

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



**Leziunile sistemului nervos autonom gastric în
infecția cu Helicobacter pylori – studiu
morfopatologic și imunohistochimic
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:
PROF.UNIV.DR. STĂNICEANU FLORICA**

**Student-doctorand:
TUDORICĂ (CĂS. STICLARU) LIANA-CĂTĂLINA**

2023

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate.....	7
Lista abrevierilor utilizate.....	8
INTRODUCERE.....	10
I. PARTEA GENERALĂ - CONSIDERAȚII TEORETICE	
CAPITOLUL 1. Infecția cu H. pylori: date generale	
1.1. Istoric.....	15
1.2. Epidemiologie.....	16
1.3. Patogeneză și mecanisme de acțiune.....	17
1.3.1. Colonizarea mucoasei gastrice.....	18
1.3.2. Factorii de virulență.....	20
1.3.3. Răspunsul imun al gazdei.....	22
1.4. Afecțiuni gastrice induse de H. pylori.....	23
1.4.1. Dispepsia funcțională.....	23
1.4.2. Gastrita.....	24
1.4.3. Ulcerul peptic.....	26
1.4.4. Carcinomul gastric.....	27
1.4.5. Limfomul gastric MALT.....	30
CAPITOLUL 2. Sistemul nervos enteric	
2.1. Sistemul nervos autonom: generalități.....	32
2.2. Embriologia și dezvoltarea sistemului nervos enteric.....	33
2.3. Structura și organizarea sistemului nervos enteric.....	34
2.4. Celulele gliale enterice.....	36
2.5. Clasificarea neuronilor enterici – particularități la nivel gastric.....	38
2.6. Controlul nervos al funcțiilor gastrice.....	44
CAPITOLUL 3. Modificările sistemului nervos enteric gastric în infecția cu H. pylori	
3.1. Neuroplasticitatea enterică în procesele inflamatorii – generalități.....	49
3.2. Modificări structurale ale sistemului nervos enteric în inflamațiile gastro-intestinale.....	52
3.3. Modificări neurochimice ale sistemului nervos enteric în infecția cu H. pylori.....	54

3.4. Modificări funcționale ale sistemului nervos enteric în infecția cu H. pylori...	56
II. PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL 4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	61
CAPITOLUL 5. Metodologia generală a cercetării	
5.1. Materialul studiat.....	63
5.1.1. Caracteristicile loturilor studiate.....	63
5.1.2. Criterii de includere/excludere a cazurilor în studiu.....	64
5.2. Metode de investigare.....	64
5.2.1. Colorații uzuale și speciale utilizate.....	65
5.2.2. Tehnici și colorații imunohistochimice utilizate.....	65
5.2.3. Evaluarea parametrilor morfopatologici studiați la nivelul mucoasei gastrice.....	69
5.2.4. Evaluarea parametrilor morfopatologici studiați la nivelul ganglionilor mienterici gastrici.....	71
5.2.5. Evaluarea parametrilor neurochimici studiați.....	75
5.3. Colectarea și analiza statistică a datelor.....	76
CAPITOLUL 6. Rezultate	
6.1. Date referitoare la intervenția chirurgicală și date topografice.....	77
6.2. Date epidemiologice ale lotului studiat.....	79
6.3. Parametri histopatologici la nivelul mucoasei gastrice.....	81
6.3.1. Colonizarea cu H. pylori.....	81
6.3.2. Infiltratul inflamator cronic.....	82
6.3.3. Gradul activității inflamatorii.....	88
6.3.4. Metaplazia intestinală.....	89
6.3.5. Atrofia glandulară.....	91
6.4. Date privind structura plexului mienteric gastric.....	92
6.4.1. Numărul și suprafața ganglionilor mienterici.....	92
6.4.2. Numărul și densitatea neuronilor din plexul mienteric.....	95
6.4.3. Numărul și densitatea celulelor gliale din plexul mienteric.....	98
6.4.4. Raportul dintre numărul de celule gliale și cel al neuronilor.....	101
6.4.5. Infiltratul inflamator periganglionar.....	102
6.4.6. Modificările degenerative ale neuronilor enterici.....	107
6.4.7. Expresia proteinei anti-apoptotice bcl-2.....	109

6.5. Modificări neurochimice ale neuronilor mienterici gastrici.....	111
6.5.1. Substanța P.....	112
6.5.2. Peptidul intestinal vasoactiv.....	114
CAPITOLUL 7. Discuții	
7.1. Date epidemiologice, topografice și referitoare la intervenția chirurgicală.....	118
7.2. Parametri histopatologici la nivelul mucoasei gastrice.....	119
7.2.1. Colonizarea cu <i>H. pylori</i>	119
7.2.2. Infiltratul inflamator cronic.....	120
7.2.3. Infiltrarea cu eozinofile.....	121
7.2.4. Activitatea gastritei.....	122
7.2.5. Metaplazia intestinală.....	122
7.3. Structura histologică a sistemului nervos autonom gastric intrinsec.....	123
7.4. Modificări morfologice ale sistemului nervos enteric gastric în infecția cu <i>H. pylori</i>	128
7.4.1. Inflamația plexului mienteric gastric.....	128
7.4.2. Apoptoza neuronilor mienterici.....	129
7.4.3. Degenerarea neuronilor mienterici.....	130
7.4.4. Hipertrofia și hiperplazia ganglionilor mienterici.....	132
7.4.5. Hiperplazia neuronilor mienterici – semnificație și mecanisme posibile.....	133
7.4.6. Semnificația hiperplaziei celulelor gliale.....	140
7.4.7. Structura și organizarea sistemului nervos enteric gastric în infecția cu <i>H. pylori</i>	143
7.5. Modificări neurochimice ale sistemului nervos enteric gastric în infecția cu <i>H. pylori</i>	144
CONCLUZII	148
Bibliografie.....	154
Anexe.....	187
Articole publicate.....	190

INTRODUCERE

Infecția cu *Helicobacter pylori* este cea mai răspândită infecție cronică de etiologie bacteriană de pe glob, estimându-se că peste jumătate din întreaga populație a lumii este purtătoare a microorganismului. *H. pylori* este implicat în patogeneza unei palete largi de afecțiuni ale tractului digestiv superior – gastrită cronică, ulcer peptic, carcinom gastric și limfom gastric de tip MALT. Progresia leziunilor gastrice și severitatea simptomelor depind, în mare măsură, de interacțiunile dintre factorii de virulență ai bacteriei și răspunsul imun al gazdei. În ultimele decade, datorită unei multitudini de studii ce au vizat cercetarea factorilor de virulență bacteriană, s-au înregistrat progrese remarcabile în ceea ce privește o înțelegere mai bună a relației microorganismului cu gazda sa. Aceste studii au sugerat faptul că, pe lângă efectele citotoxice și proinflamatorii directe pe care colonizarea bacteriană le induce la nivelul mucoasei gastrice, mecanismele patogenice ale infecției cu *H. pylori* ar putea fi mult mai complexe. În ultimii ani, a devenit tot mai evident faptul că patogeneza infecției cu *H. pylori* ar putea implica, de asemenea, unele anomalii ale morfologiei și funcțiilor sistemului nervos enteric gastric pe care bacteria le induce prin interacțiuni neuro-imune complexe, cu implicații ulterioare în evoluția clinică a leziunilor. Cu toate acestea, nivelul actual al cunoștințelor în domeniu nu permite încă o caracterizare detaliată a tuturor mecanismelor ce stau la baza acestor interacțiuni.

Cu excepția unor studii dedicate modificărilor neurochimice (a neurotransmițătorilor/neuropeptidelor) pe care infecția cu *H. pylori* le induce la nivelul terminațiilor nervoase din mucoasa gastrică, nu au fost efectuate, până în prezent, cercetări care să investigheze capacitatea bacteriei de a produce efecte neuroplastice la nivelul plexului mienteric gastric. Prin urmare, acest studiu își propune să evalueze efectele infecției cu *H. pylori* asupra arhitecturii, morfologiei și proprietăților neurochimice ale sistemului nervos gastric, cu scopul de a pune în lumină noi aspecte ale patogenezei infecției. Ipoteza de la care plecăm în acest demers științific este aceea că *H. pylori* influențează numărul neuronilor mienterici și al celulelor gliale și perturbă homeostazia neuronală.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Infecția cu *H. pylori*: date generale

Deși istoricul colonizării gazdei sale umane se întinde pe o perioadă de peste 58.000 de ani, *H. pylori* a trecut aproape neobservat până în momentul când Marshal și Warren au reușit să cultive bacteria pe medii speciale. Descoperirea a revoluționat lumea medicală și a schimbat fundamental paradigma clasică în ceea ce privește etiologia afecțiunilor gastrice, impulsționând în mod covârșitor cercetările în acest domeniu, care au culminat, zece ani mai târziu, cu clasificarea *H. pylori* ca și carcinogen de grup I.

H. pylori reprezintă, la momentul actual, bacteria responsabilă pentru cea mai răspândită infecție cronică pe întregul mapamond, însă prevalența este strâns corelată cu statutul socio-economic, astfel încât variază foarte mult între țări și între diferite subgrupuri populaționale ale aceluiași stat. Studiile epidemiologice estimează că, în țările în curs de dezvoltare, printre care se numără și România, numărul persoanelor purtătoare este de peste 80%. Infecția se dobândește prin ingestia orală a bacteriei și se transmite mai ales intrafamilial, în prima copilărie.

