

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

*CORELAȚII CLINICE, HISTOLOGICE ȘI
TRANSCRIPTOMICE ÎN
BOLILE INFLAMATORII CRONICE INTESTINALE*
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV.DR. DANIELA ADRIANA ION

Student-doctorand:

TEODORA ECATERINA MĂNUC

2019

CUPRINS

CUPRINS.....	- 10 -
INTRODUCERE.....	- 12 -
I. PARTEA GENERALĂ	- 17 -
1. Bolile inflamatorii intestinale - Generalități.....	- 17 -
1.1 Epidemiologie	- 17 -
1.2 Genetica populațională.....	- 20 -
1.3 Factori de gazdă	- 20 -
1.4 Factori de mediu	- 21 -
1.5 Influența medicamentelor	- 23 -
2. Fiziopatologia bolilor inflamatorii cronice intestinale.....	- 25 -
2.1 Factori genetici	- 25 -
2.2 Homeostazia intestinală.....	- 28 -
2.2.1 Bariera intestinală.....	- 29 -
2.2.2 Răspunsul imun înnăscut	- 30 -
2.2.3 Răspunsul imun adaptativ	- 31 -
2.3 Citokine/chemokine implicate în bolile inflamatorii cronice intestinale	- 31 -
2.4 Căi de semnalizare	- 34 -
2.4 Profilul expresiei genice la nivel mucozal în bolile inflamatorii cronice intestinale	- 37 -
3. Diagnosticul bolilor inflamatorii cronice intestinale	- 43 -
3.1 Colita Ulcerativă	- 43 -
3.2 Boala Crohn.....	- 46 -
3.3 Diagnosticul histologic al bolilor inflamatorii cronice intestinale	- 51 -
3.3.1 Histologia în Colita Ulcerativă.....	- 56 -
3.3.2 Histologia în Boala Crohn.....	- 58 -
3.3.3 Colita nedeterminată și colita neclasificabilă	- 62 -
3.3.4 Remisiunea histologică	- 63 -
II. PARTEA SPECIALĂ.....	- 64 -
4. Ipoteză de lucru și obiectivele generale.....	- 64 -
5. Metodologia generală a cercetării	- 65 -

6. Corelații clinice, endoscopice și histopatologice la pacienții cu boli inflamatorii intestinale	- 66 -
6.1 Introducere	- 66 -
6.2 Materiale și metodă.....	- 70 -
6.3 Rezultate.....	- 80 -
Colita Ulcerativă	- 85 -
Boala Crohn.....	- 93 -
Colita neclasificată.....	- 100 -
Activitatea histologică a mucoasei endoscopice normale	- 100 -
6.4 Discuții.....	- 102 -
6.5 Concluzii.....	- 109 -
7. Profilul expresiei genice la nivel mucozal la pacienții cu boli inflamatorii intestinale	- 110 -
7.1 Introducere	- 110 -
7.2 Materiale și metodă.....	- 110 -
7.3 Rezultate.....	- 126 -
Semnătura moleculară generală a bolilor inflamatorii cronice intestinale ...	- 126 -
Semnătura moleculară a mucoasei inflamate și neinflamate versus control.	- 132 -
Expresia genică mucozală în Colita Ulcerativă și Boala Crohn - diferențe...	- 137 -
7.5 Discuții.....	- 154 -
7.6 Concluzii.....	- 159 -
8. Concluzii și contribuții personale	- 161 -
Bibliografie	- 164 -
Anexe.....	- 182 -

Introducere

Bolile inflamatorii intestinale reprezintă în cercetarea fundamentală internațională în general, și în sfera gastroenterologiei în particular, un subiect în „vogă”, fiind probabil în top 5 subiecte discutate la congresele internaționale în domeniu și în top 10 articole publicate în gastroenterologie. Acest fapt se datorează evident impactului major medical, social și financiar pe care îl generează aceste afecțiuni în societatea modernă.

Există două categorii principale de BICI, Boala Crohn (BC) și Colita Ulcerativă (UC). Între acestea există diferențe semnificative legate de patogeneză și topografia lezională. Dacă UC se caracterizează printr-o inflamație difuză, limitată la mucoasa colonului și rectului, inflamația caracteristică BC este discontinuă, transmurală și poate afecta întregul tract gastro-intestinal. În plus, pacienții cu BC prezintă frecvent complicații cum ar fi stricturile intestinale, fistulele și abcesele.

Alegerea acestei teme nu a fost întâmplătoare. Ea este generată de necesitatea obținerii unor date suplimentare despre patologie și genetică ce pot modula terapia și monitorizarea pacienților cu boli inflamatorii intestinale, în contextul în care se consideră că datele actuale nu generează un management optim pentru toate categoriile de pacienți, rata de complicații și de intervenții chirurgicale rămânând ridicată în ciuda beneficiilor majore aduse de terapia imunologică în ultimii 10 ani.

Situația bolilor inflamatorii intestinale la nivel național urmează cu un anumit decalaj evoluția internațională, astfel încât și în România incidența și prevalența sunt în continuă creștere, similar cu ratele celorlalte țări în curs de dezvoltare. Nu există multe date de epidemiologie publicate, însă se estimează o creștere a incidenței de circa 10 ori din 2002 până în prezent. Din păcate, doar 20% dintre cei diagnosticați sunt probabil incluși în Registrul Național de Boli Inflamatorii Cronice Intestinale (IBD Prospect).

Până în acest moment nu au existat studii naționale care să analizeze aspectele clinice și endoscopice în corelație cu cele histologice și transcriptomice la pacienții cu boli inflamatorii. De asemenea, evaluarea histologică atât în mucoasa afectată cât și în mucoasa endoscopic îndemnă pereche, corelată cu elementele clasice și caracteristicile expresiei genice mucozale poate fi considerată o premieră la nivel național și o etapă de referință în cercetarea din bolile inflamatorii intestinale la acest moment.

Studiul de față este divizat în două părți distincte, dar interconectate.

