

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

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. SAJIN MARIA

Student-doctorand:

DR. POP (CURTE) ANAMARIA

ANUL 2020

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

Studiul modificărilor neuroendocrine

în patologia inflamatorie cronică

a tubului digestiv

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. SAJIN MARIA

Student-doctorand:

DR. POP (CURTE) ANAMARIA

ANUL 2020

CUPRINS

Introducere	9
I. Partea generală	17
1. Aspecte histologice și fiziologice relevante ale celulelor neuroendocrine la nivelul mucoasei colorectale	18
1.1. Aspecte histologice ale mucoasei colorectale normale	18
1.2. Celulele neuroendocrine la nivelul mucoasei colorectale normale	19
1.2.1. Morfologia și distribuția celulelor neuroendocrine de la nivelul mucoasei colo-rectale	19
1.2.2. Imunohistochimia celulelor neuroendocrine	20
1.2.3. Originea celulelor neuroendocrine în mucoasa colo-rectală normală	22
1.2.4. Rolurile celulelor neuroendocrine în mucoasa colo-rectală normală	23
1.2.4.1. Reglarea motilității tractului gastrointestinal și a metabolismului	24
1.2.4.2. Conexiunea enteroendocrină – nervoasă.....	25
1.2.4.3. Modularea imunității mucoale	26
2. Aspecte histopatologice ale celulelor enteroendocrine din mucoasa colorectală în bolile inflamatorii intestinale	29
2.1. Aspecte histopatologice ale mucoasei colorectale în bolile inflamatorii intestinale	29
2.1.1. Diagnosticul histopatologic al bolilor inflamatorii intestinale	29
2.1.1.1. Colita ulcerativă (rectocolita ulcerohemoragică)	29
2.1.1.2. Boala Crohn	30
2.1.1.3. Colite microscopice	31
2.1.1.4. Diagnostic diferențial	31
2.1.2. Sisteme de scorificare a inflamației mucoale în bolile inflamatorii intestinale	33
2.1.3. Conceptul de vindecare a mucoasei („ <i>mucosal healing</i> ”)	37
2.2. Alterări ale celulelor neuroendocrine în bolile inflamatorii intestinale	38
2.2.1. Definiții	38
2.2.1.1. Hiperplazia celulelor neuroendocrine.....	38
2.2.1.2. Cuiburi în lamina propria mucosală	38
2.2.1.3. Tumori neuroendocrine	39
2.2.2. Modificările celulelor neuroendocrine în colita ulcerativă și boala	

Crohn	40
2.2.2.1. Mecanisme fiziopatologice.....	40
2.2.2.2. Modificări histologice și imunohistochimice ale celulelor neuroendocrine	41
3. Analiza de imagine în patologia digitală	44
3.1. Patologia digitală și ”machine learning”.....	44
3.2. Metodele analizei de imagine pe lamele digitale.....	46
3.3. Analiza de imagine și ”machine learning” în bolile inflamatorii intestinale	47
3.3.1. Analiza de imagine pe lame digitale în bolile inflamatorii intestinale	47
3.3.2. Analiza de imagini endoscopice, radiologice și modele de ”machine learning” în studiul bolilor inflamatorii intestinale	48
II. Contribuții personale	49
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	50
5. Metodologia generală a cercetării	52
5.1. Selectarea cazurilor	52
5.2. Tehnica de laborator	52
5.2.1. Procesarea țesutului și protocolul de colorare hematoxin-eozină	52
5.2.2. Protocolul de colorare imunohistochimică	53
5.3. Evaluarea histopatologică a biopsiilor colo-rectale	54
5.3.1. Microscopia optică (convențională)	54
5.3.2. Detecția automată a celulelor pozitive la Cromogranina A	55
5.4. Prelucrarea datelor și analiza statistică	55
6. Sisteme de scorificare histologică a inflamației în colita ulcerativă (Studiul I)....	56
6.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	56
6.2. Pacienți și metode	57
6.2.1. Pacienți	57
6.2.2. Metode	58
6.3. Rezultate.....	61
6.3.1. Principalele caracteristici ale pacienților	61
6.3.2. Concordanța generală între indicele Nancy, scorul Geboes și Indicele Histologic Robarts	61
6.3.3. Nivelul de acord interobservatori și intraobservator	63
6.3.4. Timpul necesar evaluării	73

6.3.5. Corelarea cu scorul endoscopic Mayo	73
6.4. Discuții	76
7. Modificările histologice ale celulelor neuroendocrine în evoluția colitei ulcerative (Studiul II)	80
7.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	80
7.2. Pacienți și metode.....	81
7.2.1. Pacienți	81
7.2.2. Metode	81
7.2.2.1. Analiza celulelor pozitive la Cromogranina A	82
7.2.2.2. Definiții histologice utilizate	83
7.2.2.3. Analiza statistică	89
7.3. Rezultate.....	89
7.3.1. Aspecte endoscopice	89
7.3.2. Aspecte histopatologice	89
7.3.2.1. Gradul inflamației histologice	89
7.3.2.2. Arhitectura mucosală	90
7.3.2.3. Modificările celulelor neuroendocrine Cromogranina A - pozitive pe biopsiile colorectale	92
7.3.2.3.1. Modificările hiperplazice ale celulelor neuroendocrine Cromogranina - A pozitive	92
7.3.2.3.2. Modificările în dinamică ale celulelor neuroendocrine Cromogranina - A pozitive	93
7.4. Discuții	101
8. Corelații clinicopatologice ale hiperplaziei celulelor neuroendocrine la pacienții cu colită ulcerativă (Studiul III)	104
8.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	104
8.2. Pacienți și metode	105
8.2.1. Pacienți	105
8.2.2. Metode	105
8.2.2.1. Analiza histopatologică și imunohistochimică	105
8.2.2.2. Analiza statistică	106
8.3. Rezultate	106
8.3.1. Aspecte endoscopice	106
8.3.2. Gradul inflamației histologice	107