H. pylori posedă caracteristici unice, care îi permit să se adapteze perfect mediului ostil acid gastric, îi înlesnesc penetrarea, orientarea spațială și motilitatea la nivelul stratului de mucus, atașarea de epiteliul gastric superficial, eludarea răspunsului imun al gazdei și care, în consecință, conduc la colonizarea persistentă a mucoasei și supraviețuirea pe termen nelimitat în stomacul uman, rezervorul său exclusiv. Câteva dintre principalele mecanisme de adaptare ale *H. pylori* sunt producerea de urează, prezența flagelilor unipolari, proteinele de adeziune babA și sabA și factorii de virulență ai bacteriei cagA și vacA.

H. pylori determină, în mod virtual, o reacție inflamatorie cronică și persistentă a mucoasei gastrice la toți subiecții infectați, reacție inițiată și menținută de neutrofile, limfocite T și B, plasmocite și macrofage. Colonizarea mucoasei gastrice declanșează atât un răspuns imun specific înăscut, cât și unul adaptativ, care cooperează pentru a controla infecția, însă nu numai că nu reușesc să realizeze clearance-ul bacterian, ci, dimpotrivă contribuie în mod semnificativ la instalarea leziunilor epiteliului gastric.

Evoluția clinică a acestor leziuni este extrem de variabilă, fiind influențată de diversitatea genomică a bacteriei și de polimorfismul marcat al genelor gazdă, care influențează direct nivelurile de mediatori pro- sau antiinflamatori eliberați. Interacțiunile

specifice dintre bacterie și gazda sa sunt strâns corelate cu riscul de a dezvolta gastrită, ulcer peptic, carcinom sau limfom gastric.

2. Sistemul nervos enteric

Sistemul nervos enteric reprezintă cea mai mare și mai complexă subdiviziune a sistemului nervos autonom, fiind alcătuit din numeroase tipuri de celule gliale și de neuroni, organizate sub forma celor două plexuri enterice dispuse în grosimea peretelui tractului gastrointestinal. SNE este alcătuit din circuite neurale sofisticate, capabile să funcționeze autonom, chiar și în condițiile întreruperii legăturii cu sistemul nervos central, ceea ce justifică pe deplin denumirea de „creier al tubului digestiv” pe care a primit-o. La nivelul stomacului, SNE este reprezentat aproape exclusiv de plexul mienteric Auerbach, situat între stratul extern longitudinal și cel intern circular al muscularei proprii, care este responsabil de controlul neural al motilității și secreției acide gastrice. Plexul nervos Meissner gastric este alcătuit dintr-un număr limitat de ganglioni submucosali, care se găsesc în special la nivelul antrului.

Ganglionii enterici sunt alcătuiți dintr-un număr impresionant de neuroni cu proprietăți morfologice, funcționale și neurochimice distincte. Clasificarea funcțională a acestora oferă o abordare integrativă și are cea mai mare utilitate practică, cuprinzând trei clase principale de celule nervoase: neuroni aferenți primari intrinseci, neuroni motori și interneuroni. Ganglionii enterici sunt alcătuiți și dintr-un număr vast de celule gliale. Deși inițial celulelor gliale li s-a atribuit numai simpla funcție pasivă de susținere mecanică a componentei neuronale, în prezent este recunoscut rolul lor de participanți activi la menținerea homeostaziei neuronilor enterici și la modularea răspunsului inflamator gastrointestinal.

3. Modificările sistemului nervos enteric în infecția cu H. pylori

Axa „creier-tub digestiv” este alcătuită din componente ale sistemului nervos central și ale sistemului nervos autonom, fiind responsabilă de reglarea majorității proceselor digestive prin modularea activității sistemului imun și, implicit, a proceselor inflamatorii locale, a sistemului neuroendocrin și a microbiomului intestinal, ca răspuns la diverși factori de stres, emoționali sau factori de mediu.

Sistemul nervos enteric, ca parte a celui autonom, pe o parte și sistemul imun, pe de altă parte, sunt componente esențiale ale acestei axe, fiind capabile să își regleze reciproc activitatea prin interacțiuni complexe și să coopereze pentru a asigura homeostazia gastrointestinală. Activarea sistemului imun în cadrul proceselor inflamatorii digestive induce neuroplasticitatea enterică, caracterizată de cele mai multe ori prin anomalii structurale, funcționale și neurochimice ale SNE. Această capacitate extraordinară a sistemului nervos enteric de a suferi modificări adaptative și/sau fenomene reparatorii poate fi interpretată ca o încercare de îmbunătățire a funcțiilor digestive afectate și de ameliorare a simptomatologiei.

Modificările morfologice pe care inflamația le induce asupra țesutului neural au fost extrem de puțin investigate până în prezent la nivelul stomacului, însă au fost descrise, uneori cu rezultate contradictorii, în ganglionii enterici intestinali și colonici în bolile inflamatorii intestinale și în neuropatiile enterice. De asemenea, modificările expresiei neurotransmițătorilor au constituit obiectul a numeroase studii efectuate pe subiecți umani sau pe modele animale prezentând infecție cu *H. pylori*

CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Infecția cu *H. pylori* continuă să reprezintă o problemă importantă de sănătate publică la nivel mondial. Prevalența globală crescută, simptomatologia heterogenă, riscul crescut de dezvoltare a neoplaziilor gastrice și asocierea cu o serie de afecțiuni extragastrice fac ca infecția cu *H. pylori* să reprezinte, în continuare, un subiect de mare actualitate în domeniul medical. În plus, terapia de eradicare a microorganismului a devenit o adevărată provocare în ultimii ani, din cauza rezistenței crescute la antibiotice a bacteriei și complianței reduse a pacienților. În acest context, identificarea tuturor factorilor implicați în patogeniza infecției ar putea reprezenta piatra de temelie care să stea la baza eradicării definitive și cu succes a bacteriei, care va conduce, mai departe, la o scădere globală a incidenței cancerului gastric.

Această lucrare își propune să investigheze efectele pe care infecția cu *H. pylori* le are asupra morfologiei și proprietăților neurochimice ale sistemului nervos enteric gastric, plecând de la ipoteza că infecția cu *H. pylori* este capabilă să determine modificări ale

numărului de neuroni și de celule gliale enterice gastrice, să influențeze patternul eliberării neurotransmițătorilor și să perturbe homeostazia neuronală enterică.

Principalele obiective ale lucrării de față sunt următoarele:

- Definirea și caracterizarea morfometrică a structurii histologice normale a plexului nervos mienteric gastric;
- Analiza morfometrică a plexului nervos mienteric gastric la pacienții infectați cu *H. pylori*, incluzând următoarele etape: determinarea cantitativă a numărului și suprafeței ariilor ganglionare, precum și a numărului neuronilor și celulelor gliale enterice, calcularea densităților celor două tipuri de celule nervoase și a raportului dintre acestea.
- Evaluarea prezenței infiltratului inflamator dispus periganglionar la pacienții *H. pylori*-pozitivi, cu aprecierea semicantitativă a acestuia și identificarea tipurilor de celule imune implicate;
- Aprecierea fenomenelor neurodegenerative și apoptotice la nivelul plexului mienteric la pacienții cu infecție *H. pylori*;
- Evaluarea expresiei substanței P (SP) și a peptidului intestinal vasoactiv (VIP) în terminațiile nervoase din mucoasă și în neuronii mienterici gastrici;
- Stabilirea gradului de corelație între parametrii menționați anterior, precum și al asocierii dintre aceștia, pe de o parte, și intensitatea colonizării bacteriene, severitatea gastritei cronice și gradul activității neutrofilice, pe de altă parte.

Sperăm ca rezultatele demersului nostru științific să clarifice o serie de mecanisme patogenice mai puțin cunoscute ale infecției cu *H. pylori*. O înțelegere mai bună a interacțiunilor neuro-imune în contextul inflamației induse de prezența microorganismului ar putea reprezenta un prim pas în procesul mai amplu de dezvoltare a unor noi strategii terapeutice țintite și personalizate.

5. Metodologia generală a cercetării

În vederea îndeplinirii obiectivelor menționate anterior, am organizat prezentul studiu sub forma unei cercetări retrospective de tip cohortă realizată pe pacienții la care s-a practicat gastrectomie totală sau parțială pentru diferite afecțiuni neoplazice sau non-tumorale localizate la nivelul stomacului sau în organele de vecinătate în Spitalul Clinic Colentina, într-un interval de cinci ani.

Materialul analizat a constat în fragmente tisulare cuprinzând întreaga grosime a peretelui gastric, prelevate de la o distanță mai mare de 5 cm de orice leziune vizibilă macroscopic. Lotul martor a inclus un număr identic de pacienți fără istoric recent de infecție, cu păstrarea, pe cât posibil, a unei similitudini în ceea ce privește sexul și decada de vârstă a subiecților, patologia digestivă pentru care s-a intervenit chirurgical, precum și regiunea anatomică a stomacului din care au fost prelevate fragmentele tisulare examinate.

