu este retrospectiv, observațional și analitic, desfășurat pe o perioadă de patru ani asupra pacienților diagnosticați cu HVA.

Rezultate

În prezentul studiu au fost incluși 202 pacienți, reprezentând 46.22% din totalul celor 437 cazuri cu HVA internate în decursul celor 4 ani. Pentru intervalul de timp analizat se remarcă o distribuție anuală relativ omogenă a cazurilor cu HVA, cu excepția anului 2010, când s-a înregistrat un vârf epidemic cuprinzând 104 cazuri (51.48%), datorat mai probabil unei microepidemii regionale, argument fiind ancheta epidemiologică pozitivă la majoritatea cazurilor. Analizând caracteristicile demografice

ale pacienților din studiul nostru s-a evidențiat faptul că 72.7% dintre aceștia au avut vârsta sub 40 ani.

Referitor la prezența sindromului de hepatocitoliză în HVA, se constată la internare o valoare crescută a ALAT comparativ cu ASAT (ALAT/ASAT de 1.78), peste 80% din pacienți având valori ale ALAT care variază între 20 – 100 x VN (VN – valoare normală, 40UI/dL). Analiza univariată a parametrilor bioumorali la internare a decelat pentru ALAT și ASAT existența unor corelații semnificative statistic ($p < 0.05$) cu IP ($r = -0.54$, $r = -0.60$), TQ ($r = 0.53$, $r = 0.57$), INR ($r = 0.53$, $r = 0.60$), BR Totală ($r = 0.28$, $r = 0.26$), Trombocitele ($r = -0.42$, $r = -0.41$) și CRP ($r = 0.25$, $r = 0.25$).

Conform criteriilor de stratificare 20.8% dintre pacienții studiului au prezentat forme severe de boală. Manifestările hemoragipare cutaneomucoase, prezente la 7% din pacienți, s-au asociat semnificativ statistic cu formele severe de HVA ($p = 0.001$, OR = 12.19, 95%CI - 3.59 - 41.3). Studiul a demonstrat existența unei diferențe statistic semnificative ($p < 0.05$), între formele severe și medii de HVA pentru următorii parametri bioumorali, la internare: TQ, IP, INR, ALAT, ASAT, BR Totală, FA, CRP și Trombocite. La lotul analizat valorile crescute ale AUC (Aria de sub curbă), sensibilității și specificității pentru TQ (cut-off de 21.45 secunde) și INR (cut-off 1.61) susțin valoarea diagnostică a acestor parametri pentru formele severe de HVA. De asemenea ALAT, ASAT și CRP au rol predictiv pentru formele severe de HVA.

Prin regresie logistică, metoda Enter, pentru studiul de față s-a stabilit că FA (valori > 500 UI/dL, OR = 7.4), CRP (valori > 1.5 mg/dL, OR = 2.9) și Trombocitele (valori $< 150.000/\text{mm}^3$, OR = 2.69) au rol predictiv în determinarea formei severe de HVA, cu ajutorul cărora pe baza ecuației $\ln(p / 1 - p) = \text{FA}(1) \times 2.01 + \text{CRP}(1) \times 1.06 + \text{Trombocit}(1) \times 0.99 + 1.52$ pentru fiecare pacient cu HVA se poate calcula un scor de predicție pentru forma severă de boală ($\ln$ – logaritm natural, p – probabilitatea fiecărui pacient de a avea HVA forma severă).

Studiu 2. Profilul citokinelor implicate în răspunsul inflamator în hepatita acută virală tip A

Introducere

Mecanismul afectării hepatice din infecția cu VHA nu este până în prezent complet elucidat, dar majoritatea datelor pledează pentru un mecanism mediat imunologic, implicând sistemul imun celular, umoral și înăscut.

Activarea sistemului imun, ca și răspuns la agresiunea virală, conduce la producerea de citokine care acționează ca și mediatori ai procesului inflamator, de activitate a bolii. Contrar conceptului mai vechi, constând dintr-un răspuns inițial pro-inflamator urmat de un răspuns anti-inflamator, în hepatita acută aceste procese funcționale opuse apar simultan, deși, în timp echilibrul lor poate fi înclinat către un răspuns anti-inflamator.

Ipoteza de lucru

Prezentul studiu și-a propus să evalueze rolul unor citokine pro și anti-inflamatorii în imunopatogeneza HVA la adult, prin determinarea concentrației serice a acestor biomolecule în faza acută a bolii și raportarea acestora la un lot control.

De asemenea, s-au evaluat nivelele serice ale citokinelor studiate în funcție de formele clinice de boală, cu scopul identificării unor biomarkeri caracteristici formelor severe de HVA. S-a analizat corelația dintre concentrațiile serice ale citokinelor cu diferiți parametrii biochimici la pacienții cu HVA formă medie și severă.

Material și metodă

Prezentul studiu este unul analitic, longitudinal, prospectiv, comparativ, desfășurat pe o perioadă de 2 ani (2010-2011) în care au fost cuprinși 20 de pacienți diagnosticați cu HVA, la care s-au determinat concentrațiile serice ale unor citokine implicate în răspunsul imun, și anume: IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1Ra și IL-10.

Rezultate

La pacienții cu HVA comparativ cu lotul de control se constată valori semnificativ crescute ($p < 0.001$) ale concentrației serice a IL-1Ra, IL-6, IL-10, TNF- α . În schimb pentru IL-1 β ($p = 0.29$) și IFN- γ ($p = 0.15$) aceste diferențe nu au putut fi stabilite. Valoarea semnificativ crescută a AUC ($p < 0.05$) pentru IL-1Ra (0.92), IL-6 (0.92), IL-10 (0.95) și TNF- α (0.85) alături de valorile înalte ale sensibilității și specificității, susțin importanța acestor citokine ca și biomarkeri ai răspunsului inflamator din HVA.

Prin analiză univariată se constată pentru IL-1Ra prezența unor corelații semnificative statistic ($p < 0.05$), negative cu IP ($r = -0.56$) și Trombocitele ($r = -0.40$), precum și corelții pozitive cu TQ ($r = 0.53$), INR ($r = 0.57$), ASAT ($r = 0.50$) și BR Totală ($r = 0.40$). S-a decelat existența unei corelații inverse, semnificative ($p = 0.01$) între concentrația IL-10 și IP ($r = -0.43$), restul corelațiilor acestui biomarker cu parametrii de laborator fiind nesemnificative statistic. Pentru celelalte două citokine, IL-6 și TNF- α , nu au putut fi evidențiate corelații semnificative cu parametrii bioumoral.

Între formele severe și medii de HVA diferențe semnificative ($p = 0.04$) au fost decelate pentru concentrațiile IL-1Ra și IL-6, ambele cu valori mai mari la pacienții cu HVA formă severă. Cu ajutorul curbelor ROC și calculul AUC s-a evaluat valoarea acestor citokine ca și potențiali biomarkeri de severitate în HVA. Astfel, valoarea semnificativ crescută ($p = 0.04$) a AUC pentru IL-1Ra (0.75) susține rolul acestei citokine ca și potențial biomarker al răspunsului imun pentru formele severe de HVA. Curba ROC documentează prezența unei sensibilități și specificități crescute a IL-1Ra la o valoare cut-off de 1929.44

Prin analiză univariată la pacienții cu HVA formă severă s-a constatat prezența unor corelații pozitive, semnificative statistic ($p < 0.05$) între IL-1Ra cu IL-6 ($r = 0.64$) și IL-10 ($r = 0.45$). Corelații semnificative au fost decelate și între IL-6 cu TNF- α ($r = 0.76$)

și IFN- γ ($r = 0.76$). În formele medii de boală s-a constatat o corelație bună, statistic semnificativă între IL-1Ra și TNF- α ($r = 0.68$ $p = 0.03$).

