

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

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**REZUMAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI MIRCEA**

**Student-doctorand  
MEIANU CORINA GABRIELA**

**2019**

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

***ALTERĂRILE CELULELOR NEUROENDOCRINE ÎN BOALA  
INFLAMATORIE INTESTINALĂ***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI MIRCEA**

**Student-doctorand  
MEIANU CORINA GABRIELA**

**2019**

# CUPRINS

## I. PARTEA GENERALĂ

### 1.CELULELE NEUROENDOCRINE ÎN BOALA INFLAMATORIE

<b>INTESTINALĂ.....</b>	<b>10</b>
1.1. Aspecte generale cu privire la boala inflamatorie intestinală.....	10
1.2. Boala Crohn.....	14
1.3. Rectocolita ulcerohemoragică.....	19
1.4. Rolul microbiotei în generarea inflamației intestinale.....	26
1.5. Mecanisme ale inflamației în boala inflamatorie intestinală.....	29
1.6. Date generale despre stratul epitelial intestinal.....	32
1.7. Date generale despre celulele neuroendocrine ale tractului gastrointestinal.....	35
1.8. Aspecte ale interacțiunii dintre celulele neuroendocrine și microbiota intestinală.....	39
1.9. Comportamentul celulelor neuroendocrine în patologiile inflamatorii intestinale.....	42
1.10.Serotonina în boala inflamatorie intestinală.....	45
1.11. Cromogranina A în boala inflamatorie intestinală.....	49
1.12. Tumorile neuroendocrine în boala inflamatorie intestinală.....	52

## II. CONTRIBUȚII PERSONALE

### 2. DENSITĂȚILE CELULELOR NEUROENDOCRINE ÎN BOALA

<b>INFLAMATORIE INTESTINALĂ.....</b>	<b>57</b>
2.1. Introducere.....	57
2.2. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	59
2.3. Metodologia cercetării.....	60
2.4. Rezultate.....	66
2.5. Discuții.....	164
2.6. Concluzii.....	172

### 3. DIFICULTĂȚI ȘI LIMITE ALE STUDIULUI.....175

### 4.ORIGINALITATEA STUDIULUI DE CERCETARE.....177

<b>5. DIRECȚII VIITOARE DE STUDIU DESCHISE DE CERCETAREA DOCTORALĂ.....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>181</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>195</b>

## Problema fundamentală

Boala inflamatorie intestinală (BII) este o afecțiune cronică, de etiologie necunoscută, caracterizată printr-un răspuns imun anormal, al unui organism cu predispoziție genetică, la interacțiunea dintre factorii de mediu și microbiota intestinală.

Lipsa unui tratament specific și etiologia necunoscută în BII au dus la o concentrare în ultima perioadă pe înțelegerea mecanismului etiopatogenezei al BII.

Un factor important în patogeneza BII este reprezentat de bariera epitelială intestinală care este structura care menține homeostazia intestinală și separă conținutul intraluminal de țesutul gazdei. Este o structură dinamică care are rol în reglarea funcției intestinale și mediază interacțiunea dintre flora intestinală și sistemul imun mucosal

Stratul epitelial intestinal reprezintă bariera structurală și funcțională a intestinului prin care acesta modulează interacțiunea dintre antigenele intraluminales și straturile transmurale. Modificări ale funcției de barieră intestinală prin creșterea permeabilității intestinale și modificări morfologice și funcționale privind tipurile celulare componente ale acestuia au fost demonstrate în boala inflamatorie intestinală.

Celulele neuroendocrine (CNE) sunt tipuri celulare care fac parte din stratul epitelial intestinal și intră în componența sistemului neuroendocrin al tractului gastrointestinal alături de sistemul nervos enteric, având secreție hormonală cu multiple roluri funcționale și în mecanismele de inflamație locală, contribuind la homeostazia intestinală. Inflamația generează o stimulare asupra secreției neuroendocrine hormonale la nivel celular printr-un mecanism de tip switch on/off.

În boala inflamatorie intestinală au fost raportate modificări morfologice prin hiperplazie neuroendocrină cu alterarea secreției hormonale epiteliale. De asemenea există studii care susțin rolul celulelor neuroendocrine, în special al celor care exprimă serotonina, în întreținerea inflamației.

Datele din literatură privind modificările celulelor neuroendocrine și implicațiile clinice ale acestora în BII sunt limitate la nivel internațional și au în principal la bază observații pe modele animale.

Înțelegerea comportamentului celulelor neuroendocrine în BII și implicațiile acestuia în procesul de patogeneza al BII poate determina orientarea de noi ținte terapeutice.

## Sinteza capitolelor

Teza de doctorat cuprinde două părți intituluate „Partea generală” și „Partea personală”.

În *Partea generală* sunt descrise mecanisme de etiopatogenie în boala inflamatorie intestinală și se subliniază rolul stratului epitalial intestinal în mecanismele de generare a inflamației, cu modificările structurale la nivelul celulelor componente ale acestuia rolul lor în întreținerea inflamației și rolul lor funcțional în clinica bolii inflamatorii intestinale. De asemenea un alt capitol este dedicat celulelor neuroendocrine pozitive pentru serotonină și implicațiile acestora în patologii inflamatorii.

Partea personală cuprinde într-o primă etapă studiul densităților CNE la nivel mucozal la pacienții cu BII, ulterior analiza acestor modificări raportate la gradul de inflamație prin corelarea cu scoruri clinice, endoscopice și markeri serologici și fecali de activitate, totodată este analizat impactul tratamentului specific BII asupra reversibilității leziunilor CNE.

*Ipoteza de lucru* este dată de existența ideii în literatură care afirmă o creștere a densităților totale ale CNE pozitive pentru cromogranina A și a celor pozitive pentru serotonină în mucoasa colonică afectată de BII.

*Obiectivele studiului au fost:*

Evaluarea din punct de vedere histologic a densităților totale ale CNE la pacienții cu BII colonică folosind markerii generali de diferențiere neuroendocrină: cromogranina A și sinaptofizina;

Evaluarea din punct de vedere histologic a densităților CNE care exprimă serotonină la pacienții cu BII colonică.

Corelații între densitățile totale ale CNE și a celor care exprimă serotonină cu tipul de BII, cu durata BII, cu tipul de tratament (tratament convențional și tratament biologic anti TNF- $\alpha$ , cu scorurile clinice și endoscopice de activitate și cu markerii non-invazivi ai inflamației serologici și fecali: PCR (proteina C reactivă) și calprotectina fecală.

*Metodologia de lucru* a constat în realizarea unui studiu prospectiv, experimental, nerandomizat pe un esantion de 101 pacienți, împărțiți în 2 loturi :

Lotul A, format din 52 de pacienți diagnosticați cu BII cu afectare colonică: 27 de pacienți cu RCUH și 25 de pacienți cu BC, proveniți din Clinica de Gastroenterologie și Hepatologie II, Fundeni, București, lotul B, lotul control, format din 49 de pacienți care s-au

prezentat în Clinica de Gastroenterologie și Hepatologie II, Fundeni, București, cu indicație de colonoscopie pentru screening de cancer colorectal.

*Criteriile de includere* au fost pentru grupul de studiu pacienți adulți cu afectarea colonică în cadrul BII, diagnostic de BII de cel puțin 6 luni, indicație de colonoscopie pentru BII, pacienți fără alte comorbidități cunoscute în afară de BII, tratament susținut pentru BII de cel puțin 6 luni, tratament convențional sau anti-TNF- $\alpha$  în monoterapie, iar pentru grupul control pacienți cu indicație de colonoscopie de screening de cancer colorectal, fără comorbidități cunoscute.

*Analiza CNE* a fost efectuată prin prelevarea de biopsii colonice în cadrul colonoscopiei, un total de cinci fragmente biopsice, câte unul din fiecare segment anatomic colonic, orientate pe stripuri de membrane de nitroceluloză. Fragmentele de biopsie au fost evaluate imunohistochimic (IHC) folosind anticorpi pentru markerii generali de recunoaștere a CNE, cromogranina A și sinaptofizina și separat anticorpi pentru serotonină. Număratoarea celulelor neuroendocrine s-a efectuat, pe aceleași număr de glande pentru toți markerii neuroendocrini, pe secțiuni progresive pentru fiecare marker la distanță de 4 microni, manual, la microscopul optic. Număratoarea CNE a fost efectuată de trei anatomopatologi pentru aceeași secțiune care nu au cunoscut originea fragmentelor biopsice din cele două grupuri.