În primul studiu au fost evaluați transversal parametri epidemiologici, clinici, biologici, endoscopici și histopatologici pentru 66 de pacienți cu boală inflamatorie cronică intestinală. După divizarea lotului general în cele două entități clinice (Boala Crohn și Colită Ulcerativă), au fost evaluate diferențele în ceea ce privește parametri epidemiologici, clinici și biologici. Ulterior, în cadrul fiecărei entități au fost evaluate corelațiile dintre diverșii parametri studiați. Această evaluare are un dublu rol: pe de-o parte stabilirea unor caracteristici de bază ale pacienților cu BICI din centrul nostru și pe de altă parte definirea mai concretă a rolului stadializării histologice în managementul general al bolii inflamatorii. Aceste corelații sunt necesare pentru reevaluarea standardului de monitorizare și tratament, ținând cont de faptul că managementul actual ia în calcul doar activitatea endoscopică, respectiv „vindecarea mucozală”, rolul activității histologice nefiind clar definit încă.

În al doilea studiu a fost cercetată prin metoda RT-qPCR expresia genică mucozală (din biopsii prelevate atât din mucoasa inflamată cât și din mucoasa endoscopic neafectată) a unui număr de 84 gene presupus implicate în fiziopatologia inflamației din bolile inflamatorii intestinale cronice. Pentru o corectă caracterizare a expresiei genice, aceasta a fost comparată cu cea a unui lot martor. Astfel, lotul martor a fost constituit din pacienți care au efectuat colonoscopii în centrul nostru și nu au avut leziuni endoscopice. Am dorit să identificăm o semnătură inflamatorie mucozală specifică pentru BICI cu scopul de a caracteriza în primul rând mecanismele fiziopatologice implicate în generarea și perpetuarea răspunsului inflamator.

Partea generală

Bolile inflamatorii cronice intestinale (BICI) sunt caracterizate de activarea cronică sau recurentă a sistemului imun cu apariția unei inflamații cronice în orice segment al tubului digestiv. Boala Crohn (BC) și Colita Ulcerativă (UC) sunt cele două forme principale ale bolilor inflamatorii.

În ultimele decenii a devenit evident faptul că numărul pacienților cu boli inflamatorii intestinale este în plină creștere la nivel global. Odată cu urbanizarea și industrializarea globală s-au observat anumite tipare de apariție a bolilor inflamatorii. Incidența UC pare să fie crescută inițial în zonele urbane, după care se plafonează, stabilizare urmată de o creștere a incidenței BC fără a depăși UC [1].

În ceea ce privește România, aceasta trebuie înțeleasă ca o țară ”în tranziție” privind incidența BICI, deoarece în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a acestor afecțiuni. Datele naționale sunt centralizate în Registrul Național de Boală Inflamatorie Intestinală (IBD Prospect), demarat relativ recent, în 2006, sub coordonarea Prof. Diculescu Mircea ca inițiator al proiectului. Date anterioare IBD Prospect provenind din centrele de referință, raportau o rată a incidenței de 0.5:100.000 pentru BC și 0.97:100.000 pentru UC în perioada 2002-2003. Rata prevalenței a fost de 1.51:100.000 pentru BC și de 2.25:100.000 pentru UC [2].

În ciuda progreselor recente din genetică, epigenetică și metabolomică ce au dus la descoperirea unor pattern-uri moleculare care influențează răspunsul imun al gazdei și care pot fi responsabile de apariția BICI, mecanismul fiziopatologic exact este doar parțial cunoscut. Elementul de noutate din ultimii ani este reprezentat de importanța crescută a microbiotei care poate induce modificări ale barierei intestinale facilitând pasajul antigenelor și declanșarea unui răspuns imun aberant datorat unei predispoziții genetice a gazdei. După inițierea răspunsului imun aberant există defecte apărute și în auto-limitarea proceselor inflamatorii ce vor cauza un răspuns inflamator cronic cu distrugere și remaniere tisulară.

Polimorfismul NOD2/CARD15 a fost prima genă majoră de susceptibilitate identificată. Studiile experimentale au arătat că pacienții cu mutații ale NOD2 au un răspuns antibacterian deficitar, pe deoparte prin scăderea alfa-defensinelor eliberate din celulele Paneth sau prin limitarea autofagiei cu creșterea nivelului de NF-κB plasmatic [3].

La nivel celular interacțiunea dintre celulele epiteliale intestinale, bacteriile intestinale și celulele imune locale alcătuiesc baza homeostaziei intestinale. În BICI multiple mecanisme imune sunt modificate, implicând celulele limfoide, macrofagele, limfocitele B și T, celule dendritice, etc. Prin interacțiunea dintre celulele prezentatoare de antigene (APC) și antigenele bacteriene, limfocitele T naive vor fi diferențiate în celule T-helper, procese ce se petrec în plăcile Peyer și în țesutul limfoid.

Alterări ale barierei intestinale și ale celulelor epiteliale intestinale implicate în recunoașterea bacteriană și răspunsul inflamator, începând cu receptarea semnalelor PRR, ce pot declanșa autofagia sau crește gradul de stress ale RE, pot fi implicate în mecanismul patogen al BICI[4].

Multiple citokine și căi de semnalizare sunt perturbate în cazul bolilor inflamatorii intestinale IL12-IL23, IL-10, TGF-β, IL1-IL6, TNF-α, IL17, IL8. Niveluri crescute ale MMP-1,

3, 7, 9, 10 și 12 au fost identificate în biopsiile intestinale ale pacienților cu BICI, fiind astfel o țintă terapeutică posibilă [5]. Sursele celulare de MMP includ celule epiteliale, mezenchimale și neutrofile.

Primele studii privind expresia genică mucozală în bolile inflamatorii intestinale datează din 2004 și au pornit de la evaluarea pieselor de rezecție chirurgicală, fără a putea lua în discuție markerii precoce ai bolii, astfel fiind centrate mai mult pe influența tratamentului[6].

Inițial au fost puse în evidență semnături diferite ale genelor pro-inflamatorii raportat la cele două subtipuri ale BICI (UC și BC). În colita ulcerativă a fost observată o supra-expresie a genelor responsabile pentru secreția de chemokine, funcția imună, lipocalinele HNL și NGAL, legate de inflamație și genele CXCL legate de proliferare. Anumite gene implicate în carcinogeneză, au fost exprimate diferențial doar în UC. Alte gene exprimate atât în UC cât și în BC au inclus familia genelor REG și genele S100A9 și S100P. Defensinele naturale antimicrobiene (DEFA5 și DEFA6) au fost în mod deosebit supra-exprimate în BC [7].