8.3.3. Modificările celulelor neuroendocrine Cromogranina A pozitive	107
8.3.3.1. Distribuția celulelor neuroendocrine Cromogranina A pozitive	107
8.3.3.2. Morfologia celulelor neuroendocrine Cromogranina A pozitive	112
8.3.3.2.1. Aspectul morfologic la colorația hematoxilin-eozină	112
8.3.3.2.2. Aspectul morfologic la colorația imunohistochimică pentru Cromogranina A	114
8.3.3.3. Descriptori histologici ai hiperplaziei de celule neuroendocrine Cromogranina A pozitive	114
8.3.3.4. Corelații cu parametri clinicopatologici	117
8.3.3.4.1. Vârsta	117
8.3.3.4.2. Durata evoluției bolii	117
8.3.3.4.3. Modificările endoscopice	119
8.3.3.4.4. Tratamentul	120
8.3.3.5. Corelații cu parametri histologici	122
8.3.3.5.1. Gradul inflamației histologice	122
8.3.3.5.2. Arhitectura criptelor	123
8.4. Discuții	131
9. Discuții	134
10. Concluzii	152
Bibliografie	154
Anexe	162

Problema fundamentală

Bolile inflamatorii intestinale prezintă o incidență în creștere, iar evoluția clinică, marcată de pusee de activitate, poate conduce la colectomie. Tratamentul acestora, nespecific, include așa-numita terapie convențională și terapia cu agenți biologici (anti-TNF- α), însă în cazul unui număr semnificativ de bolnavi se constată lipsa de răspuns la administrarea medicației.

Rolul celulelor neuroendocrine în patogenia bolilor inflamatorii intestinale este incomplet cunoscut. Numeroase studii au abordat mecanismele fiziopatologice și moleculare prin care ele contribuie la apariția simptomelor (1–5), multe dintre acestea pe modele murine (6–9), însă există puține informații privitoare la aspectele histopatologice și valoarea predictivă a unor parametri histologici care să le caracterizeze.

Cercetările referitoare la modificările histologice ale celulelor enteroendocrine, publicate în literatura de specialitate, se rezumă la stabilirea faptului că în aceste afecțiuni există o hiperplazie de celule neuroendocrine comparativ cu normalul, exprimată în densități medii de celule per criptă sau pe mm² (10–17).

Una dintre provocările legate de studiul histologic al bolilor inflamatorii intestinale, cu impact asupra integrării rezultatelor existente în literatură, este lipsa standardizării în ceea ce privește raportarea inflamației histologice și un consens asupra conceptului de vindecare histologică a mucoasei intestinale (18–21). În cazul colitei ulcerative, studii recente au arătat faptul că vindecarea histologică a mucoasei colorectale se corelează cu un interval crescut între recurențe, comparativ cu vindecarea mucosală evaluată endoscopic (18,22–25), conturându-se astfel ideea că ținta tratamentului ar trebui să fie reprezentată de revenirea la normal a histologiei mucoasei intestinale. Așadar, standardizarea raportării prin selectarea unui sistem de scorificare ce răspunde atât cerințelor cercetării științifice, cât și necesităților din practica de rutină, ar contribui la obținerea de rezultate convergente privind îmbunătățirea managementului terapeutic al bolnavilor.

Utilizarea unui sistem de scorificare a inflamației histologice adecvat din punctele de vedere menționate în studiul modificărilor celulelor neuroendocrine poate facilita identificarea de corelații semnificative, relevante, între acestea și factori clinicopatologici.

În plus, descrierea pattern-urilor histologice de distribuție ale celulelor enteroendocrine poate contribui la întregirea imaginii asupra mecanismelor fiziopatologice

în care sunt implicate și, astfel, la identificarea de markeri histologici predictivi ai evoluției bolii în scopul optimizării terapiei.

Am concentrat cercetarea asupra bolnavilor de colită ulcerativă pentru a obține o mai mare putere statistică a rezultatelor.

Sinteza ideilor principale

În **Partea generală**, am descris în detaliu aspectele histologice relevante mucoasei colorectale normale, incluzând aspecte legate de morfologia și funcțiile celulelor neuroendocrine (de reglare a metabolismului și motilității gastrointestinale, de modulare a imunității la nivelul mucoasei intestinale, conexiunea neuro-endocrină, interacțiunea cu microbiota), apoi aspectele histopatologice de la nivelul mucoasei colorectale întâlnite în bolile inflamatorii intestinale, cu un subcapitol dedicat studiilor publicate privitoare la alterările histologice ale celulelor neuroendocrine. Un capitol special este destinat patologiei digitale cu amănunte despre aplicabilitatea, provocările și limitele analizei de imagine centrate pe obiect a secțiunilor histologice digitalizate, precum și asupra cercetărilor în aria bolilor inflamatorii intestinale efectuate cu ajutorul „inteligenței artificiale”.

Partea secundă, de **Contribuții personale**, cuprinde capitolele referitoare la ipoteza de lucru și obiectivele generale, metodologia cercetării și la cele trei studii realizate în cadrul cercetării doctorale privind compararea sistemelor de scorificare a inflamației histologice și identificarea unuia adecvat cercetării ulterioare, modificările în dinamică ale celulelor neuroendocrine, determinate cu ajutorul analizei de imagine computerizate prin metode de „machine learning” și caracterizate prin descriptori histologici propuși în acest studiu doctoral, și corelațiile clinicopatologice ale modificărilor celulelor enteroendocrine cu factori clinici și patologici la pacienți cu colită ulcerativă.

Ipoteza de cercetare

Am pornit studiul doctoral de la premiza că celulele neuroendocrine prezintă modificări histologice la nivelul mucoasei colorectale, evidențiabile imunohistochimic prin Cromogranina A și exprimate sub forma unor descriptori histologici detaliați, care se corelează cu factori clinicopatologici evolutivi la bolnavii de colită ulcerativă.

Obiectivele principale au fost reprezentate de:

- Identificarea unui sistem de scorificare a inflamației histologice pentru colita ulcerativă adecvat atât cercetării științifice, cât și practicii de rutină
- Detecția, atât prin metode convenționale (microscopia optică), cât și cu ajutorul *analizei de imagine computerizate, prin metode de „machine learning”*, și cuantificarea celulelor enteroendocrine intracriptice pe biopsii colorectale cu marcaj imunohistochimic pentru Cromogranina A
- Realizarea unei analize a distribuției histologice și a morfologiei celulelor neuroendocrine (CNE), folosind *o serie de descriptori histologici noi, propuși în acest studiu doctoral*: numărul mediu de CNE/criptă pe întreaga suprafață a secțiunii histologice, numărul mediu de CNE/criptă în „hotspot”, numărul maxim de CNE/criptă, numărul de cripte cu hiperplazie lineară de celule neuroendocrine pe întreaga suprafață a secțiunii histologice și numărul de cripte cu hiperplazie lineară în „hotspot”
- Analiza rezultatelor în vederea identificării unor corelații statistic semnificative între descriptorii histologici ce cuantifică modificările celulelor neuroendocrine și parametri clinicopatologici (evoluția în dinamică, corelații cu aspectul endoscopic, tratamentul administrat, inflamația la nivel histologic reflectată de sistemul de scorificare selectat etc.)
- Evaluarea aplicabilității analizei de imagine computerizate în detecția celulelor neuroendocrine marcate imunohistochimic cu Cromogranină A

Metodologia de cercetare

Am alcătuit o bază de date prin identificarea retrospectivă de pacienți din arhiva Spitalului Universitar de Urgență Elias și înrolând noi pacienți cu diagnostic clinic și histologic de colită ulcerativă, cărora li s-au prelevat biopsii colorectale în diferite momente ale evoluției bolii, evaluate histopatologic în departamentul de Anatomie patologică a aceluiași spital, în perioada ianuarie 2017- decembrie 2019.

