

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



**ROLUL HISTOPATOLOGIEI ȘI IMUNOHISTOCHEMIEI ÎN
MONITORIZAREA PACIENȚILOR CU BOLI INFLAMATORII
INTESTINALE**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI-MIRCEA

Cotutelă:

PROF. UNIV. DR. STEPAN ALEX-EMILIAN

Student-doctorand:

PAVEL CHRISTOPHER VLAD

2025

Cuprins

I. Partea generală. Obiectivele studiului	1
II. Contribuții personale	
1.Importanța remisiunii histologice în colita ulcerativă și a utilizării scorului histologic Nancy în practica curentă	
1.1 Introducere.....	3
1.2 Scoruri histologice în colita ulcerativă	3
1.3 Markerii individuali ai activității histologice	5
1.4 Concluzii	5
2. Studiul prospectiv al evaluării histopatologice în bolile inflamatorii intestinale	
2.1 Introducere	6
2.2 Materiale și metode	6
2.3 Rezultate	7
2.4 Concluzii	10
3. Analiza imunohistochimică în bolile inflamatorii intestinale - este subestimată importanța interleukinei-10?	
3.1 Introducere	11
3.2 Materiale și metode	11
3.3 Rezultate	12
3.4 Concluzii	17
4. Rolul chirurgiei în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale în era tratamentului biologic: un studiu multicentric în România	
4.1 Introducere	18
4.2 Materiale și metode	19
4.3 Rezultate	19
4.4 Concluzii	22
5. Concluzii și contribuții personale	
5.1. Concluzii	23
6.2. Contribuții personale	25
Bibliografie	28

I. PARTEA GENERALĂ. OBIECTIVELE STUDIULUI

Bolile inflamatorii intestinale (BII) reprezintă o patologie de o reală importanță și actualitate în sfera gastroenterologiei, chirurgiei generale și anatomiei patologice. BII sunt reprezentate de colita ulcerativă (UC) și boala Crohn (BC), patologii cunoscute cu un puternic caracter cronic cu perioade de recăderi și remisiuni. În pofida progreselor în domeniul cercetării axate în ultimele decade asupra acestor entități, se remarcă la ora actuală insuficiente date științifice care să permită un abord medical optim, individualizat asupra fiecărei categorii de pacienți și a diferitelor fenotipuri de boală inflamatorie intestinală.

Așa cum se observă în studii retro- și prospective, ratele de recăderi, complicații precum și evoluția către forme refractare sau fulminante cu imperiozitatea intervențiilor chirurgicale rămân în continuare la valori semnificative. Se remarcă însă ameliorări ai acestor parametri după introducerea terapiilor biologice cu anticorpi monoclonali precum și a noilor molecule de tip anti-interleukină, inhibitorii JAK sau anti-integrină. În ansamblu, ratele de remisiune endoscopică per moleculă, analizate individual, nu depășesc 60-70% [1]. Așadar, devine stringent necesară desfășurarea unor arii de cercetare care să obiectiveze criterii și markeri utili în aprecierea prognosticului și monitorizării pacientului cu BII. Importanța temei alese derivă pe de o parte și din datele epidemiologice care indică un avans însemnat al incidenței și prevalenței în ultimele decade inclusiv în România [2], cu impact care se răsfrânge evident și asupra sistemului de sănătate.