Interacțiunea dintre microbiotă și terenul genetic al gazdei duce la un profil transcriptomic foarte specific la nivel mucozal[8]. Analiza acestei expresii genetice mucozale poate oferi informații referitoare la căile moleculare funcționale și la activitatea transcripțională cu rol în declanșarea și perpetuarea procesului patologic. Prin intermediul GWAS au fost relevate suprapuneri între locusurile de risc ale UC și BC. De asemenea, Granlund a găsit asemănări semnificative între modelul expresiei genice mucozale al peptidelor antimicrobiene și cel asociat activării T helper [9].

Pentru diagnosticul și managementul bolilor inflamatorii cronice, dar și pentru alte situații speciale în contextul acestora, există ghiduri publicate de către țările cu cea mai mare incidență a acestei patologii. În Europa ghidurile ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) sunt cel mai des utilizate. Examinarea histologică a biopsiilor colonice sau a pieselor chirurgicale este o parte fundamentală a diagnosticului bolilor inflamatorii și poate ajuta la diferențierea între colitele cronice și cele care au altă etiologie. Dacă un diagnostic definitiv de UC, BC sau colită microscopică (colagenozică sau limfocitară) nu este posibil, se recomandă folosirea termenului de colită nedeterminată pentru piesele chirurgicale și de boală inflamatorie cronică neclasificabilă pentru biopsii[10].

Remisiunea endoscopică definită prin rezoluția inflamației vizuale și a ulcerărilor la endoscopie a devenit o nouă țintă în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale, fiind asociată cu

o remisiune clinică prelungită, spitalizări reduse și scăderea necesității pentru colectomie. În ultimii ani, efectul unei remisiuni histologice este documentat, constituind probabil următoarea țintă a unei remisiuni complete.

În decursul timpului, peste 30 de sisteme de scorificare au fost elaborate, dar cel mai utilizat scor de severitate histologică din UC este Indexul Geboes, acesta beneficiind atât de validarea în practica medicală, cât și de o bună inter și intra-observabilitate[11]. Inflamația persistentă microscopică, atât acută, cât și cronică, la pacienții având UC a fost asociată cu creșterea ratei de recădere, spitalizare, colectomie și risc de neoplazie colorectală. Aceste aspecte sunt probabil mai semnificative pentru UC decât pentru BC, dat fiind faptul că inflamația mucozală difuză din UC este relevată mai ușor de către biopsii comparativ cu inflamația transmurală din Crohn, care poate reprezenta un bias al metodei pentru acest subgrup. Un argument în favoarea biopsiilor la pacienții cu BC este paralelismul dintre afectarea transmurală, care este invariabilă în zonele cu boală mucosala severă [12].

Partea specială

Ipoteza și obiective

În primul studiu au fost evaluați transversal parametrii epidemiologici, clinici, biologici, endoscopici și histopatologici pentru 66 de pacienți cu boală inflamatorie cronică intestinală. După divizarea lotului general în cele două entități clinice (BC și UC), au fost evaluate diferențele în ceea ce privește parametrii epidemiologici, clinici și biologici. Parametrii evaluați au fost cei clasici conform parametrilor de includere în platforma națională (IBD Prospect).

Ulterior, în cadrul fiecărei entități au fost evaluate corelațiile dintre parametrii studiați. Această evaluare are un dublu rol: pe de-o parte, stabilirea unor caracteristici de bază ale pacienților cu BICI din centrul nostru și pe de altă parte, definirea mai concretă a rolului stadializării histologice în managementul general al bolii inflamatorii.

În al doilea studiu a fost cercetată prin metoda RT-qPCR expresia genică mucozală (din biopsii prelevate atât din mucoasa inflamată cât și din mucoasa endoscopic neafectată) a unui număr de 84 gene implicate în fiziopatologia BICI. Pentru o cât mai corectă caracterizare a expresiei genice la pacienții studiați, expresia genică obținută a fost comparată cu cea a unui lot martor. Astfel, lotul martor a fost constituit din pacienți care au efectuat colonoscopii în centrul nostru și nu au avut leziuni endoscopice.

În continuare am dorit să identificăm o semnătură inflamatorie mucozală specifică pentru BICI cu scopul de a caracteriza în primul rând mecanismele fiziopatologice implicate în generarea și perpetuarea răspunsului inflamator. Un alt obiectiv a fost izolarea de markeri ai inflamației subclinice sau markeri pentru diagnosticul diferențial dintre UC și BC. Efectul diferitelor clase terapeutice a fost de asemenea cercetat prin raportul cu modificarea expresiei genice. Pentru a răspunde la aceste întrebări am evaluat expresia genică mucozală a unui panel de 84 de gene, asociate anterior cu BICI. Aceasta a fost evaluată în mucoasa normală/patologică a pacienților și în mucoasa subiecților non-BICI.

Corelații clinice, endoscopice și histopatologice la pacienții cu boli inflamatorii cronice intestinale

Material și metoda: Au fost selectați pacienți spitalizați în cadrul Institutului Clinic Fundeni în perioada 1 ianuarie 2017 – 15 august 2017. Toți pacienții au semnat consimțământ pentru includerea în studiu și acord multiplu la internarea în spital. Pentru acești pacienți au fost completate chestionare incluzând parametrii de evaluare din IBD Prospect, completat ulterior cu alți parametrii biologici care au fost incluși în evaluarea statistică.

Pregătirea examinării colonoscopice s-a făcut conform protocolului standard cu 4 litri de soluție purgativă în cazul pregătirii cu Fortrans sau 2 litri de soluție în cazul pregătirii cu Picoprep. Calitatea pregătirii a fost notată în rezultatele explorărilor dar nu a fost luată în considerare pentru studiul desfășurat. Per protocol, în cadrul perechilor de biopsii mucoasă neinflamată/mucoasă patologică, s-a considerat necesară o distanță endoscopică de minim 5 cm între zona afectată și zona cu mucoasă normală.