Prin analiză multivariabilă, tip regresie logistică metoda ENTER, folosind concentrațiile citokinelor cu valoare semnificativă la analiza univariată, ca și variabile independente, s-a stabilit că valorile citokinelor IL-1Ra (OR = 1.2) și TNF- α (OR = 0.001) pot avea un rol predictiv în diagnosticul formei severe de HVA. Pentru fiecare pacient cu HVA, cu ajutorul ecuației de regresie se poate calcula un scor de predicție pentru forma severă de boală, și anume: $\ln(p/1-p) = \text{IL1Ra} \times 0.001 - \text{TNF}\alpha \times 9.276 - 1331.63$. ($\ln$ – logaritm natural, p – probabilitatea fiecărui pacient de a avea HVA forma severă).

Studiu 3. Hepatita acută virală B – aspecte clinico – biologice și evolutive.

Introducere

Evoluția naturală a infecției cu VHB este determinată de intercondiționarea dintre factorul gazdă și factorul viral.

Ipoteza de lucru

Studiul de față își propune o analiză a aspectelor clinico-evolutive și de laborator ale HVB, pe o perioadă de 4 ani, într-un areal din Nord -Vestul României.

Alte obiective ale studiului au vizat: identificarea unor parametri bioumorali sugestivi pentru evoluția potențial severă a bolii, prin compararea formelor medii și severe de HVB, precum și identificarea unor markeri biologici sugestivi pentru clearance-ul AgHBs la 6 luni.

Material și metodă

Studiul de față este retrospectiv, observațional și analitic, desfășurat pe o perioadă de patru ani asupra pacienților diagnosticați cu HVB. Ulterior, un subgrup din pacienții lotului de studiu au fost urmăriți pentru o perioadă de 6 luni de la externare.

Rezultate

În prezentul studiu au fost incluși 102 pacienți cu HVB. Pentru intervalul de timp studiat se remarcă o scădere a distribuției anuale a cazurilor de HVB, în anul 2008 înregistrându-se un cel mai mare procent (43.13%). Repartiția pe grupe de vârstă a pacienților cu HVB relevă faptul că 50% din cazuri aparțin grupelor de vârstă 18 – 29 ani, respectiv 30 – 39 ani.

Referitor la prezența sindromului de hepatocitoliză în HVB, se constată la internare o valoare crescută a ALAT comparativ cu ASAT (ALAT/ASAT de 1.58), 87.25% dintre pacienți având valori ale ALAT care variază între 20 – 100 x VN.

Dintre pacienții cu HVB un procent de 43.14% aveau la internare AgHBe pozitiv. Nu s-a putut stabili o asocieră semnificativă între formele severe de boală și prezența la internare a AgHBe ($p = 0.17$, OR = 0.49, 95%CI - 0.19 - 1.27). Pentru ALAT și ASAT diferențe semnificative în funcție de status-ul AgHBe la internare nu au putut fi stabilite. IP a înregistrat valori scăzute, semnificative ($p=0.03$) la pacienții cu AgHBe negativ la internare. Analiza univariată a parametrilor bioumorală la internare a decelat pentru ALAT și ASAT existența unor corelații semnificative statistic ($p < 0.05$) cu IP ($r = -0.41$, $r = -0.32$), INR ($r = 0.51$, $r = 0.37$) și BR Totală ($r = 0.40$, $r = 0.34$).

Pe baza criteriilor de stratificare 25.49% din pacienții cu HVB au prezentat forme severe de boală. Studiul de față a demonstrat existența unor diferențe statistic semnificative între formele severe și medii de HVB pentru următorii parametri bioumorală, determinați la internare: ALAT, ASAT, TQ, INR, IP, BR Totală și Trombocite. La lotul analizat valorile crescute ale AUC, sensibilității și specificității pentru TQ (cut-off de 21.7 secunde) și INR (cut-off 1.65) susțin importanța acestor parametri în diagnosticul formelor severe de HVB. De asemenea, ALAT și ASAT s-au dovedit a avea rol predictiv pentru formele severe de HVB. Analiza univariată a relevat faptul că valorile serice determinate la internare ale ALAT >1500UI/dL, ASAT >1000UI/dL, TQ >20 secunde, INR >1.5, BRTotală >6 mg/dL și CRP >1.5 mg/dL s-au corelat semnificativ statistic ($p < 0.05$) cu formele severe de HVB. Analiză multivariată folosind regresia logistică a identificat că INR >1.5 reprezintă singurul factor semnificativ și independent corelat cu evoluția spre forme severe, la pacienții cu HVB din prezentul studiu.

Analiza univariată a parametrilor biologici a relevat faptul că valorile serice la internare ale ASAT >1000UI/dL și ale BRTotală >6 mg/dL s-au corelat semnificativ statistic ($p < 0.05$) cu negativarea AgHBs la 6 luni. Prin analiză multivariată tip regresie logistică, pe baza ecuației $\ln(p/1-p) = -ASAT(1) \times 1.88 - BrTotală(1) \times 0.82 + 0.03$, pentru fiecare pacient cu HVB din studiu se poate calcula un scor de predicție pentru clearance-ul AgHBs ($\ln$ – logaritm natural, p – probabilitatea fiecărui pacient de a realiza clearance al AgHBs la 6 luni).

Studiu 4. Profilul citokinelor implicate în răspunsul imuno-inflamator în hepatita acută virală B

Introducere

Imunopatogeneza bolilor hepatice induse de VHB implică mecanisme multiple, corelate cu replicarea virală și răspunsul imun, incluzând imunitatea înnăscută, imunitatea mediată celular specifică VHB și citokinele inflamatorii.

Citokinele dețin un rol important în apărarea împotriva infecțiilor virale atât prin acțiunea directă, inhibând replicarea virală, cât și prin mecanism indirect, inducând pattern-ul predominant al răspunsului imuno-inflamator al gazdei.

Ipoteza de lucru

Prezentul studiu și-a propus să evalueze rolul unor citokine pro și anti-inflamatorii în imunopatogeneza HVB la adult, prin determinarea concentrațiilor serice a acestor biomolecule în faza acută a bolii și raportarea la un lot control. În scopul identificării unor biomarkeri caracteristici formelor severe de boală s-au evaluat concentrațiile serice ale citokine la pacienții cu HVB în funcție de forma clinică a bolii. De asemenea s-a evaluat profilul citokinelor în funcție de statusul AgHBe la internare. S-a analizat corelația dintre concentrațiile serice ale citokinelor și parametrii biologici determinați la internare, precum și implicarea acestora în realizarea clearance-ului AgHBs la 3 și 6 luni de la debutul clinic al bolii, cu scopul identificării unor citokine cu rol semnificativ.

Material și metoda

Prezentul studiu este unul analitic, longitudinal, prospectiv, desfășurat pe o perioadă de 4 ani (2008-2011), în care au fost incluși 60 pacienți cu HVB, la care le-au fost determinate concentrațiile serice ale: IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1Ra și IL-10. Nici unul din pacienții prezentului studiu nu a primit terapie antivirală.