În ceea ce privește colita ulcerativă, până la 90% dintre pacienți vor prezenta cel puțin o recădere pe parcursul vieții, iar o recădere precoce precum și lipsa unei remisiuni susținute în primii 2 ani de boală se asociază cu un prognostic nefavorabil [3]. Conform unor studii anterioare, până la 25% dintre pacienții cu colită ulcerativă vor fi supuși unei colectomii totale, secundare refractarității bolii la terapia biologică [4]. Referitor la boala Crohn, rata intervențiilor chirurgicale este semnificativ mai crescută, deși a cunoscut o ușoară ameliorare în ultimele decade; astfel, conform meta-analize, riscul chirurgical la 10 ani de la diagnostic este de aproximativ 40% [5], iar la 20 ani de la diagnostic 75% dintre pacienți beneficiază de o intervenție chirurgicală. Așa cum s-a menționat anterior, rata intervențiilor chirurgicale (care poate reprezenta un marker surogat al refractarității bolii la terapia medicamentoasă) nu a cunoscut o scădere dramatică în ultimele decade, în pofida apariției noilor molecule precum terapiile biologice, având drept pivot Infliximab-ul (moleculă de tip anti-TNF) aprobat în anul 1998 pentru boala Crohn [6] și în 2005 pentru colita ulcerativă [7]. Un alt argument pentru actualitatea și importanța temei alese este riscul

crescut de apariție a leziunilor displazice, respectiv a cancerului colo-rectal (CCR) la 6-8 ani de la momentul diagnosticului [8]. În cadrul lucrării, probele de biopsie vor presupune inclusiv detectarea modificărilor displazice și analiza imunohistochimică a indicelui de pozitivitate p53, respectiv a indicelui de proliferare Ki-67.

Astfel, principalele **obiective** specifice ale proiectului includ:

1. Extinderea cunoștințelor și corelațiilor legate de parametri clinico-biologici, endoscopici, histopatologici, imunohistochimici care intervin în bolile inflamatorii intestinale, în scopul aprofundării mecanismelor acestora.
2. Aprofundarea relației dintre inflamația intestinală și dezvoltarea proceselor displazice.
3. Completarea parametrilor histopatologici de diagnostic și urmărire a bolilor inflamatorii intestinale, care să permită îmbunătățirea criteriilor utilizate în scorurile de apreciere a activității/ răspunsului/ remisiei leziunilor.
4. Identificarea celor mai specifici parametri imagistici, histopatologici și imunohistochimici pentru monitorizarea bolilor inflamatorii intestinale.
5. Identificarea categoriilor populaționale aflate la risc crescut de evoluție către forme severe, ce impun strategii individualizate de monitorizare și escaladare (*step-up*) a terapiei medicamentoase.

Pentru îndeplinirea acestor obiective, abordarea interdisciplinară și multicentrică reprezintă un element cheie, fiind implicați în studiul actual medici gastroenterologi și anatomo-patologi din centre terțiare în managementul bolilor inflamatorii (Spitalul Clinic de Urgență București, Institutul Clinic Fundeni, Spitalul Clinic de Urgență Craiova).

În concluzie, studiul propune investigarea complexă, integrată, epidemiologică, clinico-biologică, endoscopică, histopatologică, imunohistochimică și statistică a unui număr de 46 de cazuri de boli inflamatorii intestinale prin analiză retrospectivă și prospectivă, în contextul monitorizării pacienților și identificarea unor markeri de prognostic și individualizare a terapiei medicamentoase. Rezultatele obținute în acest studiu pot contribui la rafinarea selecției terapiei biologice din bolile inflamatorii intestinale, pot îmbunătăți criteriile de evaluare endoscopică și histopatologică a leziunilor în vederea ameliorării prognosticului și pot identifica anumite subtipuri de pacienți care impun escaladarea precoce a terapiei sau principii de monitorizare mai agresive.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Importanța remisiunii histologice în colita ulcerativă și a utilizării scorului histologic Nancy în practica curentă