Toate analizele statistice au fost efectuate utilizând software SPSS (versiunea 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Datele continue au fost exprimate ca medie \pm deviația standard și au fost analizate utilizând testul T sau testul Mann-Whitney. Variabilele categorice au fost exprimate ca frecvențe și analizate utilizând testul Chi-pătrat. Corelațiile dintre variabile au fost estimate utilizând coeficientul de corelare Pearson sau coeficientul de corelare Spearman. Valorile $p < 0,05$ au fost considerate semnificative pentru analiză.

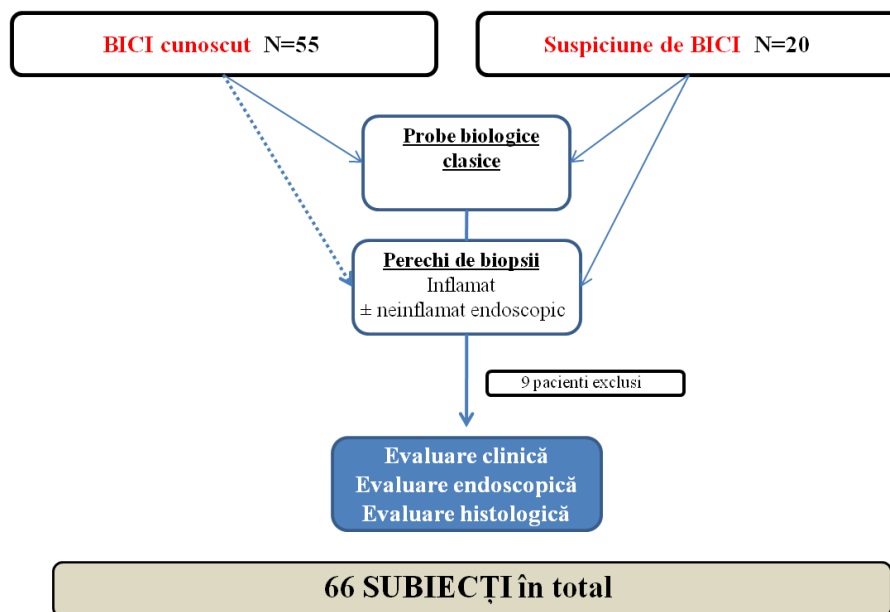


Figura 6.7 Schema de studiu – 2 cohorte inițiale

Evaluarea clinică a pacienților a fost efectuată folosind scorurile clinice MAYO parțial pentru colită ulcerativă și CDAI pentru Boală Crohn. Au fost prelevate probe sangvine în vederea stabilirii parametrilor biologici relevanți pentru bilanțul și evaluarea bolii inflamatorii - CRP, VSH, fibrinogen, hemoleucograma, albumină. Clasificarea rezultatelor endoscopice a fost făcută conform scorului MAYO pentru colita ulcerativă și conform scorului CDEIS pentru boala Crohn[13], [14]. Pentru pacienții cu biopsii a fost stabilit scorul histopatologic conform ghidurilor europene (ECCO 2017) – GEBOES, GHAS.

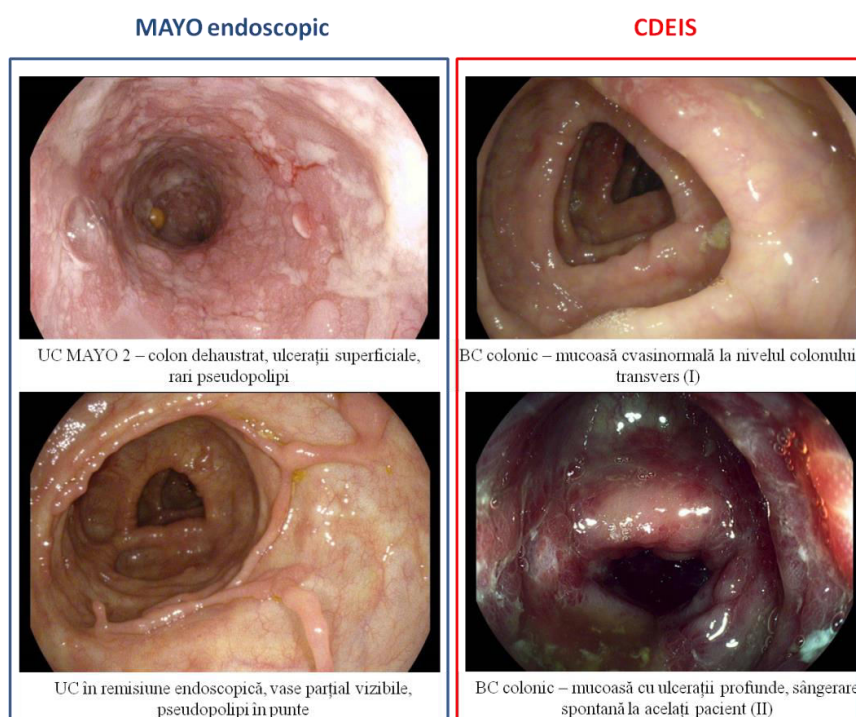


Figura 6.10 Imagini comparative ale scorurilor endoscopice

În total, un număr de 66 de pacienți au fost incluși – 33 de pacienți cu UC, 29 cu BC și 4 pacienți cu boală inflamatorie nedeterminată. Peste jumătate dintre pacienți (65.2%) au fost de sex masculin în timp ce 34.8% au fost de sex feminin. Nu au fost identificate diferențe semnificative statistic între UC și BC pentru distribuția pe sexe. Se observă un procent mai mare de bărbați pentru UC, în timp ce raportul între sexe este egal pentru BC.

Se observă că pacienții cu BC au avut un IMC mai scăzut față de cei cu UC. Doi pacienți au fost obezi cu un IMC peste 30. De asemenea, pacienții cu BC au avut de 5 ori mai multe intervenții chirurgicale, concordant cu literatura de specialitate. În plus, aceștia au un nivel al hemoglobinei și albuminei mai scăzut, fără a se poziționa sub valoarea normală, în timp ce parametrii inflamatori sunt semnificativ mai crescuți.