Pentru *analiza statistică* s-a efectuat o analiză descriptivă care a determinat: media, deviația standard (D.S), mediana, Inter-Quartile-Range (IQR), skewness-ul (deviația de la simetrie a distribuției), valoarea minimă și valoarea maximă pentru variabilele continue, în vreme ce pentru variabilele de categorie au fost determinate frecvența absolută (numărul) și frecvența relativă (procentele). Pentru comparație a fost folosită o procedură de bootstrap (reesantionare cu reintroducere) a diferenței de medii aritmetice, folosind 100000 de astfel de reesantionări, fiind determinate valoarea  $p$  și Intervalul de Confidență (IC) 95% (IC a fost evaluat ca diferența între cantila de 2.50% și cea de 97.50%). Pentru analiza impactului factorilor demografici, clinici și paraclinici asupra mediei densităților CNE de la nivelul colonului și al rectului, s-a folosit o regresie linear univariată, cu variabila dependentă calculată cu ajutorul variabilelor: densitatea celulelor pozitive pentru sinaptofizină, densitatea celulelor pozitive pentru cromogranină, densitatea celulelor pozitive pentru serotonină luând "direcția de variație maximă" a acestor variabile determinată printr-o analiză a componentelor principale (PCA) și anume formula primului component, iar variabilele independente au fost parametrii demografico-clinici urmăriți în studiu.

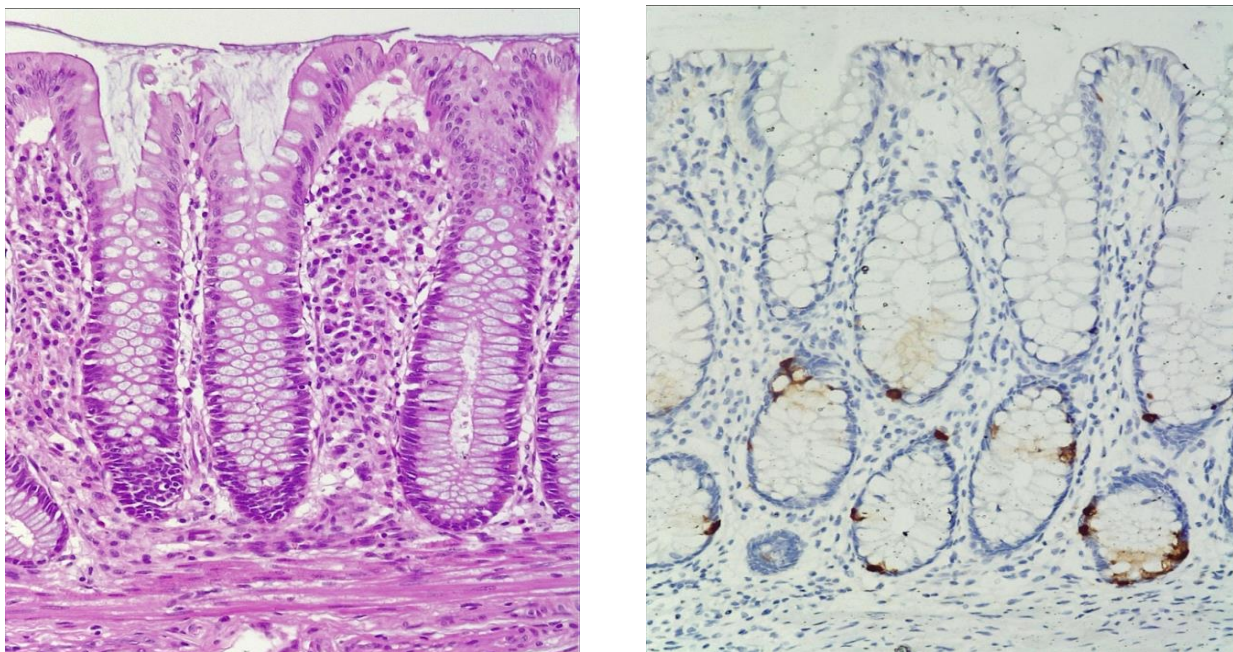
Relevanța statistică a fost stabilită la valori  $p$  mai mici de 0.05.

*Evaluarea imunohistochimică* a arătat următoarele aspecte :

Dispoziția celulelor neuroendocrine, evidențiate IHC, este uniformă în mucoasa colonică normală și neuniformă în mucoasa colonică inflamată.

În mucoasa normală, celulele neuroendocrine prezintă o dispoziție predominant bazală la nivelul criptelor și rare celule superficiale, inclusiv celule neuroendocrine izolate în epiteliul superficial.

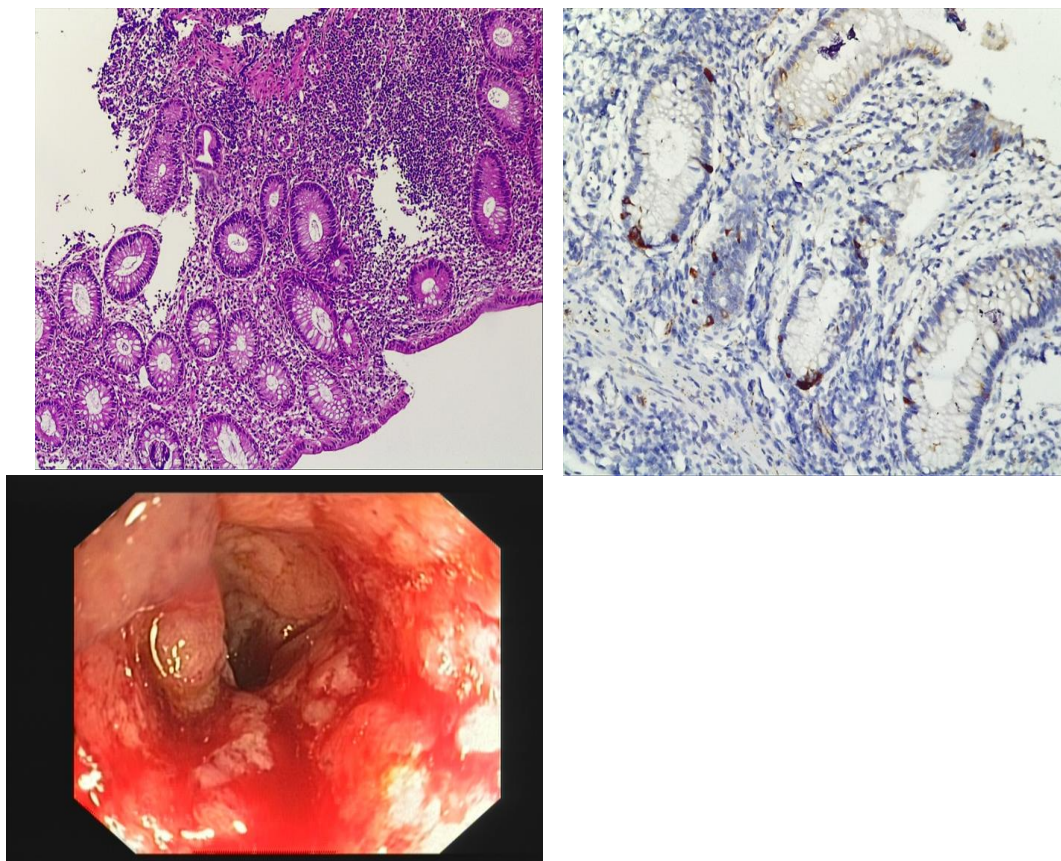
În mucoasa normală nu se evidențiază decât izolat celule neuroendocrine alăturate, fără a forma micronoduli sau cordoane de celule neuroendocrine- **Figura 1**