1.1 Introducere

Colita ulcerativă este o afecțiune inflamatorie cronică cu evoluție ondulantă, ce prezintă în continuare un risc crescut pentru necesar de intervenții chirurgicale la 1, 5 sau 10 ani de la diagnostic, în pofida unei ameliorări discrete în ultimele șase decenii [5]. Începând cu anii 1980, obiectivul principal al studiilor clinice a fost ameliorarea simptomelor. În anii următori, dovezile cumulative au condus la crearea unor scoruri compozit ce urmăreau ca obiectiv final ameliorarea simptomelor și vindecarea mucoasei [9]. În CU, pacienții cu un scor Endoscopic Mayo (Mayo Endoscopic Score - MES) ≥ 1 prezintă risc triplu de recidivă clinică comparativ cu cei cu MES 0 [10]. D'Haens a fost unul dintre primii autori care a subliniat, încă din anul 2007, importanța remisiunii histologice, afirmând că aceasta ar trebui să fie luată în considerare ca obiectiv secundar în studiile clinice [11]. Nu există o metodă standardizată de raportare a remisiunii histologice, ceea ce limitează utilizarea clinică a acesteia în practica curentă. După cum a demonstrat Lemmens *et al.*, există un grad ridicat de variabilitate între anatomopatologi în ceea ce privește rapoartele histopatologice, cu excepția extremelor spectrului, și anume boală inactivă sau cu activitate inflamatorie severă [12]. Scopul acestei lucrări este de a analiza datele disponibile privind cele mai recente și validate scoruri histologice dezvoltate pentru colita ulcerativă și subcomponentele individuale ale acestora, pentru a determina care este abordarea standardizată optimă în practică.

1.2 Scoruri histologice în colita ulcerativă

Au fost concepute aproximativ treizeci de sisteme de clasificare pentru a evalua activitatea histologică. Cu toate acestea, ele sunt utilizate în principal în scopuri de cercetare, iar relevanța lor clinică pentru influențarea tratamentului pacienților este limitată [13]. Doar o parte dintre acestea au fost supuse validării, iar utilizarea unor sisteme de clasificare nevalidate ar putea explica evoluția trenantă care se remarcă în dezvoltarea unui scor histologic care să caracterizeze sistematic răspunsul în tratamentul CU.

Scorul Geboes (GS) a fost conceptualizat în urmă cu peste 20 de ani ca sistem de clasificare a activității histologice cu reproductibilitate bună, dar corelare modestă cu

sistemul de clasificare endoscopică [14]. Include șapte caracteristici histologice ale bolii inflamatorii intestinale, dar din cauza complexității sale, acesta nu a fost adoptat niciodată în practica zilnică, fiind mai degrabă rezervat trial-urilor clinice. Remisiunea histologică este definită ca GS continuu ≤ 6 sau GS ≤ 2 (absența neutrofilelor de la nivelul epiteliului) [15]. Unul dintre primele studii care a evaluat prospectiv asocierea dintre scorul Geboes și evoluția pe termen lung la pacienții cu CU a fost publicat în 2016 [16]. A fost înrolat în studiu un lot de 179 de pacienți în remisiune clinică; gradul histologic inițial a fost singurul factor independent asociat cu recăderea clinică la 12 luni. Un scor Geboes > 3.1 a avut o sensibilitate de 74%, respectiv o valoare predictivă pozitivă de 40% pentru recădere. În cazul unui scor Geboes de 0 sau 1, riscul relativ de recidivă clinică a fost de doar 0.22 [17].

Indicele Robarts a fost dezvoltat în 2017 și poate fi considerat o versiune simplificată a GS, o analiză a trei cohorte prospective a arătat faptul că ambele scoruri se corelează puternic în ceea ce privește definițiile răspunsului histologic, astfel că 95% dintre pacienții care au îndeplinit criteriile pentru răspuns histologic conform RHI au prezentat răspuns și după criteriile GS. Un număr foarte mic de studii compară sensibilitatea RHI cu cea a GS în prezicerea recidivei clinice. Am identificat un astfel de studiu de tip prospectiv publicat în 2022 [18], care a inclus 187 de pacienți în remisiune clinică și endoscopică, la care s-au efectuat biopsii rectale și remisiunea histologică a fost definită ca RHI < 3 . Riscul cumulativ de recidivă la pacienții cu remisiune histologică la 1 și 3 ani a fost de 20.7 (vs. 45% la pacienții cu activitate histologică) și respectiv 56.3% (vs. 67.8%) [18]. În mod surprinzător, într-o analiză post-hoc [18], nu a existat nicio diferență semnificativă în ceea ce privește riscul de recidivă între pacienții care au obținut remisiunea histologică și cei cu activitate histologică limitată doar la nivelul laminei propria (infiltrat neutrofilic prezent în lamina propria, dar nu și în epiteliu).