Rezultate

La pacienții cu HVB comparativ cu lotul control s-au decelat valori crescute, înalt semnificative statistic ($p < 0.001$) ale concentrațiilor serice ale citokinelor IL-1Ra, IL-6, IL-10, TNF- α . Valoarea semnificativ crescută ($p < 0.001$) a AUC pentru TNF- α (0.97), IL-10 (0.95), IL-1Ra (0.89) și IL-6 (0.83) alături de parametrii sensibilitate (S_n) și specificitate (S_p), susțin rolul acestor citokine ca și potențiali biomarkeri ai răspunsului imuno-inflamator din cadrul HVB. Pentru IL-1 β ($p = 0.62$) și IFN- γ ($p = 0.43$) diferențe între ale concentrației acestor citokine la pacienții cu HVB comparativ cu lotul control nu a putut fi demonstrate.

Prin analiză univariată la pacienții cu HVB din lotul de studiu, au fost decelate corelații înalt semnificative statistic ($p < 0.05$) între concentrațiile serice ale IL-1Ra cu TNF- α , IL-10 și IL-6 ($r = 0.60$, $r = 0.63$, $r = 0.41$). Corelații semnificative statistic ($p < 0.05$) au fost decelate și între concentrațiile IL-10 cu TNF- α și IL-6. ($r = 0.66$, $r = 0.32$). Analiza univariată dintre concentrațiile serice ale citokinelor cu valoare diagnostică în HVB (IL-1Ra, IL-10, IL-6, TNF- α) și parametrii bioumorali determinați la internare a relevat prezența unor corelații, semnificative statistic ($p < 0.05$) pentru IL-1Ra cu TQ ($r = -0.31$), pentru TNF- α și IL-10 cu CRP ($r = 0.34$, $r = 0.41$) și ASAT ($r = 0.30$, $r = 0.31$). Pentru IL-6 corelații semnificative au fost decelate cu valorile BrTotale ($r = 0.28$, $p < 0.05$).

Conform criteriilor de stratificare 30% din pacienții lotului au prezentat forme severe de HVB. S-au decelat diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) între formele severe și medii de HVB, pentru concentrațiile IL-1Ra, IL-6 și TNF- α , respectiv IL-6 și TNF- α cu valori mai mari și IL-1Ra cu valori mai mici, la pacienții cu forme severe de boală. Valoarea semnificativ crescută ($p = 0.04$) pentru IL-1Ra a AUC (0.68) cu S_n -

93% și Sp - 44%, la o valoare cut-off de 2054.76, ar putea susține rolul acestei interleukine ca și posibil biomarker de severitate în cadrul răspunsului imuno-inflamator din HVB. Prin analiză multivariabilă, tip regresie logistică metoda ENTER, folosind concentrațiile citokinelor cu valoare semnificativă ca și variabile independente, s-a stabilit că TNF- α (OR = 18.98), IL-6 (OR = 13.14) și IL-1Ra (OR = 0.8) pot avea un rol predictiv în diagnosticul formei severe de HVB. Pentru fiecare pacient cu HVB se poate calcula un scor de predicție pentru forma severă de boală, cu ajutorul ecuației de regresie: $\ln(p/1-p) = \text{TNF}\alpha \times 2.94 + \text{IL6} \times 2.57 - \text{IL1Ra} \times 0.001 - 1.41$, în care $\ln$ - logaritm natural, p - probabilitatea fiecărui pacient de a avea HVB formă severă. Pentru raportul IL-1Ra/IL-1 β și respectiv TNF- α /IL-10 se constată o diferență semnificativă ($p < 0.05$) între valoarea acestora la pacienții cu HVB formă severă comparativ cu cei cu formă medie de boală. Valoarea semnificativ crescută ($p < 0.05$) a AUC (0.81) pentru raportul IL-1Ra/IL-1 β (cut-off de 93402.46, Sn 57% și Sp 78%) susțin importanța calculării acestui raport la pacienții cu HVB formă severă versus forme medii de boală.

În prezentul studiu 36.66% din subiecții cu HVB aveau la internare AgHBe pozitiv, restul de 63.34% fiind cu AgHBe negativ și Ac antiHBe pozitivi. Diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$) între concentrațiile serice ale citokinelor la pacienții cu HVB stratificați în funcție de AgHBe nu au putut fi stabilite.

S-a analizat implicarea citokinelor în realizarea clearance-ului AgHBs la 3 și 6 luni de la debutul clinic al bolii, cu scopul identificării unor citokine cu rol semnificativ în seroconversie. Bilanțurile efectuate la 3 luni și respectiv 6 luni de la debut au documentat faptul că negativarea AgHBs s-a realizat la pacienții cu valori semnificativ crescute ($p < 0.05$) ale citokinelor IL-10 și IL-1Ra. La lotul studiat și concentrațiile serice ale TNF - α au fost mai mari la pacienții la care s-a realizat clearance al AgHBs. De asemenea s-a decelat o asocieră semnificativă între valorile serice ale IL-10 mai mari de 1.5 pg/mL și negativarea AgHBs la 6 luni (OR=26.95, 95%CI - 1.48-480.7, p 0.001).

Concluzii generale

1. În HVA pe perioada celor 4 ani ai studiului a existat o distribuție anuală relativ omogenă a cazurilor, cu excepția anului 2010 când s-a înregistrat un vârf epidemic regional.
2. La pacienții cu HVA valoarea IP s-a corelat semnificativ statistic cu valorile ALAT, ASAT, ale BR Totale, FA, CRP și Trombocitelor.
3. Pacienții cu HVA au prezentat predominant forme medii de boală (79.2%).
4. Valorile ASAT, ALAT, IP, INR, TQ, BR Totale, FA, CRP și Trombocitelor determinate la internare au fost semnificativ crescute la pacienții cu HVA formă severă comparativ cu pacienții cu forme medii de boală.
5. Parametrii ALAT, ASAT, TQ, INR și CRP au dovedit valoare diagnostică pentru formele severe de HVA.