Blocurile de parafină selecționate au fost secționare cu ajutorul unui microtom rotativ semiautomat, efectuându-se secțiuni de 3 μ pentru colorații uzuale și de 2 μ pentru cele imunohistochimice, care au fost etalate pe lame simple și apoi uscate 2 ore la termostat. Ulterior, acestea au fost deparafinate în xilen, rehidratate în soluții de etanol cu concentrație crescândă și apoi în apă și colorate cu colorații uzuale, speciale sau imunohistochimice.

Analiza histopatologică a efectelor microorganismului asupra mucoasei gastrice a fost efectuată pe secțiunile tisulare colorate cu hematoxilină-eozină (HE), Giemsa și PAS și a constat în aprecierea semicantitativă a parametrilor urmăriți conform criteriilor din sistemul Sydney modificat pentru diagnosticul gastritelor. Degenerescența neuronală, obiectivată prin prezența de neuroni cu citoplasmă condensată sau vacuolată și/sau cu nuclei mici, picnotici, a fost analizată calitativ pe secțiunile colorate cu HE, notându-se prezența sau absența ei.

Evaluarea cantitativă a celulelor ganglionare din plexul mienteric gastric a fost realizată prin tehnici imunohistochimice, utilizând anticorpii HuC/D și S100. Suprafața ariilor ganglionare a fost calculată pe secțiunile colorate cu S100. Analiza celulelor inflamatorii s-a efectuat atât pe preparatele histopatologice colorate cu hematoxilină-eozină, cât și pe secțiunile pe care am efectuat teste imunohistochimice (CD3, CD4, CD8 și CD20). Activitatea anti-apoptotică neuronală a fost analizată imunohistochimic, prin evaluarea expresiei bcl-2. Ganglionita, definită ca prezența infiltratului inflamator periganglionar, a fost cuantificată ținând cont numai de numărul limfocitelor T CD3- pozitive. Densitatea expresiei celor două neuropeptide analizate - VIP și SP - la nivelul fibrelor nervoase din mucoasa gastrică, respectiv în ganglionii mienterici, a fost cuantificată semicantitativ cu un scor cuprins între 0 și 3.

Pentru analiza morfometrică a celulelor ganglionare enterice gastrice, am adaptat metoda propusă anterior într-un studiu ce a avut drept obiectiv evaluarea numerică a neuronilor mienterici din colon, la pacienții cu colită ulcerativă. Astfel, pentru fiecare secțiune tisulară au fost evaluate, cu obiectivul 40x (HPF), 40 de câmpuri microscopice

consecutive dispuse de-a lungul plexului mienteric, între straturile circular și longitudinal al păturii muculare netede gastric. Am ales numărul de 40 întrucât acesta a fost numărul minim de câmpuri identificate pe cea mai mică dintre secțiunile efectuate, evitând prin această metodă normalizarea cuantificării celulelor ganglionare. Numărătoarea câmpurilor microscopice a început în momentul identificării primului ganglion mienteric pe secțiunea respectivă.

Evaluarea și achiziția imaginilor s-a efectuat utilizând un microscop Olympus BX43 echipat cu o cameră digitală Olympus XC30 (Olympus Corporation, Japan), iar vizualizarea și prelucrarea acestora s-a realizat cu un program software de analiză a imaginilor (cellSens Dimension, Olympus Corporation, Japan). Fiecare câmp microscopic a corespuns unui dreptunghi cu dimensiuni de 0,36 mm x 0,27 mm, având o suprafață de 0,0972 mm². Astfel, pe fiecare secțiune tisulară, plexul mienteric a fost examinat pe o lungime totală de 14,4 mm, respectiv pe o suprafață de 3,888 mm².

Pentru descrierea distribuției grupurilor am folosit media și mediana; pentru compararea celor două loturi am folosit testul t Student pentru eșantioane dependente și testul Wilcoxon pentru date nonparametrice. Pentru datele non-parametrice, graficele au fost ilustrate sub forma diagramelor de tip box-whisker plot. Pentru cuantificarea asocierii unor variabile în cadrul aceluiași lot am folosit corelația Spearman pentru variabile ordinale și testul chi-pătrat pentru variabile categorice. Au fost aleși parametri obișnuiți de semnificație statistică ($p < 0,05$) și intervalul de încredere de 95%.

6. Rezultate

Parametri histopatologici la nivelul mucoasei gastrice

Cele mai multe dintre cazurile grupului țintă au prezentat o densitate moderată (22) sau scăzută (13) a *H. pylori* în stratul de mucus din suprafață, în restul de 5 cazuri densitatea bacteriei fiind marcată. Infiltratul inflamator cronic limfo-plasmocitar a fost observat în corionul mucoasei gastrice la toți pacienții infectați cu *H. pylori*, 31 (77.5%) dintre ei prezentând semne de activitate a gastritei cronice. Analiza imunofenotipică a celulelor imune implicate a demonstrat o predominanță netă a limfocitelor T CD3-pozitive. Metaplazia intestinală și atrofia glandulară au fost observate în 25, respectiv 22 de cazuri.

Morfologia plexului mienteric gastric

Numărul și suprafața ariilor ganglionare mienterice gastrice au fost semnificativ mai mari la pacienții infectați (mediană de 29 ganglioni, respectiv 0,447 mm²) comparativ cu lotul martor, la care s-au observat valori de 20,5 ganglioni, respectiv 0,231 mm²) - Fig. 1.

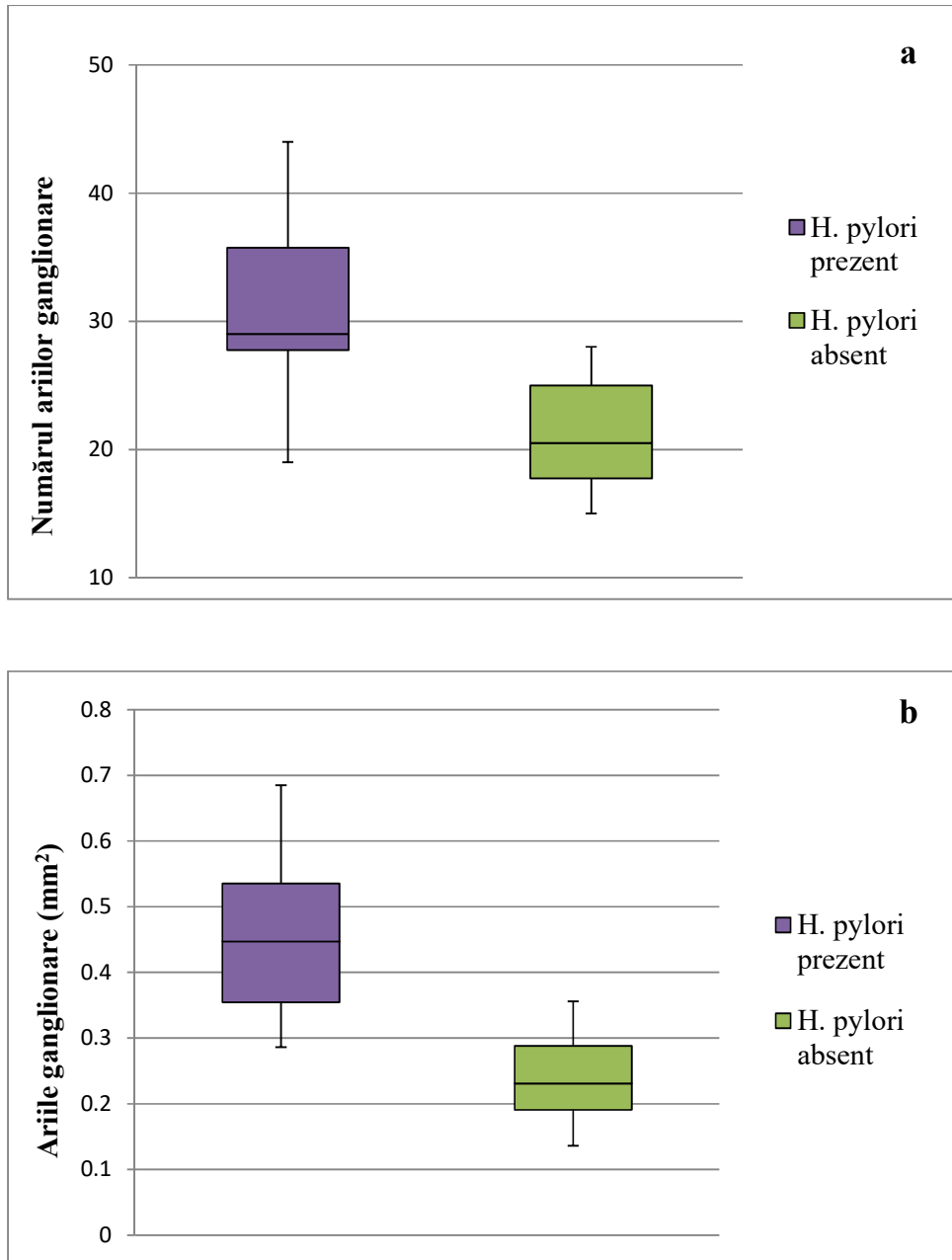


Figura 1. Numărul ganglionilor mienterici gastrici a fost semnificativ mai mare la pacienții cu H. pylori față de cei neinfecțați (a, p=0,002). Suprafața ganglionilor mienterici gastrici a fost, de asemenea, mai mare în lotul țintă față de lotul control (b, p=0,003)

Aceste valori au corespuns unui număr de 3-7 ganglioni mienterici per cm liniar de perete gastric (mediană 5) în lotul martor, respectiv 4-10 ganglioni/cm (mediană 7) în grupul țintă.