Indicele Nancy (NI) analizează trei caracteristici ale activității mucoasei: infiltratul inflamator acut, cel cronic și prezența ulcerărilor. Pentru calcularea NI, s-a constatat că acordarea a numai trei grade pentru infiltratul celular inflamator acut (absent, ușor sau moderat-sever) a fost suficientă, în timp ce includerea plasmocitozei bazale ca indice al infiltratului inflamator cronic nu a îmbunătățit sensibilitatea NI, fiind astfel considerată redundantă [19]. Această evaluare etapizată ia în considerare cel mai sever aspect al fiecăreia dintre cele trei caracteristici, este simplă, pragmatică, ceea ce a condus la recomandarea ECCO de a utiliza acest scor pentru practica clinică de rutină [20]. Remisiunea histologică este definită ca NI = 0, în timp ce NI ≤ 1 definește răspunsul histologic [19]. Datorită aplicabilității clinice superioare, indicele Nancy a fost comparat cu scorul Geboes pentru a

se dovedi validitatea pe o cohortă mare, în care au fost incluși peste 400 de pacienți [21]. S-a demonstrat că NI prezintă o corelație foarte bună cu GS, ambele scoruri identificând 92% dintre pacienții fiind considerați a fi în remisiune histologică și 99% dintre pacienții cu activitate histologică [21].

1.3 Markeri individuali ai activității histologice

Amplitudinea rolului pe care diferiți markeri histologici îl au asupra rezultatelor clinice a reprezentat subiectul unei review sistematic [22]. Absența neutrofilelor din lamina propria sau epiteliu a prezis un risc mai scăzut de recădere sau exacerbare, cu un risc relativ (RR) de 0.32 [22]. Aceste date sunt în contrast cu analiza post-hoc recent publicată a studiului menționat, în care prezența neutrofilelor în lamina propria nu a influențat prognosticul [23]. Alte caracteristici care au prezis recăderea/exacerbarea au fost abcese criptice, prezența eozinofilelor în lamina propria și infiltratul celular inflamator cronic. Pe de altă parte, absența plasmocitozei bazale, a agregatelor limfoide bazale și a deformării arhitecturii criptelor nu au fost asociate cu scăderea episoadelor de recidivă.

1.4 Concluzii

Luând în considerare dovezile prezentate mai sus, considerăm că o abordare practică ar fi benefică din mai multe perspective. În primul rând, uniformizarea rapoartelor histopatologice, secundară utilizării scorurilor de activitate ar determina o mai bună aderență în practica clinică și ar susține implementarea remisiunii histologice ca obiectiv formal. În al doilea rând, deși scorul Nancy pare a fi cea mai simplistă abordare, s-a dovedit validitatea acestuia în comparație cu scorul Geboes, semnificativ mai complex. În afara scorurilor clinice, unele exhaustive, simpla examinare a statusului neutrofilelor intraepiteliale s-a dovedit a fi precisă în ceea ce privește prognosticul pe termen lung și reprezintă cel mai precis marker histologic independent pentru remisiune. Actualmente, pledăm pentru principiul simplificării în raportarea histologică prin utilizarea scorului Nancy așa cum am procedat și în cadrul studiilor ce vor fi prezentate ulterior sau a caracterizării statusului neutrofilelor intraepiteliale, ca parametru individual de activitate histologică.