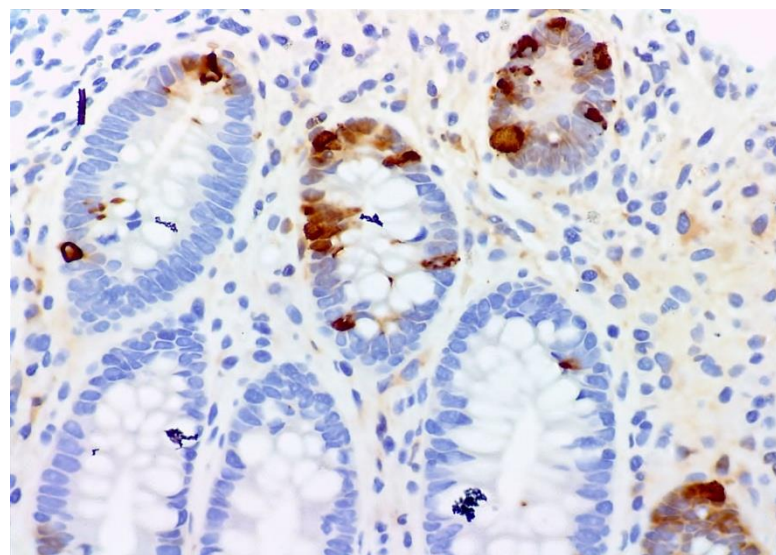
**Figura 1.** Aspect imunohistochimic al un fragment de mucoasă normală de la nivelul colonului sigmoid. Colorație HE ( stânga), IHC pentru cromogranină ( dreapta). Imagini de la același pacient din grupul control

În mucoasa inflamată, celulele neuroendocrine prezintă o densitate crescută, dar neuniformă, cu arii de aglomerare la nivelul unor cripte, formând frecvent travee și cuiburi de 3 – 5 celule neuroendocrine.

În mucoasa inflamată sunt mai frecvente celulele neuroendocrine dispuse superficial, inclusiv în epiteliul de acoperire- **Figura 2, Figura 3.**



**Figura 2.** RCUH activă. Fragment din mucoasă rectală de la același pacient. Colorație HE ( stânga sus), IHC pentru cromogranină (dreapta sus), aspect endoscopic ( stânga jos) (200x)



**Figura 3.** RCUH activă. Fragment din mucoasacolonică rectală. IHC pentru cromogranină. CNE localizate la baza criptelor în grupuri de 3-4 celule (200x).

Numărul de glande intestinale la nivelul cărora a fost efectuată numărătoarea CNE a fost reprezentat de numărul maxim de cripte intestinale din secțiunea de biopsie cu grosimea de 4 $\mu$ , pentru fiecare segment colonic, o medie minimă de 20 glande la grupul cu BII (la

nivelul colonului transvers și la nivelul colonului ascendent) și o medie maximă de 25 glande (la nivelul rectului). Pentru grupul control s-au numărat o medie minimă de 26 glande (la nivelul colonului ascendant) și o medie maximă de 38 glande (la nivelul colonului descendent).

Dintre rezultatele studiului menționez:

Analiza CNE la nivelul întregului colon a arătat o medie a densităților celulare pe criptă semnificativ mai mare la grupul pacienților cu BII față de grupul control pentru cromogranina A cu o valoare  $p < 0.001$  și [ IC 95%] 0.83 [0.58-1.06] - **Tabel 1, Figura 4.**

**Tabel 1**

Media densităților CNE pozitive pentru cromogranină la nivelul întregului colon

Densități CNE Cromogranină	BII	Control
Medie ± D.S	1.84 ± 0.78	1.01 ± 0.44
Mediana (IQR)	1.61 (0.58)	0.90 (0.38)
Min – Max	0.60 – 4.16	0.40 – 3.11
Skewness	0.96	2.38

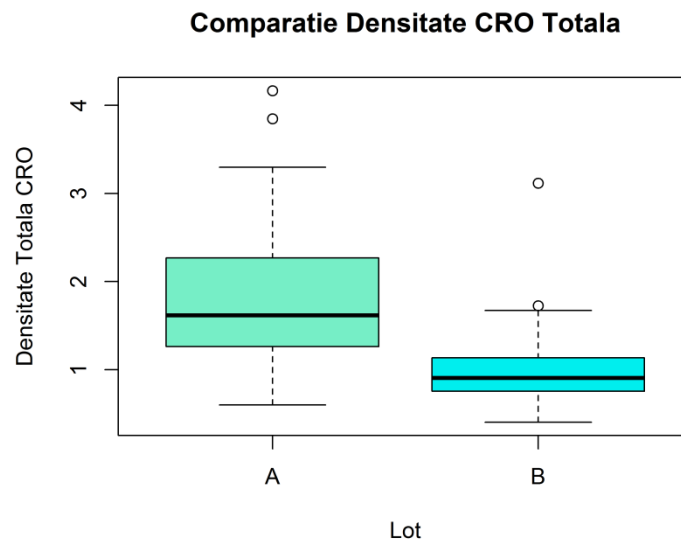


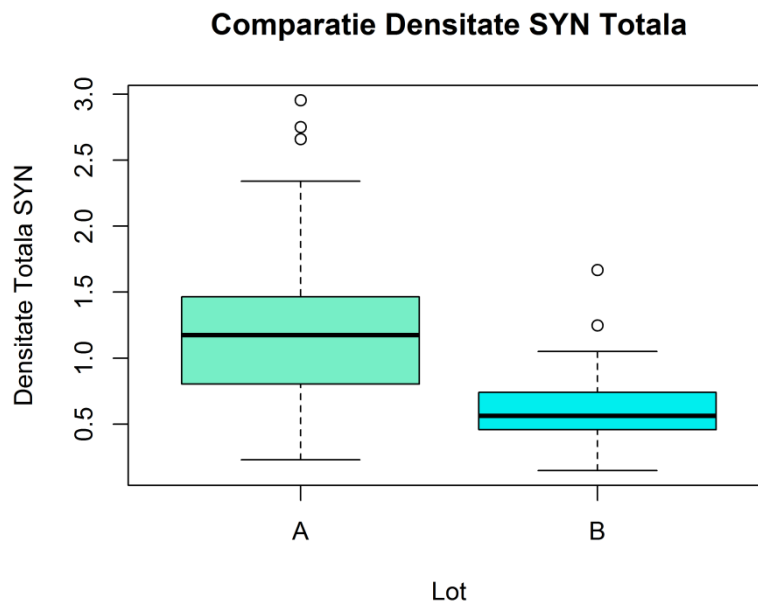
Figura 4 .Ploturi de probabilitate normală privind densitățile celulare pentru cromogranină la nivelul întregului colon

De asemenea CNE pozitive pentru sinaptofizină au avut o medie de  $1.22 \pm 0.63$  la pacienții cu BII față de  $0.62 \pm 0.28$  la grupul control cu o valoare  $p < 0.001$  și [IC 95%]  $0.60 [0.42 - 0.80]$ - **Tabel 2, Figura 5.**

**Tabel 2.**

Media densităților CNE pozitive pentru sinaptofizină la nivelul întregului colon

Densități CNE Sinaptofizină	BII	Control
Medie ± D.S	$1.22 \pm 0.63$	$0.62 \pm 0.28$
Mediana (IQR)	1.17 (0.41)	0.56 (0.17)
Min – Max	0.22 – 2.95	0.14 – 1.66
Skewness	0.89	1.31



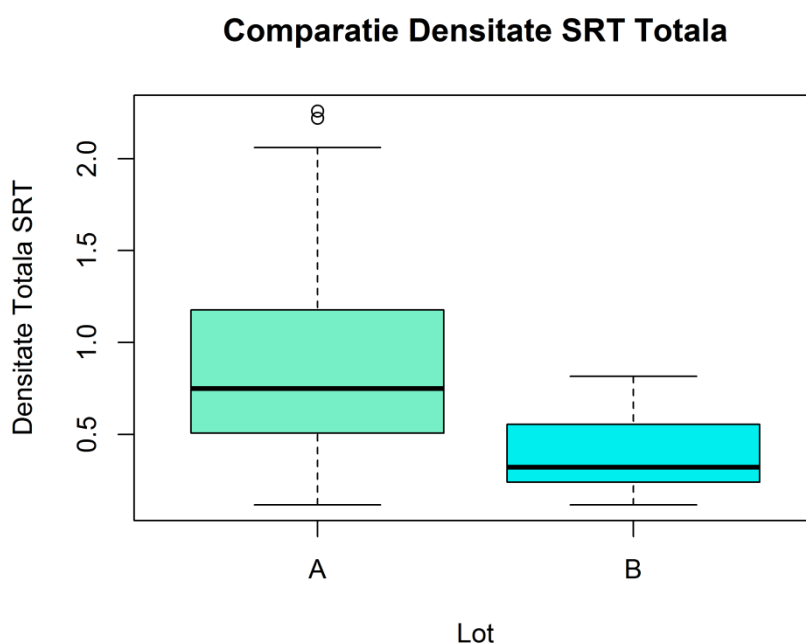
**Figura 5.** Boxploturi privind densitățile celulare pentru sinaptofizină la nivelul întregului colon

