

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

**Genotipul receptorilor KIR și al genelor HLA – factori de prognostic în
infecția cronică cu virusul hepatitic C**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MIRCEA DICULESCU

Student-doctorand:

URSU (căs. VIȘAN) LARISA-DENISA

ANUL

2021

CUPRINS

LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	4
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI.....	8
Introducere.....	10
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Date generale privind infecția cronică cu virusul hepatitic C	15
1.1. Prevalența VHC	15
1.2. Epidemiologia VHC	15
1.3. Ciclul de viață al VHC	16
1.4. Diagnosticul infecției VHC	17
1.5. Markerii fibrozei.....	20
1.6. Tratatamentul infecției cu VHC	23
1.6.1. Efectul terapiei pe bază de IFN- α / ribavirină pegilată asupra celulelor NK	24
1.6.2. Efectul terapiei antiviralelor cu acțiune directă asupra celulelor NK	24
2. Răspunsul imun în infecția VHC	26
2.1. Implicarea celulelor NK în imunitatea înăscută și cea adaptativă.....	26
2.2. Răspunsul antiviral mediat de celulele T specifice	27
2.3. Răspunsul imun umoral în infecția cu VHC	28
2.4. Incapacitatea răspunsului imun adaptativ în controlul VHC.....	28
2.5. Rolul citokinelor în infecția VHC	29
3. Genele KIR și liganzii HLA corespunzători.....	30
3.1. Celulele natural killer	30
3.1.1. Rolul celulei NK în hepatita C acută.....	30
3.1.2. Rolul celulei NK în hepatita C cronică	32
3.2. Receptorii KIR	33
3.2.1. Polimorfismul receptorilor KIR	34
3.2.2. Diversitatea genelor KIR.....	35
3.3. Genele KIR și liganzii HLA corespunzători	38
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	40
4. Scopul și obiectivele studiului.....	40
5. Pacienți și metode	41
5.1. Loturi de pacienți.....	41

5.2. Metode de lucru	43
5.2.1. Izolarea ADN genomic.....	43
5.2.2. Genotiparea genelor HLA	45
5.2.3. Genotiparea genelor KIR	51
6. Rezultate	55
6.1. Caracteristici generale ale grupului de studiu	55
6.2. Frecvența genelor KIR	57
6.3. Frecvența alelelor HLA de clasă I	59
6.3.1. Frecvența alelelor HLA-A în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control	59
6.3.2. Frecvența alelelor HLA-B în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control	61
6.3.3. Frecvența alelelor HLA-C în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control	64
6.4. Distribuția interacțiunilor moleculare gene KIR liganzi-HLA la pacienții cu hepatită cronică VHC	66
6.5. Distribuția genelor KIR și HLA la pacienții cu VHC cronică ce prezintă diferite stadii de fibroză	67
6.5.1. Distribuția liganzilor HLA la pacienții cu hepatită cronică cu VHC ce prezintă diferite stadii de fibroză.....	67
6.5.2. Distribuția genelor KIR la pacienții cu VHC ce prezintă diferite grade de fibroză (F0-F2 vs F3-F4)	68
6.5.3. Distribuția alelelor HLA de clasă I la pacienții cu HCV ce prezintă diferite grade de fibroză (F0-F2 vs F3-F4)	69
6.5.4. Distribuția genotipurilor KIR în rândul pacienților cu ciroză, versus pacienți fără ciroză	74
6.5.5. Distribuția ligandului HLA A3, A11 în rândul pacienților cu ciroză, versus pacienți fără ciroză	75
6.5.6. Distribuția liganzilor Bw4, Bw6 în rândul pacienților cu ciroză, versus pacienți fără ciroză.....	76
6.5.7. Distribuția liganzilor C1, C2, C1C1, C1C2, C2C2 în rândul pacienților cu ciroză, versus fără ciroză.....	77
6.6. Corelații între genele KIR și parametrii biochimici specifici.....	78

6.6.1. Grafice ale rezultatelor reprezentative privind corelațiile între genele KIR și parametrii biochimici specifici.....	95
6.7. Corelații între liganzii HLA ai genelor KIR și parametrii biochimici	101
6.7.1. Grafice ale rezultatelor semnificativ statistice privind corelațiile între liganzii HLA ai genelor KIR și parametrii biochimici.....	115
7. Discuții	123
8. Concluzii și contribuții personale.....	128
Bibliografie.....	130
Anexe	153

Introducere

Infecția cu virusul hepatitei C (VHC) este una dintre cele mai importante amenințări la adresa sănătății, la nivel mondial înregistrându-se aproximativ 71 de milioane de infectări [1]. Prevalența VHC variază la nivel global, prevalența infecției cu VHC este de 3,23% în România fiind una dintre cele mai mari comparativ cu alte țări europene [2].

Este cunoscut faptul că infecția cu VHC se asociază cu hepatita acută sau cronică și cu cancerul hepatic [3, 4]. O serie de factori ca genotipul viral, factorii de mediu și/sau comportamentali (coinfecții, consumul de alcool), factorii genetici ai gazdei exercită un impact major asupra evoluției infecției cu VHC [5, 6].

Prima linie de apărare împotriva infecțiilor virale precum VHC este sistemul imunitar înăscut reprezentat de celulele dendritice și celulele natural killer (NK). Celulele NK, joacă un rol crucial în apărarea împotriva tumorilor și a infecțiilor virale contribuind, de asemenea, la răspunsul imun din cadrul infecțiilor cronice cu VHC [13-15].

Celulele NK pot recunoaște hepatocitele infectate cu virus datorită interacțiunii dintre receptorii lor și moleculele sistemului major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I exprimate pe suprafața tuturor celulelor nucleate [16]. Odată ce au fost detectate, celulele infectate sunt eliminate prin apoptoza mediată de receptorii NK, fie prin eliberarea de granule citotoxice, fie prin inducerea unui răspuns imun mediat de celule T [17, 18]. Este bine stabilit faptul că receptorii killer cell immuno-globulin-like (KIRs) sunt cei mai polimorfi receptori ai celulelor NK [19] și au capacitatea de a se lega de liganzii specifici, având ori un efect stimulator, ori un efect inhibitor asupra celulelor NK [20, 21].