2. Studiul prospectiv al evaluării histopatologice în bolile inflamatorii intestinale

2.1 Introducere

Bolile inflamatorii intestinale (BII) prezintă un spectru larg de manifestări clinice și grade diferite de severitate a bolii. Actualizarea consensului STRIDE a propus o abordare temporală cu obiective pe termen scurt, intermediar și lung, vizând un răspuns simptomatic la început și gradual urmărind vindecarea endoscopică [24]. Vindecarea histologică este menționată doar cu grad de recomandare, fără a reprezenta o țintă formală, în special pentru colita ulcerativă [24]. Vindecarea mucoasei are un anumit impact pozitiv asupra ratei recidivelor sau a incidenței spitalizărilor [25] însă este, fără îndoială, un marker imprecis al activității histologice, deoarece mai mult de o treime dintre pacienții cu remisiune endoscopică nu prezintă vindecare microscopică simultană [26]. În același timp, activitatea histologică are cea mai puternică asocieră cu riscul de recidivă clinică [16]. În consecință, unii experți în domeniul BII au afirmat că remisiunea histologică ar trebui să fie considerată un punct final critic în studiile clinice [11]. Acest studiu aprofundează caracterizarea probelor histologice la pacienții cu BII atât înainte, cât și în timpul tratamentului biologic, cu scopul de a evalua impactul asupra evoluției clinice, răspunsului la tratament și managementului terapeutic, precum și corelațiile cu parametrii biochimici și endoscopici.

2.2 Materiale și metode

Acesta este un studiu prospectiv realizat în două centre de referință din România (Spitalul Clinic de Urgență București și Institutul Clinic Fundeni) care evaluează parametrii histologici ai 40 de pacienți cu BII aflați în tratament biologic, în două etape diferite ale evoluției bolii.

- În prima etapă, biopsiile au fost recoltate înainte de introducerea unei terapii biologice (la pacienți biologic-*naivi* sau biologic-*experimentați*).
- În a doua etapă, pacienții au fost reevaluați la 6-12 luni pentru a compara rezultatele histologice. Pentru o evaluare completă, au fost analizați simultan parametrii clinici, biochimici (hemoleucogramă, proteină C reactivă, calprotectină fecală) și endoscopici.

Pacienții au îndeplinit condițiile pentru înrolare atunci când evoluția bolii a impus introducerea unei terapii biologice, ca escaladare de la terapia convențională (pacienți naivi la terapia biologică) sau ca trecerea la o altă clasă din cauza pierderii răspunsului primar/secundar (pacienți expuși la terapie biologică). Rezultatele histopatologice au fost

expuse prin intermediul indicelui Nancy (NI), care este recomandat în practica zilnică datorită acurateții și accesibilității sale [27, 28]. Terapia a fost ghidată în conformitate cu ghidurile actuale publicate de Organizația Europeană de Boală Crohn și Colită Ulcerativă (ECCO) și de Societatea Britanică (BSG) [29,30].

2.3 Rezultate

2.3.1 Inflamația acută

Toți parametrii inflamației acute care au fost evaluați (criptită, abcese și ulcerații) au avut o incidență mai scăzută în grupul de pacienți tratați comparativ cu evaluarea inițială.

Astfel, acumularea neutrofilelor în epiteliul criptelor (criptită) sau ca agregate neutrofilice în lumenul criptelor (abcese criptice), împreună cu pierderea criptelor și înlocuirea acestora cu țesut de granulație imatur sau exudat fibrinopurulent (ulcerație) au fost ameliorate în urma tratamentului (Figura 1 A-E). De asemenea, împreună cu fenomenele inflamatorii acute ale BII, au fost obiectivate depleția de mucină și prezența displaziei (Figura 1F).