6. Valorile FA >500 UI/dL, CRP >1.5 mg/dL și Trombocitelor <150.000/mm³ pot avea un rol predictiv în diagnosticul formei severe de HVA.
7. Concentrațiile semnificativ crescute ale citokinelor IL-6, TNF- α , IL-1Ra și IL-10 la pacienții cu HVA comparativ cu lotul de control, alături de valorile crescute ale AUC, sensibilității și specificității demonstrează prezența simultană a celor două componente ale răspunsului inflamator, pro și anti-inflamator la debutul bolii.
8. Concentrațiile serice ale IL-1Ra și IL-6 au fost semnificativ crescute în formele severe de HVA comparativ cu cele medii.
9. La pacienții cu HVA din prezentul studiu valorile IL-1Ra și IL-10 s-au corelat negativ, semnificativ statistic cu IP.
10. Concentrațiile serice ale IL-1Ra și TNF- α pot avea un rol predictiv în determinismul formei severe de HVA.
11. În HVB pe perioada celor 4 ani ai studiului s-a observat o scădere a distribuției anuale a cazurilor, în primul an al studiului (2008) înregistrându-se un procent de 43.13% din totalul cazurilor.
12. La internare, 43.14% din pacienții cu HVB aveau AgHBe pozitiv iar 56.86% prezentau AchBe pozitivi, ceea ce ar putea pleda pentru implicarea variantelor mutante în arealul nostru geografic.
13. Valorile ALAT, ASAT, IP, TQ, INR, BR Totale și ale Trombocitelor determinate la internare au fost semnificativ crescute la pacienții cu HVB formă severă comparativ cu subiecții cu forme medii de boală.
14. Analiza univariată a relevat faptul că valorile serice ale ALAT >1500UI/dL, ASAT >1000UI/dL, TQ >20 secunde, INR >1.5, BR Totală >6 mg/dL și CRP >1.5 mg/dL s-au corelat cu formele severe de evoluție ale HVB.
15. La pacienții cu HVB din prezentul studiu prin analiză univariată s-a dovedit că valorile ASAT>1000UI/dL , BRTotale>6 mg/dL s-au corelat cu negativarea la 6 luni a AgHBs.
16. Concentrațiile semnificativ crescute ale citokinelor IL-6, TNF- α , IL-1Ra și IL-10 la pacienții cu HVB din lotul de studiu comparativ cu lotul control, alături de valorile crescute ale AUC, sensibilității și specificității susțin rolul acestor citokine ca și biomarkeri ai răspunsului imuno-inflamator din HVB.
17. Nivelele serice ale TNF- α și IL-10 s-au corelat pozitiv cu valorile CRP și ASAT.
18. Concentrațiile serice crescute ale TNF- α și IL-6 la pacienții cu HVB formă severă comparativ cu formele medii de boală, susțin rolul acestor citokine ca și markeri de severitate a bolii.
19. În formele severe de HVB comparativ cu formele medii, concentrațiile scăzute ale IL-1Ra, alături de valorile crescute ale AUC, sensibilității și specificității susțin rolul acestei citokine ca și biomarker de severitate, cu posibilă valoare diagnostică și prognostică pentru formele severe de boală.

20. La pacienții cu HVB analizați concentrațiile serice ale citokinelor determinate nu au putut fi influențate de statusul AgHBe la internare.
21. Concentrațiile serice ale TNF- α , IL-6 și IL-1Ra pot avea un rol predictiv în diagnosticul formei severe de HVB.
22. Clearance-ul AgHBs la 3 respectiv 6 luni de la debutul bolii s-a realizat la pacienți cu valori semnificativ crescute ale citokinelor IL-10 și IL-1Ra.
23. La pacienții cu HVB din lotul de studiu s-a decelat existența unei asocieri semnificative între concentrațiile serice ale IL-10 mai mari de 1.5 pg/mL și clearance-ul AgHBs la 6 luni.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cu toate progresele realizate în domeniul terapiei antivirale precum și a profilaxiei (implementarea vaccinurilor antiVHA și antiVHB), hepatitele acute virale continuă să rămână o importanta problemă de sănătate publică, cu evoluție uneori imprevizibilă spre formă fulminantă (cu producerea decesului în absența efectuării transplantului hepatic). Studii recente atenționează asupra creșterii morbidității prin ciroză și carcinom hepatocelular, post infecție cu VHB.

Se cunoaște că atât în patogeniza cât și în evoluția clinică a infecției cu VHB și VHA sunt implicați atât factorii virali cât și răspunsurile imune ale gazdei. În ultimii ani s-au realizat progrese importante în imunopatologia hepatitelor, în strânsă corelație cu descrierea unor markeri implicați în răspunsul imun.

Lucrarea de față și-a propus să realizeze o cercetare complexă, atât a aspectelor epidemiologice, clinico-evolutive ale HVA și HVB într-un areal geografic din Nord-Vestul României, cât și a corelațiilor dintre formele evolutive de boală și markeri ai răspunsului imuno-inflamator.

În partea generală a tezei s-a realizat o amplă și actualizată prezentare a noțiunilor generale de imunologie, precum și a aspectelor particulare ale răspunsului imun din cadrul hepatitelor acute cu VHB și VHA. S-a evaluat rolul a șase citokine pro și anti-inflamatorii implicate în imunopatogeneza infecției acute cu VHA și VHB la adult, demonstrându-se prezența la debutul bolii a ambelor componente ale răspunsului inflamator. Originalitatea tezei rezidă din studierea factorilor prognostici pentru formele severe de evoluție a pacienților cu HVA și HVB, precum și din analiza profilului unor citokine implicate în determinismul formelor evolutive de boală.

Vor fi necesare studii suplimentare cu extinderea profilului serologic al citokinelor pentru a elucida modul în care aceste biomolecule pro și anti-inflamatorii pot interacționa în inițierea, progresiunea și rezoluția leziunilor hepatocitare induse imunologic din cadrul hepatitelor acute virale A și B.

PhD THESIS - ABSTRACT

Clinical - immunological correlations in the evolution of acute viral hepatitis

PhD candidate **Melinda Milena Horvat, MD**

Scientific coordinator **Professor Dumitru Cârstina, MD, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Etiology and pathogeny of acute viral hepatitis A and B	17
1.1. Etiology of acute viral hepatitis A and B	17
1.1.1. Hepatitis A virus	17
1.1.2. Hepatitis B virus	18
1.2. Pathogeny of acute viral hepatitis A and B	19
1.2.1. Pathogeny of acute viral hepatitis A	19
1.2.2. Pathogeny of acute viral hepatitis B	20
2. Epidemiological data, clinical and laboratory diagnosis in acute viral hepatitis A and B	25
2.1. Epidemiological data in acute viral hepatitis A and B	25
2.1.1. Epidemiological data in acute viral hepatitis A	25
2.1.2. Epidemiological data in acute viral hepatitis B	26
2.2. Clinical diagnosis of acute viral hepatitis A and B	27
2.2.1. Clinical diagnosis of acute viral hepatitis A	27
2.2.2. Clinical diagnosis of acute viral hepatitis B	28
2.3. Laboratory diagnosis of acute viral hepatitis A and B	29
2.3.1. Laboratory diagnosis of acute viral hepatitis	29
2.3.2. Etiological diagnosis of acute viral hepatitis A	30
2.3.3. Etiological diagnosis of acute viral hepatitis B	31
3. Immuno-inflammatory response in acute viral hepatitis A and B	33
3.1. Immune response – general data	33
3.1.1. Innate immune response	33
3.1.2. Adaptive immune response	34
3.2. Immune response in acute viral hepatitis A	35
3.2.1. Cellular immune response	36
3.2.2. Humoral immune response	37
3.3. Immune response in acute viral hepatitis B	38
3.3.1. Innate immune response	39
3.3.2. Adaptive immune response	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	47
2. General methodology	51

3. Study 1 – Acute viral hepatitis A – description of epidemiological, clinical-biological and evolutive aspects	55
3.1. Introduction	55
3.2. Work hypothesis/objectives	55
3.3. Material and method	56
3.4. Results	57
3.5. Discussion	66
3.6. Conclusions	69
4. Study 2 – Profile of cytokines involved in immuno-inflammatory response in acute viral hepatitis A	71
4.1. Introduction	71
4.2. Work hypothesis/objectives	71
4.3. Material and method	72
4.4. Results	73
4.5. Discussion	81
4.6. Conclusions	85
5. Study 3 – Acute viral hepatitis B – description of clinical-biological and evolutive aspects	87
5.1. Introduction	87
5.2. Work hypothesis/objectives	87
5.3. Material and method	88
5.4. Results	88
5.5. Discussion	98
5.6. Conclusions	100
6. Study 4 – Profile of cytokines involved in immuno-inflammatory response in acute viral hepatitis B	103
6.1. Introduction	103
6.2. Work hypothesis/objectives	104
6.3. Material and method	104
6.4. Results	105
6.5. Discussion	119
6.6. Conclusions	124
7. General conclusions (synthesis)	127
8. Originality and innovative contributions of the thesis	131
REFERENCES	133

Key words – acute viral hepatitis A, acute viral hepatitis B, immune-inflammatory response, cytokines, Luminex.