Compararea numărului de celule neuronale mienterice în cele două grupuri de pacienți a relevat diferențe importante. Astfel, în cazurile cu infecție H. pylori, numărul de neuroni mienterici gastrici a fost semnificativ mai mare (valoare mediană de 116,5) față de pacienții din lotul martor (mediană de 56,5), creșterea procentuală medie fiind de aprox. 171% - Fig. 2a. Aceste date au corespuns unor valori de 7-22 neuroni (mediană 13) pentru fiecare cm liniar de perete gastric în lotul martor, respectiv 22-50 neuroni (mediană 27) per cm în lotul țintă.

Pentru a vedea dacă acest număr este influențat de vârsta pacienților sau dacă el variază în funcție de regiunea anatomică a stomacului, am evaluat corelațiile dintre numărul celulelor neuronale identificate și decada de vârstă a pacienților incluși în studiu, pe de o parte ($p=0,832$), precum și cu zona topografică din care au fost prelevate fragmentele tisulare examinate, pe de altă parte ($p=0,576$), fără a obține însă rezultate semnificative statistic.

O tendință asemănătoare s-a înregistrat și în cazul celulelor gliale enterice gastrice, al căror număr observat la pacienții infectați cu H. pylori (mediană 588) a fost net superior celui calculat în grupul martor (mediană 314), date ce denotă o creștere procentuală medie de 87%, reprezentând însă numai jumătate din valoarea înregistrată în cazul neuronilor - Fig 2b. Echivalând aceste date, obținem un număr de 45-111 celule gliale (mediană 73) per cm de perete gastric în grupul control, respectiv 79-211 celule gliale (mediană 136) pe fiecare cm în lotul pacienților infectați.

În mod interesant, în grupul control, numărul ariilor ganglionare și densitatea neuronală nu s-au corelat cu vârsta pacienților sau cu localizarea anatomică a fragmentelor tisulare prelevate.

Raportul dintre celulele gliale și neuronii mienterici gastrici a fost relativ constant în lotul martor (valori cuprinse între 5,04 și 6,87, mediană 6,13), în timp ce, la pacienții infectați, valorile respective au fost în general mai mici, cuprinse între 2,06 și 6,5 (mediană 4,64), observație ușor de anticipat, având în vedere faptul că hiperplazia neuronală a fost mai pronunțată decât cea a celulelor gliale în acest grup.

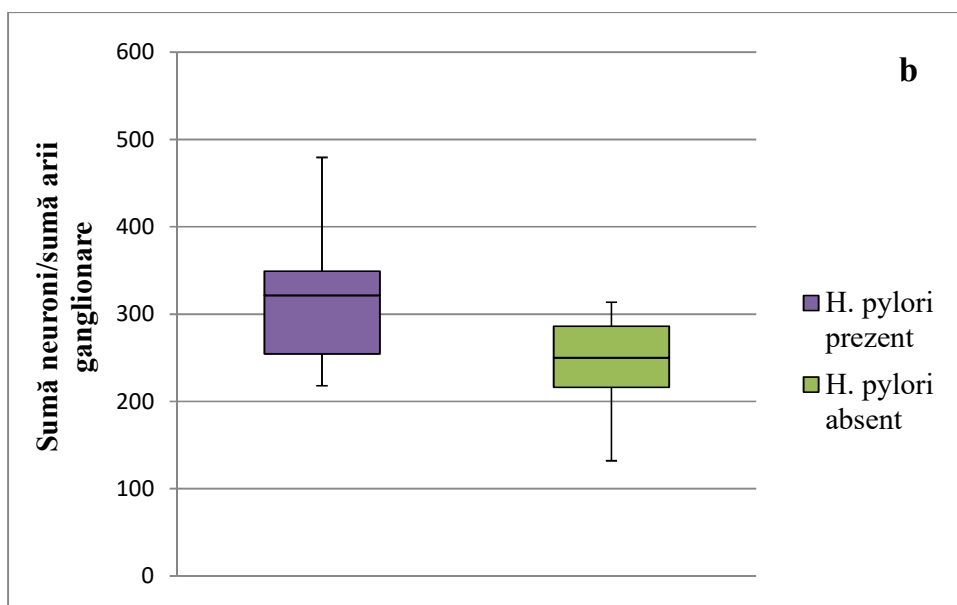
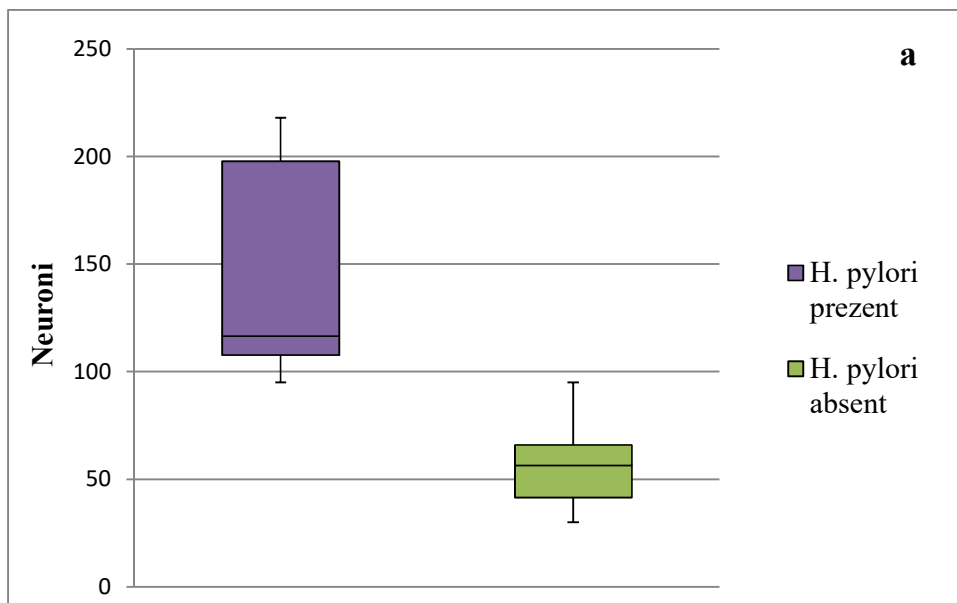


Figura 2. Numărul neuronilor (a) și al celulelor gliale mienterice gastrice (b) a fost semnificativ mai mare la pacienții infectați cu *H. pylori* comparativ cu subiecții din lotul martor.

Ganglionita a fost observată în 33 (82.5%) dintre cazurile cu infecție *H. pylori*. Analiza histologică și imunohistochimică efectuată în vederea identificării tipurilor de celule din infiltratul inflamator peri-/intraganglionar a demonstrat o preponderență netă a limfocitelor T CD3-pozitive, prezente în 30 de cazuri, în timp ce limfocitele B CD20-pozitive, plasmocitele și eozinofilele au fost observate cu o frecvență redusă. (Figura 3).

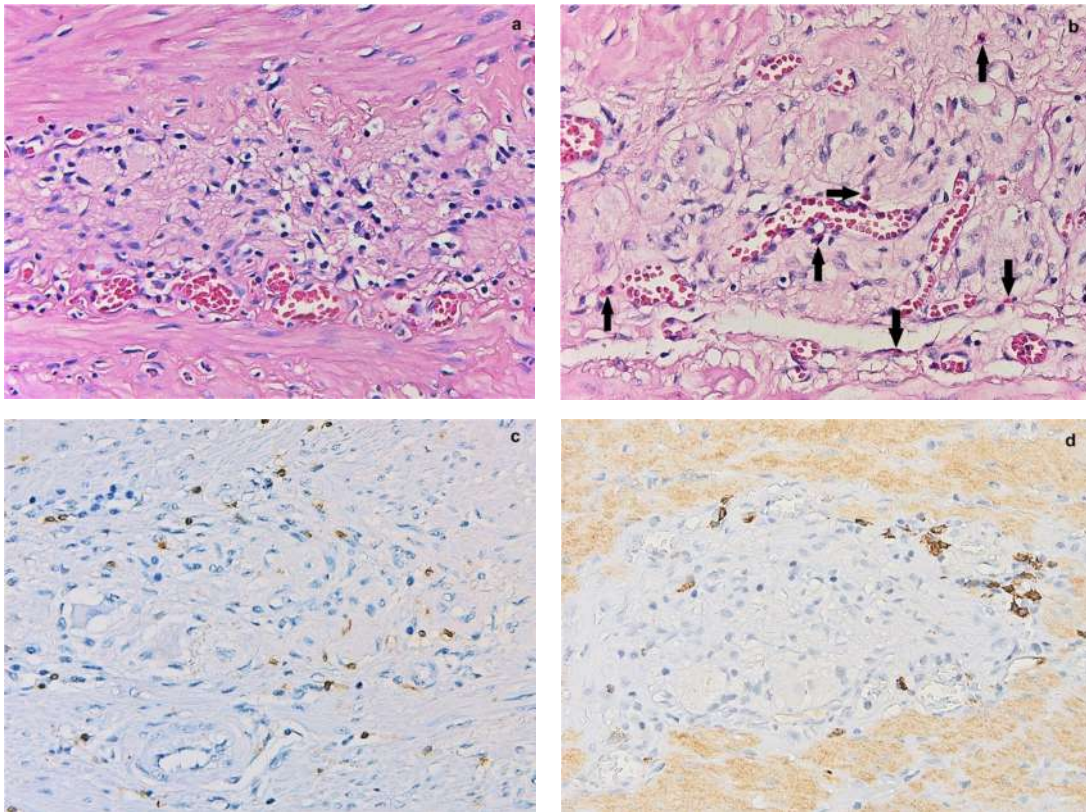


Figura 3. Frecvente limfocite (a, colorație HE, obiectiv 40x) și eozinofile (săgeți, b, colorație HE), numeroase limfocite T CD3+ (c) și relativ frecvente limfocite B CD20+ (d) dispuse peri- și intraganglionar la pacienții cu *H. pylori*, obiectiv 40x