Pentru serotonină la nivelul întregului colon media densităților a fost de  $0.91 \pm 0.54$  la grupul pacienților cu BII și de  $0.37 \pm 0.18$  la grupul control,  $p < 0.001$  și [IC 95%]  $0.54 [0.38 - 0.69]$ - **Tabel 3, Figura 6.**

**Tabel 3.**

Media densităților CNE pozitive pentru serotonină la nivelul întregului colon

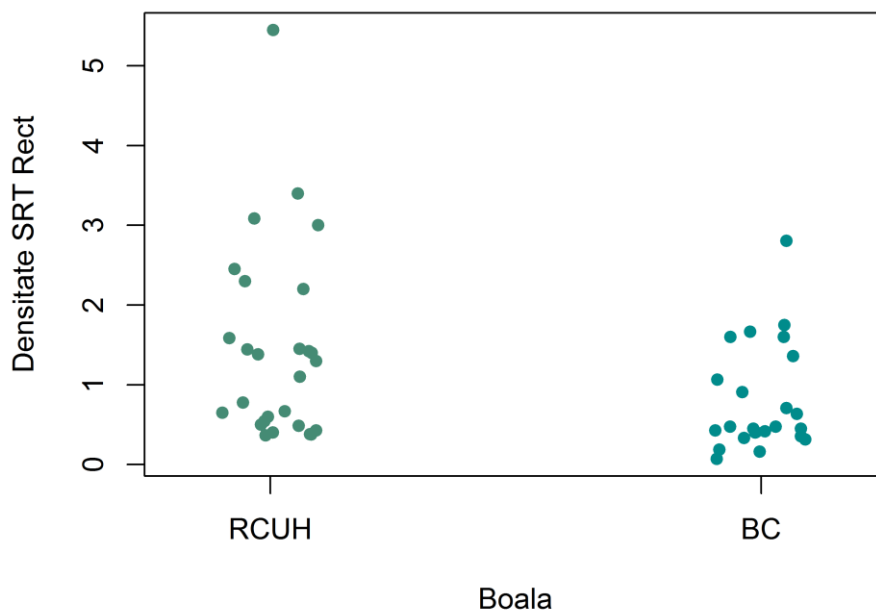
Densități CNE serotonină	BII	Control
Medie ± D.S	0.91 ± 0.54	0.37 ± 0.18
Mediana (IQR)	0.74 (0.41)	0.32 (0.32)
Min – Max	0.11 – 2.25	0.11 – 0.81
Skewness	0.96	0.82



**Figura 6.** Boxploturi normală privind densitățile celulare pentru serotonină la nivelul întregului colon

Comparând densitățile CNE între tipurile de BII, BC respectiv RCUH nu s-au înregistrat diferențe semnificativ statistice pentru niciun marker de diferențiere, indiferent de localizare cu excepția CNE pozitive pentru serotonină la nivel rectal care au avut densități mai crescute în RCUH și 0.77 CNE pentru BC, diferență semnificativ statistic cu o valoare  $p < 0.01$ -  
**Figura 7.**

### Comparatie Densitate SRT Rect



**Figura 7.** Stripcharturi comparative privind densitățile pentru CNE pozitive pentru serotonină la nivel rectal la grupul cu BII

Analizând densitățile celulare la nivelul fiecărui segment colonic s-au obținut: la nivel rectal pentru sinaptofizină o densitate medie de  $1.4 \pm 0.86$  CNE la grupul cu BII față de  $0.63 \text{ CNE} \pm 0.44$  la grupul control  $p < 0.01$ , pentru cromogranina A media densităților a fost de  $2.23 \pm 1.27$  CNE la grupul cu BII și de  $1.09 \pm 0.47$  CNE la grupul control cu valoarea  $p < 0.01$ . Pentru serotonină media densităților rectal a fost de  $1.12 \pm 1.03$  la grupul cu BII și  $0.44 \pm 0.29$  la grupul control,  $p < 0.01$ . Pentru sigmoid media densităților CNE pentru cei trei markeri a fost:  $1.20 \pm 0.89$  la grupul cu BII și de  $0.60 \pm 0.30$  la grupul control pentru sinaptofizină,  $p < 0.01$ , pentru cromogranina A  $1.81 \pm 1.04$  la grupul cu BII și  $0.94 \pm 0.38$  grup control cu  $p < 0.01$ , iar pentru serotonină  $0.92 \pm 0.78$  la grupul BII și  $0.38 \pm 0.22$  la grupul control cu  $p < 0.01$ . La nivelul colonului descendent pentru sinaptofizină s-au obținut o medie a densităților de  $1.06 \pm 0.81$  grup BII și  $0.56 \pm 0.34$  grup control,  $p < 0.01$ , pentru cromogranina A  $1.58 \pm 0.94$  la grupul cu BII și  $1.00 \pm 0.59$  la grupul control,  $p < 0.01$ , iar pentru serotonină  $0.83 \pm 0.55$  pentru BII și  $0.35 \pm 0.24$  pentru control,  $p < 0.01$ . Pentru colonel transvers media densităților a fost: pentru sinaptofizină  $1.20 \pm 0.80$  grup BII,  $0.69 \pm 0.58$  grup control,  $p < 0.01$ , pentru cromogranina A  $1.84 \pm 1.23$  grup BII și  $1.08 \pm 0.68$  pentru grupul control,  $p < 0.01$ , pentru serotonină  $0.90 \pm 0.67$  la BII și  $0.39 \pm 0.32$  pentru control  $p < 0.01$ .

La nivelul colonului ascendent s-au obținut o medie a densităților CNE pentru sinaptofizină de  $1.26 \pm 0.82$  pentru BII și  $0.62 \pm 0.53$  pentru grupul control,  $p < 0.01$  pentru cromogranina A de  $1.72 \pm 1.06$  la grupul BII și  $0.96 \pm 0.95$  la grupul control,  $p < 0.01$ , iar pentru serotonină  $0.91 \pm 0.54$  la grupul cu BII și  $0.37 \pm 0.18$  la grupul control,  $p < 0.01$ .

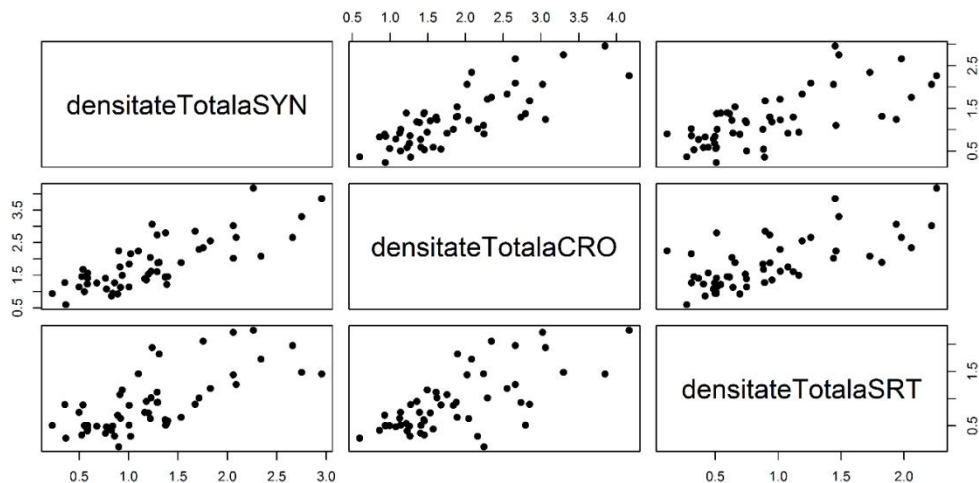
În partea a doua a studiului pentru pacienții cu BII au fost analizate mediile densităților totale/colon ale CNE pozitive pentru toți markerii de diferențiere în raport cu activitatea bolii inflamatorii. S-a folosit o regresie liniară univariată, variabila independentă fiind calculată folosind următoarele variabile: densitățile totale de la nivelul colonului ale celulelor pozitive pentru sinaptofizină, cromogranină și serotonină și a fost luat în considerare direcția de variație maximă a lor prin analiza componentelor principale (PCA). Variabilele independente au fost reprezentați de vârsta, durata bolii, tipul de tratament, scorurile de activitate clinic, activitatea endoscopică.