În **studiul I**, am analizat literatura privitoare la sistemele de scorificare a inflamației în bolile inflamatorii intestinale și am selectat trei scoruri (indicele Nancy, scorul Geboes și Indicele Histopatologic Robarts) pe care le-am aplicat unui număr de 64 de lame colorate hematoxilin-eozină (corespunzând unui număr de 46 de cazuri), la microscopul optic, înregistrând scorul și timpul necesar evaluării de către 3 anatomopatologi, la un interval de

două săptămâni între diferitele scoruri. Analiza statistică a constatat în calcularea nivelului de acord inter- și intraobservator pentru fiecare sistem de scorificare folosind coeficientul Cohen's kappa; compararea diferențelor între duratele de timp înregistrate pentru aplicării fiecărui scor prin testul Friedman; evaluarea corelației între timpul destinat evaluării și scorul histologic utilizând coeficientul de corelație de rang Spearman pentru variabile ordinale; evaluarea corelației între timpul necesar evaluării și numărul de fragmente biopsice prin calcularea coeficientul de corelație Pearson pentru variabile continue.

În **studiile II și III** cercetarea s-a concentrat pe analiza modificărilor celulelor neuroendocrine, integrând rezultatele din studiul anterior. În studiul II am evaluat modificările în dinamică pe un lot de 9 pacienți cu biopsii prelevate la momente diferite în evoluția bolii. În studiul III, am aplicat descriptorii histologici propuși în studiul II pe un lot lărgit, de 42 de pacienți, cu scopul de a identifica corelații clinicopatologice. Metodologia pentru aceste două studii a fost similară.

Prin marcaj imunohistochimic cu anticorpul monoclonal de șoarece Cromogranină A (LK2H10) Cell Marque, diluție 1:100, conform protocolului obișnuit pentru țesuturile incluse la parafină, am evidențiat celulele neuroendocrine pe fragmentele biopsice din mucoasa colonică și rectală.

Detecția și cuantificarea celulelor pozitive la Cromogranina A (CgA) a fost realizată atât manual, cât și automat, prin analiză de imagine computerizată, pe lamele digitalizate, utilizând QuPath, un software „open source” pentru lame histologice integrale (whole-slide image).

Pentru detecția computerizată, am folosit tehnici de analiză de imagine centrată pe obiect, cu separarea automată a culorilor („*color deconvolution*”) și metode de „*machine learning*”, descrise în detaliu capitolele corespunzătoare din teza de doctorat.

Am aplicat următoarele definiții:

- *hiperplazia de celule neuroendocrine* – ≥ 3.2 celule CgA-pozitive/criptă;
- *hiperplazia lineară* – ≥ 5 celule CgA-pozitive adiacente;
- „*hotspot*” – grup de 10 cripte cu cea mai mare densitate de celule CgA-pozitive pe lamă, detectate vizual.

Am realizat analiza statistică privind corelațiile între variabilele continue calculând coeficientul de corelație Pearson, între variabile continue și variabile ordinale coeficientul de corelație de rang Spearman, iar între variabilele continue și cele dihotomice testul

punct-biserial. În analiza statistică din întreg studiul doctoral, am considerat semnificative rezultatele cu valori $p < 0.05$.

Sinteza studiilor

Capitolul 6. Sisteme de scorificare histologică a inflamației în colita ulcerativă (Studiul I)

În **studiul I**, am analizat datele din literatură privind sistemele de scorificare a inflamației histologice, elaborate în numeroase studii privitoare la bolile inflamatorii intestinale. Dintre acestea am selectat trei scoruri – indicele Nancy, scorul Geboes și Indicele Histopatologic Robarts – pentru a le aplica pe lame colorate convențional și a le analiza în vederea identificării celui mai adecvat cercetării clinice, cât și practicii anatomopatologice de rutină (pentru a putea fi utilizat în studiile de cercetare și transpus apoi în practică).

Am constatat faptul indicele Nancy a necesitat durata cea mai redusă de timp pentru evaluare și desemnarea unei categorii (medie 72.06s), urmată de scorul Geboes (medie 72.06s) și Indicele Histopatologic Robarts (medie 92.67s). Testul Friedman a demonstrat faptul că diferențele între timpii necesari pentru aplicarea celor trei sisteme de scorificare au fost semnificative statistic ($\chi^2(2) = 67.881$, $p < 0.005$).

Nivelul de acord interobservatori și intraobservator a fost foarte bun pentru indicele Nancy (Cohen's kappa mediu interobservator de 0.861; Cohen's kappa intraobservator de 0.973; $p < 0.005$.) și scorul Geboes (Cohen's kappa mediu interobservator de 0.861; Cohen's kappa intraobservator de 0.973; $p < 0.005$), cu valori foarte apropiate, și bun pentru Indicele Histopatologic Robarts (Cohen's kappa mediu interobservator de 0.592; Cohen's kappa intraobservator de 0.892; $p < 0.005$).

Indicele Nancy prezintă un algoritmul simplu, fiind astfel cel mai abordabil. Scorul Geboes are o structură mai complexă, dar, de asemenea, și o precizie mai mare a descrierii aspectelor histopatologice, subgradele sale fiind caracterizate de parametri histologici mai detaliați comparativ cu cele cinci categorii, destul de largi, ale indicelui Nancy. Indicele Histopatologic Robarts este similar structurat cu scorul Geboes, însă pretinde atribuirea unui punctaj pentru fiecare parametru histologic și însumarea acestora pentru calcularea scorului, fiind astfel destul de laborios.