La nivel mondial, mecanismele genetice responsabile de debutul și evoluția hepatitei cronice VHC precum și variațiile lor geografice sunt sub intensă cercetare. În același timp, niciun studiu nu s-a concentrat asupra legăturii dintre variabilitatea genelor KIR / HLA și infecția VHC la pacienții români. În acest context, scopul specific al prezentului studiu a fost investigarea prevalenței liganzilor KIR și alelelor HLA de clasă I la pacienții români cu hepatită cronică C și să exploreze posibilele asocieri între genele KIR și liganzii HLA respectivi. De asemenea, ne-am propus, în studiul de față să corelăm parametrii virusologici și biochimici cu genele KIR și liganzii lor specifici pentru a afla importanța clinică a acestora la pacienții infectați cu VHC.

Obiectivele studiului:

Dintre obiectivele prezentei teze enumerăm:

- analiza frecvenței genele KIR și a alelelor HLA de clasă I atât la pacienții cu infecție cronică VHC, cât și la grupul control;

- identificarea unor asocieri între genele KIR și liganzii HLA corespunzători;
- identificarea unor asocieri între genele KIR și progresia fibrozei către ciroză;
- distribuția alelelor HLA-A, HLA-B, HLA-C la pacienții cu HCV ce prezintă diferite grade de fibroză;
- corelații între genele KIR și parametrii biochimici (ALT, AST, GGT, bilirubina, ALP, AFP), corelații între genele KIR și valorile viremiei.

Pacienți si metode

Pentru acest studiu de tip transversal, au fost selectați un număr de 127 de pacienți cu infecție cronică VHC din cadrul Departamentului de Gastroenterologie și Hepatologie a Institutului Clinic Fundeni. Dintre aceștia un număr de 73 (57%) a fost reprezentat de bărbați, iar un număr de 54 (43%) a fost reprezentat de femei. În primă fază s-au colectat date despre vârsta infectării, durata infecției, valorile viremiei (la debutul tratamentului, la 12 săptămâni după tratament, la 24 săptămâni după tratament, la 48 săptămâni după tratament, respectiv la 1 an după tratament), tipul de antivirale administrate, valorile anumitor markeri biochimici, comorbidități asociate. Ulterior, prin metode de biologie moleculară au fost analizate genele KIR și alelele HLA de clasă I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) atât la grupul de studiu, cât și la grupul control (reprezentat din 130 de persoane sănătoase).

Testele diagnostice au inclus:

• Teste pentru depistarea infecției cu VHC:

- teste serologice pentru depistarea anticorpilor anti-VHC prin metoda imunoenzimatică cu ajutorul analizorului ARCHITECT *i1000SR*
- teste moleculare pentru detectarea genotipului viral și evaluarea încărcăturii virale: RT-PCR (Cobas 6800, Roche Molecular Diagnostics).

• **Teste biochimice:** ALT, AST, GGT, ALP, bilirubina totală, bilirubina directă. Acestea au fost efectuate prin metoda spectrofotometrică folosind analizorul Dimension® EXL TM 200 (Siemens Healthcare GmbH, Germania) împreună cu kiturile de detectare specifice.

• **Teste ale markerilor tumorali:** alfa-fetoproteina (AFP), a fost analizat[prin intermediul unui test de chemiluminiscență pe analizorul ARCHITECT 2000 (Abbott, SUA).

- **Teste genetice:**

- *genotiparea KIR* s-a efectuat utilizand metoda PCR-SSP (KIR Ready Gene, Inno-Train Diagnostik GmbH, Germany).

S-au analizat următoarele:

- ✓ gene inhibitorii: KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3;
- ✓ gene activatoare: 2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1;
- ✓ 2 pseudogene: 2DP1, 3DP1.

Genele framework (KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 și KIR3DP1) au fost prezente la toți indivizii și au fost utilizate ca parametrii pentru validarea tehnicii utilizate în studiu. Haplotipurile KIR, au fost determinate de prezența sau absența anumitor gene KIR în funcție de genotipul fiecărui individ.

- *genotiparea alelelor HLA de clasă I:* HLA-A, HLA-B, HLA-C a fost efectuată la pacienții cu VHC folosind o metoda PCR-SSP, conform instrucțiunilor producătorului (AllSet + TM Gold SSP, OneLambda, SUA). De asemenea, am identificat prezența a trei grupuri majore de ligand KIR: HLA-C1, HLA-C2 și HLA-Bw4.

- **Examinare ecografică a ficatului**

Pentru evaluarea fibrozei hepatice s-a folosit FibroScan®, denumit elastografie unidimensională tranzitorie (TE) ca forma neinvazivă de măsurare a gradului fibrozei hepatice. Această procedură neinvazivă a înlocuit biopsia hepatică la pacienții cu infecție VHC deoarece are valoare predictivă pozitivă mare pentru fibroza hepatică avansată/severă.

Stadiile fibrozei au fost clasificate pe o scară de la 0-4:

- F0 = fără fibroză;
- F1 = fibroză ușoară (<8 kPa) ;
- F2 = fibroză moderată (8,0-10,5 kPa);
- F3 = fibroză severă (10,0-14,0 kPa);
- F4 = ciroză (> 14,0 kPa).

Rezultate

1. Caracteristici generale ale grupului de studiu

Lotul de studiu analizat a fost alcătuit din 127 pacienți cu hepatită cronică VHC, dintre care 73 (57.5%) fiind femei și 54 (42.5%) fiind bărbați. Vârsta medie a pacienților a fost 58.2 ani, cu o vârstă medie a infectării 51.1 și cu o evoluție a bolii de 5 ani ($q_1=3.0$; $q_3=10.0$).

Evaluarea încărcăturii virale înainte de tratamentul cu AAD a arătat o valoare medie a ARN-VHC de 351.000 UI/mL, iar la evaluarea post-tratament viremia a fost nedetectabilă la 12, 24 și 48 de săptămâni.

În urma analizei parametrilor biochimici ce evaluează funcția hepatică, s-a observat o scădere de 2x a valorii medianei pentru AST (58.0 U/L vs 25.0 U/L) și ALT (65.0 U/L vs 24.0 U/L) după inițierea tratamentului.

Analiza gradului de fibroză prin Fibroscan® a arătat prezența fibrozei avansate/severe la 60 pacienți (47,2%). Din numărul total de pacienți VHC analizați, 8 pacienți (6.3%) nu au prezentat semne de fibroză (F0), 30 pacienți (23.6%) au avut fibroză ușoară (F1), 29 pacienți (22.8%) fibroză moderată (F2), 23 pacienți (18.1%) fibroză avansată (F3) și 37 pacienți (29.1%) au prezentat fibroză severă (F4).