Introduction

Hepatitis A virus (HAV) and hepatitis B virus (HBV) infections are currently an important public health problem at international level, producing a wide spectrum of clinical manifestations, which vary from asymptomatic, subclinical form of the disease to moderate, severe or even fulminant evolution forms, with acute hepatic failure.

In viral infection, the immune response has two components: a non-specific immune response, represented by the activation of natural killer (NK) as well as natural killer T (NKT) cells, with cytokine production, and a specific viral cellular and humoral immune response. Both host immune responses and viral factors are involved in the pathogenesis and clinical evolution of HAV and HBV infections. The interaction between hepatitis viruses and the host entails the evolution of acute viral hepatitis, an essential role being played by the immune system, through the local and systemic production of cytokines, along with innate and adaptive immune responses.

Cytokines, polypeptide molecules that mediate intercellular communication, play an essential role in the regulation of the host immune response, both directly, by inhibiting viral replication, and indirectly, by inducing the predominant pattern of immunological mechanisms. The imbalance of these biomolecules as well as their genetic polymorphism play an important role in the promotion of inflammatory reactions responsible for massive hepatic lesions in fulminant hepatitis. Cytokines, through humoral and cell-mediated immune responses, are involved in immunopathogenesis, as well as in antiviral activity, viral clearance, viral persistence, apoptosis and fibrogenesis.

The role of cytokines in HBV infection is complex. There is a mutual interaction between them, in which IFN- γ has a principal role, producing the release of other cytokines by the immune system cells, in order to improve the immune mediated cytotoxic activity.

The literature data suggest the fact that in HBV infection, the profile of circulating cytokines is correlated both with the virus replication level and hepatic disease activity, viral clearance being mediated by cytokines secreted as part of innate and adaptive immune responses. The level of activation of T cells to viral antigenic stimuli can be assessed by measuring the serum concentration of cytokines and chemokines.

The dynamic interaction between hepatitis viruses and the host inflammatory response as well as the consecutive impact of this interaction on the clinical evolution of acute viral hepatitis are not yet completely understood, and the reasons for viral persistence are not completely elucidated. This is why further studies are required, with the extension of the serological profile of cytokines, as well as the dynamic

evaluation of these biomolecules during the evolution of acute viral hepatitis, in order to identify their role in the early diagnosis of severe and fulminant disease forms.

In this thesis we aimed to analyze the serological profile of some pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute viral hepatitis A (AHA) and acute viral hepatitis B (AHB) in adults, by comparing to a control group; the serum concentrations of these biomolecules were also correlated with the activity and evolution forms of hepatitis.

PERSONAL CONTRIBUTION

Work hypothesis/objectives

Hepatitis A virus (HAV) and hepatitis B virus (HBV) infections are associated with considerable morbidity and mortality.

The diagnosis of acute viral hepatitis A (AHA) and B (AHB) is essential, considering their extremely various clinical manifestations and evolutive spectrum. Thus, HBV infection causes a wide spectrum of hepatic disorders that may vary from asymptomatic carriers to self-limited acute hepatitis, fulminant hepatitis with hepatic failure and chronic infection.

The studies performed in the field of hepatology allowed the description of the pathogenetic mechanisms involved in acute viral hepatitis, demonstrating the reduced cytopathogenic effect of HAV and HBV, the lesions being predominantly induced by the complex innate and acquired, cellular and humoral immunological response. Over the past decades, important progress has been achieved in the description of the immunopathogenesis of acute hepatic disease, correlated with the detection of new biological markers involved in the immune response to hepatitis viruses, with a potential therapeutic impact.

The evolution of AHA and AHB depends on the interaction between the virus and host, the competence of the immune system conferred by the local and systemic production of cytokines, as well as the innate and adaptive immune responses, being essential. Although cytokines modulate viral replication control, viral clearance and protection from reinfection are achieved by the adaptive immune response.

Patients with a self-limited evolution of AHB develop a multispecific polyclonal immune response of cytotoxic T cells (CD8+) to viral antigens, mediated by T helper cells (CD4+). The early limitation of viral replication, the maturing of the adaptive immune response, associated with IFN- γ and TNF α secretion in the liver determine the resolution of acute HBV infection. CD8+ T cells specific for HBV are the main effector cells involved in the clearance and the control of HBV infection; these cells can also initiate hepatic injury.

In HBV infection, the profile of circulating cytokines is correlated with the virus replication level as well as the hepatic disease activity. Viral clearance is modulated by cytokines secreted by the innate and adaptive immune response cells.

Although many studies over the past years support the role of cytokines in the immunopathogenesis of AHA and AHB, there are currently no consensus conclusions. Further studies regarding the immunopathogenesis of AHB will allow in the future the development of immunomodulatory strategies in order to obtain an effective anti-HBV immune response. In the present study we aimed to assess the serum concentrations of some pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in AHA and AHB by comparing to a control group, analyzing in the same time the profile of these biomolecules in relation to the forms of activity of hepatitis.

The objectives proposed in the personal research contribution were structured in four studies, carried out over a four years period (2008-2011) at the Clinical Hospital of Infectious Diseases from Cluj-Napoca.

Studies 1 and 3 include a description of demographic, clinical-biological and evolutive data in patients with AHA and AHB, as well as an analysis of biohumoral parameters, in order to identify markers suggestive for the severe evolution of the disease, by comparing moderate and severe forms of the hepatitis.

In studies 2 and 4, the serum concentrations of some pro- and anti-inflammatory cytokines were measured, in order to evaluate the role of these biomarkers of immune-inflammatory response in the immunopathogenesis of AHA and AHB. The profile of cytokines depending on the clinical evolution form of hepatic disease was also assessed, in order to identify some biomarkers characteristic of severe disease forms. The analysis of correlations between the serum concentrations of these biomolecules and the values of biohumoral parameters characteristic of moderate and severe disease forms, as well as their implication in viral clearance in HBV infection, may represent data with a potential prognostic value for severe forms of acute viral hepatitis, with a possible impact on future immunomodulatory therapies.

General methodology

The study protocol was approved by the Ethics Board of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, according to the Helsinki declaration.

The present studies included patients aged over 18 years, diagnosed with AHA and AHB according to the case definitions: suggestive clinical symptomatology, associating jaundice and increased alanine aminotransferase values, as well as the presence of anti-HAV IgM antibodies in AHA and anti-HBc IgM antibodies for AHB. Patients with HIV infection, co-infected with HDV, HCV, and patients with acute CMV and EBV infection were excluded.

Based on the prothrombin index (PI), INR, Prothrombin time (PT), presence/absence of clinical neurological signs, the patients were stratified into two

groups: patients with severe hepatitis, with PI<50%, INR>1.5 and PT>16 seconds, with or without neurological manifestations; patients with moderate hepatitis, with PI>50%, INR<1.5 and PT<16 seconds, without neurological manifestations.

The xMAP Multiplex (Luminex) technique was used to measure the serum concentrations of some pro- and anti-inflammatory cytokines involved in the immune response: interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and interleukin-10 (IL-10). The control group, in which the serum concentrations of these cytokines were determined, consisted of 14 healthy volunteers.

For statistical analysis and the description of data, the SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, USA) was used.