Tabelul VI.6. Nivelurile de acord inte- și intraobservator pentru indicele Nancy, scorul Geboes și Indicele Histopatologic Robarts

	Indicele Nancy	Scorul Geboes	RHI	p
Nivelul Cohen's kappa				
O1 - O2	0.895	0.845	0.478	<0.005
O1 - O3	0.870	0.789	0.604	<0.005
O2 - O3	0.818	0.826	0.696	<0.005
Cohen's kappa mediu <i>interobservator</i>	0.861	0.820	0.592	<0.005
Cohen's kappa <i>intraobservator</i>	0.973	0.942	0.892	<0.005

Abrevieri:

O1, O2, O3 – observator 1, 2, 3

RHI – Indicele Histopatologic Robarts

Aspectul endoscopic apreciat prin scorul parțial Mayo s-a corelat pozitiv, moderat, cu cele trei scoruri histologice (coeficient ρ 0.412 pentru indicele Nancy, 0.469 pentru scorul Geboes, respectiv 0.357 pentru Indicele Histopatologic Robarts; $p < 0.05$).

Așadar, scorul Geboes este, în opinia autoarei, cel mai adecvat studiilor științifice în colita ulcerativă, datorită detaliilor corespunzătoare subgradelor sale, fiind, de asemenea, aplicabil în practica anatomopatologică. Indicele Nancy este mai potrivit pentru practica de rutină, aplicabilitatea sa în studiile clinice rămânând a fi stabilită, prin comparație cu scorul Geboes.

Capitolul 7. Modificările histologice ale celulelor neuroendocrine în evoluția colitei ulcerative (*Studiul II*)

În **studiul II**, am constituit un lot de 9 pacienți cu prezentări multiple cu scopul de a analiza în dinamică modificările celulelor neuroendocrine ce apar pe parcursul evoluției bolii. Pentru atingerea acestui obiectiv, am elaborat un protocol pentru detecția manuală și automată, prin analiză de imagine computerizată, a celulelor marcate imunohistochemic cu Cromogranină A și am propus o serie de descriptori histologici ai statusului acestora.

Am evaluat, datorită automatizării, un număr foarte mare de cripte, comparativ cu alte studii, pe lama digitalizată – o medie de 136 de cripte/lamă (minim 20, maxim 415), detectând o densitate medie a celulelor neuroendocrine de 4.18 CNE CgA-pozitive/criptă, 88.88% dintre pacienții incluși în studiu prezentând, astfel, hiperplazie de celule neuroendocrine cel puțin la un moment din evoluția bolii.

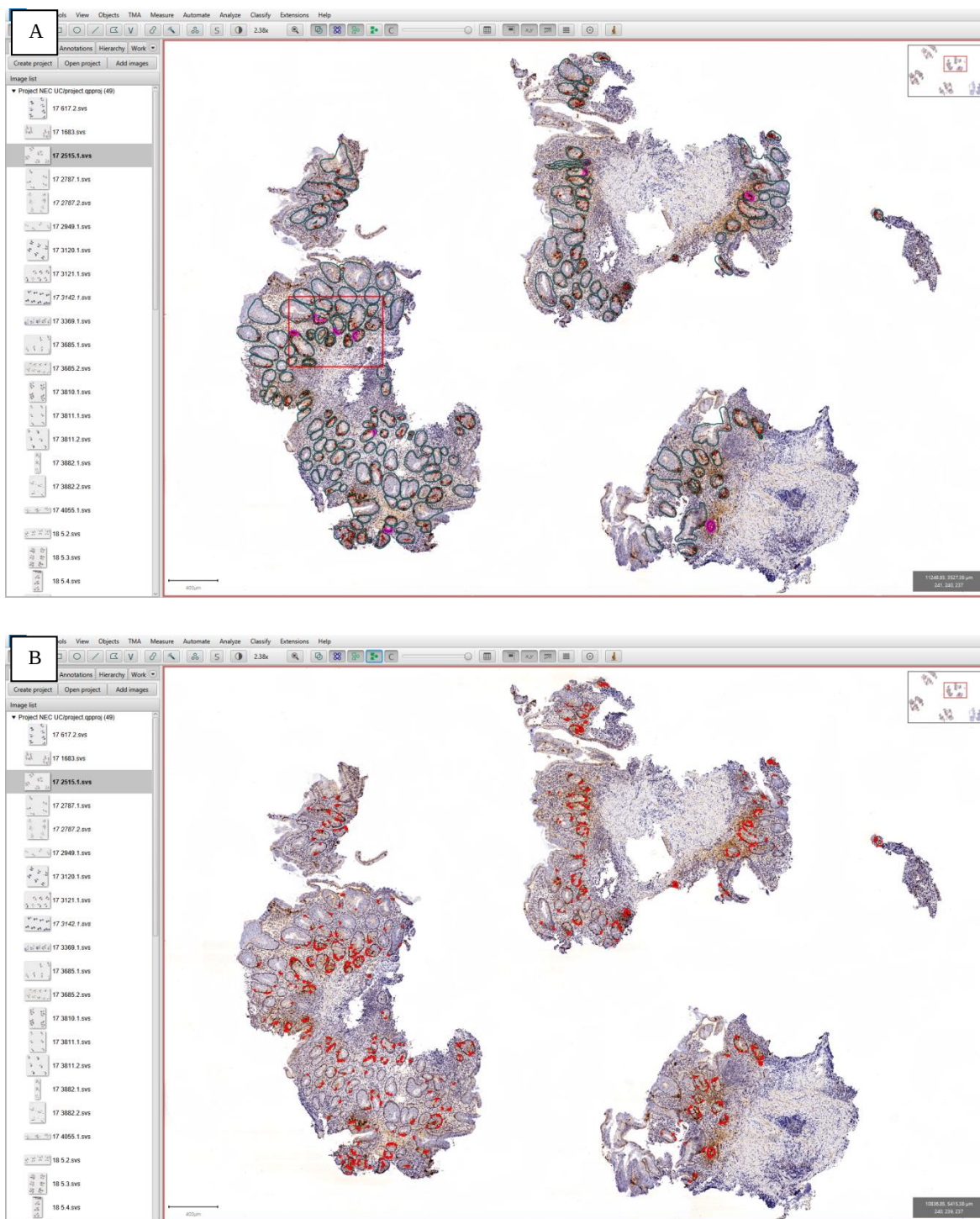


Figura 7.11. Detecția automată a celulelor neuroendocrine marcate imunohistochemic cu Cromogranina A în programul QuPath. (A) – Cripte sunt adnotate cu verde. Hiperplazia lineară este adnotată cu mov. „Hotspot”-ul este adnotat în chenar roșu. (B) – Celulele DAB-pozitive sunt detectate și marcate cu roșu.