În grupul nostru de studiu, cele mai frecvente comorbidități asociate cu infecția VHC au fost în ordinea apariției: sindrom metabolic (44,1%), patologii ale sistemului cardiovascular (35,4%) și bolile urogenitale (23,6%).

Grupul de control a fost format din 130 de indivizi cu serologie VHC negativă, 60 (46,2%) dintre aceștia fiind de sex masculin cu o vârstă medie de 54,6 ani; nu au existat diferențe semnificativ statistice în ceea ce privește sexul sau vârsta cazurilor și controalelor incluse în acest studiu.

2. Distribuția alelelor HLA-A în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control

Genotiparea HLA de clasă I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) a fost realizată folosind tiparea de înaltă rezoluție SSP-PCR, pentru a releva posibilele asocieri cu infecția VHC. Genotiparea fiabilă a fost obținută pentru toți pacienții și grupul control. În total, au fost identificate 28 de alele HLA-A, 48 alele HLA-B și 29 alele HLA-C prezente la grupul studiat. La nivelul locusului HLA-A, 13 alele (A*01:01, A*02:01, A*02:05, A*03:01, A*11:01, A*23:01, A*24:02, A*26:01, A*29:01, A*30:01, A*31:01, A*32:01, A*68:01) au

prezentat frecvențe > 1% la pacienții cu VHC cronică, reprezentând 70% din totalul alelelor HLA-A identificate.

HLA-A*23:01 ($p = 0.030$) a fost semnificativ mai frecvent în grupul pacienților cu VHC decât în grupul control (Tabel 2.1)

Atunci când pacienții cu VHC cronică au fost stratificați în funcție de grupele de vârstă (<65 de ani, respectiv >65 de ani), frecvența HLA A*23:01 ($p = 0.017$) a fost semnificativ mai mare în grupul celor <65 de ani.

Tabel 2.1 Distribuția alelelor HLA-A în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control

HLA-A	Pacienți VHC		Controale		Pacienți vs
	254 alele		260 alele		Controale
	n	%	n	%	p- value*
*01:01	29	11.4	33	12.7	0.657
*02:01	59	23.2	71	27.3	0.287
*02:05	3	1.2	0	0	0.079
*02:06	1	0.4	0	0	0.311
*02:09	1	0.4	0	0	0.311
*02:11	2	0.8	2	0.8	0.981
*02:17	1	0.4	1	0.4	0.987
*03:01	32	12.6	30	11.5	0.712
*03:02	1	0.4	0	0	0.311
*11:01	26	10.2	24	9.2	0.701
*23:01	9	3.5	2	0.8	0.030
*24:02	34	13.4	30	11.5	0.526
*24:03	0	0	2	0.8	0.161
*24:07	0	0	2	0.8	0.161
*25:01	1	0.4	3	1.2	0.327
*26:01	12	4.7	16	6.2	0.475
*29:01	3	1.2	0	0	0.079
*29:02	2	0.8	0	0	0.152
*30:01	6	2.4	4	1.5	0.499
*30:02	1	0.4	0	0	0.311

Testul square a	*31:01	4	1.6	4	1.5	0.973	*Chi- fost
	*32:01	12	4.7	15	5.8	0.596	
	*33:01	2	0.8	3	1.2	0.672	
	*33:03	1	0.4	6	2.3	0.061	
	*66:01	2	0.8	1	0.4	0.549	
	*68:01	9	3.5	9	3.5	0.960	
	*68:02	0	0	2	0.8	0.161	
	*74:01	1	0.4	0	0	0.311	

utilizat pentru a estima diferențele dintre pacienții cu hepatită cronică VHC și grupul control;
n: numărul de cazuri cu genotipuri relevante; semnificația a fost stabilită la o valoare $p < 0.05$.

3. Frecvența alelelor HLA-B în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control

În urma genotipării de înaltă rezoluție a alelelor HLA-B s-a obținut o valoare semnificativ statistică a alelei HLA-B*44:02 în rândul pacienților cu VHC cronică (26 (10.2%) vs. 11 (4.2%), $p = 0.008$). De asemenea, la limita semnificației statistice a fost alela HLA-B*27:02 (2 (0.8%) vs. 8 (3.1%), $p=0.060$) (Tabel 3.1).

Genotiparea fiabilă a fost obținută pentru toți pacienții și grupul control, fiind identificate un număr de 48 alele HLA-B prezente la grupul studiat. La nivelul locusului HLA-B, 27 alele (B*07:02, B*08:01, B*13:02, B*14:02, B*15:01, B*18:01, B*27:05, B*35:01, B*35:02, B*35:03, B*35:08, B*37:01, B*38:01, B*39:01, B*40:02, B*40:06, B*41:01, B*44:02, B*44:03, B*44:05, B*48:01, B*49:01, B*51:01, B*52:01, B*55:01, B*56:01, B*58:01) au prezentat frecvențe $> 1\%$ la pacienții cu VHC cronică, reprezentând 56% din totalul alelelor HLA-B identificate.

HLA B*49:01 ($p = 0.027$) a fost semnificativ mai frecvent în grupul >65 de ani al pacienților cu VHC cronică atunci când pacienții au fost stratificați în funcție de grupele de vârstă (<65 de ani, respectiv >65 de ani).

**Tabel 3.1 Distribuția alelelor HLA-B în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC
și în grupul control**

HLA-B	Pacienți VHC		Controale		Pacienți
	254 alele		260 alele		VHC vs
	n	%	n	%	Controale
*07:02	14	5.5	14	5.4	0.949
*07:05	2	0.8	0	0	0.152
*08:01	12	4.7	17	6.5	0.373
*13:01	1	0.4	0	0	0.311
*13:02	8	3.1	13	5.0	0.289
*14:02	5	2.0	8	3.1	0.424
*15:01	3	1.2	9	3.5	0.087
*15:03	1	0.4	0	0	0.311
*15:08	1	0.4	1	0.4	0.987
*15:17	0	0	1	0.4	0.322
*18:01	29	11.4	20	7.7	0.151
*18:03	0	0	1	0.4	0.322
*18:04	1	0.4	0	0	0.311
*27:02	2	0.8	8	3.1	0.060
*27:03	1	0.4	0	0	0.311
*27:05	6	2.4	8	3.1	0.619
*35:01	15	5.9	20	7.7	0.421
*35:02	4	1.6	5	1.9	0.763
*35:03	11	4.3	12	4.6	0.876
*35:05	1	0.4	0	0	0.311
*35:08	3	1.2	1	0.4	0.304
*37:01	3	1.2	3	1.2	0.977
*38:01	9	3.5	12	4.6	0.539
*39:01	5	2.0	6	2.3	0.790
*39:06	0	0	3	1.2	0.086
*40:01	1	0.4	3	1.2	0.327
*40:02	5	2.0	8	3.1	0.424