Study 1. Acute viral hepatitis A – analysis of epidemiological, clinical-biological and evolutive aspects

Introduction

From an epidemiological point of view, acute viral hepatitis A (AHA) has large variations in endemicity, age at the time of infection and frequency of the disease. The clinical evolution of the disease can be influenced by age and the host immune status, varying from asymptomatic infection to fulminant hepatitis.

Work hypothesis

The study aimed an analysis of demographic, clinical-evolutive and laboratory aspects of AHA in adults, over a 4-years period, in a geographical area from North-West Romania, a country where anti-HAV vaccination is not compulsory. Another objective of the study was the identification of biohumoral parameters suggestive for the potentially severe evolution of the disease, by comparing the moderate and severe forms of AHA.

Material and method

This retrospective, observational and analytical study was carried out over a 4-years period on patients diagnosed with AHA.

Results

The study included 202 patients, representing 46.22% of all 437 AHA cases hospitalized during the course of the 4 years. For the analyzed time frame, a relatively homogeneous annual distribution of AHA cases was found, except for 2010, when an epidemic peak including 104 cases (51.48%) was recorded, most probably due to a regional microepidemy, which is supported by the positive epidemiological inquiry in

the majority of the cases. The analysis of the demographic characteristics of the patients from our study revealed that 72.7% of these were aged less than 40 years.

Concerning the presence of hepatocytolysis syndrome in AHA, an increased Alanine aminotransferase (ALAT) value at admission was found compared to Aspartate aminotransferase (ASAT), ALAT/ASAT 1.78; over 80% of the patients had ALAT values ranging between 20-100 x NV (NV – normal value, 40 UI/dL).

The univariate analysis of biohumoral parameters at admission revealed for ALAT and ASAT the presence of statistically significant correlations ($p < 0.05$) with PI ($r = -0.54$, $r = -0.60$), INR ($r = 0.53$, $r = 0.60$), PT ($r = 0.53$, $r = 0.57$), total Bilirubin (BR) ($r = 0.28$, $r = 0.26$), thrombocytes ($r = -0.42$, $r = -0.41$) and C reactive protein (CRP) ($r = 0.25$, $r = 0.25$).

According to stratification criteria, 20.8% of the studied patients had severe disease forms. Hemorrhagic cutaneomucous manifestations, present in 7% of the patients, were statistically significantly associated with severe AHA forms ($p = 0.001$, OR=12.19, 95%CI 3.59-41.3).

The study demonstrated the presence of a statistically significant difference ($p < 0.05$) between severe and moderate AHA forms for the following biohumoral parameters at admission: PI, INR, PT, ALAT, ASAT, total BR, Alkaline phosphatase (ALP), CRP and thrombocytes.

In the analyzed group, the increased values of AUC (area under the curve), sensitivity and specificity for PT (cut-off 21.45 seconds) and INR (cut-off 1.61) support the diagnostic value of these parameters for severe AHA forms. Also, ALAT, ASAT and CRP proved to have a predictive role for severe AHA forms.

Through logistic regression, the Enter method, it was established that ALP (values > 500 IU/dL, OR=7.4), CRP (values > 1.5 mg/dL, OR=2.9) and thrombocytes (values $< 150.000/mm^3$, OR=2.69) had a predictive role in determining the severe AHA forms, and based on the equation $\ln(p / 1 - p) = AP(1) \times 2.01 + CRP(1) \times 1.06 + \text{thrombocyte}(1) \times 0.99 + 1.52$, for each patient with AHA, a prediction score for the severe form of the disease could be calculated ($\ln$ – natural logarithm, p – probability for each patient to have the severe form of AHA).

Study 2. Profile of cytokines involved in the inflammatory response in acute viral hepatitis A

Introduction

The mechanism of hepatic impairment in HAV infection is not completely understood, but the majority of the data support an immune mediated mechanism, involving the cellular, humoral and innate immune system.

The activation of the immune system, as a response to viral aggression, leads to the production of cytokines that act as mediators of the inflammatory process of the

disease activity. Contrary to the older concept of an initial pro-inflammatory response followed by an anti-inflammatory response, in acute hepatitis these opposite functional processes occur simultaneously, although in time, the balance can shift towards an anti-inflammatory response.

Work hypothesis

This study aimed to evaluate the role of some pro- and anti-inflammatory cytokines in the immunopathogenesis of AHA in adults, by measuring the serum concentrations of these biomolecules in the acute phase of the disease and by comparing them to those of a control group. Also, the serum levels of the studied cytokines were assessed depending on the clinical forms of the disease, in order to identify some biomarkers characteristic of severe AHA forms. The correlation between serum cytokine concentrations and different biochemical parameters was analyzed in patients with moderate and severe AHA.

Material and method

This was an analytical, longitudinal, prospective, comparative study, carried out over a 2-year period (2010-2011), which included 20 patients diagnosed with AHA, in whom the serum concentrations of some cytokines involved in immune response were measured: IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1Ra and IL-10.

Results

In patients with AHA compared to the control group, significantly increased values ($p < 0.001$) of the serum concentrations of IL-1Ra, IL-6, IL-10, TNF- α were found. In contrast, for IL-1 β ($p = 0.29$) and IFN- γ ($p = 0.15$), these differences could not be established.

The significantly increased AUC value ($p < 0.05$) for IL-1Ra (0.92), IL-6 (0.92), IL-10 (0.95) and TNF- α (0.85) along with high sensitivity and specificity parameters support the importance of these cytokines as biomarkers of the inflammatory response in AHA.

Univariate analysis shows for IL-1Ra the presence of statistically significant negative correlations ($p < 0.05$) with PI ($r = -0.56$) and thrombocytes ($r = -0.40$), as well as positive correlations with INR ($r = 0.57$), PT ($r = 0.53$), ASAT ($r = 0.50$) and total BR ($r = 0.40$). The presence of a significant negative correlation ($p = 0.01$) was found between IL-10 concentration and PI ($r = -0.43$), the rest of the correlations of this biomarker with laboratory parameters being statistically insignificant. For the two other cytokines, IL-6 and TNF- α , no significant correlations with biohumoral parameters could be evidenced.

Between the severe and moderate forms of AHA, significant differences ($p = 0.04$) were detected for IL-1Ra and IL-6 concentrations, both with higher values in patients with severe AHA. Using the ROC curves and AUC calculation, the value of these

cytokines as potential biomarkers of severity in AHA was assessed. Thus, the significantly increased value ($p=0.04$) of AUC for IL-1Ra (0.75) supports the importance of this cytokine as a potential biomarker of the immune response for severe AHA forms. The ROC curve documents the presence of increased sensitivity and specificity of IL-1Ra at a cut-off value of 1929.44.

Univariate analysis in patients with severe AHA showed statistically significant positive correlations ($p<0.05$) of IL-1Ra with IL-6 ($r=0.64$) and IL-10 ($r=0.45$). Significant correlations of IL-6 with TNF- α ($r=0.76$) and IFN- γ ($r=0.76$) were also found. In moderate disease forms, there was a good statistically significant correlation between IL-1Ra and TNF- α ($r=0.68$, $p=0.03$).

In multivariate analysis by logistic regression, the ENTER method, using the cytokine concentrations with a significant value on univariate analysis as independent variables, it was established that the values of cytokines IL-1Ra (OR=1.2) and TNF- α (OR=0.001) might have a predictive role in the diagnosis of severe AHA. For each patient with AHA, using the regression equation, a prediction score for the severe form of the disease could be calculated: $\ln(p/1-p) = \text{IL-1Ra} \times 0.001 - \text{TNF-}\alpha \times 9.276 - 1331.63$, where: $\ln$ – natural logarithm, p – probability for each patient to have the severe AHA form.