Analizând în dinamică, am observat că există o tendință descrescătoare a numărului de celule CgA-pozitive pe parcursul evoluției bolii, demonstrată de corelația negativă între durata evoluției bolii (între 1 și 100 de săptămâni de la debutul afecțiunii, la pacienții investigați în acest studiu) și următorii parametri: numărul mediu de CNE CgA-pozitive /criptă pe întreaga secțiune histologică, numărul mediu de CNE CgA-pozitive /criptă în „hotspot” și numărul maxim de CNE CgA-pozitive /criptă (coeficienți de corelație r_p de -0.517, -0.518, respectiv -0.557; $p < 0.05$). Acest rezultat susține ideea că celulele enteroendocrine CgA-pozitive suferă modificări hiperplazice ca urmare a injuriei, în calitate de „first responders”, și, pe măsură ce aceasta scade în intensitate și/sau datorită tratamentului administrat, numărul acestor celule se reduce.

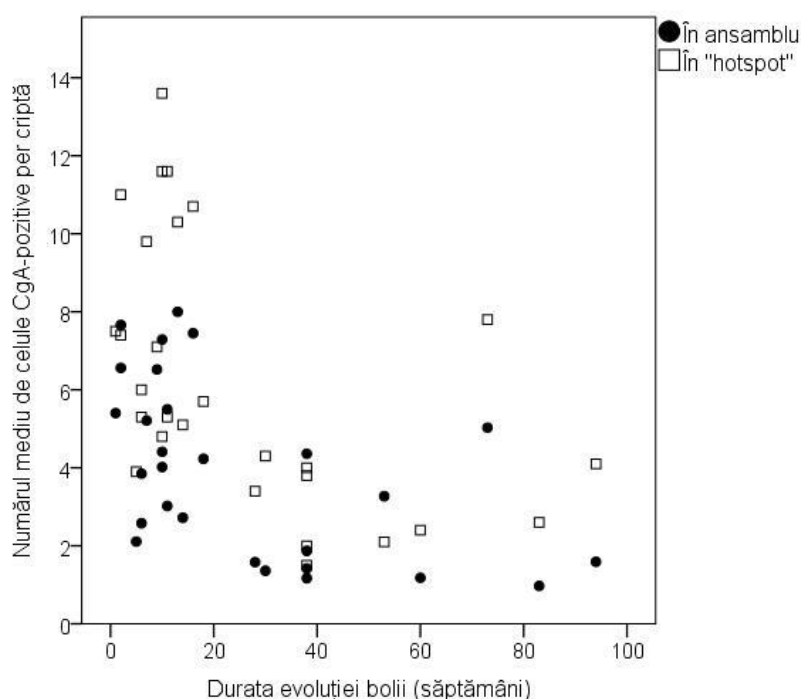


Figura 7.16. Dinamica evoluției *numărului mediu* de celule neuroendocrine per criptă în ansamblu și în „hotspot”, în raport cu durata bolii

Modificări hiperplazice am constatat pe 68.18% dintre biopsiile colorectale evaluate, în 54.55% observându-se hiperplazie lineară de celule neuroendocrine CgA-pozitive intracriptic, leziune localizată, de obicei, în „hotspot”.

Alterările neuroendocrine din „hotspot” au fost în concordanță cu cele prezente pe întreaga suprafață a fragmentelor biopsice, așadar, evaluarea modificărilor de la acest nivel (metoda „hotspot”-ului) ar putea reprezenta o abordare practică, mai eficientă, reducând timpul și resursele necesare detecției manuale și computerizate.

Tabelul VII.3. Testele Pearson de corelație între *durata* bolii și variabile descriptive ale celulelor neurendocrine (Cromogranin A-pozitive)

Variabile	r_p	Valoarea p
Numărul <i>mediu</i> de celule CgA-pozitive/criptă	-.517	.014
Numărul <i>mediu</i> de celule CgA-pozitive/criptă în „ <i>hotspot</i> ”	-.518	.014
Numărul <i>maxim</i> de celule CgA-pozitive/criptă	-.557	.007
Numărul <i>maxim</i> de celule CgA-pozitive/criptă în „ <i>hotspot</i> ”	-.355	.105
Numărul <i>mediu</i> de cripte prezentând <i>hiperplazie liniară</i> de CgA-pozitive	-.376	.084
Numărul <i>mediu</i> de cripte prezentând <i>liperplazie liniară</i> de CgA-pozitive în „ <i>hotspot</i> ”	-.388	.074

Aplicarea detecției automate computerizate pentru cuantificarea celulelor CgA-pozitive a permis analiza unui număr foarte mare de cripte într-un timp scurt, fiind astfel foarte utilă în demersul nostru. De menționat este un aspect cunoscut în literatură ca „paradoxul standardului de aur”, întâlnit în experiența cu această metodă computerizată de detecție, care descrie situațiile în care „inteligența artificială” poate cuantifica mai obiectiv aspectele specifice detecției decât patologul, a cărui evaluare este considerată „standardul de aur”. Totuși, rezultatele detecției sunt validate în final tot de patolog care, prin expertiza lui, optimizează parametrii de detecție cu scopul obținerii unor valori cât mai apropiate de realitate.

Capitolul 8. Corelații clinicopatologice ale hiperplaziei celulelor neuroendocrine la pacienții cu colită ulcerativă (*Studiul III*)

În **studiul III**, am aplicat protocolul de detecție și descriptorii histologici propuși pe un lot de 42 de bolnavi de colită ulcerativă, în vederea identificării de corelații cu factori clinici și patologici evolutivi.

Rezultatele pe lotul lărgit au confirmat apariția unei hiperplazii de celule enteroendocrine la acești pacienți (medie de 3.62 de CNE CgA-pozitive /criptă, respectiv 5.97 CNE CgA-pozitive /criptă în „hotspot”; media numărului maxim de CNE CgA-pozitive /criptă = 18.85, în „hotspot”). De remarcat este faptul că toți descriptorii celulelor

neuroendocrine s-au corelat între ei pozitiv, moderat sau puternic (coeficienți de corelație r_p între 0.429 și 0.776, $p=0.000$).