*40:06	5	2.0	3	1.2	0.456
*41:01	5	2.0	3	1.2	0.456
*41:02	2	0.8	1	0.4	0.549
*41:03	2	0.8	0	0	0.152
*44:02	26	10.2	11	4.2	0.008
*44:03	6	2.4	4	1.5	0.499
*44:05	3	1.2	1	0.4	0.304
*44:06	1	0.4	0	0	0.311
*47:01	2	0.8	4	1.5	0.428
*48:01	3	1.2	0	0	0.079
*49:01	8	3.1	3	1.2	0.118
*50:01	1	0.4	2	0.8	0.576
*51:01	25	9.8	24	9.2	0.813
*51:07	1	0.4	0	0	0.311
*51:08	0	0	1	0.4	0.322
*52:01	10	3.9	10	3.8	0.958
*55:01	4	1.6	4	1.5	0.973
*56:01	3	1.2	6	2.3	0.330
*57:01	1	0.4	1	0.4	0.987
*58:01	3	1.2	7	2.7	0.215
*73:01	0	0	2	0.8	0.161

Testul *Chi-square a fost utilizat pentru a estima diferențele dintre pacienții cu hepatită cronică VHC și grupul control; n: numărul de cazuri cu genotipuri relevante; semnificația a fost stabilită la o valoare $p < 0.05$.

4. Frecvența alelelor HLA-C în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control

De asemenea, au fost evaluate prin SSP de înaltă rezoluție alelele HLA-C atât la pacienții cu VHC cronic cât și la lotul control. Genotiparea fiabilă a fost obținută pentru toți pacienții și grupul control, fiind identificate un număr de 29 alele HLA-C prezente la grupul studiat. La nivelul locusului HLA-C, 19 alele (C*01:02, C*02:02, C*03:03, C*03:04, C*04:01, C*04:02, C*05:01, C*06:02, C*07:01, C*07:02, C*07:04, C*08:01, C*08:02,

C*12:02, C*12:03, C*14:02, C*15:02, C*16:01, C*17:03) au prezentat frecvențe > 1% la pacienții cu VHC cronică, reprezentând 65% din totalul alelelor HLA-C identificate.

Studiul a relevat prezența HLA-C*04:02 (7 (2.8%) vs. 0 (0%), $p = 0.007$) doar în rândul pacienților cu VHC cronică. În același timp, HLA-C*03:04 (3 (1.2%) vs. 11 (4.2%), $p = 0.034$) s-a dovedit a fi semnificativ mai frecvent în grupul de control decât în grupul de studiu (Tabel 4.1).

Atunci când pacienții cu VHC au fost stratificați în funcție de grupele de vârstă (<65 de ani, respective >65 de ani), nu s-au obținut diferențe semnificativ statistice.

Tabel 4.1 Distribuția alelelor HLA-C în grupul pacienților cu hepatită cronică VHC și în grupul control

HLA-C	Pacienți VHC		Controale		Pacienți VHC vs Controale p- value*
	254 alele		260 alele		
	n	%	n	%	
*01:01	0	0	1	0.4	0.322
*01:02	16	6.3	15	5.8	0.801
*02:01	1	0.4	0	0	0.311
*02:02	21	8.3	21	8.1	0.937
*03:02	2	0.8	5	1.9	0.267
*03:03	5	2.0	6	2.3	0.790
*03:04	3	1.2	11	4.2	0.034
*04:01	36	14.2	36	13.8	0.915
*04:02	7	2.8	0	0	0.007
*05:01	9	3.5	8	3.1	0.768
*05:02	1	0.4	0	0	0.311
*06:02	19	7.5	25	9.6	0.387
*07:01	39	15.4	37	14.2	0.720
*07:02	9	3.5	18	6.9	0.086
*07:04	4	1.6	3	1.2	0.681
*08:01	3	1.2	0	0	0.079
*08:02	3	1.2	8	3.1	0.138
*08:03	2	0.8	0	0	0.152

*12:02	10	3.9	13	5.0	0.560
*12:03	28	11.0	29	11.2	0.963
*14:02	4	1.6	4	1.5	0.973
*15:02	18	7.1	13	5.0	0.320
*15:05	2	0.8	2	0.8	0.981
*15:11	0	0	1	0.4	0.322
*16:01	3	1.2	1	0.4	0.304
*16:02	2	0.8	1	0.4	0.549
*16:04	1	0.4	0	0	0.311
*17:01	2	0.8	0	0	0.152
*17:03	4	1.6	2	0.8	0.395

Testul *Chi-square a fost utilizat pentru a estima diferențele dintre pacienții cu hepatită cronică VHC și grupul control; n: numărul de cazuri cu genotipuri relevante; semnificația a fost stabilită la o valoare $p < 0.05$.

5. Distribuția liganzilor HLA la pacienții cu hepatită cronică cu VHC ce prezintă diferite stadii de fibroză

Liganzii HLA ai pacienților cu infecție cronică VHC, au fost analizați în cele 2 grupuri rezultate în urma împărțirii pe grade de fibroză (F0-F2 vs F3-F4). Astfel, s-au obținut rezultate semnificativ statistice pentru ligandul HLA A3 și A11, acesta fiind mai frecvent în rândul pacienților cu un grad de fibroză severă sau de ciroză (F3-F4) comparativ cu grupul de fibroză ușoară-moderată (F0-F2) (31 (51.7%) vs 22 (32.8%), $p=0.047$, CI 95%= 1.066-4.486, OR= 2.187).

De asemenea, pentru liganzii Bw4, Bw6, C1, C2, homozigot C1C1, homozigot C2C2 și heterozigot C1C2 nu s-au obținut rezultate semnificativ statistice între cele două grupuri (F0-F2 vs F3-F4).