Pentru cohorta de UC, scorul clinic MAYO parțial a fost corelat cu scorul endoscopic, iar severitatea s-a corelat cu activitatea histologică. Valoarea hematocritului s-a corelat negativ cu extensia lezională conform clasificării Montréal. Nu au fost observate modificări în funcție de tipul tratamentului administrat și acesta nu s-a corelat cu localizarea, scorul endoscopic, scorul clinic sau activitatea histologică. De asemenea, nu am identificat diferențe semnificative la parametrii biologici între pacienții cu UC activă endoscopic și cu cei cu UC inactivă.

Pentru cohorta de BC, majoritatea pacienților au fost diagnosticați înainte de 40 de ani, în acord cu datele epidemiologice generale. Pacienții cu BC activă endoscopic au avut un nivel mai ridicat al CRP și mai scăzut al hematocritului. Scorul clinic (corespunzător unei activități ușoare/moderate) s-a corelat negativ cu valoarea hemoglobinei/ hematocritului și albuminei. Scorul histologic GHAS s-a corelat pozitiv cu scorul clinic și negativ cu valoarea albuminei. Din punct de vedere al terapiilor efectuate nu s-au obținut diferențe semnificative.

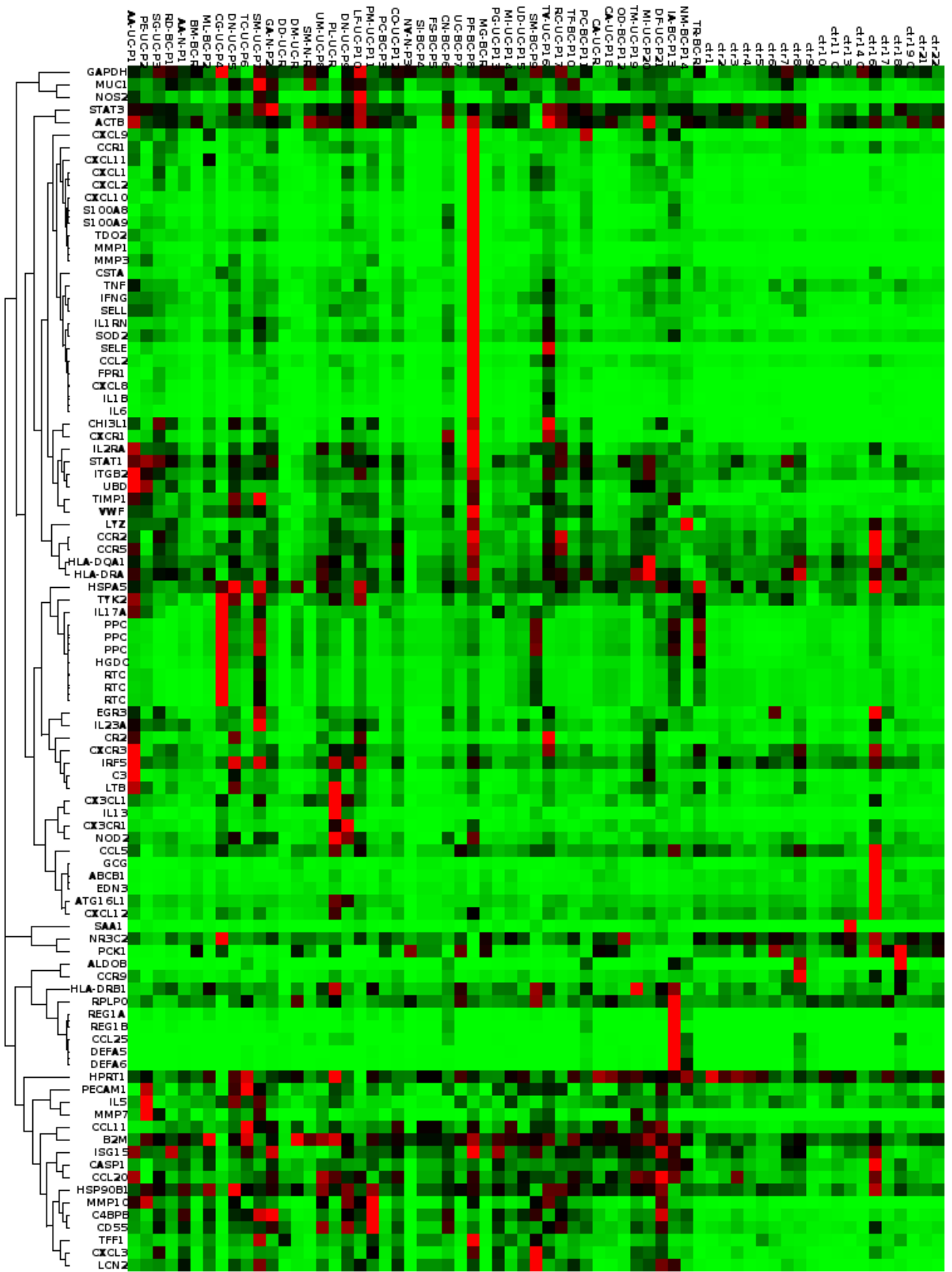
Profilul transcriptomic mucozal la pacienții cu boli inflamatorii intestinale

Material și metoda: Plecând de la rezultatele obținute anterior de cercetările în domeniu, am dorit să identificăm un profil genic mucozal care să explice pe de-o parte predispoziția pacienților către dezvoltarea bolilor inflamatorii cronice intestinale (prin compararea cu biopsiile luate de la pacienții control) și pe de altă parte diferențele care pot exista între cele două entități (prin evaluarea comparativă a expresiei genice din UC și BC). De asemenea, s-a încercat o corelare a profilului genic mucozal cu scorul histopatologic în scopul de a observa variația expresiei genice în funcție de magnitudinea răspunsului inflamator.

Întrucât chiar și mucoasa endoscopic normală a pacienților cu boli inflamatorii intestinale poate avea modificări histopatologice, s-a constituit un lot de pacienți control cu mucoasă colonică normală (confirmată histopatologic). Au fost incluși în acest lot persoane care s-au prezentat la colonoscopie asimptomatici (14 pacienți); sau cu simptome nespecifice pentru o boala inflamatorie intestinală (5 pacienți). Pacienții care au fost selectați pentru lotul control au semnat anterior procedurii endoscopice atât consimțământul pentru efectuarea colonoscopiei și a biopsiei, cât și pentru includerea în studiu.