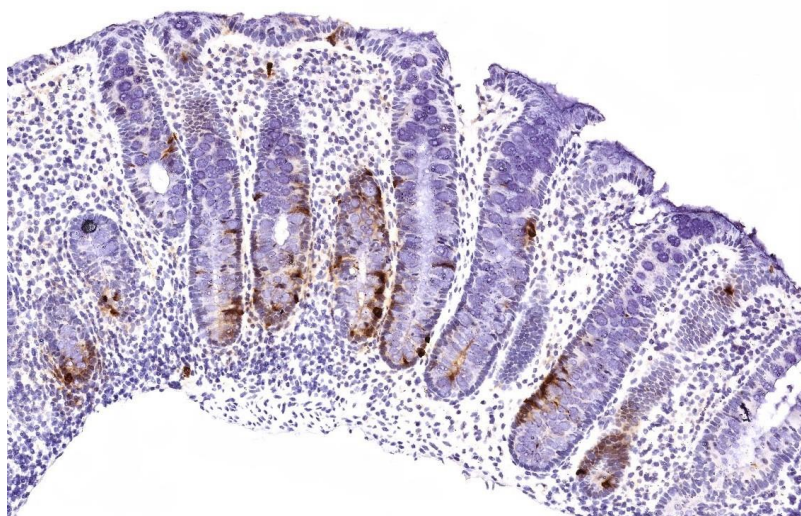


Figura 8.38. Cromogranina A, 10x. Arhitectură mucosală ușor alterată (cripte rectilinii, dar focal scurtate), infiltrat inflamator cronic difuz, moderat, cu plasmocitoza bazală, celule neuroendocrine solitare și contigue (hiperplazie lineară)

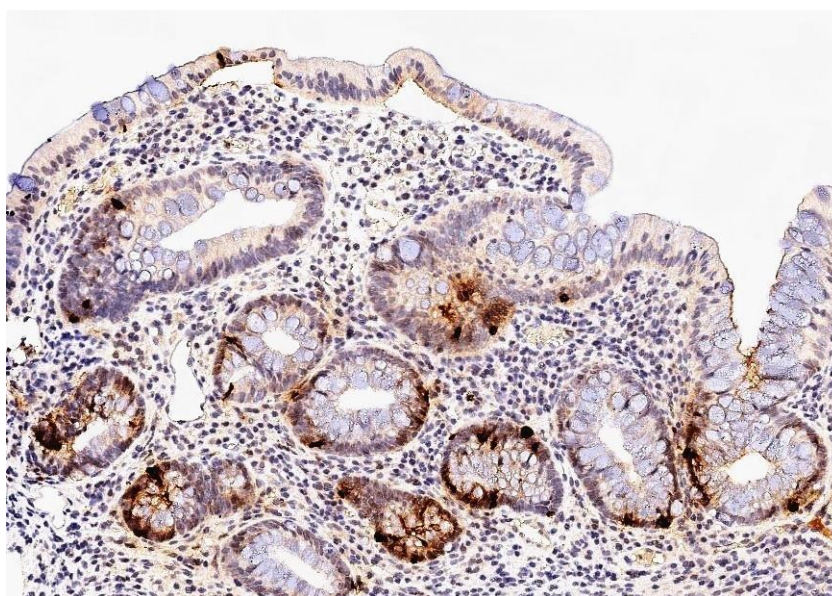


Figura 8.39. Cromogranina A, 20x. Arhitectură mucosală marcat alterată în „hotspot”, cu suprafață crenelată, orientare pierdută a criptelor și infiltrat inflamator cronic difuz. Numeroase cripte cu hiperplazie lineară de celule neuroendocrine

Distribuția celulelor CgA-pozitive a fost difuză, cu o arie de densitate mai mare („hotspot”) identificabilă încă de la un obiectiv cu putere de mărire mică. Celulele hiperplazice au prezentat cel mai adesea o distribuție în zona bazală a criptelor, dar, în special în situațiile în care hiperplazia a fost severă, au putut fi observate și în jumătatea superioară a criptelor, unde am identificat inclusiv aspecte de hiperplazie lineară.

Pe acest lot, am observat că există un trend descrescător odată cu creșterea duratei bolii (intervalul de la debutul bolii: 1-172 de luni), similar rezultatului din studiul II, dovedit de corelațiile semnificative statistic cu densitatea medie a celulelor CgA-pozitive, pe întreaga secțiune histologică și în „hotspot” ($r_p = -0.388$, $p=0.013$; respectiv $r_p = -0.416$, $p=0.008$). Și ceilalți descriptori histologici au avut o tendință aparentă de scădere, însă fără valori semnificative statistic. Am mai constatat că vârsta pacienților s-a corelat negativ cu numărul de cripte cu hiperplazie lineară ($r_p = -0.328$, $p=0.039$).

Unul dintre cele mai importante rezultate ale acestui studiu îl reprezintă corelația pozitivă, moderată, între tratamentul cu corticosteroizi și numărul maxim de celule neuroendocrine per criptă ($r_p=0.332$, $p=0.012$).

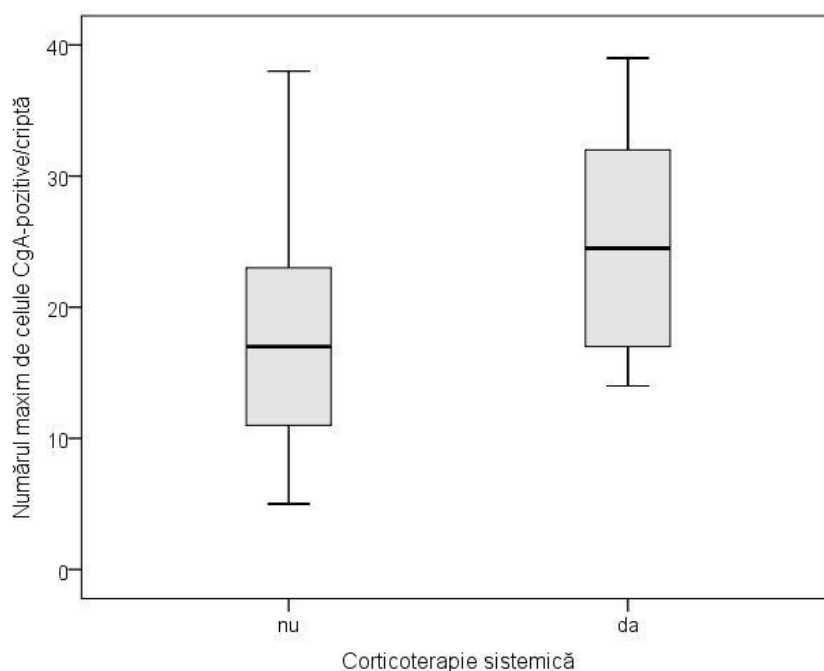


Figura 8.22. Box plot prezentând numărul maxim de celule neuroendocrine în funcție de administrarea de corticoterapie sistemică

În cazul pacienților sub terapie biologică, am observat o scădere a numărului de cripte cu hiperplazie lineară de celule neuroendocrine, însă valoarea p nu a relevat un test semnificativ statistic, posibil datorită numărului mic de pacienți din acest studiu care urmau acest tratament ($r_p = -0.244$, $p = 0.067$).