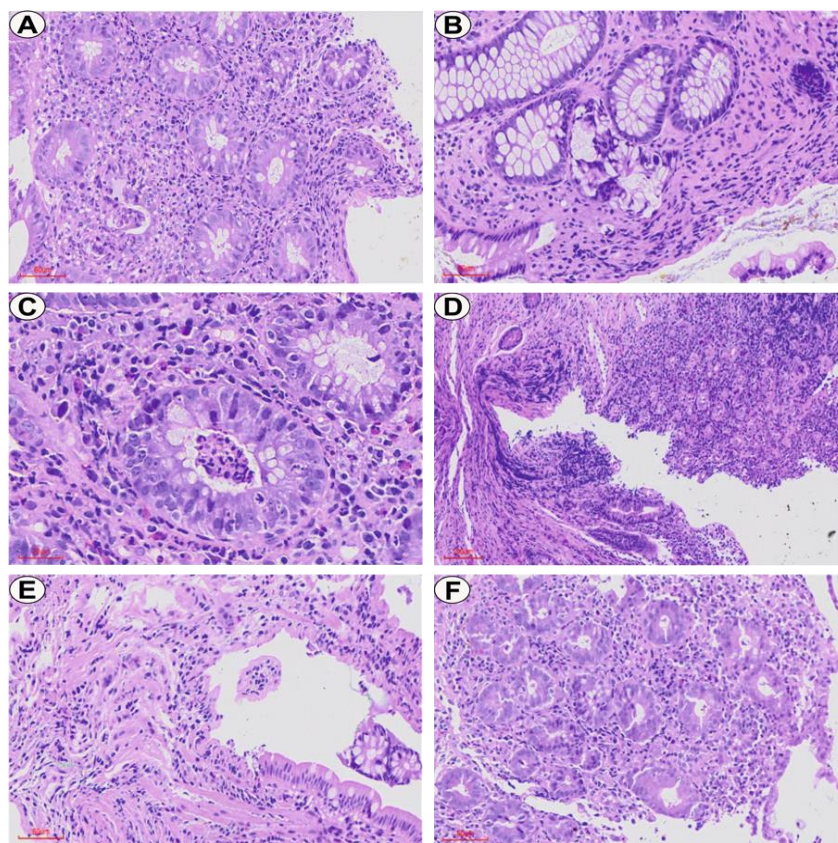


Figura 1. A. CU, înainte de tratament; criptită și abcese criptice, colorație HE, x200. B. CU, același pacient după tratament (6 luni); ameliorare histologică semnificativă (rezoluția criptitei și a abceselor), HE, x200. C. CU, abces criptic, HE, x400. D. BC, înainte de tratament; ulcerație, HE, x100. E. BC, același pacient după tratament (7 luni); fibroză, HE, x100. F. CU, înainte de tratament; depleție de mucină și displazie de grad scăzut, HE, x200.

Cea mai semnificativă ameliorare a fost observată pentru depleția de mucină, cu o scădere procentuală de 57.8% ($p = 0.018$) în evaluarea din etapa a doua. Aceasta a fost urmată de criptită (54.5%), ulceratii (41,1%) și abcese (26.6%). În pofida ameliorării notabile a evaluării histologice, singurul parametru care a atins semnificația statistică a fost depleția de mucină.

2.3.2 Inflamația cronică

Evaluarea cazurilor de boli inflamatorii a obiectivat prezența unor aspecte histopatologice cu trăsături de cronicitate reprezentate de infiltrarea plasmocitară localizată profund în mucoasă, la baza criptelor, astfel acestea nu mai ating musculara mucoasei, apărând de dimensiuni reduse (Figura 2A). S-a remarcat acumularea de celule limfocitare mononucleare cu formarea de agregate limfocitare, unele cu centru germinal (Figura 2 B-C), metaplazia de celule Paneth identificată atât în cazuri de BC cât și CU (Figure 2 D-E), precum și prezența de granuloame în BC (Figura 2F). În toate cazurile s-au observat distorsiuni arhitecturale criptoepiteliale.