În total au fost evaluate probe de la 46 de pacienți și comparate cu biopsii colonice de la 19 pacienți control. În total 30 gene au fost supraexprimate (la un prag de semnificație statistică ($p < 0,05$), în timp ce doar trei gene au fost subexprimate, toate atingând pragul de semnificație statistică (ABC1, EDN3 și PCK1). Au fost izolate 14 căi moleculare posibile în care genele

reprezentative identificate de noi sunt fi implicate. Cele mai reprezentative au fost calea de semnalizare mediată de citokine și calea semnalizării chemokinelor. În acord cu ontologia genetică majoritatea acestor gene sunt implicate major în chemotaxia leucocitară, răspunsul imun local și reglarea proliferării celulare. Harta de clusterizare ierarhica este prezentata in figura urmatoare.



Folosind pacienții incluși în primele cohorte am analizat semnătura specifică mucozală pentru 46 de cazuri de BICI și 19 pacienți control. Am folosit date publicate în literatura de specialitate și în alte teze doctorale internaționale pentru comparație. Din cohorta noastră, considerând expresia genică mucosală generală (țesut inflamă și neinflamă) reținem un număr de 30 de gene supraexprimate semnificativ și 3 gene subexprimate comparativ cu mucoasa subiecților control. Observăm că din genele supraexprimate semnificativ, cele mai mari valori ale Fold regulation au fost obținute pentru expresia matrixmetaloproteinazelor (MMP7, MMP10 și MMP3) urmat de CHI3L1, CXCR1 și LCN2.

Rolul MMP10 este disputat întrucât expresia MMP10 apare la răspunsul imun din injuria colonică, dar există date care sugerează că ar avea și un rol în rezoluția bolii cu vindecarea mucozală [15][16]. Supraexpresia matrixmetaloproteinazelor subliniază rolul important al acestor enzime în dezorganizarea și remodelarea mucozală generală. De remarcat că expresia TNF nu a fost modificată comparativ cu lotul control în semnătura generală a BICI.

Genele subexprimate au fost PCK1, ABCB1 și EDN3. ABCB1/MDR1 este complexul genetic asociat cu rezistența medicamentoasă, fiind implicat și în patogeneza UC, și mai puțin în BC [17], [18]. EDN3 are rol în vasoconstricția endotelială și ar putea fi implicat în procesul patogenic proinflamă și fibrozant întâlnit în BC. Subexpresia acestuia este dificil de interpretat în acest context. Din clusterizarea ierarhică generală se poate observa un pattern diferit între mucoasa pacienților control și cea a pacienților bolnavi.

Expresia CCL11 a fost crescută semnificativ comparativ cu lotul martor. CCL11 face parte din familia eotaxinelor, nu are sursă cunoscută la nivel mucozal însă pare să derive din celulele mononucleare/macrofage ale laminei propria. Nu este cunoscut gradul de implicare al CCL11 în apariția recăderilor dar acesta are un rol în inflamația mediată de eozinofile în special la UC al adultului [19].

Divizăm entitățile principale (UC, BC) și discutăm individual modificările apărute în profilele genetice, comparându-le cu rezultate asemănătoare din literatură. Pacienții cu UC au avut un scor endoscopic sever în 3 cazuri, comparativ cu doar 1 pacient cu BC care a avut scor moderat endoscopic.

Pentru pacienții cu UC am identificat două gene supraexprimate semnificativ – CCL11 și MMP10, în timp ce pentru BC au fost identificate 4 gene - C4BPB, IL1RN, LCN2 și S100A8. Comparativ, un număr mai mare de gene a fost supraexprimat în cazul pacienților cu BC, 15

gene vs 9 gene în cazul UC. Analiza nu a identificat gene comune între cele două entități. Observăm ca țesutul neinflamat al BC are expresie crescută pentru S100A8, gena care codifică pentru calprotectină, un biomarker cunoscut al acestei boli.

În 2013 un studiu al Rismo et al a investigat expresia citokinică mucozală la pacienții cu BC aflați în remisiune endoscopică, urmărindu-i până la recădere. Pentru cei 37 de pacienți s-a constatat că nivelul TNF, IL17A și FOXP3 a fost semnificativ mai crescut, mai ales la pacienții cu recădere precoce (înainte de 26 de săptămâni), sugerând că nu toate remisiunile endoscopice sunt egale din punct de vedere al inflamației persistente histologice [20]. În cazul pacienților noștri nu s-a observat o supraexpresie a TNF sau IL17A pentru mucoasa neinflamată endoscopic.

Pentru mucoasa inflamată a UC au fost identificate mai multe gene supraexprimate (57 de gene dintre care 49 semnificative) comparativ cu BC (40 de gene au fost supraexprimate dintre care 23 semnificative). Gene subexprimate au fost mai multe pentru BC (5 gene) dintre care 2 au atins pragul semnificativ, în timp ce pentru UC doar PCK1 a fost semnificativă. Studii similare au raportat un număr mai mare de gene supraexprimate în mucoasa afectată a pacienților cu UC comparativ cu BC [21]. Genele cu expresia cea mai mare au fost REG1A și REG1B, gene nespecifice, care alături de REG3A sunt dependente de metaplazia celulelor Paneth [22].

Observând hărțile calorice, există un pattern comun între mucoasa inflamată a celor două patologii reprezentată de cele 24 de gene comune. Între acestea observăm IL17A, MMP10 și MMP7, alături de multe dintre căile implicate în sinteza chemokinelor. Rezultatele noastre susțin implicarea MMP10 în procesele inflamatorii având în vedere că rămâne exprimat atât în mucoasa inflamată, dar și în cea aflată în remisiune. Acesta ar putea fi o nouă țintă terapeutică pentru vindecarea profundă mucozală.

Patru pacienți diagnosticați cu colită neclasificată. Am fost interesați în compararea expresiei genice mucozale la acești pacienți cu patternurile UC/BC obținute anterior pentru a observa gradul de similitudine. 2 gene au fost identificate specific supraexprimate pentru această entitate – IL1B și SELE. După cum se poate observa, patternul obținut se suprapune atât UC cât și BC. Motivul unei suprapuneri poate indica o etiologie mixtă cu un răspuns imun asemănător pe anumite căi dar diferit pe altele. De asemenea se poate presupune existența unor factori protectivi pentru mucoasa sănătoasă intercalară sau se poate presupune că există leziuni histologice fără expresie endoscopică, făcând astfel ca patternul lezional să fie continuu. În practică un procent de 10 % din colitele neclasificate vor ajunge să poarte alt diagnostic[23].