Un alt aspect important este faptul că scorul Geboes și indicele Nancy au prezentat coeficienți de corelație cu valoare negativă, moderată, cu hiperplazia lineară de celule neuroendocrine – $\rho = -0.368$ ($p = 0.005$), respectiv $\rho = -0.326$ ($p = 0.013$). Explicațiile pentru acest fenomen pot fi multiple, dar converg către ideea că în leziunile acute marcate, fragmentele biopsice prezintă leziuni distructive criptice, cu pierderea acestora și țesut de granulație, iar celulele neuroendocrine suferă modificările hiperplazice ca răspuns la aceste injurii acute, putând avea nevoie de un anumit interval de timp pentru constituirea lor. Comparativ, am observat că valoarea statistică a acestei corelații este mai mare pentru scorul Geboes decât pentru indicele Nancy, reflectând sensibilitatea mai mare a primului scor.

Capitolul 9. Concluzii și contribuții personale

Prin rezultatele obținute în urma realizării studiilor prezentate în această teză de doctorat, am atins principalele obiective propuse și am identificat noi direcții de cercetare.

Am identificat două sisteme de scorificare pentru colita ulcerativă, adecvate cercetării clinice și practicii de rutină deopotrivă, în urma unei analize obiective asupra aplicabilității – scorul Geboes și indicele Nancy. Dintre acestea două, indicele Nancy prezintă un algoritm simplu și rapid, care ar putea fi mai ușor implementabil în practica de rutină. În plus, acesta a prezentat coeficienți de corelare cu factori clinicopatologici similari celor obținuți pentru scorul Geboes în studiile mele, sugerând faptul că indicele Nancy ar fi cel mai adecvat cercetării clinice, cât și practicii de rutină.

Am descris modificările hiperplazice ale celulelor neuroendocrine în colita ulcerativă cu ajutorul unor descriptori histologici noi, propuși în acest studiu doctoral, aplicând metode din aria patologiei digitale – analiza de imagine centrată pe obiect, cu metode de „*machine learning*”.

Am identificat corelații notabile, semnificative statistic, cu factori clinici (vârsta, durata evoluției bolii, corticoterapia sistemică) și histopatologici (nivelul inflamației histologice reflectate de scorul Geboes și indicele Nancy).

Am constatat și corelații care nu au atins nivelul p de semnificație statistică, dar care merită explorări viitoare, pe loturi mai mari, cum ar fi scăderea numărului de cripte cu hiperplazie lineară la pacienții sub tratament cu agenți biologici.

Dintre **limitele cercetării** menționăm faptul că biopsiile colorectale examinate au fost prelevate predominant de la pacienți cu activitate moderată sau severă a bolii, cel mai probabil datorită lipsei indicației de endoscopie datorită preferării markerilor-surogat inflamatori, precum calprotectina fecală. Altă limitare a fost reprezentată de lipsa prelevării de biopsii din fiecare segment colonic pentru fiecare pacient. Totuși, în studiul nostru, modificările neuroendocrine hiperplazice cele mai accentuate au fost localizate la nivelul colonului stâng și rectului, asemănător altor studii publicate.

Sintetic, **principalele contribuții proprii** la studiul celulelor neuroendocrine în colita ulcerativă, selectate dintre cele prezentate mai sus și descrise pe larg în teza de doctorat, sunt următoarele:

- Scorul Geboes, în experiența noastră, este cel mai adecvat pentru evaluarea standardizată a nivelului inflamației histologice în colita ulcerativă.
- Există o tendință descrescătoare a numărului de celule CgA-pozitive pe parcursul evoluției bolii a *numărul mediu de CNE CgA-pozitive/criptă pe întreaga secțiune histologică, numărul mediu de CNE CgA-pozitive /criptă în „hotspot” și numărul maxim de CNE CgA-pozitive /criptă* ($r_p = -0.517$, -0.518 , respectiv $r_p = -0.557$; $p < 0.05$).
- Vârsta pacienților s-a corelat negativ cu *numărul de cripte cu hiperplazie lineară de celule CgA-pozitive* ($r_p = -0.328$, $p = 0.039$).
- Există o corelație pozitivă, moderată, între *tratamentul cu corticosteroizi și numărul maxim de celule neuroendocrine CgA-pozitive per criptă* ($r_p = 0.332$, $p = 0.012$).
- Scorul Geboes și indicele Nancy au prezentat coeficienți de corelație cu valoare negativă, moderată, cu *hiperplazia lineară de celule neuroendocrine CgA-pozitive* ($\rho = -0.368$, $p = 0.005$; respectiv $\rho = -0.326$, $p = 0.013$).
- Am propus și aplicat o serie de *descriptori histologici noi* pentru evaluarea statusului celulelor neuroendocrine care s-au dovedit relevanți în studiul acestora.
- *Descriptorii histologici ai celulelor neuroendocrine CgA-pozitive s-au corelat între ei pozitiv, moderat sau puternic* (r_p între 0.429 și 0.776 , $p = 0.000$), validând metoda „hotspot”-ului.

- Analiza de imagine aplicată în programul QuPath este de mare utilitate în evaluarea morfologică și cuantificarea celulelor neuroendocrine marcate imunohistochimic cu Cromogranina A.

Rezultatele prezentate în această teză de doctorat deschid câteva **perspective de cercetare** viitoare interesante, pe care le sumarizăm mai jos:

- *analizarea oportunității includerii statusului celulelor enteroendocrine în definiția vindecării mucoale*, care ar putea fi evaluată standardizat, prin scorul Geboes;
- utilitatea CgA în *diagnosticul diferențial* între colitele infecțioase, colitele ischemice și bolile inflamatorii intestinale;
- analizarea posibilei asocieri între prezența *celulelor CgA-pozitive din lamina propria mucosală* cu proliferările tumorale și bolile inflamatorii intestinale;
- analiza, în studii prospective, a *descriptorilor histologici ai modificărilor hiperplazice ale celulelor neuroendocrine CgA-pozitive* propuși în acest studiu doctoral, ca *markeri predictivi* pentru evoluția bolii și tratamentul convențional și biologic;
- extinderea utilizării analizei de imagine în bolile inflamatorii intestinale prin elaborarea unui *algoritm automat pentru scorificarea inflamației histologice*.