La calculul indicilor de corelație  $r$  Pearson, au existat corelații puternice între densitățile celulare pentru cei trei markeri de diferențiere - **Tabel 4, Figura 8.**

**Tabel 4.**

Corelația între densităților totale celulare în funcție de markerii de diferențiere

<b>Variabila</b>	<b>Densitate totală sinaptofizină r Pearson (valoare p)</b>	<b>Densitate totală cromogranină r Pearson (valoare p)</b>
<b>Densitate totala cromogranină</b>	0.78 (< 0.0001)	1.00
<b>Densitate totală Serotonină</b>	0.70 (< 0.0001)	0.68 (< 0.0001)



**Figura 9.** Corelația între densităților totale celulare în funcție de markerii de diferențiere

La regresia liniară univariată factorii care au fost asociați cu densități crescute ale CNE au fost: PCR (protein C reactivă) crescută, valorile mari ale calprotectinei, absența tratamentului antiTNF- $\alpha$ , un scor Mayo clinic  $\geq 2$ , scorul CDAI  $> 150$ , scorurile de activitate endoscopică CDEIS  $\geq 3$  și Mayo endoscopic  $\geq 2$ . La regresia liniară multivariată parametrii independenți care sunt asociați cu o densitate crescută sunt: PCR, calprotectina fecală și activitatea endoscopică.

Ulterior s-a folosit regresia liniară univariată cu variabila dependentă densitatea pe colon + rect a CNE pozitive pentru serotonină. Parametrii asociați cu o densitate mai mare a CNE pozitive pentru serotonină, sunt aceiași ca și la analiza anterioară univariată. La regresia liniară multivariată, doar scorul activității endoscopice (Mayo endoscopic  $\geq 2$  și CDEIS  $\geq 3$ ) este parametru independent care influențează densitatea totală a CNE pozitive pentru serotonină.

Pe baza rezultatelor *discuțiile* aferente sunt prezentate sumar mai jos:

Toți pacienții cu BII au avut afectare colonică. Pentru RCUH nu au fost excluși pacienții cu afectare strict limitată la rect, dar pentru cazurile de proctită la care s-a efectuat examen endoscopic în perioada studiului, rectoscopia a fost suficientă pentru orientarea conduitei terapeutice.

Alegerea pacienților cu BII cu o durată a tratamentului de cel puțin 6 luni a fost bazată pe necesitatea îndeplinirii unuia dintre obiectivele studiului, de a evalua modificările CNE în funcție de tratamentul convențional sau biologic, respectiv anti TNF- $\alpha$  și este cunoscut faptul

că în boala inflamatorie intestinală pentru vindecare mucozală este nevoie de 3-6 luni pentru RCUH și 6-12 luni pentru BC, de unde se poate deduce că eficiența unui tratament nou introdus asupra vindecării mucozale se evaluează la aceste intervale.

De asemenea din grupul pacienților cu BII au fost excluși pacienții cu tratament anti TNF- $\alpha$  în comboterapie pentru ca s-a dorit diferențierea strict între tratamentul convențional și tratamentul biologic asupra modificărilor comportamentului CNE.

A fost evaluat numărul maxim de cripte intestinale din secțiunea de biopsie cu grosimea de 4 $\mu$ , pentru fiecare segment colonic, o medie minimă de 20 glande la grupul cu BII (la nivelul colonului trasnvers și la nivelul colonului ascendant) și o medie maximă de 25 glande (la nivelul rectului), pentru grupul control s-au numărat o medie minimă de 26 glande (la nivelul colonului ascendant) și o medie maximă de 38 glande (la nivelul colonului descendent), ceea ce reprezintă cel puțin un număr dublu față de studiile similare din literatură[1][2].

În 1997 El Salhi a făcut un studiu similar pe un grup de 17 pacienti cu RCUH și 11 pacienți cu BC, a prelevat biopsii seriate la nivelul întregului colon un total de 31 biopsii pe care le-a evaluat IHC cu anticorpi neuroendocrini pentru diferite tipuri de CNE inclusive CgA și 5-HT. A obținut un număr de 116-150 CNE pe  $\mu\text{m}^2$  pentru Cg A și un număr de 106-171 CNE pe  $\mu\text{m}^2$  pentru 5-HT, în funcție de gradul de activitate al bolii exprimat calitativ[2].

Studiul lui Chojnacki care a evaluat numărul de celule EC la nivel rectal și colonic pe un total de 30 pacienți a folosit ca marker de IHC anticorp policlonal de iepure, a obținut o medie de celule EC pe 10 cripte examinate de 225.4 $\pm$ 37.75 la grupul proctită și 22.5 $\pm$ 40.5 la grupul colită RCUH[1].

De remarcat că diferențele dintre celule în funcție de BII au fost foarte mici, fără semnificație statistică, în afară de analiza CNE pozitive pentru 5-HT la nivel rectal. Media densităților acestora la nivelul rectului a fost mai mare la pacienții cu RCUH. Tinând cont de caracteristicile grupurilor și de faptul că și pacienții cu BC au avut afectare rectală la un moment dat de la diagnosticul bolii până la includerea în studiu, diferența a fost semnificativă în ceea ce privește densitățile celulare numai pentru serotonină. Fapt care se poate traduce prin fenotipul RCUH cu debut rectal și care chiar dacă pacientul este în remisiune endoscopică poate persista inflamația histologică. De asemenea uniformitatea afectării rectal în cadrul RCUH face mai probabilă prelevarea de biopsii din zonele afectate de inflamație anterior la un pacient în remisiune endoscopică, comparative cu BC.

În literatură mai există două studii, dar pe model animal ale lui El.Salhi M. din 2016 și 2017 care folosesc cromogranin A și serotonina ca markeri de evaluare ai CNE la colita

indusă DSS (dextran sulfat sodiu) și TNBS (trinitrobenzensulfonic acid) pe model murin. Numărătoare CNE a fost efectuată pe 10 glande intestinale cu o densitate de  $333.1 \pm 34.7$  celule pentru CgA și  $61.8 \pm 6.5$  celule pentru serotonină la colita DSS și o densitate scăzută pentru Cg A, dar crescută pentru serotonină la grupul TNBS de colită[3][4].

Un alt studiu publicat de Coates a evaluat numărul de CNE pozitive pentru cromograinina A și serotonina la nivel rectal pentru 22 pacienți cu RCUH, pacienți cu sindrom intestine iritabil

(SII) și grup control, pe un număr de 3-6 glande și a obținut că nu există diferențe semnificative între numărul de CNE pozitive pentru cromogranina A între grupul cu excepția subgrupului de colită severă unde s-a obținut o creștere a densităților acestora[5].

De asemenea CNE și mai ales secreția mucozală de serotonină au fost evaluate pentru patologia funcțională intestinală în câteva studii[6][7][8].

În studiul doctoral cele mai mari densități celulare în funcție de markerii generali de diferențiere au fost obținute pentru cromogranina A aceasta fiind mai bine exprimată la nivelul CNE la analiza imunohistochimică morfologică, cu un semnal mai puternic, mai intens comparativ cu sinaptofizina care a fost exprimată de un număr mai redus de celule.

CNE pozitive pentru cromogranina A și sinaptofizina au avut o distribuție omogenă, uniform la grupul control, fiind întâlnite izolat la nivelul stratului epitelial intestinal, cu localizare superficial la nivelul criptelor, în timp ce la grupul cu BII, acestea au avut o distribuție neuniformă, au fost organizate nodular, în grupuri celulare și au migrat spre baza criptelor. Examinarea morfologică a arătat un aspect de hiperplazie marcată la nivelul CNE pentru toți markerii de diferențiere, la grupul cu BII.