Din comparația grupată a biopsiilor inflamate cu cele neinflamate și cu cele control s-a alcătuit o clusterizare ierarhică. Observăm agregarea inițială a mucoasei neinflamate (BC și UC) cu mucoasa normală, precum și agregarea celor 2 tipuri de mucoasă inflamată.

Pentru analizarea biopsiilor endoscopice normale s-a preferat divizarea în funcție de activitatea histologică – grup 1 – biopsii histologic normale (GHAS/Geboes 0), grup 2 – modificări minime histologice. Nu au fost identificate gene semnificativ modificate între grupul 1 și control. Între grupul cu modificări inflamatorii minime și grupul control au fost identificate 6 gene semnificativ modificate - MMP7, MMP1, CCL11, S100A9, IL1RN ȘI C4BPB. La compararea directă a biopsiilor cu scor histologic 0 față de cele cu minime modificări am identificat 3 gene semnificativ supraexprimate (MMP1, MMP10 și TDO2).

Concluzii

Din punct de vedere al caracterelor morfometrice reținem că pacienții cu UC au fost mai frecvent supraponderali. Chiar dacă activitatea clinică a pacienților cu UC a fost mai crescută față de cei cu BC, din punct de vedere biologic aceștia au avut valori mai mici ale CRP/VSH și mai mari ale hemoglobinei și albuminei. Pentru UC scorul clinic s-a corelat cu scorul endoscopic și cu activitate histologică mai severă.

Pentru pacienții cu BC, chiar dacă aceștia au fost cu afectare ușoară/moderată, scorul clinic s-a corelat cu scorul histologic dar nu și cu scorul endoscopic. CDEIS s-a corelat cu un nivel mai mare al CRP-ului și cu o valoare mai mică a hemoglobinei.

În continuare am dorit să identificăm o semnătură inflamatorie mucozală specifică pentru BICI cu scopul de a caracteriza în primul rând mecanismele fiziopatologice implicate în generarea și perpetuarea răspunsului inflamator. Un alt obiectiv a fost izolarea de markeri ai inflamației subclinice sau markeri pentru diagnosticul diferențial dintre UC și BC. Efectul diferitelor clase terapeutice a fost de asemenea cercetat prin raportul cu modificarea expresiei genice. Pentru a adresa aceste întrebări am evaluat expresia genică mucozală a unui panel de 84 de gene, asociate anterior cu BICI. Aceasta a fost evaluată în mucoasa normală/patologică a pacienților și în mucoasa subiecților non-BICI.

În majoritatea cazurilor a existat concordanță între aspectul endoscopic normal și scorul histologic de 0 pentru biopsiile din țesut normal ale pacienților cu BICI. Un sfert din biopsiile din țesut normal endoscopic au prezentat modificări histologice în diferite grade.

Importanța acestor observații se leagă de practicile clinice obișnuite în care ghidarea tratamentului se face în funcție de evaluarea clinică și secundar endoscopică. Această abordare poate fi eronată având în vedere că pentru aspectul endoscopic compatibil remisiunii, leziunile histologice inflamatorii pot persista.

În afară de vindecarea mucozală endoscopică, actualul gold-standard pentru bolile inflamatorii intestinale, remisiunea histologică ar putea fi o țintă importantă în menținerea remisiunii pe termen lung.

Evaluarea mucoasei endoscopic neinflamate a relevat persistența unei supraexpresii genice. În țesutul neinflamat endoscopic comparativ cu cel al coortei control s-au identificat un număr de 12 gene supraexprimate semnificativ, dintre care cele mai importante au fost HLA-DQA1 și CCL11 sugerând că inflamația moleculară există dincolo de aspectul observabil la endoscopie.

Am identificat două gene specific supraexprimate în țesutul neinflamat al UC (CCL11, MMP10) și 4 gene în țesutul neinflamat al BC (LCN2, S100A8, C4BPB, IL1RN) comparative cu lotul control.

Profilurile inflamatorii obținute au fost relativ similare între BC și UC, cu 26 de gene exprimate specific în UC și doar o genă cu BC. Pacienții cu colită neclasificată au avut profil similar cu cel al UC/BC și doar 2 gene specific supraexprimate (SELE, IL1B).

Global, nivelul de expresie genică a fost mai accentuat la pacienții cu UC comparativ cu cei cu BC. Se poate specula că acesta ar putea fi motivul pentru care în UC deși leziunile sunt strict mucozale, extensia lezională este continuă, iar în BC intervin și elemente extramucozale, ca atare, leziunile sunt mai profunde, dar au frecvent doar un caracter parcellar.

Expresia genică mucozală a probelor endoscopice normale a identificat 6 gene supraexprimate semnificativ– MMP7, MMP1, CCL11, S100A9, IL1RN și C4BPB pentru probele cu infiltrat inflamator minim sau modificări arhitecturale.

Perioada de doctorat s-a concretizat și în publicarea a patru lucrări ISI pe acest subiect, două articole în țară și două în reviste din străinătate, ceea ce reprezintă fără îndoială un pas important în activitatea de cercetare și elaborare de materiale destinate publicării în reviste de specialitate. De asemenea, au fost susținute patru comunicări sub formă de poster la congrese internaționale de histopatologie și boli inflamatorii digestive.

Legat de rezultatele cercetării, lucrarea aduce date suplimentare în descifrarea etiopatogeniei celor două entități ale BICI, confirmând importanța particulară a unor gene în apariția bolii, dar și existența unor diferențe importante între BC și UC atât în faza acută a bolii cât și în remisiune.

Aceste evaluări vor permite poate și identificarea unor noi ținte terapeutice care pot permite un management individualizat al bolii în funcție de anomaliile mucozale diagnosticate.

Trebuie de asemenea remarcat faptul că studiul expresiei genice mucozale nu reprezintă decât un factor din ecuația cu multe necunoscute pe care o reprezintă BICI. Poate că această cercetare va contribui ulterior la identificarea uneia din aceste necunoscute. Nu ne rămâne decât să așteptăm viitorul ca să obținem confirmarea celor afirmate.