Bibliografie selectivă

1. Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2018;11(1):3–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2017.73>
2. Yu Y, Yang W, Li Y, Cong Y. Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2020;26(1):11–20.
3. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2015/12/21. 2016 May;28(5):620–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26691223>
4. Bohórquez D V, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, et al. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J Clin Invest*. 2015;125(2):782–6.
5. El-Salhy M, Solomon T, Hausken T, Gilja OH, Hatlebakk JG. Gastrointestinal neuroendocrine peptides/amines in inflammatory bowel Disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(28):5068–85.
6. 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;15(1):12–20.
7. Heures M-C, Brubaker PL. Glucagon-Like Peptide-2 and Common Therapeutics in a Murine Model of Ulcerative Colitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jul;306(1):347 LP – 354.
8. Lebrun LJ, Lenaerts K, Kiers D, Pais de Barros JP, Le Guern N, Plesnik J, et al. Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion. *Cell Rep*. 2017;21(5):1160–8.
9. Pang XH, Li TK, Xie Q, He FQ, Cui DJ, Chen YQ, et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by neuropeptide Y antisense oligodeoxynucleotide. *Int J Colorectal Dis* [Internet]. 2010;25(9):1047–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00384-010-0964-z>
10. El-Salhy M, Danielsson Å, Stenling R, Grimelius L. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 1997;242(5):413–9.
11. Mazzawi T, Gundersen D, Hausken T, El-Salhy M. Increased chromogranin A cell

- density in the large intestine of patients with irritable bowel syndrome after receiving dietary guidance. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:34–6.
12. Massironi S, Zilli A, Cavalcoli F, Conte D, Peracchi M. Chromogranin A and other enteroendocrine markers in inflammatory bowel disease. *Neuropeptides* [Internet]. 2016;58:127–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2016.01.002>
 13. Arevalo F, Zurita F, Vergara G, Ramirez R, Castillo J, Monge E. Neuroendocrine cell hyperplasia in ulcerative colitis and lymphocytic colitis . 2017;1(2):2–4.
 14. Meianu C, Becheanu G, Preda C-M, Istratescu D, Ciora C-A, Manuc M, et al. P047 Neuroendocrine cells densities alterations in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2019;13(Supplement_1):S110–S110.
 15. Wong M, Larson BK, Dhall D. Neuroendocrine proliferations in inflammatory bowel disease: differentiating neuroendocrine tumours from neuroendocrine cell micronests. *Histopathology*. 2019;74(3):415–23.
 16. Giuffrida P, Vanoli A, Biletta E, Klersy C, Bergamaschi G, Sampietro GM, et al. Increase in chromogranin A- and serotonin-positive cells in pouch mucosa of patients with ulcerative colitis undergoing proctocolectomy. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2018;50(11):1205–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.04.021>
 17. 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;19(23):3602–7.
 18. Villanacci V, Antonelli E, Geboes K, Casella G, Bassotti G. Histological healing in inflammatory bowel disease: A still unfulfilled promise. *World J Gastroenterol*. 2013;19(7):968–78.
 19. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(6):649–70.
 20. Mazzuoli S, Guglielmi FW, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G, Villanacci V. Definition and evaluation of mucosal healing in clinical practice. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2013 Dec 1;45(12):969–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2013.06.010>

21. Bryant R V., Winer S, SPL T, Riddell RH. Systematic review: Histological remission in inflammatory bowel disease. Is “complete” remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohn’s Colitis*. 2014;8(12):1582–97.
22. Bryant R V, Burger DC, Delo J, Walsh AJ, Thomas S, von Herbay A, et al. Beyond endoscopic mucosal healing in UC: histological remission better predicts corticosteroid use and hospitalisation over 6 years of follow-up. *Gut* [Internet]. 2016 Mar 1;65(3):408 LP – 414. Available from: <http://gut.bmj.com/content/65/3/408.abstract>
23. Zenlea T, Yee EU, Rosenberg L, Boyle M, Nanda KS, Wolf JL, et al. Histology grade is independently associated with relapse risk in patients with ulcerative colitis in clinical remission: A prospective study. Vol. 111, *American Journal of Gastroenterology*. 2016. p. 685–90.
24. Christensen B, Hanauer SB, Erlich J, Kassim O, Gibson PR, Turner JR, et al. Histologic Normalization Occurs in Ulcerative Colitis and Is Associated With Improved Clinical Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017/02/24. 2017 Oct;15(10):1557-1564.e1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28238954>
25. Narang V, Kaur R, Garg B, Mahajan R, Midha V, Sood N. Association of endoscopic and histological remission Association of endoscopic and histological remission. 2018;16(1):55–61.

Lista lucrărilor științifice publicate

1. **Curte A**, Becheanu G, Andrei F, Nicolae C, Chivu M, Tieranu C, Sajin M. Histological scoring systems in ulcerative colitis patients: a routine practice perspective. Archives of the Balkan Medical Union. March 2020. vol. 55, no. 1, pp. 64-71. doi.org/10.31688/ABMU.2020.55.1.07

<https://umbalk.org/wp-content/uploads/2020/03/07.histological-scoring-systems-in-ulcerative.pdf>

2. **Curte A**, Becheanu G, Sajin M. Neuroendocrine cell histology changes in the evolution of ulcerative colitis. Research and Science Today. Spring 2020. No. 1(19)/2020: 99-108. doi.org/10.38173/RST.2020.19.1.10:99-108. ISSN-P: 2247-4455 / ISSN-E: 2285-9632

<https://www.rstjournal.com/rst-119-2020/>

3. **Curte A**, Nicolae C, Chivu M, Andrei F, Tieranu C, Sajin M, Becheanu G. Clinicopathological correlations of neuroendocrine cell hyperplasia in ulcerative colitis patients. Archives of the Balkan Medical Union. June 2020. vol.55, no. 2, pp. 11-19. doi.org/10.31688/ABMU.2020.55.2.09

Acceptat pentru publicare – iunie 2020

Lucrări prezentate la manifestări științifice:

Prezentare orală

Curte A, Becheanu G, Andrei F, Nicolae C, Chivu M, Sajin M. Computed Analysis of Neuroendocrine Cell Hyperplasia in Ulcerative Colitis. 10th National Congress of Coloproctology, Bucharest, Romania. Initial date 12-14 March 2020, *postponed* until 3-5 December 2020