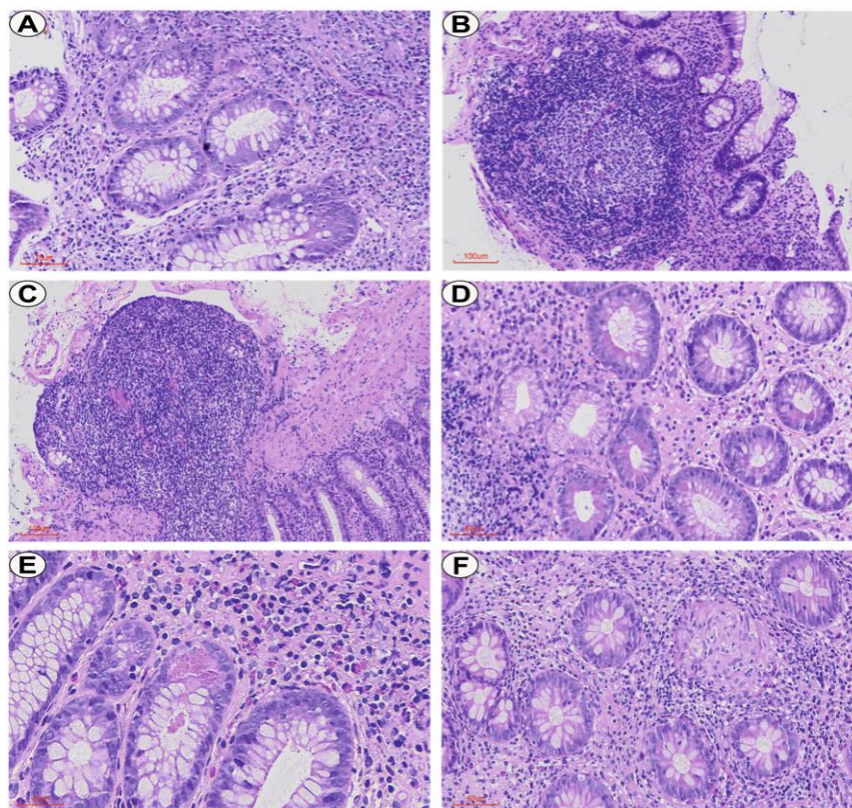


Figura 2. A. CU, plasmocitoză bazală, colorație HE, x200. B-C. CU, agregate limfoide, HE, x100. D. BC, status postoperator; metaplazie Paneth (peri-anastomoză ileo-colică), HE, x200. E. CU, metaplazie Paneth, HE, x400. F. BC, granulom și distorsiune arhitecturală, HE, x200.

Plasmocitoza bazală și modificările metaplazice s-au ameliorat considerabil în timpul evaluării de control, cu o scădere de 83.3%, respectiv 64.2%. Ambii parametri au atins semnificația statistică (Figura 3). La evaluarea agregatelor limfoide nu a fost observată o scădere similară procentual (27.5%). Granuloamele au fost detectate la același număr de pacienți cu BC (10%). Parametrii inflamației acute și cronice cu semnificație statistică sunt prezentați în figura 3.

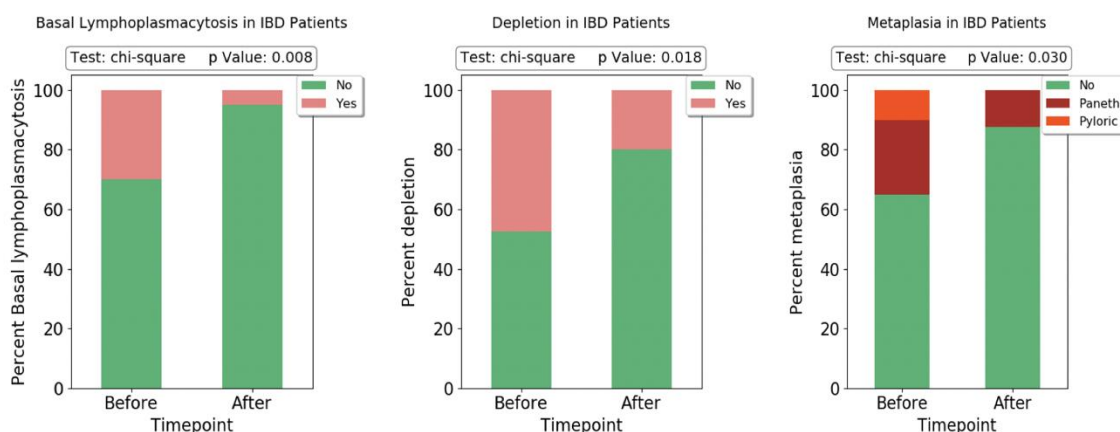


Figura 3. Caracteristici histopatologice cu semnificație statistică ($p < 0.05$) - plasmocitoză bazală, depleție de mucină și modificări metaplazice.