Study 3. Acute viral hepatitis B – clinical-biological and evolutive aspects.

Introduction

The natural evolution of hepatitis B virus (HBV) infection is determined by the interconditioning between the host factor and the viral factor.

Work hypothesis

This study aimed to analyze the clinical-evolutive and laboratory aspects of acute viral hepatitis B (AHB) over a 4-years period in a geographical area of North-West Romania.

Other objectives of the study were: the identification of biohumoral parameters suggestive for the potentially severe evolution of the disease, by comparing the moderate and severe AHB forms, as well as the identification of biological markers suggestive for HBsAg clearance at 6 months.

Material and method

This was a retrospective, observational and analytical study, carried out over a 4-year period on patients diagnosed with AHB. Subsequently, a subgroup of patients of the study group were followed up for 6 months after discharge.

Results

The present study included 102 patients with AHB. Over the studied time frame, there was a decrease in the annual distribution of AHB cases, with the highest percentage in 2008 (43.13%). The age distribution of patients with AHB shows the fact that 50% of the cases belonged to the 18-29 years and the 30-39 years age group.

Regarding the presence of hepatocytolysis syndrome in AHB, an increased ALAT value at admission was found compared to ASAT (ALAT/ASAT 1.58), 87.25% of the patients having ALAT values ranging between 20-100 x NV.

Of patients with AHB, 43.14% had positive HBeAg at admission. No significant association could be found between severe disease forms and the presence of HBeAg at admission ($p=0.17$, $OR=0.49$, $95\%CI$ 0.19-1.27). For ALAT and ASAT, no significant differences depending on the HBeAg status at admission could be established. PI had significant ($p=0.03$) low values, in patients with negative HBeAg at admission. The univariate analysis of biohumoral parameters at admission detected for ALAT and ASAT the presence of statistically significant correlations ($p<0.05$) with PI ($r=-0.41$, $r=-0.32$), INR ($r=0.51$, $r=0.37$) and total BR ($r=0.40$, $r=0.34$).

Based on stratification criteria, 25.49% of patients with AHB had severe disease forms. This study demonstrated the presence of statistically significant differences between the severe and moderate AHB forms for the following biohumoral parameters, measured at admission: ALAT, ASAT, PT, INR, PI, total BR, and thrombocytes. In the analyzed group, the increased values of AUC, sensitivity and specificity for PT (cut-off 21.7 seconds) and INR (cut-off 1.65) support the importance of these parameters in the diagnosis of severe AHB forms. Also, ALAT and ASAT proved to have a predictive role for severe AHB forms. The univariate analysis revealed the fact that the serum values determined at admission for $ALAT>1500$ UI/dL, $ASAT>1000$ UI/dL, $PT>20$ seconds, $INR>1.5$, total BR >6 mg/dL and CRP >1.5 mg/dL were statistically significantly correlated ($p<0.05$) with severe AHB forms. The multivariate analysis using logistic regression showed that $INR>1.5$ represented the only significant and independent factor correlated with evolution towards severe forms, in patients with AHB in the present study.

The univariate analysis of biological parameters revealed that the serum values at admission for $ASAT>1000$ UI/dL and total BR >6 mg/dL were statistically significantly correlated ($p<0.05$) with HBsAg clearance at 6 months. By multivariate analysis using logistic regression, based on the equation $\ln(p/1-p) = -ASAT(1) \times 1.88 - \text{total BR}(1) \times 0.82 + 0.03$, for each patient with AHB from the study, a predictive score for HBsAg clearance could be easily calculated ($\ln$ -natural logarithm, p - probability for each patient to have HBsAg clearance at 6 months).

Study 4. Profile of cytokines involved in immuno-inflammatory response in acute viral hepatitis B

Introduction

The immunopathogenesis of hepatic diseases induced by HBV involves multiple mechanisms, correlated with viral replication and immune response, including innate immunity, cell-mediated immunity specific for HBV and inflammatory cytokines.

Cytokines play an important role in the defense against viral infections both by direct action, inhibiting viral replication, and by an indirect mechanism, inducing the predominant pattern of the host immune-inflammatory response.

Work hypothesis

The present study aimed to evaluate the role of some pro- and anti-inflammatory cytokines in the immunopathogenesis of acute hepatitis B (AHB) in adults, by measuring the serum concentrations of these biomolecules in the acute phase of the disease and by comparing them to those of a control group. In order to identify biomarkers characteristic of severe disease forms, serum cytokine concentrations were evaluated in patients with AHB depending on the clinical form of the disease. Also, the profile of cytokines depending on the HBeAg status at admission was assessed. The correlation between serum cytokine concentrations and the biological parameters determined at admission was analyzed. The implication of cytokines in HBsAg clearance at 3 months and 6 months from the clinical onset of the disease was studied, in order to identify cytokines with a significant role.

Material and method

This was an analytical, longitudinal, prospective study, carried out over a 4 years period (2008-2011), which included 60 patients with AHB, in whom serum IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1Ra and IL-10 concentrations were measured. None of the patients of the present study received antiviral therapy.

Results

In patients with AHB compared to the control group, increased values were found, which were highly statistically significant ($p < 0.001$) for the serum concentrations of cytokines IL-1Ra, IL-6, IL-10, TNF- α . The significantly increased AUC value ($p < 0.001$) for TNF- α (0.97), IL-10 (0.95), IL-1Ra (0.89) and IL-6 (0.83) along with high sensitivity (Sn) and specificity (Sp) parameters support the role of these cytokines as potential biomarkers of the immuno-inflammatory response in AHB. For IL-1 β ($p = 0.62$) and IFN- γ ($p = 0.43$), no differences could be demonstrated between the median of their concentration in patients with AHB compared to the control group.

Through univariate analysis, in patients with AHB of the study group, highly statistically significant correlations ($p < 0.05$) between serum IL-1Ra concentrations

and TNF- α , IL-10 and IL-6 ($r=0.60$, $r=0.63$, $r=0.41$) were evidenced. There were found also statistically significant correlations ($p<0.05$) between IL-10 concentrations and TNF- α and IL-6 ($r=0.66$, $r=0.32$). The univariate analysis between the serum concentrations of cytokines with a diagnostic value in AHB (IL-1Ra, IL-10, IL-6, TNF- α) and the biohumoral parameters determined at admission revealed the presence of statistically significant correlations ($p<0.05$) for IL-1Ra with PT ($r=-0.31$), for TNF- α and IL-10 with CRP ($r=0.34$, $r=0.41$) and ASAT ($r=0.30$, $r=0.31$). For IL-6 significant correlations with total BR values were found ($r=0.28$, $p<0.05$).