Table 5.1. Distribuția liganzilor HLA la pacienții cu hepatită cronică cu VHC ce prezintă diferite stadii de fibroză (F0-F2 vs F3-F4)

Liganzii HLA	F0-F2 (n=67)	F3-F4 (n=60)	Valoarea- p	OR (95% CI)
A3 și A11	22 (32.8)	31 (51.7)	0.047	2.187 (1.066 – 4.486)
Bw4	46 (68.7)	36 (60.0)	0.355	0.685 (0.330 – 1.421)

Bw6	21 (31.3)	24 (40.0)	0.355	1.460 (0.704 – 3.031)
C1C1	17 (25.4)	22 (36.7)	0.183	1.703 (0.796 – 3.643)
C1C2	34 (50.7)	24 (40.0)	0.285	0.647 (0.320 – 1.309)
C2C2	15 (22.4)	14 (23.3)	1.000	1.055 (0.460 – 2.418)
C1	51 (76.1)	46 (76.7)	1.000	1.031 (0.454 – 2.342)
C2	50 (74.6)	38 (63.3)	0.183	0.587 (0.274 – 1.256)
O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativ statistică. Alelele prezente în populația studiată ce se leagă de liganzii Bw4, Bw6, C1 și C2 au fost următoarele: - Bw4: *13, B*15:17, B*27, B*32:01, B*37:01, B*38, B*44, B*47, B*49, B*51, B*52, B*57 și B*58; - Bw6: B*07, B*08, B*14, B*15, B*18, B*35, B*39, B*40, B*41, B*48, B*50, B*55, B*56 și B* 73; - C1: C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*14 și C*16; - C2: C*02, C*04, C*05, C*06, C*15 și C*17.				

6. Distribuția alelelor HLA de clasă I la pacienții cu HCV ce prezintă diferite grade de fibroză (F0-F2 vs F3-F4)

Alelele HLA de clasă I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) au fost analizate în cele două grupuri F0-F2 vs F3-F4. Frecvența HLA-A*02:01 la pacienții cu fibroză F3-F4 a fost semnificativ mai mică decât grupul de fibroză F0-F2 (18 (30.0%) vs 33 (49.3%); $p = 0.031$; OR = 0.442, CI = 0.213 – 0.917). De asemenea, frecvența HLA A*23:01 este semnificativ mai mare în grupul pacienților cu fibroză ușoară-moderată F0-F2, comparativ cu grupul pacienților cu fibroză severă F3-F4 (8 (11.9%) vs 1 (1.9%); $p = 0.035$; OR = 0.125, CI = 0.015 – 1.031).

În ceea ce privește distribuția alelelor HLA-B la pacienții cu HCV ce prezintă diferite grade de fibroză nu s-au putut demonstra rezultate semnificativ statistice între cele două grupuri F0-F2 vs F3-F4.

În schimb, prezența HLA-C*12:02 a fost semnificativ mai mare în grupul cu fibroză F3-F4 decât la pacienții cu fibroză F0-F2 (11,7% vs 1,5%; $p = 0,026$; OR = 8,717, CI = 1,040 - 73,077).

6. Corelații între genele KIR și parametrii biochimici specifici

O altă linie de cercetare a fost evaluarea posibilelor legături între datele biochimice ale pacienților infectați cu VHC, prezența genelor KIR și a liganzilor lor HLA. Au fost luați în considerare următorii parametrii biochimici: AST înainte și după tratament, ALT înainte și după tratament, GGT, bilirubina totală, bilirubina directă, ALP și AFP.

Rezultatele studiului au arătat următoarele asocieri cu semnificație statistică:

- prezența *KIR2DL2* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AST după tratament (27.0 U/L ($q_1=22.0$; $q_3=40.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (22.5 U/L ($q_1=18.3$; $q_3=29.5$)), $p=0.013$;
- prezența *KIR2DL2* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mari ale medianei bilirubinei directe (0.3 mg/dl ($q_1=0.2$; $q_3=0.5$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (0.2 mg/dl ($q_1=0.2$; $q_3=0.4$)), $p=0.028$;
- prezența *KIR2DL3* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei ALT înainte de tratament (56.0 U/L ($q_1=35.0$; $q_3=104.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (117.5 U/L ($q_1=47.0$; $q_3=325.0$)), $p=0.011$;
- prezența *KIR2DL3* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mici ale medianei GGT (45.0 U/L ($q_1=26.0$; $q_3=76.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (98.5 U/L ($q_1=39.5$; $q_3=172.0$)), $p=0.021$;
- prezența *KIR2DL4del* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei AST după tratament (24.0 U/L ($q_1=19.0$; $q_3=32.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (29.0 U/L ($q_1=23.0$; $q_3=42.8$)), $p=0.018$;
- prezența *KIR2DL4del* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mici ale medianei AFP (4.1 ng/mL ($q_1=2.8$; $q_3=6.2$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (6.0 ng/mL ($q_1=3.5$; $q_3=12.4$)), $p=0.017$;
- prezența *KIR2DL5null* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AST după tratament (31.0 U/L ($q_1=23.0$; $q_3=42.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (24.0 U/L ($q_1=19.3$; $q_3=31.0$)), $p=0.009$;
- prezența *KIR2DL5null* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT (65.0 U/L ($q_1=32.0$; $q_3=158.0$)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (43.4 U/L ($q_1=25.3$; $q_3=82.8$)), $p=0.046$;

- prezența *KIR2DP1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AFP (5.1 ng/mL (q1=3.4; q3=8.8)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (3.8 ng/mL (q1=2.4; q3=5.9)), p=0.043;
- prezența *KIR2DS2* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT (56.5 U/L (q1=32.3; q3=124.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (38.0 U/L (q1=24.0; q3=66.0)), p=0.014;
- prezența *KIR2DS3* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ALT după tratament (29.0 U/L (2q1=0.5; q3=44.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei 23.0 U/L (q1=16.0; 3q3=4.0)), p=0.013;
- prezența *KIR2DS3* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mari ale medianei GGT (70.0 U/L (q1=32.5; q3=147.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (42.4 U/L (q1=25.8; q3= 68.5)), p=0.034;
- prezența *KIR2DS4del* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mari ale medianei ALP (88.0 U/L (q1=65.0; q3=110.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (84.0 U/L (q1=72.0; q3=118.0)), p=0.020;
- prezența *KIR3DL1* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei bilirubinei totale (0.6 mg/dl (0.4; 0.9)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (0.9 mg/dl (0.6; 1.5)), p=0.040.