Bibliografie selectiva

- [1] G. G. Kaplan, “The global burden of IBD: from 2015 to 2025,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 12, pp. 720–727, Sep. 2015.
- [2] J. Burisch, T. Jess, M. Martinato, and P. L. Lakatos, “The burden of inflammatory bowel disease in Europe,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 7, no. 4, pp. 322–337, May 2013.
- [3] T.-E. M. Manuc, M. M. Manuc, and M. M. Diculescu, “Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn’s disease: a review of emerging therapeutic targets.,” *Clin. Exp. Gastroenterol.*, vol. 9, pp. 59–70, Mar. 2016.
- [4] K. J. Maloy and F. Powrie, “Regulatory T cells in the control of immune pathology.,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 9, pp. 816–822, Sep. 2001.
- [5] M. D. Baugh *et al.*, “Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease.,” *Gastroenterology*, vol. 117, no. 4, pp. 814–22, Oct. 1999.
- [6] T. P. Dooley *et al.*, “Regulation of gene expression in inflammatory bowel disease and correlation with IBD drugs: screening by DNA microarrays.,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2004.
- [7] I. C. Lawrance, C. Fiocchi, and S. Chakravarti, “Ulcerative colitis and Crohn’s disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 10, no. 5, pp. 445–456, 2001.
- [8] C. N. Bernstein and J. D. Forbes, “Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Other Chronic Immune-Mediated Inflammatory Diseases,” *Inflamm. Intest. Dis.*, vol. 2,

- no. 2, pp. 116–123, Nov. 2017.
- [9] A. van B. Granlund *et al.*, “Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn’s disease and ulcerative colitis.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56818, Feb. 2013.
- [10] F. Magro *et al.*, “European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 7, no. 10, pp. 827–851, Nov. 2013.
- [11] K. Geboes, R. Riddell, A. Ost, B. Jensfelt, T. Persson, and R. Löfberg, “A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis.,” *Gut*, vol. 47, no. 3, pp. 404–9, Sep. 2000.
- [12] R. V. Bryant, S. Winer, T. SPL, and R. H. Riddell, “Systematic review: Histological remission in inflammatory bowel disease. Is ‘complete’ remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 8, no. 12, pp. 1582–1597, Dec. 2014.
- [13] K. Geboes *et al.*, “Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn’s disease,” *Curr. Med. Res. Opin.*, vol. 21, no. 11, pp. 1741–1754, Nov. 2005.
- [14] N. Mohammed Vashist *et al.*, “Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 1, p. CD011450, Jan. 2018.
- [15] F. L. Koller *et al.*, “Lack of MMP10 exacerbates experimental colitis and promotes development of inflammation-associated colonic dysplasia,” *Lab. Investig.*, vol. 92, no. 12, pp. 1749–1759, Dec. 2012.
- [16] S. O’Sullivan, J. F. Gilmer, C. Medina, and C. Medina, “Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: an update.,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, p. 964131, Apr. 2015.
- [17] G.-T. Ho, N. Soranzo, E. R. Nimmo, A. Tenesa, D. B. Goldstein, and J. Satsangi, “ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 5, pp. 797–805, Mar. 2006.
- [18] M. Brinar *et al.*, “MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients.,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 13, p. 57, Mar. 2013.

- [19] A. Waddell *et al.*, “Intestinal CCL11 and eosinophilic inflammation is regulated by myeloid cell-specific RelA/p65 in mice.,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 9, pp. 4773–85, May 2013.
- [20] R. Rismo *et al.*, “Normalization of mucosal cytokine gene expression levels predicts long-term remission after discontinuation of anti-TNF therapy in Crohn’s disease,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 48, no. 3, pp. 311–319, Mar. 2013.
- [21] L. XU *et al.*, “Gene expression alterations in inflamed and unaffected colon mucosa from patients with mild inflammatory bowel disease,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, no. 3, pp. 2729–2735, Mar. 2016.
- [22] A. van B. Granlund, “Colonic mucosal gene expression in inflammatory bowel disease: From whole genome to REG gene family expression,” 2013.
- [23] G. E. Tontini, “Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: State of the art and future perspectives,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 1, p. 21, 2015.

I) Lucrări elaborate

1. Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets. - Manuc T, Manuc M, Diculescu M, publicat Clin Exp Gastroenterol, pe 15 Martie 2016, Volum 2016:9 Paginile 59—70.

Link - <https://www.dovepress.com/recent-insights-into-the-molecular-pathogenesis-of-crohn39s-disease-a-peer-reviewed-article-CEG>.

2. Gene expression profile of endoscopically active and inactive ulcerative colitis: preliminary data. Autori - Cristian George Țieranu, Maria Dobre, Teodora Ecaterina Mănuș, Elena Milanesi, Iancu Emil Pleșea, Caterina Popa, Mircea Mănuș, Ioana Țieranu, Carmen Monica Preda, Mihai Mircea Diculescu, Elena Mirela Ionescu, Gabriel Becheanu, publicat în Rom J Morphol Embryol 2017, 58(4):1301–1307.

Link - <http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/58041713011307.pdf>

3. Mucosal CCR1 gene expression as a marker of molecular activity in Crohn's disease: preliminary data Maria Dobre, Teodora Ecaterina Mănuș, Elena Milanesi, Iancu Emil Pleșea, Eugen Nicolae Țieranu, Caterina Popa, Mircea Mănuș, Carmen Monica Preda, Ioana Țieranu, Mihai Mircea Diculescu, Elena Mirela Ionescu, Gabriel Becheanu, publicat în Rom J Morphol Embryol 2017, 58(4):1263–1268.

Link - <https://pdfs.semanticscholar.org/b5f4/4aed96821862a06420f95603de52009e09ce.pdf>

4. Differential Intestinal Mucosa Transcriptomic Biomarkers for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Autori - Maria Dobre, Elena Milanesi, Teodora Ecaterina Mănuș, Dorel Eugen Arsene, Cristian George Țieranu, Carlo Maj, Gabriel Becheanu, and Mircea Mănuș. Publicat în Journal of Immunology Research, Volume 2018, Article ID 9208274, 10 pages

Link - <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/9208274/>