According to stratification criteria, 30% of the patients of the group had severe AHB forms. Statistically significant differences ($p<0.05$) between severe and moderate AHB forms were found for IL-1Ra, IL-6 and TNF- α concentrations, with higher IL-6 and TNF- α values and lower IL-1Ra values in patients with severe disease forms. The significantly increased AUC value ($p=0.04$) for IL-1Ra (0.68), with Sn 93% and Sp 44%, at a cut-off value of 2054.76, might support the role of this interleukin as a possible severity biomarker of immun-inflammatory response in AHB. In multivariate analysis by logistic regression, the ENTER method, using cytokine concentrations with a significant value as independent variables, it was established that TNF- α (OR=18.98), IL-6 (OR=13.14) and IL-1Ra (OR=0.8) might have a predictive role in the diagnosis of severe AHB. For each patient with AHB, a predictive score for the severe disease form could be calculated using the regression equation: $\ln(p/1-p) = \text{TNF-}\alpha \times 2.94 + \text{IL-6} \times 2.57 - \text{IL-1Ra} \times 0.001 - 1.41$, where $\ln$ – natural logarithm, p – probability for each patient to have a severe AHB form. For the IL-1Ra/IL-1 β ratio and the TNF- α /IL-10 ratio, a significant difference ($p<0.05$) was found between their value in patients with severe AHB compared to those with the moderate disease form. The significantly increased AUC value ($p<0.05$) (0.81) for the IL-1Ra/IL-1 β ratio (cut-off 93402.46, Sn 57% and Sp 78%) supports the importance of calculating this ratio in patients with severe versus moderate AHB forms.

In the present study, 36.66% of subjects with AHB had positive HBeAg at admission, the rest of 63.34% having negative HBeAg and positive anti-HBe antibodies. Statistically significant differences between serum cytokine concentrations in patients with AHB stratified depending on HBeAg could not be established ($p>0.05$).

The implication of cytokines in HBsAg clearance at 3 months and 6 months from the clinical onset of the disease was analyzed, in order to identify cytokines with a significant role in seroconversion. The evaluations performed at 3 month and 6 months from onset documented the fact that HBsAg clearance was present in patients with significantly increased values ($p<0.05$) of cytokines IL-10 and IL-1Ra. In the studied group, serum TNF- α concentrations were also higher in patients with HbsAg clearance. A significant association was also found between serum IL-10 values higher than 1.5 pg/mL and HbsAg clearance at 6 months (OR=26.95, 95%CI 1.48-480.7, $p=0.001$).

General conclusions

1. In AHA, over the 4 years of the study, there was a relatively homogeneous annual distribution of the cases, except for 2010, when a regional epidemic peak was recorded.
2. In patients with AHA, the PI value was statistically significantly correlated with the values of ALAT, ASAT, total BR, ALP, CRP, and thrombocytes.
3. Patients with AHA predominantly had moderate disease forms (79.2%).
4. The values of ASAT, ALAT, PI, INR, PT, total BR, ALP, CRP, thrombocytes measured at admission were significantly increased in patients with severe AHA compared to patients with moderate disease forms.
5. ALAT, ASAT, PT, INR and CRP parameters demonstrated diagnostic value for severe AHA forms.
6. Values of $ALP > 500 \text{ UI/dL}$, $CRP > 1.5 \text{ mg/dL}$ and of $\text{thrombocytes} < 150.000/\text{mm}^3$ may have possible predictive value in diagnosis of the severe form of AHA.
7. The significantly increased concentrations of cytokines IL-6, TNF- α , IL-1Ra and IL-10 in patients with AHA compared to the control group, along with increased values of AUC, sensitivity and specificity, demonstrate the simultaneous presence of the two components of inflammatory response, pro- and anti-inflammatory, at the disease onset.
8. Serum IL-1Ra and IL-6 concentrations were significantly increased in severe versus moderate AHA forms.
9. In patients with AHA in the present study, IL-1Ra and IL-10 values were negatively, statistically significantly correlated with PI.
10. Serum IL-1Ra and TNF- α concentrations may have a predictive role in the determinism of the severe AHA form.
11. In AHB, over the 4-years period of the study, a decrease in the annual distribution of the cases was seen; in the first year of the study, a percentage of 43.13% of all cases was recorded.
12. At admission, 43.14% of the patients had positive HBeAg, and 56.86% had positive HBeAb, which might support the implication of mutated variants in our geographical area.
13. The values of ALAT, ASAT, PI, INR, PT, total BR, and thrombocytes measured at admission were significantly increased in patients with severe versus moderate forms of AHB.
14. Univariate analysis showed the fact that the serum values of $ALAT > 1500 \text{ UI/dL}$, $ASAT > 1000 \text{ UI/dL}$, $PT > 20 \text{ seconds}$, $INR > 1.5$, $\text{total BR} > 6 \text{ mg/dL}$ and $CRP > 1.5 \text{ mg/dL}$ were correlated with severe AHB forms.
15. In patients with AHB of the present study, univariate analysis demonstrated that ASAT values $> 1000 \text{ UI/dL}$, total BR $> 6 \text{ mg/dL}$ were correlated with HBsAg clearance at 6 months.

16. The significantly increased concentrations of cytokines IL-6, TNF- α , IL-1Ra and IL-10 in patients with AHB in the study group compared to the control group, along with increased values of AUC, sensitivity and specificity, support the role of these cytokines as potential biomarkers of immune-inflammatory response in AHB.
17. Serum TNF- α and IL-10 values were positively correlated with CRP and ASAT values.
18. Increased serum TNF- α and IL-6 concentrations in patients with severe AHB compared to moderate disease forms support the role of these cytokines as markers for the severity of the disease.
19. In severe AHB forms compared to moderate forms, low IL-1Ra concentrations, along with increased AUC values, sensitivity and specificity, sustain the role of this cytokine as a severity biomarker, with a possible diagnostic and prognostic value for severe disease forms.
20. In the present study, the serum concentrations of the studied cytokines could not be influenced by the HBeAg status at admission.
21. Serum TNF- α , IL-6 and IL-1Ra concentrations may have a predictive role in the diagnosis of the severe AHB form.
22. HBsAg clearance at 3 months and 6 months, respectively, from the onset of the disease was present in patients with significantly increased values of cytokines IL-10 and IL-1Ra.
23. In patients with AHB of the study group, a significant association between serum IL-10 concentrations higher than 1.5 pg/mL and HBsAg clearance at 6 months was found.

Originality and innovative contributions of the PhD thesis

Despite all progress achieved in the field of antiviral therapy and prophylaxis (implementation of anti-HAV and anti-HBV vaccines), acute viral hepatitis continues to remain an important public health problem, with a possible unpredictable evolution toward the fulminant form (with death in the absence of liver transplantation). Recent studies warn of the increase in morbidity through cirrhosis and hepatocellular carcinoma post-HBV infection.

It is known that in the pathogenesis and the clinical evolution of HBV and HAV infection, both viral factors and host immune responses are involved. Over the past years, important progress in the immunopathology of hepatitis has been achieved, in close correlation with the description of markers implicated in the immune response.

This study aimed a complex investigation of the epidemiological, clinical-evolutive aspects of AHA and AHB in a geographical area of North-West Romania, as well as the correlations between the evolutive forms of the disease and immune-inflammatory response markers.

The general part of the thesis was an extensive and updated presentation of general knowledges of immunology, as well as of particular aspects of immune response in AHB and AHA. The role of the six pro- and anti-inflammatory cytokines involved in the immunopathogenesis of acute HAV and HBV infection in adults was evaluated, and the presence of both components of the inflammatory response at the disease onset was demonstrated. The originality of the thesis resides in the study of prognostic factors for the severe forms of the disease in patients with AHA and AHB, as well as in the analysis of the profile of some cytokines involved in the determinism of the disease forms.

Further studies, with the extension of the serological profile of cytokines are necessary in order to elucidate the way in which these pro- and anti-inflammatory biomolecules can interact in the initiation, progress and resolution of immunologically induced hepatocytic lesions in acute viral hepatitis A and B.