Degenerarea neuronală a fost observată în 30 dintre cazurile cu infecție *H. pylori* (75%), față de numai 13 (32,5%) dintre pacienții neinfecțați (Fig. 4), însă corelația dintre modificările degenerative și gradul ganglionitei mienterice a fost una modestă ($p=0,031$). O corelație mai robustă ($p=0,002$) a fost observată între degenerarea neuronilor mienterici și infiltratul inflamator polimorf periganglionar, incluzând, pe lângă limfocitele T, și alte celule imune precum limfocite B, plasmocite și eozinofile, sugerând faptul că modificările degenerative neuronale reprezintă efectul acțiunii concertate a tuturor celulelor inflamatorii recrutate la nivelul plexului mienteric.

Absența expresiei bcl-2 în neuronii mienterici a fost identificată focal în 23 de cazuri cu infecție cu *H. pylori* (57,5%) și în doar 3 cazuri din lotul fără infecție (5,7%) – observându-se o diferență înalt semnificativă între cele două grupuri – Fig. 5. Apoptoza neuronală s-a corelat semnificativ cu prezența limfocitelor T periganglionare ($p=0,006$),

însă nu și cu neurodegenerarea. În lotul martor, neuronii fără expresie bcl-2 au fost identificați exclusiv la pacienții care au prezentat rare limfocite T periganglionar, confirmând efectul proapoptotic al acestor celule inflamatorii.

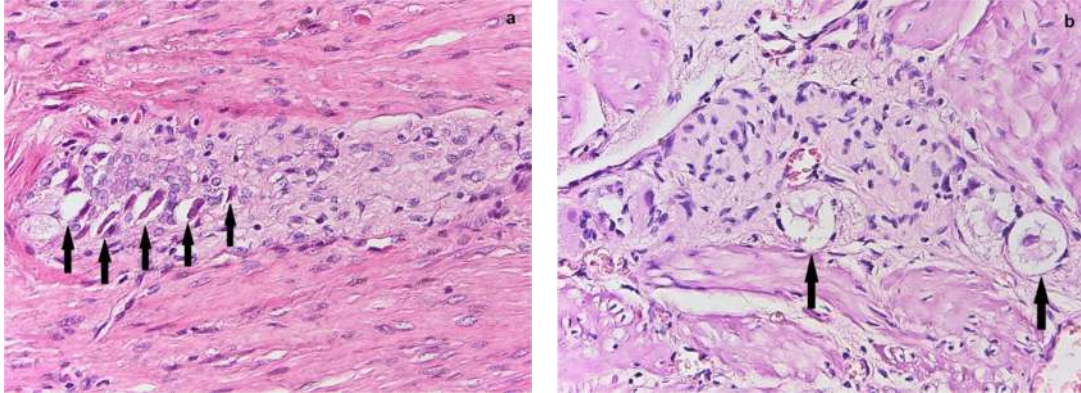


Figura 4. Modificări distrofice ale neuronilor mienterici identificate la pacienții infectați cu *H. pylori*, constând în condensarea (stânga) și vacuolizarea citoplasmei (dreapta), asociate cu picnoza nucleilor, colorație HE, obiectiv 40x

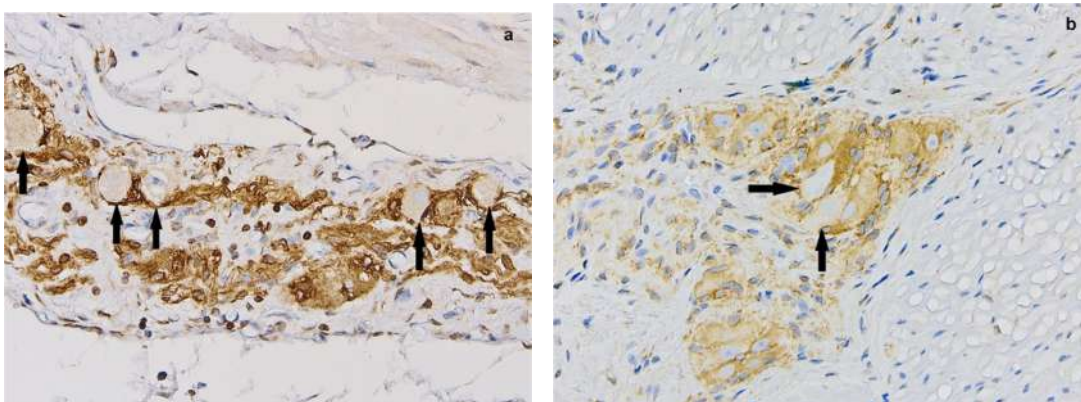


Figura 5. Pierderea focală a expresiei bcl-2 în neuronii mienterici (săgeți). Se observă că limfocitele dispuse intraganglionar (stânga), precum și restul neuronilor (dreapta) își păstrează expresia pentru proteina antiapoptotică bcl-2, colorație bcl-2, obiectiv 40x

Modificări neurochimice ale neuronilor mienterici gastrici

Rezultatele obținute au arătat că, la pacienții cu *H. pylori*, expresia neuronală a SP a fost semnificativ mai pronunțată comparativ cu cei din grupul martor (Fig. 6). Majoritatea pacienților (24 de cazuri) a prezentat o intensitate moderată a expresiei neuropeptidului, restul având un nivel scăzut sau marcat al sintezei neuronale a SP (Fig. 7).

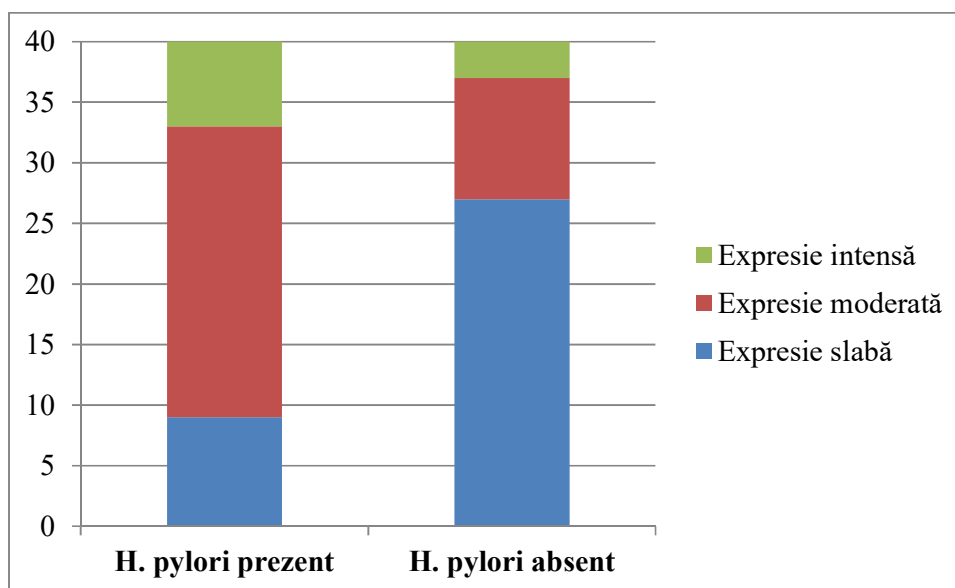


Figura 6. Diferențe ale expresiei SP neuronale la pacienții infectați cu H. pylori comparativ cu grupul martor