Totuși, menționez, că nu au fost găsite elemente de displazie la nivelul CNE pe niciunul dintre fragmentele examinate.

Există date în literatură care explică implicarea în inflamație a cromograninei A. Cromogranina A inhibă efectele TNF asupra epiteliului vascular de creștere a permeabilității. Totodata cromogranina A este crescută la nivel serologic la pacienții cu BII comparativ cu pacienții care nu sunt afectați de boală[9][10][11].

În funcție de localizare, densitățile cele mai pronunțate ale CNE pozitive pentru CgA au fost la nivel rectal și sigmoidian și au scăzut spre colonul drept.

De asemenea cea mai mare medie a densităților CNE pozitive pentru serotonină a fost obținută la nivel rectal, urmată de sigmoid, descendent și cele mai mici densități s-au obținut la nivelul colonului drept.

Această modificare a distribuției în BII ar putea fi explicată prin comportamentul RCUH cu afectare rectală, iar pentru pacienții cu BC incluși în studiu, toți au avut implicare rectală în evoluția bolii, indiferent de statusul de activitate în momentul includerii în studiu.

O altă explicație ar fi faptul că, după intestinal subțire, rectul este localizarea unde CNE se găsesc în mod fiziologic în cea mai mare densitate. Deși distribuția lor este izolată la nivelul stratului epitelial intestinal în tubul digestiv, la nivel rectal, acestea pot fi găsite distribuite în grupuri celulare[12].

În partea a doua a studiului fost analizată legătura între densitățile CNE la nivel rectal și colonic și activitatea bolii inflamatorii intestinale.

Ca metodă statistică a fost folosită regresia lineară univariată în care, variabila dependentă a fost calculată luând în considerare mediile densităților celulare pentru fiecare marker neuroendocrin de diferențiere celulară folosind o analiza de tip PCA. Variabilele independente au fost vârsta, sexul, durata bolii inflamatorii, PCR, calprotectina fecală, tipul de tratament, convențional sau anti TNF- $\alpha$ , scorurile de activitate clinică Mayo clinic și CDAI (Crohn's Disease Activity Index) și scorurile de activitate endoscopică CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of SEverity) și Mayo endoscopic.

Pentru cele trei variabile dependente s-a calculat inițial indicele de corelație Pearson cu o valoare  $r = 0.68$  și  $p < 0.01$  ceea ce indică o corelație puternică, pozitivă și semnificativă din punct de vedere statistic.

Dacă există date în literatură privind legătura dintre modificările CNE pozitive pentru markerii generali de diferențiere și inflamația intestinală în contextual patologiilor inflamatorii intestinale, datele despre această corelație pentru CNE pozitive pentru serotonină sunt limitate în ceea ce privește BII. Din această prima etapă de analiză se poate demonstra că există o influență similară a inflamației asupra hiperplaziei CNE ce exprimă serotonină.

În urma analizei univariate, factorii care au fost asociați cu creșterea densităților CNE au fost boala activă clinic și endoscopic, valorile crescute ale PCR și ale calprotectinei fecale și absența tratamentului anti TNF- $\alpha$ .

Nu au influențat densitățile CNE durata bolii, factorii demografici și nici fenotipul BII.

Faptul că durata bolii inflamatorii nu a influențat hiperplazia neuroendocrină deschide următoarea discuție: posibilitatea ca modificările celulare declanșate eventual de un prim puseu să fie ireversibilă, fie există o inflamație persistentă subclinică la pacienții cu BII, tratamentul BII nu poate reversa leziunile la nivel structural ale epiteliului intestinal chiar în caz de remisiune clinică și endoscopică susținută. Durata medie a bolii pe lotul de pacienți cu

BII a fost de 5 ani (60 luni pentru BC și 64 luni pentru RCUH) cu o durată minimă de 12 luni în ambele cazuri. Hiperplazia prelungită poate reprezenta o modificare preneoplazică în dezvoltarea tumorilor carcinoide[13][14]. Totuși aceeași analiza arată că tratamentul anti TNF- $\alpha$  se asociază cu densități mai scăzute de CNE comparativ cu tratamentul convențional ceea ce ar conduce la posibila contribuție a acestuia în reversibilitatea modificărilor de la nivelul stratului epitelial intestinal.

Totuși un factor de influență al acestui rezultat poate fi reprezentat de faptul că pacienții nu au fost în remisiune de la debutul tratamentului inițial fie el convențional sau biologic, au avut mai multe pusee de boală care au întreținut gradul inflamației mucozale. De asemenea nu sunt date care să ateste timpul necesar reversibilității hiperplaziei neuroendocrine din momentul opririi stimulului care o inițiază.

Pentru regresia multivariată s-au folosit ca variabile independente calprotectina fecală, proteina C reactivă și scorurile de activitate endoscopică.

Toate cele trei variabile fiind asociate cu hiperplazia CNE, obținându-se o corelație strânsă între PCR și calprotectina fecală ( $r = 0.92$ ), cu  $p < 0.05$ .

De asemenea același calcul folosind în regresia univariată ca variabilă dependentă densitățile celulare pentru serotonina a obținut aceiași parametri care se corelează cu hiperplazia celulară pentru serotonina adică scorurile de activitate clinică și endoscopică ridicate și valori crescute ale PCR și ale calprotectinei.

La regresia multivariată s-au folosit aceleași variabile dependente adică markerii de inflamație și scorul de activitate endoscopică și s-a obținut că densitățile celulare crescute pentru serotonina sunt corelate numai cu activitatea endoscopică cu un coeficient "r" de 0.2 și o valoare p semnificativă statistic ( $p < 0.01$ ).

Serotonina serică este crescută la pacienții cu sindrom de intestin iritabil. Medicația antiserotoninergică la acești pacienți ameliorează simptomatologia în ceea ce privește durerile abdominale și ameliorarea diareei, de unde reiese că rolul serotoninei în motilitate[6][15][16][17].

De asemenea, Levin, în 2014 a propus ca potențial tratament pentru BII medicația antiserotoninergică, bazat pe un experiment pe model animal cu două astfel de molecule care acționează prin blocarea căii de metabolizare a serotoninei din triptofan la nivel mucozal fără să blocheze secreția neuronală cu rezultate favorabile asupra scăderii mediatorilor inflamatori și în vindecarea mucozale[18][19][20].

*Principalele concluzii* ale studiului au fost :

1. Lotul pacienților cu BII a fost omogen din punct de vedere al tipului BII și al parametrilor de boală analizați. Lotul control a fost reprezentat de pacienți fără comorbidități cunoscute digestive sau extradigestive, cu indicație de colonoscopie de screening pentru cancerul colorectal. Pentru grupul cu RCUH majoritatea au avut afectarea pancolonică. Toți pacienții cu BC incluși au avut afectare colonică în evoluția BC. De asemenea grupul cu BII a fost omogen din punct de vedere al activității bolii inflamatorii. Tratamentul în curs specific BII a fost susținut pe cel puțin 6 luni înainte de includere și a fost reprezentat de tratament convențional sau de tratament anti TNF- $\alpha$  în monoterapie. Majoritatea pacienților din ambele grupuri (BC și RCUH) au avut tratament biologic la includere pe o perioadă medie de 13 luni. Durata bolii a fost de cel puțin 12 luni pentru RCUH și pentru BC cu o medie de 60, respective 64 luni
2. Analiza CNE s-a efectuat prin IHC folosind anticorpi pentru markerii generali de diferențiere neuroendocrină cromogranina A, sinaptofizina și separat pentru serotonină.
3. Au fost prelevate prin examen colonoscopic biopsii seriate din fiecare segment anatomic colonic, un total de 5 biopsii pe pacient câte un fragment din rect, sigmoid, descendent, transvers, ascendent, orientate pe hârtie de nitroceluloză
4. Număratoarele CNE au fost efectuate manual, la microscopul optic pe secțiuni progresive la distanță de 4 $\mu$ , pentru fiecare marker de diferențiere de către 3 anatomopatologi pentru fiecare număratoare. Anatomopatologii nu au cunoscut originea biopsiilor din grupurile de studiu
5. CNE au fost numărate pe o medie minimă de 20 cripte intestinale și o medie maximă de 25 glande la grupul cu BII și o medie minimă de 26 glande și 38 glande pentru grupul control. Numărul de CNE a fost exprimat ca medie a densităților CNE pe criptă
6. La examinarea morfolologică CNE din grupul BII au avut o hiperplazie marcată față de grupul control pentru toți markerii de diferențiere, fiind organizate în grupuri/cuiburi celulare la baza criptelor
7. S-au obținut densități medii crescute ale CNE pentru toți markerii de diferențiere la nivelul întregului colon și separate pe fiecare segment la pacienții cu BII față de grupul control cu valori semnificative statistic în toate cazurile
8. Raportat la markerii generali de diferențiere, densitățile celulare pentru cromogranina A au fost în toate cazurile mai mari comparativ cu cele pentru sinaptofizină, cromogranina A având un semnal uniform, difuz și omogen față de sinaptofizină.