-

7. Corelații între liganzii HLA ai genelor KIR și parametrii biochimici

În următoarea etapă, s-au analizat corelațiile între liganzii HLA ai genelor KIR și parametrii biochimici: AST înainte de tratament, AST după tratament, ALT înainte de tratament, ALT după tratament, GGT, ALP, AFP, bilirubină totală, bilirubină direct. De asemenea, s-au analizat corelațiile între liganzii HLA ai genelor KIR și ARN-VHC înainte de tratament, la 12 săptămâni după tratament, la 24 săptămâni după tratament și la 12 luni după tratament.

Rezultatele studiului au arătat următoarele asocieri cu semnificație statistică:

- prezența *KIR2DL2/2DL2* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ALT înainte de tratament (113.0 U/L (q1=45.0; q3=325.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (57.5 U/L (q1=35.0; q3=105.5)), p=0.029
- prezența *KIR2DL2/2DL2* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mari ale medianei GGT înainte de tratament (95.0 U/L (q1=38.0; q3=166.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (45.0 U/L (q1=26.3; q3=82.8)), p=0.048

- prezența *KIR2DL2/2DL3* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei bilirubinei directe înainte de tratament (0.3 mg/dl (q1=0.2; q3=0.6)), comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (0.7 mg/dl (q1=0.5; q3=1.1)), p=0.026
- prezența *KIR2DL3/2DL3* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei AST după tratament (23.0 U/L (q1=19.0; q3=30.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (26.5 U/L (q1=21.3; q3=39.8)), p=0.022
- prezența *KIR2DL3/2DL3* s-a asociat, de asemenea, cu valori mai mici ale medianei bilirubinei directe înainte de tratament (0.2 mg/dl (q1=0.2; q3=0.4)), comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (0.3 mg/dl (q1=0.2; q3=0.5)), p=0.026
- prezența *KIR3DL2-HLA -A3, -A11* s-a asociat, cu valori mai mici ale medianei bilirubinei directe înainte de tratament (0.2 mg/dl (q1=0.2; q3=0.4)), comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (0.3 mg/dl (q1=0.2; q3=0.5)), p=0.009
- prezența *KIR2DS2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT (56.5 U/L (q1=33.8; q3=136.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (39.0 U/L (q1=27.0; q3=73.0)), p=0.011
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ARN-VHC înainte de tratament (2125520.0 UI/ml (q1=249000.0; q3=5213469.3)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (253800.0 UI/ml (q1=2340.5; q3=1578265.0)), p=0.020
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AST înainte de tratament (72.0 U/L (q1=43.0; q3=250.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (53.5 U/L (q1=32.5; q3=82.7)), p=0.041
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ALT înainte de tratament (122.0 U/L (q1=53.0; q3=325.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (57.5 U/L (q1=34.3; q3=109.0)), p=0.016
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT înainte de tratament (108.0 U/L (q1=44.0; q3=174.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (45.0 U/L (q1=26.3; q3=82.8)), p=0.016
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ARN-VHC înainte de tratament (2673245.0 UI/ml (q1=1224010.0; q3=4878862.5)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (313000.0 UI/ml (q1=2990.0; q3=1993025.0)), p=0.046

- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AST înainte de tratament (88.5 U/L (q1=64.3; q3=271.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (54.0 U/L (q1=32.0; q3=86.5)), p=0.023
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei AST după tratament (46.0 U/L (q1=35.0; q3=63.3)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (24.0 U/L (q1=20.0; q3=32.0)), p=0.009
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ALT înainte de tratament (142.0 U/L (q1=112.0; q3=325.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (59.0 U/L (q1=34.5; q3=111.0)), p=0.006
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei ALT după tratament (68.5 U/L (q1=35.0; q3=77.0)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (23.0 U/L (q1=19.0; q3=34.5)), p=0.015
- prezența *KIR2DL2/2DL2- HLA-C1C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT (151.0 U/L (q1=125.8; q3=185.8)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (45.0 U/L (q1=26.5; q3=88.0)), p=0.003
- prezența *KIR2DL3/2DL3- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei AST după tratament (21.0 U/L (q1=18.0; q3=29.5)) comparativ cu valorile înregistrate în absența genei (26.0 U/L (q1=21.0; q3=34.5)), p=0.029

Concluzii

Rezultatele prezentate în acest studiu au arătat o asociere semnificativ crescută a alelelor HLA A*23:01, B*44:02 și C* 04:02 și a genelor KIR2DL3, KIR2DL5, KIR2DS4 norm, KIR3DL3, KIR2DP1, KIR3DP1 în grupul pacienților cu hepatită cronică C. Atunci când au fost împărțiți pe categorii de vârstă (<65 de ani, respectiv > 65 de ani), s-a observat o frecvență semnificativ mai mare a alelei HLA-A*23:01 la pacienții <65 de ani și a alelei HLA-B*49:01 la pacienții > 65 de ani.

Evaluarea distribuției liganzilor HLA s-a realizat și în funcție de gradul fibrozei, pacienții cu hepatită cronică VHC fiind împărțiți în două categorii: grupul de fibroză ușoară-moderată (F0-F2) comparativ cu grupul de fibroză severă sau de ciroză (F3-F4). În ceea ce privește liganzii HLA, s-au obținut rezultate semnificativ statistice pentru ligandul HLA-A3 și -A11, acesta fiind mai frecvent în rândul pacienților cu un grad de fibroză F3-F4 comparativ cu grupul de fibroză F0-F2.

La pacienții cu fibroză F3-F4 s-a observat o scădere a frecvenței HLA-A*02:01 și HLA A*23:01 și o creștere a frecvenței HLA-C*12:02, comparativ cu grupul de fibroză F0-F2.

Analiza corelațiilor între genele KIR și parametrii biochimici specifici au indicat asocierea genei inhibitorii *KIR2DL2* cu valori mai mari ale medianei AST după tratament și ale bilirubinei directe, iar gena inhibitorie *KIR2DL3* s-a asociat cu valori mai mici ale medianei ALT și GGT înainte de tratament. Valori mai mici ale medianei bilirubinei totale s-au înregistrat la pacienții la care gena *KIR3DL1* a fost prezentă.

Genele activatoare *KIR2DS2* și *KIR2DS3* s-au asociat cu valori mai mari ale GGT, iar în cazul genei *KIR2DS3* raportându-se și asocierea cu valori mai mari ale ALT după tratament.