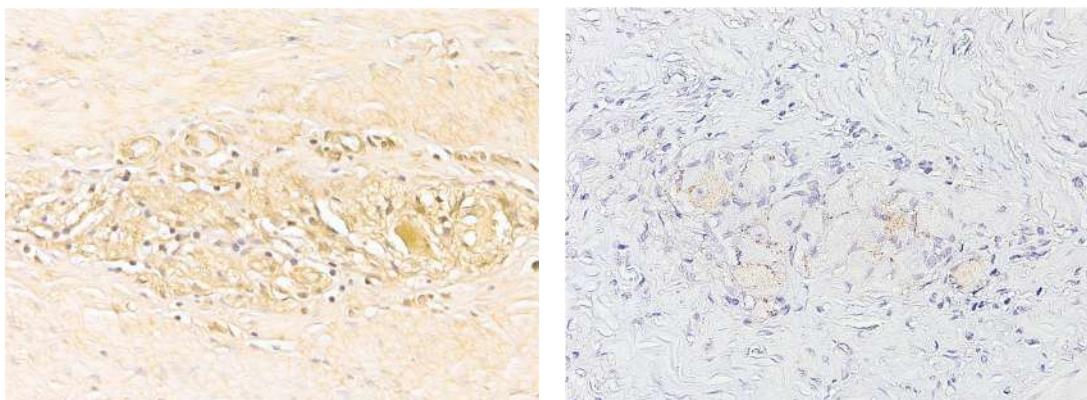


Figura 7. Expresie variabilă ca intensitate a SP în plexul mienteric: intensă în neuroni și celule gliale la pacienții H. pylori-pozitivi (stânga), redusă, limitată doar la neuroni, la subiecții martor (dreapta), colorație SP, obiectiv 40x

O situație asemănătoare a fost observată și în ceea ce privește densitatea fibrelor nervoase din corion imunoreactive pentru SP, care a fost semnificativ mai mare la pacienții infectați cu H. pylori față de subiecții din lotul martor. Ca și în cazul neuronilor, cei mai mulți dintre pacienții grupului țintă (27) au prezentat o expresie moderată a neuropeptidului la nivelul fibrelor nervoase, în timp ce la subiecții neinfecțiați, densitatea fibrelor imunoreactive pentru SP a fost una preponderent scăzută (22 de cazuri, Fig. 8). În

grupul țintă, expresia neuronală a substanței P s-a corelat semnificativ din punct de vedere statistic cu cea din terminațiile nervoase mucosale ($p=0,024$).

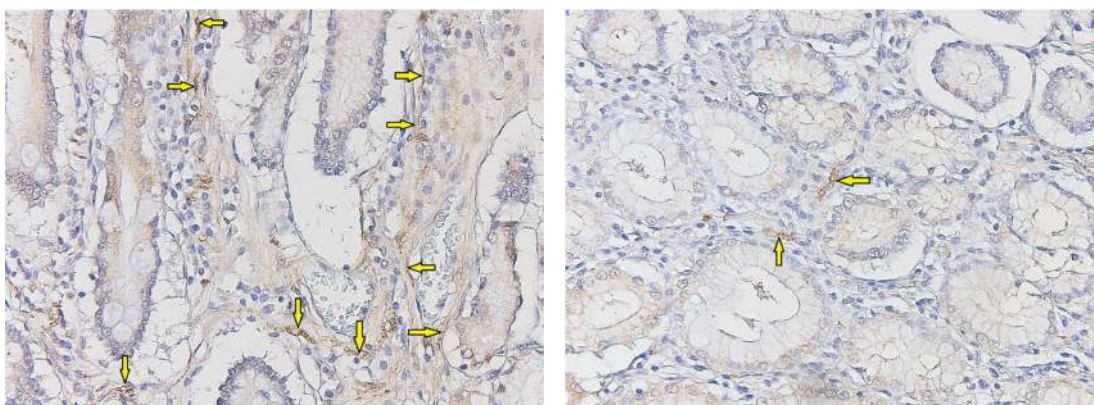


Figura 8. Expresie variabilă a SP în terminațiile nervoase mucosale: densitate moderată la pacienții H. pylori-pozitivi (stânga) și redusă în lotul control, colorație SP, obiectiv 40x

În mod interesant, în grupul pacienților cu H. pylori, am observat o corelație semnificativă între expresia SP din neuronii mienterici și gradul ganglionitei ($p=0,018$). Pe de altă parte, pentru a identifica dacă densitatea fibrelor nervoase SP-imunoreactive este legată de densitatea H. pylori, de infiltratul inflamator cronic din corion sau de gradul de activitate a gastritei, am realizat corelații între acești parametri, însă fără a obține rezultate semnificative statistic.

La pacienții cu H. pylori, expresia VIP a fost mult mai mare în neuronii mienterici față de cei din grupul martor (Fig. 9). Așa cum se observă din următorul grafic, puțin peste jumătate dintre pacienții lotului țintă (21 de cazuri) au prezentat o expresie intensă a neuropeptidului, 8 pacienți au avut o expresie moderată, în timp ce la 11 subiecți a fost observată o expresie redusă a VIP. Aceste date sunt semnificativ diferite de cele observate în lotul martor, în care, în jumătate dintre cazuri, expresia VIP a fost una slabă.

Așa cum anticipam, investigarea densității fibrelor nervoase imunoreactive pentru VIP situate în mucoasa gastrică a relevat faptul că aceasta a fost mult mai mare la pacienții cu H. pylori, comparativ cu subiecții control. Majoritatea a prezentat niveluri moderate (22 de pacienți) sau crescute (12 pacienți) de VIP, în timp ce, în lotul fără infecție, densitatea terminațiilor nervoase pozitive pentru VIP a fost în mod covârșitor una redusă (29 de pacienți).

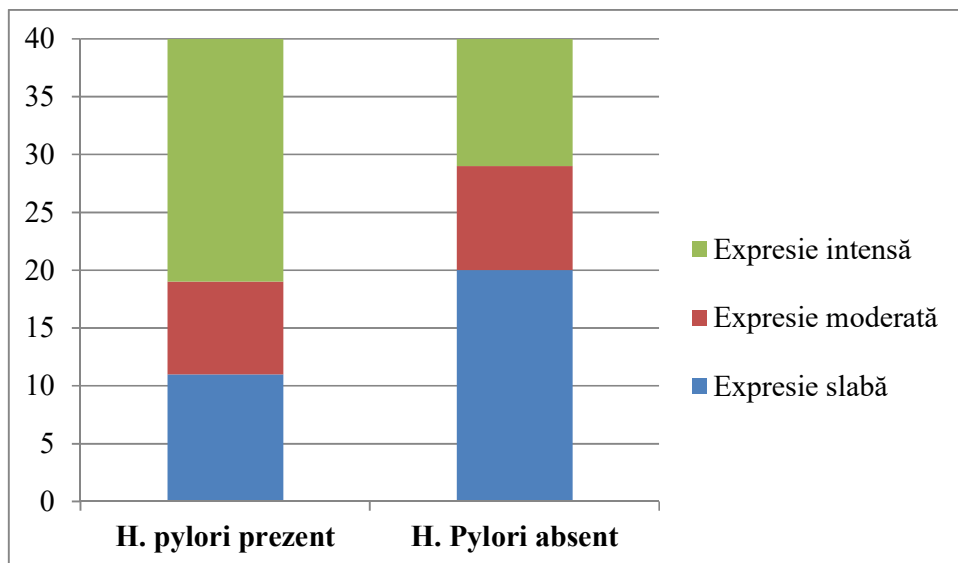


Figura 9. Grupul pacienților infectați cu H. pylori a prezentat o expresie neuronală mai pronunțată a VIP comparativ cu grupul martor

Oarecum surprinzător, expresia VIP nu a fost concordantă în cele două compartimente examinate, respectiv în neuroni și fibrele nervoase, nici la pacienții din lotul infectat cu H. pylori și nici la cei din lotul martor. În ceea ce privește corelația dintre nivelul VIP în neuronii mienterici și gradul ganglionitei, în cadrul grupului de pacienți H. pylori pozitivi, nu am obținut o valoare cu semnificație statistică ($p=0,671$). Am verificat, și pentru acest neuropeptid, dacă densitatea fibrelor nervoase imunoreactive pentru VIP se corelează cu densitatea H. pylori, cu infiltratul inflamator cronic din corion sau cu gradul de activitate a gastritei, fără a obține însă rezultate cu semnificație statistică.

7. Discuții

Inflamația plexului mienteric gastric

Ganglionita mienterică, definită ca prezența celulelor inflamatorii în proximitatea plexului nervos mienteric, constituie expresia unui dezechilibru al interacțiunilor neuroimune dintre componentele microclimatului neural enteric. Existența infiltratului inflamator periganglionar în stomac a fost consemnată foarte rar în literatura de specialitate, fiind descrisă în special la pacienții gastroparetici. În studiul nostru, am observat o diferență semnificativă în ceea ce privește prezența celulelor inflamatorii periganglionare între pacienții H. pylori-pozitivi și cei fără infecție, confirmând astfel capacitatea bacteriei de a modula funcțiile gastrice neuroimune. Observația este

surprinzătoare, având în vedere faptul că în gastrita cronică, infiltratul inflamator este descris, în mod clasic, ca fiind limitat la nivelul mucoasei gastrice, fără interesarea straturilor mai profunde ale stomacului. Analiza imunofenotipică a infiltratului periganglionar a arătat o preponderență a limfocitelor T CD3+, date ce concordă cu observațiile anterioare, care sugerează existența unei activități predominant T-citotoxice direcționate împotriva unor proteine exprimate de neuronii mienterici. Limfocitele B și plasmocitele au fost identificate periganglionar exclusiv în contextul infecției cu H. pylori, ceea ce denotă participarea lor activă la interacțiunea neuroimună. Rezultatele obținute în lucrarea de față confirmă datele raportate în literatură, potrivit cărora limfocitele B mature participă la răspunsul imun prin sinteza de imunoglobuline îndreptate împotriva unor antigene exprimate de neuronii mienterici.