9. Cele mai mari densități celulare pentru ambele grupuri de studiu s-au întâlnit la nivel rectal pentru toți cei 3 markeri
10. Comparând densitățile celulare între subgrupurile BC și RCUH, diferențe semnificativ statistice s-au înregistrat numai în cazul expresiei serotoninei la nivel rectal
11. S-au obținut corelații pozitive, puternice, cu semnificație statistic între mediile densităților celulare celor 3 markeri ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,01$ ).
12. La analiza lineară univariată creșterea densităților celulare pentru toți markerii de diferențiere a fost corelată cu valori crescute ale scorurilor clinice, endoscopice cu valori crescute ale PCR și ale calprotectinei fecale și cu absența tratamentului anti TNF- $\alpha$ . La regresia liniară multivariată densitățile crescute au fost corelate cu valori mari ale PCR, calprotectinei fecale și cu scorurile mari de activitate endoscopică. Rezultatele au fost semnificative statistic
13. La analiza lineară univariată densitățile celulare crescute pentru serotonină au fost corelate cu aceiași parametrii ca cei obținuți la analiza lineară univariată pentru toți markerii neuroendocrini. La analiza lineară multivariată creșterea densităților celulare pentru serotonină a fost asociată cu boala activă endoscopic ( $r = 0,20$ ,  $p < 0,01$ ).

## **Originalitatea studiului**

CNE sunt componente ale barierei epiteliale intestinale. Modificări ale funcției de barieră intestinală au fost observate în BII. Analiza comportamentului CNE în BII reprezintă un subiect actual pentru înțelegere fiziopatologiei BII privind modificările structurale, implicarea în mecanismele de inflamație, impactul clinic și potențiale ținte terapeutice.

Există foarte puține date în literatură despre dinamica modificărilor CNE în BII, care se bazează majoritar pe studii pe model animal.

Principiu studiului s-a bazat pe analiza imunohistochimică a densităților totale ale CNE pozitive pentru markerii generali de diferențiere, cromogranina A și sinaptofizina, și separat s-a analizat CNE pozitive pentru serotonină.

Originalitatea studiului a constat în evaluarea detaliată a distribuției densităților celulare pe fiecare segment anatomic colonic și a densităților totale celulare pe întreg colonul la fiecare pacient cu BII.

De asemenea, în plus față de studiile din literatură, numărătoare CNE a fost efectuată pe un număr semnificativ mai mare de glande. Studiul a inclus un număr mai mare de pacienți față de studiile existente cu distribuție uniformă a tipurilor de boală BC și RCUH și a fenotipurilor acestora.

S-a ales evaluarea separată a CNE pozitive pentru serotonină pentru că serotonina este produsul principal de secreție al celulelor enterocromafine care reprezintă tipul celular neuroendocrin cel mai abundent al epitelului intestinal. De asemenea creșterea concentrațiilor serice de serotonină a fost demonstrată la pacienții cu patologie intestinală inflamatorie.

Un alt motiv a fost faptul că serotonina îndeplinește roluri funcționale la nivelul intestinului cum ar fi motilitatea, secreția, reglarea apetitului și este implicată în mecanismele de inflamație.

Prin analiza detaliată a comportamentului CNE pozitive pentru serotonină s-a urmărit relația dintre hiperplazia celulară neuroendocrină și activitatea bolii inflamatorii la pacienții incluși.

De asemenea o altă idee de noutate a constat în efectuarea de corelații a numărului de CNE cu durata bolii inflamatorii, tipul de tratament specific BII și cu activitatea bolii pentru a determina dacă există o dinamică a acestor leziuni celulare influențată de tratament sau de evoluția prelungită a BII în care chiar dacă există remisiune clinică sau endoscopică dată de tratament poate persista inflamația în grade variabile la nivel histologic.

De asemenea există numeroase studii care susțin beneficiul tratamentului anti TNF- $\alpha$  în refacerea barierei intestinale la pacienții cu BII.

În plus față de datele existente în literatură, studiul a dorit să analizeze impactul tratamentului anti TNF- $\alpha$  asupra hiperplaziei neuroendocrine de la nivel intestinal la pacienții cu BII.

Cercetarea doctorală oferă o evaluare detaliată a comportamentului CNE la nivelul colonic la pacienții cu BII integrată în context clinic.

## **Dificultăți și limite ale studiului**

Studiul a prezentat câteva limitări și o serie de dificultăți în realizare.

În primul rând, provocarea a fost reprezentată de alegerea grupurilor de studiu, care a fost limitată de indicația de colonoscopie pentru ambele loturi. Alegerea în grupul control a

pacienților cu indicație de screening de cancer colorectal a oferit o oarecare neuniformitate în legătură cu parametrii demografici, în primul rând vârsta. De asemenea, a fost dificil de selectat în grupul control pacienții fără comorbidități cunoscute care ar fi putut influența densitatea CNE. De aici reiese o altă limitare a studiului pentru că evaluarea comorbidităților asociate la grupul control a fost făcută doar anamnestic.

Cercetarea a fost un studiu prospectiv, observațional, nerandomizat, care a urmărit analiza densităților CNE la nivelul colonic în BII. Nu a fost inclusă examinarea ileonul terminal pentru că intubarea acestuia nu a putut fi făcută, din motive tehnice, pentru toți pacienții, de asemenea nu a fost inclusă examinarea tubului digestiv superior sau a pacienților cu pouch ileal datorită cazurilor reduse din aceste grupe.

O altă dificultate a fost reprezentată de alegerea markerilor neuroendocrini pentru evaluarea celulară. S-au ales ambii markeri de diferențiere generală. Cromogranina A și sinaptofizina pentru a determina cât mai exact densitatea tuturor tipuri de CNE la nivelul epitelial. Ca tip celular a fost ales doar serotonina datorită evidențelor mai numeroase cu privire la rolul ei funcțional și legătura cu mecanismele inflamație la patologia inflamatorie de tub digestiv. Toate studiile privind rolul funcțional al serotoninei au vizat patologia funcțională intestinală.

Datorită costurilor mari de IHC nu au fost folosite colorații pentru determinarea expresiei celulare care exprimă ceilalți produși de secreție neuroendocrini care ar fi oferit o imagine mai exactă a modificărilor neuroendocrine la BII.

Costurile mari au limitat și absența dozării secreției serotonina sau a cromograninei A în lumenul colonic și concentrațiile lor serice care ar fi oferit date suplimentare cu privire la corelația dintre hiperplazia neuroendocrină cu concentrațiile digestive și serologice a produșilor lor de secreție.

O altă limită a studiului a fost dată lipsa calculării scorurilor de activitate histologică implicit de lipsa de corelare a densităților celulare neuroendocrine cu grad de activitate histologic.

În plus, în ceea ce privește activitate clinică și endoscopică, acestea au fost cuantificate calitativ ca boală activă, respectiv inactivă în concordanță cu valorile de cut-off specifice ale scorurilor de activitate pentru fiecare BII. Nu a fost efectuată o determinare cantitativă pentru boala activă, pentru a determina în ce măsură gradul de inflamație poate influența hiperplazia celulară neuroendocrină.