Genele *KIR2DL2/2DL2*, *KIR2DL2/2DL2 -C1* și *KIR2DL2/2DL2 -C1C1* s-au asociat cu valori mai mari ale medianei ALT, AST, GGT înainte de tratament comparativ cu valorile înregistrate în absența genei respective. De asemenea, viremia ARN-VHC a înregistrat valori mai mari înainte de tratament la pacienții cu genotipul *KIR2DL2/2DL2 -C1*.

Valori mai mici ale medianei bilirubinei directe înainte de tratament s-au raportat la pacienții cu genele *KIR2DL2/2DL3*, *KIR2DL3/2DL3* și *KIR3DL2-HLA -A3, -A11*. Genele inhibitorii *KIR2DL3/2DL3*, cu sau fără ligandul C1 s-au asociat cu valori mai mici ale medianei AST după tratament, iar prezența genei activatoare *KIR2DS2- HLA-C1* s-a asociat cu valori mai mari ale medianei GGT.

O încărcătură virală mai mare s-a raportat la pacienții la care *KIR2DL2/2DL2-HLA-C1* și *KIR2DL2/2DL2-HLA-C1C1* au fost prezente.

Sistemul imun înăscut are un rol important în imunitatea antivirală a infecției cu VHC, în special în fața epuizării / pierderii potenței răspunsurilor celulelor T și B, celulele NK având o influență protectoare împotriva infecției prin modularea receptorilor activatori și inhibitori. În infecția cronică, VHC influențează semnificativ compartimentul celulelor NK, atât prin repertoriul receptorilor cât și prin funcțiile efectoare contribuind la progresia hepatitei cronice. Înțelegerea memoriei celulelor NK și efectele rezultate asupra acestora în infecția cu VHC va putea ajuta la dezvoltarea de viitoare vaccinuri precum și tratamente curative și preventive pentru VHC.

Bibliografie selectivă

1. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolin A, Cacciapuot C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*, 2016. 22(34): p. 7824-40.
2. Manuc M, Preda CM, Popescu CP, Baicus C, Voiosu T, et al. New Epidemiologic Data Regarding Hepatitis C Virus Infection in Romania. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2017;26(4):381-6.
3. Tong MJ, Neveen S, El-Farra BS, Reikes AR, Ruth L. Clinical Outcomes after Transfusion-Associated Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(22):1463-6.
12. Harris HE, Eldridge KP, Harbour S, Alexander G, Teo CG, Ramsay ME, et al. Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus type? *Journal of viral hepatitis*. 2009;14(3):213-20.
29. Nozawa Y, Umemura T, Joshita S, Katsuyama Y, Shibata S et al. KIR, HLA, and IL28B Variant Predict Response to Antiviral Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients in Japan. *PloS one*. 2013;8(12): e83381.
36. Xiong H HJ, Rong X, Zhang M, Huang K, et al. HLA-B alleles B*15:01 and B*15:02: opposite association with hepatitis C virus infection in Chinese voluntary blood donors. *Intervirology*. 2015;58(2):80-7.
37. Huang J, Huang K, Xu R, Wang M, Liao Q et al. The Associations of HLA-A*02:01 and DRB1*11:01 with Hepatitis C Virus Spontaneous Clearance Are Independent of IL28B in the Chinese Population. *Scientific reports*. 2016;6:31485.
38. Shiffman ML, Jiago M, Tran A, Pockros P, et al. Chronic hepatitis C in patients with persistently normal alanine transaminase levels. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(5):645-52.
45. Gheorghe L, Csiki IE, Iacob S, Gheorghe C, Smira G, Regep L. The Prevalence and Risk Factors of Hepatitis C Virus Infection in Adult Population in Romania: a Nationwide Survey 2006 - 2008. *J Gastrointest Liver Dis*. 2010;Dec;19(4):373-9.
46. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2014;61(1 Suppl):S58-68.

47. Vilibic-Cavlek T, Kucinar J, Kaic B, Vilibic M, Pandak N, Barbic L, et al. Epidemiology of hepatitis C in Croatia in the European context. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(32):9476-93.
79. Hassan MI, Kassim SK, Ali HS, Sayed el DA, Khalifa A. Evaluation of nitric oxide (NO) levels in hepatitis C virus (HCV) infection: relationship to schistosomiasis and liver cirrhosis among Egyptian patients. *Disease markers*. 2002;18(3):137-42.
80. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547-54.
81. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
89. Körner T, Kropf J, Gressner AM. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *Journal of hepatology*. 1996;25(5):684-8.
90. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, et al. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med*. 2013;19(12):1617-24.
91. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(4):2247-50.
132. Rehmann B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2015;1(6):578-88.
133. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, et al. Recurrence of Hepatitis C Virus After Loss of Virus-Specific CD4⁺ T-Cell Response in Acute Hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999;117(4):933-41.
134. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(8):509-23.
135. Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol Rev*. 2013;255(1):182-96.
143. Flynn JK, Dore GJ, Hellard M, Yeung B, Rawlinson WD, White PA, et al. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users. *Journal of viral hepatitis*. 2011;18(8):549-61.

144. Rigopoulou EI, Stefanidis I, Liaskos C, Zervou EK, Rizos C, Mina P, et al. HCV-RNA qualitative assay based on transcription mediated amplification improves the detection of hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis: results from five hemodialysis units in central Greece. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;34(1):81-5.
145. MacParland SA, Fadel SM, Mihajlovic V, Fawaz A, Kim C, Rahman AK, et al. HCV Specific IL-21 Producing T Cells but Not IL-17A Producing T Cells Are Associated with HCV Viral Control in HIV/HCV Coinfection. *PloS one*. 2016;11(4):e0154433.
198. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(1):1-8.
228. Yan Z, Wang Y. Viral and host factors associated with outcomes of hepatitis C virus infection (Review). *Molecular medicine reports*. 2017;15(5):2909-24.
239. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2012;367(1590):800-11.
240. Ursu LD, Calenic B, Diculescu M, Dima A, Stoian IT, Constantinescu I. Clinical and histopathological changes in different KIR gene profiles in chronic HCV Romanian patients. *International journal of immunogenetics*. 2020;48(1):16-24.
241. David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, et al. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *Journal of immunology*. 2013;191(9):4778-88.
242. VandenBussche CJ, Dakshanamurthy S, Posch PE, Hurle CK. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *Journal of immunology*. 2006;177(8):5347-57.

LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole în reviste indexate ISI

1. **Ursu L**, Calenic B, Diculescu M, Dima A, Constantinescu I. HLA Alleles and KIR Genes in Romanian Patients with Chronic Hepatitis C. JGLD. 27Oct.2020;29(4):595-01. Factor de impact: 2.351.
<https://www.jgld.ro/jgld/index.php/jgld/article/view/2546>
2. **Ursu LD**, Calenic B, Diculescu M, Dima A, Stoian IT, Constantinescu I. Clinical and histopathological changes in different KIR gene profiles in chronic HCV Romanian patients. Int J Immunogenet. 2021 Feb;48(1):16-24. doi: 10.1111/iji.12515. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32961633. Factor de impact:1.130.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/iji.12515>
3. Milena Ivanova, Lisa E.Creary, BushraAl Hadra, Tsvetelin Lukanov, Michela Mazzocco, Nicoletta Sacchi, Reem Ameen, Salem Al-Shemmari, Ana Moise, **Larisa Denisa Ursu**, Ileana Constantinescu, Tamara Vayntrub, Marcelo A.Fernández-Viña, Velizar Shivarov, Elissaveta Naumova. 17th IHIW component “Immunogenetics of Ageing” – New NGS data. 2019Sep;80(9):703-713. Elsevier. Factor de impact:2.412.

Articole în reviste indexate BDI

1. **Larisa Denisa Ursu**, Ileana Constantinescu, Ana Moise, Maria Mirela Iacob, Carmen Maria Preda, Mircea Diculescu. NK cell receptor (KIR) diversity and the impact on HCV infection outcome. Maedica. Volume 13 (16) Supplement 2018.
2. **Larisa Denisa Ursu**, Carmen Monica Preda, Mircea Diculescu, Ileana Constantinescu. “Are KIR-HLA polymorphisms relevant for the outcome of chronic infected hepatitis C virus patients?”. Immunogenetics: Open Access. 2018.
3. Ileana Constantinescu, **Larisa Denisa Ursu**. “Relevance of HLA-KIR Genes in Chronic Hepatitis C Virus Infection Outcome”. Immunogenetics: Open Access. 2018.
4. Ana Moise, Cătălin Baston, Natalia Cucu, **Larisa Denisa Ursu**, Mirela Maria Iacob, Ileana Constantinescu. “Challenges and clinical significance of virtual crossmatch in kidney transplantation. Our experience”. Journal of Urology. 2017

Abstracte în reviste ISI

1. Ileana Constantinescu, Ana Moise, Dontu Corina, Maruntelu Ion, Toader Adela, Nedelcu Daniela Filofteia, **Larisa Denisa Ursu**. "KIR gene diversity in hepatitis C virus infection outcome in a Romanian population". HLA, 2016;87(4):286.
2. Ileana Constantinescu, **Larisa Denisa Ursu**, Dontu Corina, Maruntelu Ion, Nedelcu Daniela Filofteia, Toader Adela, Ana Moise. "Our experience in Polioma BK virus infection in kidney allograft outcome." HLA, 2016; 87(4):260-261.
3. Ileana Constantinescu, Maruntelu Ion, Toader Adela, Nedelcu Daniela Filofteia, **Visan Larisa Denisa**, Rotaescu Corina, Mirela Maria Iacob, Talangescu Adriana, Moise Ana. "Aspects of allelic HLA polymorphism in patients with chronic kidney diseases undergoing kidney transplantation". HLA, 2020;95(4):411-412.
4. Ileana Constantinescu, Caragea Andreea M, Talangescu Adriana, Rotaescu Corina, **Visan Larisa Denisa**, Maruntelu Ion, Maruntelu Ion, Moise Ana. "Aspects of pediatric immunology in approaching kidney transplantation in children." HLA, 2020;95(4):312.

Cărți:

1. Ileana Constantinescu, Ana Moise, **Larisa Denisa Ursu**. "Imunogenetica - De la teorie la aplicații clinice". Editura Universitară "Carol Davila", 2020.

Postere:

1. Carmen Monica Preda, Mircea Diculescu, Ileana Constantinescu, **Larisa Denisa Ursu**. PROGNOSTIC VALUE OF KIR GENES IN HCV CHRONIC INFECTION. Al XXXVIII-lea Congres de Gastroenterologie, Hepatologie si Endoscopie Digestiva, Craiova 2018.

Prezentari orale:

1. **Larisa Denisa Ursu**, Bogdan Calenic, Mircea Diculescu, Alina Dima, Iulia Teodora Stoian, Ileana Constantinescu. "Modificări clinice și histo-patologice în diferite configurații ale genelor KIR la pacienții cu hepatita C cronică." 30 septembrie - 03 octombrie 2020. Conferința anuală de imunologie și imuno-dermatologie.
2. **Larisa Denisa Vișan**, Ana Moise, Adela Maria Toader, Corina Andreea Rotărescu, Mirela Maria Iacob, Ion Mărunțelu, Andreea Mirela Caragea, Adriana Tălăngescu,

Ileana Constantinescu. „Impactul potrivirii alelice HLA în supraviețuirea de lungă durată a pacienților cu transplant de celule stem hematopoietice”. Cea de-a 3-a Conferință a Asociației Române de Imuno-Dermatologie, a 48-a Conferință a Societății de Imunologie din România. 18-21 septembrie 2019.

3. **Larisa D. Ursu**, Ileana Constantinescu, Ana Moise, Maria Mirela Iacob, Preda Carmen Monica, Diculescu Mircea “Diversitatea receptorilor celulelor NK (KIR) și impactul asupra evoluției infecției cu VHC”. Congresul Universitatii de Medicina si Farmacie Carol Davila Bucuresti, Editia aVI-a. 2018
4. **Larisa Ursu**, Ana Moise, Maria Mirela Iacob, Adriana Oprea, Adela Toader, Daniela Filofteia Nedelcu, Ileana Constantinescu. “Valoarea prognostică a genelor KIR în infecția cronică cu VHC”. Volum rezumate SIR 2017.
5. **Larisa Ursu**, Ana Moise, Mihaela Sora, Adela Toader , Ileana Constantinescu. “Tipizarea HLA de înaltă rezoluție rezolvă problema apariției rejetului acut post-transplant de organ solid?” Volum rezumate SIR 2016.