Degenerarea și apoptoza neuronilor mienterici

Degenerescenta corpilor neuronali și a terminațiilor nervoase în plexul mienteric este bine documentată la pacienții cu boli inflamatorii intestinale. Studiul nostru a relevat faptul că neurodegenerarea mienterică, obiectivată morfopatologic printr-o citoplasmă condensată sau vacuolată și/sau un nucleu picnotic, se observă cu o frecvență semnificativ mai mare la pacienții infectați cu H. pylori, ceea ce denotă capacitatea microorganismului de a induce modificări distrofice la nivelul plexului mienteric gastric. A fost identificată o corelație modestă între degenerarea neuronală și densitatea limfocitelor T CD3+ periganglionare, însă modificările neuronale s-au asociat mult mai puternic din punct de vedere al semnificației statistice cu infiltratul inflamator limfo-plasmocitar dispus în jurul plexului mienteric, indicând faptul că și limfocitele B și plasmocitele recrutate contribuie în mod activ, alături de limfocitele T, la procesul neurodegenerativ. Observațiile noastre confirmă datele raportate anterior care arată că, în tractul gastrointestinal, degenerarea neuronilor mienterici poate surveni în contextul ganglionitei.

Expresia proteinei antiapoptotice bcl-2 se reduce progresiv la nivelul neuronilor SNC odată cu înaintarea în vârstă, însă rămâne constantă pe tot parcursul vieții în neuronii periferici, pe care îi protejează împotriva unei game largi de factori nocivi, promovând supraviețuirea acestora chiar și în absența factorilor neurotrofici. Deși unele studii au demonstrat o scădere a expresiei bcl-2 la nivelul plexurilor nervoase în anumite boli intestinale motorii non-inflamatorii, apoptoza neuronală nu a fost investigată și în inflamațiile gastrointestinale. Rezultatele obținute în studiul de față au arătat pentru prima dată că, la pacienții cu infecție cu H. pylori, pierderea expresiei bcl-2 în neuronii mienterici

gastrici este mult mai frecventă comparativ cu cei neinfecțați, sugerând că microorganismul este capabil să declanșeze fenomenul de apoptoză, conducând astfel la moartea neuronilor. Aceste date vin în sprijinul observațiilor potrivit cărora *H. pylori* poate promova apoptoza în celulele epiteliale infectate prin intermediul a diferiți mediatorii ai inflamației, conducând spre concluzia că bacteria ar putea induce, într-o manieră similară, dereglări ale mecanismului de moarte celulară programată în diferite tipuri celulare ale peretelui gastric. Corelația semnificativă observată între ganglionita cu limfocite T CD3- pozitive și pierderea expresiei neuronale pentru bcl-2 confirmă faptul că inflamația neuronală indusă de aceste celule poate conduce la pierderea funcției neuroprotectoare a proteinei bcl-2 și activarea mecanismelor apoptotice în neuronii mienterici. La nivelul SNC, studiile au arătat că limfocitele T CD4+ activate pot induce moartea neuronală într-o manieră pasivă, independent de prezentarea antigenelor, în special prin citokinele pe care le eliberează, precum IFN- γ și interleukina-17, sau prin intermediul glutamatului excitotoxic, în timp ce limfocitele CD8+ pot promova apoptoza neuronală prin recunoașterea antigenelor prezentate de moleculele complexului major de histocompatibilitate (CMH) clasa I, exprimate de neuronii expuși la citokinele proinflamatorii. Apoptoza neuronală observată la pacienții cu ganglionită indusă de infecția cu *H. pylori* ar putea surveni prin mecanisme asemănătoare, însă acestea trebuie investigate în studii viitoare.

Hiperplazia neuronilor și a celulelor gliale

Corelația dintre numărul crescut de neuroni mienterici gastrici și prezența *H. pylori* a reprezentat poate cea mai surprinzătoare observație a cercetării. Variațiile numerice ale neuronilor enterici nu au fost investigate la nivelul peretelui gastric în cadrul infecției cu *H. Pylori*, însă au fost descrise de unii autori în bolile inflamatorii intestinale, caracterul pozitiv sau negativ al creșterii numărului corpiilor neuronali depinzând de tipul afecțiunii. În contextul în care, la majoritatea pacienților din lotul cu infecție cu *H. pylori*, am identificat semne de degenerare și/sau de apoptoză neuronală, nu putem oferi momentan o explicație pertinentă pentru hiperplazia neuronală. În opinia noastră, cea mai plauzibilă ipoteză este aceea potrivit căreia creșterea numărului de neuroni gastrici la pacienții infectați ar putea reprezenta un mecanism compensator pentru injuria neuronală indusă de inflamația ganglionară.

Întrebarea firească ce decurge din această observație este următoarea: dacă neuronii sunt celule post-mitotice, care nu se divid, cum se explică hiperplazia acestora? Pentru o perioadă lungă de timp, s-a considerat că neurogeneza enterică survine exclusiv în cursul

embriogenezei și în perioada postnatală timpurie. Cu toate acestea, un număr tot mai mare de cercetări recente au sugerat că neurogeneza intestinală postnatală se poate produce în anumite circumstanțe și în organismul adult, deși originea acestor celule capabile de neurogeneză și stimulii lor activatori au rămas incomplet elucidați.

Una dintre variante presupune existența, la nivelul tractului digestiv adult, a unui rezervor de celule capabile să genereze neuroni în condiții patologice. Cel mai probabil, în condiții fiziologice, acești precursori neuronali se află într-o stare dormantă, iar în condiții patologice asociate cu injuria neuronală, anumiți stimuli inițiază activarea, proliferarea și diferențierea lor. Unele studii au sugerat că, în context inflamator, lipopolizaharidele (LPS) bacteriene ar putea declanșa activarea progenitorilor neuronali prin intermediul receptorilor TLR4, stimulând proliferarea acestora și diferențierea lor în neuroni și celule gliale. Într-o manieră similară, *H. pylori* ar putea induce activarea celulelor stem neuronale enterice prin efectul stimulator de eliberare a citokinelor proinflamatorii exercitat de lipopolizaharidele prezente la nivelul învelișului său extern.

O a doua variantă ar fi aceea care presupune că celulele gliale pot da naștere unor noi neuroni prin transdiferențiere directă, printr-un mecanism mediat de receptorii serotoninerfici. Potrivit unor autori, în colita infecțioasă sau cea indusă chimic s-a înregistrat o intensificare accentuată a proliferării celulelor gliale, însă numărul acestora a rămas constant. Concomitent, numărul neuronilor a crescut, iar neuronii nou formați au exprimat markeri de celule gliale precum Sox2, Nestina și CD49b, fără a prezenta însă dovezi ale replicării ADN, ceea ce oferă dovezi pentru existența unui nou mecanism al neurogenezei enterice. Sunt necesare studii suplimentare care să elucideze originea acestor celule progenitoare și a stimulilor care pot declanșa potențialul lor neurogen.

Prezentul studiu a identificat, la pacienții cu *H. pylori*, și o hiperplazie a celulelor gliale la nivelul plexului mienteric. Pe lângă funcția lor clasică de suport mecanic al neuronilor și de a asigura integritatea lor structurală și funcțională, celulele gliale prezintă receptori pentru diverși neurotransmițători, putând fi activate sub acțiunea acestora și, de asemenea, sunt implicate în semnalizarea imună, astfel că numărul lor poate varia în inflamațiile tractului digestiv. Această observație a fost raportată anterior, deși cu rezultate contradictorii, în bolile inflamatorii intestinale, dar, până în prezent, nu a fost efectuată o analiză morfometrică a compartimentului glial gastric în cadrul infecției cu *H. pylori*. În studiul de față, valorile înregistrate în cazul multiplicării celulelor gliale au fost constant mai mici decât cele exprimând hiperplazia neuronală, sugerând faptul că neuronii mienterici par mai expuși fenomenului hiperplazic indus de infecția cronică cu *H. Pylori*,

comparativ cu componenta glială. Nu este încă clar dacă hiperplazia glială reprezintă o consecință a hiperplaziei neuronale sau este o cauză a acesteia, deși unele studii susțin ultima variantă.

Modificările neurochimice

SP și VIP sunt mediatori exprimați la diferite niveluri ale sistemului nervos digestiv, fiind printre cele mai studiate neuropeptide în inflamațiile gastro-intestinale, întrucât, pe lângă funcția lor de reglare a motilității, a fluxului sanguin sau a activității secretorii, au și proprietatea de a modula inflamația, fie în sensul întreținerii acesteia (SP), fie acționând ca și agent anti-inflamator (VIP).

Studiul nostru a identificat o densitate crescută a fibrelor nervoase imunoreactive pentru SP la nivelul mucoasei gastrice inflamate în cadrul infecției cu *H. pylori*, ceea ce confirmă rolul acestui neuropeptid de mediator important în inițierea și menținerea inflamației digestive, prin stimularea activării și diferențierii limfocitelor, promovarea chemotaxiei monocitelor și neutrofilelor și activarea macrofagelor. Toate aceste celule imune eliberează diferite citokine cu rol proinflamator, care produc injuria tisulară locală observată în inflamațiile cronice.