## **Direcții viitoare de studiu deschise de cercetarea doctorală**

Lucrarea doctorală analizează o temă de actualitate în studiul BII. Modificări la nivelul stratului epitelial intestinal sunt descrise ca mecanism fiziopatologic în BII. Datele limitate din literatură cu privire la modificările celulare neuroendocrine sunt limitate în aceasta patologie.

Cercetarea a analizat modificările în densitatea CNE la nivelul epiteliului intestinal și corelația acestora cu gradul de activitate clinico-biologic și endoscopic al BII și influența tratamentului BII asupra acestor modificări.

Datele obținute au arătat o creștere a densităților CNE pozitive pentru cromogranina A, sinaptofizină și serotonină la nivelul fiecărui segment colonic la pacienții cu BII față de grupul control.

De asemenea s-a demonstrat că există o corelație strânsă între hiperplazia neuroendocrină și activitatea clinică și endoscopică a BII și cu markerii serologici și fecali de inflamație.

În plus densitățile crescute ale CNE au fost corelate cu absența tratamentului biologic anti- TNF- $\alpha$ .

Studiul doctoral este singura lucrare existentă în literatură care oferă date concrete, în detaliu, despre modificările neuroendocrine în context clinic la pacienții cu BII, acest lucru deschizând multiple perspective pentru cercetarile ulterioare.

În primul rând trebuie evaluată măsura în care hiperplazia CNE se corelează cu creșterea produșilor de secreție la nivel serologic sau intraluminal și legătura dintre aceștia și simptomatologia BII.

De asemenea ar fi interesant de observat comportamentul celular în dinamică pentru același pacient în evoluția bolii pentru a determina dacă există o reversibilitate a acestor modificări în caz de remisiune susținută.

În plus, analiza CNE în studiul prezentat a inclus 3 markeri de diferențiere celulară, dintre care unul singur cu rol funcțional. Ulterior, pentru înțelegerea comportamentului neuroendocrin și impactul acestor modificări în BII, este necesar ca studii viitoare să includă analiza celulară pentru expresia cât mai multor tipuri celulare, inclusiv cu analiza serologică și intraluminală a produșilor lor de secreție.

De asemenea studiul a arătat că există o posibilă corelație doar a tratamentului anti TNF- $\alpha$  cu scăderea gradului de hiperplazie celulară, ceea ce conduce la ipoteza că acesta ar avea rol în repararea modificărilor epiteliale la pacienții cu BII.

Acest lucru este foarte important având în vedere că ținta ideală în BII este vindecarea histologică, apoi că repararea integrității și funcției epiteliale ar putea opri întreținerea răspunsului inflamator inițiat de antigenele microbiene intraluminale.

Rolul tratamentului anti TNF- $\alpha$  și a celorlalte molecule terapeutice din BII trebuie definit, în studii ulterioare, ca rol în restabilirea integrității și homeostaziei stratului epitelial intestinal.

De asemenea în studiul prezent s-a demonstrat că densitatea CNE pozitive pentru serotonină este mult crescută în BII cu potențiale implicații funcționale și pro-inflamatorii. Există un studiu în literatură de două molecule orale care vizează blocarea sintezei de serotonina la nivelul mucozal cu rol în ameliorarea funcțională și în vindecarea mucozală pe model animal de colită indusă. În concluzie CNE pozitive pentru serotonină ar putea reprezenta ținte pentru viitoarele terapii de BII.

Toate medicamentele din BII vizează blocarea căilor de inflamație, dar s-a demonstrat că modificări ale CNE antrenează și susțin inflamația, iar terapii care să vizeze repararea modificărilor celulare de la nivelul SEI ar putea avea beneficii în mecanismele de producere a BII.

## **Bibliografie selectivă**

*(din totalul de 196 referințe incluse în teză)*

1. Chojnacki C, Wiśniewska-Jarosińska M, Kulig G, Majsterek I, Reiter RJ, Chojnacki J. Evaluation of enterochromaffin cells and melatonin secretion exponents in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2013;
2. El-Salhy M, Danielsson Å, Stenling R, Grimelius L. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 1997;
3. El-Salhy M, Hatlebakk JG, Gilja OH. Abnormalities in endocrine and immune cells are correlated in dextran-sulfate-sodium-induced colitis in rats. *Mol Med Rep.* 2017;
4. El-Salhy M, Mazzawi T, Umezawa K, Gilja OH. Enteroendocrine cells, stem cells and differentiation progenitors in rats with TNBS-induced colitis. *Int J Mol Med.* 2016;
5. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004;
6. Camilleri M. Intestinal Secretory Mechanisms in Irritable Bowel Syndrome-Diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;
7. El-Salhy M, Wendelbo IH, Gundersen D. Reduced chromogranin a cell density in the ileum of patients with irritable bowel syndrome. *Mol Med Rep.* 2013;
8. Lee KJ, Kim YB, Kim JH, Kwon HC, Kim DK, Cho SW. The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;
9. Corti A, Ferrero E. Chromogranin A and the Endothelial Barrier Function. *Curr Med Chem.* 2012;
10. Zissimopoulos A, Vradelis S, Konialis M, Chadolias D, Bampali A, Constantinidis T, et al. Chromogranin A as a biomarker of disease activity and biologic therapy in inflammatory bowel disease: A prospective observational study. *Scand J Gastroenterol.* 2014;
11. Sciola V, Massironi S, Conte D, Caprioli F, Ferrero S, Ciafardini C, et al. Plasma chromogranin A in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;
12. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The “normal” endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;
13. Grin A, Streutker CJ. Neuroendocrine tumors of the luminal gastrointestinal tract. *Arch Pathol Lab Med.* 2015.

14. R. G, P. B, P. D, T. S, E. I, G. B. Neuroendocrine carcinomas arising in ulcerative colitis: Coincidences or possible correlations? *World J Gastroenterol.* 2009;
15. El-Salhy M, Solomon T, Hausken T, Gilja OH, Hatlebakk JG. Gastrointestinal neuroendocrine peptides/amines in inflammatory bowel Disease. *World J. Gastroenterol.* 2017.
16. Mazzawi T, Hausken T, Gundersen D, El-Salhy M. Dietary guidance normalizes large intestinal endocrine cell densities in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2016;
17. Stasi C, Bellini M, Gambaccini D, Duranti E, de Bortoli N, Fani B, et al. Neuroendocrine dysregulation in irritable bowel syndrome patients: A pilot study. *J Neurogastroenterol Motil.* 2017;
18. Levin AD, van den Brink GR. Selective inhibition of mucosal serotonin as treatment for IBD? *Gut.* 2014;
19. Margolis KG, Pothoulakis C. Serotonin Has a Critical Role in the Pathogenesis of Experimental Colitis. *Gastroenterology.* 2009;
20. Margolis KG, Stevanovic K, Li Z, Yang QM, Oravec T, Zambrowicz B, et al. Pharmacological reduction of mucosal but not neuronal serotonin opposes inflammation in mouse intestine. *Gut.* 2014;

## Lista cu lucrări publicate

1. **Meianu C**, Becheanu G, Diculescu M. Alteration of serotonin positive cells in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Research and Science Today, 1(17), pag 230-238,2019  
<https://www.rstjournal.com/arhiva/2019-2/>
2. **Meianu C**, Becheanu G, Diculescu M. Neuroendocrine cells alterations in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Research and Science Today, 1(17), pag 195-204,2019  
<https://www.rstjournal.com/arhiva/2019-2/>
3. **Meianu C**, Becheanu G, Diculescu M, P047 Neuroendocrine cells densities alterations in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. J Crohn`s and Colitis, 2019  
<https://www.ecco-ibd.eu/publications/congress-abstract-s/abstracts-2019/item/p047-neuroendocrine-cells-densities-alterations-in-colonic-mucosa-of-patients-with-inflammatory-bowel-disease.html>

### *Lucrări prezentate la manifestări științifice*

#### Prezentări orale

1. **Meianu C**, M Diculescu, Clinical implications of increased densities of neuroendocrine cells and serotonin expressing cells in IBD colitis. The 39<sup>th</sup> National Congress of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy, 6-8 June, 2019, Timișoara
2. **Meianu C**, M Diculescu, The density of neuroendocrine cells and the correlation with inflammatory status in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. The 9<sup>th</sup> National Symposium of Inflammatory Bowel Diseases, 28-29 September, 2017, București – Lucrare premiată, premiul III.