O expresie crescută a SP a fost observată în cercetarea actuală și la nivelul neuronilor mienterici, care s-a corelat cu nivelul neuropeptidului de la nivelul mucoasei gastrice, date ce sugerează faptul că expresia SP din terminațiile nervoase prezente în corion se datorează, măcar parțial, unei sinteze neuronale crescute. Pe de altă parte, am observat o corelație semnificativă din punct de vedere statistic între expresia neuronală a SP și gradul ganglionitei care, la rândul ei, s-a corelat cu densitatea limfocitelor T din mucoasă. Aceste observații ne permit să formulăm ipoteza conform căreia augmentarea expresiei neuronale a neuropeptidului poate surveni ca rezultat al mediatorilor inflamației eliberați local de limfocitele recrutate în proximitatea ganglionilor mienterici, în urma acțiunii limfocitelor T de la nivelul mucoasei gastrice.

În concluzie, substanța P și răspunsul imun par să formeze, în prezența infecției cu *H. pylori*, un cerc vicios, în care cei doi protagoniști se potentează reciproc, perpetuând astfel inflamația cronică a mucoasei gastrice. Aceste interacțiuni neuroimune ar putea explica persistența sau recurența simptomelor observate la unii pacienți după eradicarea infecției bacteriene.

Densitatea crescută a terminațiilor nervoase din mucoasa gastrică pentru VIP, identificată la pacienții infectați cu *H. pylori*, este în concordanță cu observațiile raportate

anterior. Având în vedere proprietățile anti-inflamatorii bine documentate în literatura de specialitate ale VIP, expresia crescută a neuropeptidului ar putea fi interpretată ca o tentativă a SNE de a combate inflamația indusă de infecția cu *H. pylori*, prin restaurarea unui echilibru între mediatorii nocivi și cei benefici. Mai mult, studiul nostru a identificat un nivel crescut al acestui neuropeptid și la nivelul neuronilor mienterici, însă acesta nu s-a corelat cu cel din terminațiile nervoase, observație ce indică o posibilă perturbare în stocarea, transmiterea nervoasă, eliberarea sau în degradarea VIP, perturbare generată de răspunsul inflamator. Această ipoteză necesită însă validare în studii viitoare.

Concluzii

Studiul de față a reușit, așadar, să atingă toate obiectivele propuse inițial, care au vizat analiza cantitativă morfometrică a structurilor ganglionare din plexul mienteric gastric și evaluarea expresiei neuropeptidelor SP și VIP în fibrele nervoase mucosale și în neuronii mienterici, atât în condiții normale, cât și în cadrul infecției cu *H. pylori*. Din datele pe care le deținem, acesta este primul studiu de o asemenea amploare și complexitate care a investigat parametrii enumerați mai sus prin utilizarea unor metode imunohistochimice moderne și eficiente.

Rezultatele obținute au confirmat, în premieră, ipoteza potrivit căreia *H. pylori* este capabil să determine o gamă variată de anomalii structurale la nivelul componentei intrinseci a sistemului nervos autonom gastric și au demonstrat faptul că modificările produse asupra acestuia pot fi asimilate unui mecanism patogenic important, deși puțin investigat, al infecției cu *H. pylori*. Lucrarea demonstrează, pentru prima dată, că neurogeneza și gliogeneza pot surveni în contextul inflamației induse de infecția cu *H. pylori*. Teza doctorală contribuie astfel în mod semnificativ la o caracterizare cât mai minuțioasă a interacțiunilor complexe dintre microorganism și gazda sa umană și deschide calea pentru discuții și investigații mai ample în domeniul neuroplasticității gastrice.

De asemenea, studiul demonstrează că infecția cu *H. pylori* poate declanșa modificări ale expresiei neuropeptidelor atât în terminațiile nervoase din mucoasa gastrică, cât și în neuronii mienterici din stomac. SP și VIP acționează ca mediatori endogeni cu efecte antagonice, care modulează și, la rândul lor, sunt influențați de către sistemul imun. Deși sunt necesare investigații suplimentare care să clarifice mecanismele acțiunii celor două neuropeptide în inflamația produsă de infecția cu *H. pylori*, rezultatele studiului

sugerează că receptorii acestora ar putea reprezenta o țintă nouă și promițătoare în managementul terapeutic al gastritei cronice și al cancerului gastric.

La 40 de ani după descoperirea sa, *H. pylori* încă rămâne un agent patogen enigmatic, cu multe secrete ce urmează a fi dezvăluite și care ridică multe semne de întrebare ale căror răspunsuri urmează să fie găsite. Cercetarea noastră furnizează noi perspective care înlesnesc o înțelegere mai bună a patogenezei infecției, ceea ce stimulează dezvoltarea de noi strategii terapeutice personalizate și eficiente ale bolilor gastrointestinale induse de *H. pylori*.

Bibliografie selectivă

1. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic Review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2017; 153(2):420-429.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449-490.
4. Budzyński J, Kłopocka M. Brain-gut axis in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(18): 5212-5225.
5. Furness JB. The enteric nervous system. Blackwell Publishing. Oxford. 2006.
6. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390): 1311-1315.
7. Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter Pylori* infection. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl 1): 15-20.
8. Charitos IA, D'Agostino D, Topi S, Bottalico L. 40 Years of *Helicobacter pylori*: A Revolution in Biomedical Thought. *Gastroenterology Insights*. 2021; 12(2):111-135.
9. World Health Organisation. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IACR Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241.
10. Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12(Suppl 1): 1-3.

11. Abadi ATB. Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(16): 2870-2882.
12. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of Helicobacter pylori pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20(36):12781-808.
13. Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in Helicobacter pylori Infection. *Gastroenterology.* 2008; 134: 306-323.
14. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 3-21.
15. Gershon MD. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (1995).* 1999; 34(7): 31-2, 35-8, 41-2 passim.
16. Progatzy F, Pachnis V. The role of enteric glia in intestinal immunity. *Curr Opin Immunol.* 2022; 77: 102183.
17. Jakob MO, Kofoed-Branzk M, Deshpande D, Murugan S, Klose CSN. An Integrated View on Neuronal Subsets in the Peripheral Nervous System and Their Role in Immunoregulation. *Front Immunol.* 2021; 12: 679055.
18. Mandić P, Filipović T, Gasić M, Djukić-Macut N, Filipović M, Bogosavljević I. Quantitative morphometric analysis of the myenteric nervous plexus ganglion structures along the human digestive tract. *Vojnosanit Pregl.* 2016 ; 73(6): 559-65.
19. Ippolito C, Segnani C, De Giorgio R, Blandizzi C, Mattii L, Castagna M, et al. Quantitative evaluation of myenteric ganglion cells in normal human left colon: implications for histopathological analysis. *Cell Tissue Res.* 2009; 336(2): 191-201.
20. Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, et al. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 ; 20(9): 1009-16.
21. Berčík P, De Giorgio R, Blennerhassett P, Verdú EF, Barbara G, Collins SM. Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology.* 2002; 123: 1205-1215.
22. Sipos G, Altdorfer K, Pongor E, Chen LP, Feher E. Neuroimmune link in the mucosa of chronic gastritis with Helicobacter pylori infection. *Dig Dis Sci.* 2006; 51: 1810–1817.
23. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(22): 4249-4264.

24. Ganea D, Hooper KM, Kong W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015; 213(2): 442-52.
25. Kulkarni S, Micci MA, Leser J, Shin C, Tang SC, Fu YY, et al. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(18): E3709-E3718.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

➤ **Sticlaru L**, Stăniceanu F, Cioplea M, Nichita L, Bastian A, Micu G, Popp C. Dangerous Liaison: *Helicobacter pylori*, Ganglionitis, and Myenteric Gastric Neurons: A Histopathological Study. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019 Dec 30; 2019:3085181. doi: 10.1155/2019/3085181. PMID: 32082967; PMCID: PMC7012220 – lucrare publicată în revista *Analytical Cellular Pathology*, ISSN / eISSN 2210-7177 / 2210-7185, indexată ISI, factor de impact 4,133;
<https://www.hindawi.com/journals/acp/2019/3085181/>

➤ **Sticlaru L**, Stăniceanu F, Cioplea M, Nichita L, Bastian A, Micu G, Popp C. Neuroimmune cross-talk in *Helicobacter pylori* infection: analysis of substance P and vasoactive intestinal peptide expression in gastric enteric nervous system. *J Immunoassay Immunochem*. 2018; 39(6):660-671. doi: 10.1080/15321819.2018.1529683. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30325259 – lucrare publicată în revista *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, indexată PubMed;
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321819.2018.1529683?journalCode=ljii20>

➤ **Sticlaru L**, Bastian A, Micu G, Stăniceanu F, Popp C. Functional and morphological alterations induced by *Helicobacter pylori* infection in gastric nerve supply. *Rom J Intern Med*. 2014;52(3):192-7. PMID: 25509565 – lucrare publicată în revista *Romanian Journal of Internal Medicine*, indexată PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25509565/>