Prin analiza univariată, prezența agregatelor limfoide, a depleției de mucină și a ulcerărilor indică o asociere pozitivă puternică cu răspunsul la tratament (Odds Ratio > 4). La polul opus, pacienții cu un diagnostic de BII > 5 ani și terapie biologică anterioară sunt cei mai susceptibili privind lipsa răspunsului la tratament (OR 0.1 și respectiv 0.23) (Figura 4).

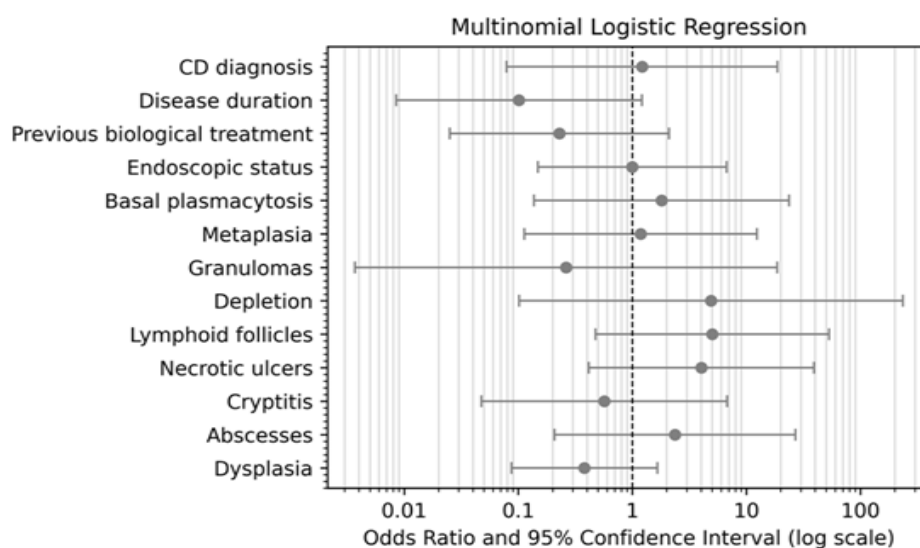


Figura 4. Forest plot exprimând odds ratio pentru răspunsul la terapia biologică.

2.3.3 Indicele Nancy

Fără a cunoaște datele clinice sau endoscopice, medicul anatomopatolog a împărțit pacienții în 2 grupuri, „*responderi*” și „*non-responderi*”. Pacienții au fost clasificați ca „*responderi*” în cazul ameliorării a cel puțin 2 parametri histologici. Analiza statistică evidențiază acuratețea $NI \geq 1$ în definirea responderilor la tratament, în timp ce $NI > 3$ este asociat cu lipsa de răspuns în BII (Figura 5). În afară de indicele Nancy, am evaluat date clinice, biochimice și endoscopice cu scopul de a identifica acuratețea și sensibilitatea fiecărui parametru în predicția răspunsului la tratament. Indicele Nancy este cel mai precis (88%), sensibil (92%) și specific (88%) parametru în identificarea responderilor la tratament. Activitatea endoscopică are o sensibilitate rezonabilă (86%), dar este lipsită de specificitate (60%). La capătul opus al spectrului, activitatea clinică (HBI la pacienții cu CD și, respectiv, cMS la pacienții cu CU) este lipsită atât de sensibilitate, cât și de specificitate (36% și respectiv 66.6%). Surprinzător, calprotectina fecală a avut o sensibilitate mai mică comparativ cu datele din alte studii (60%).

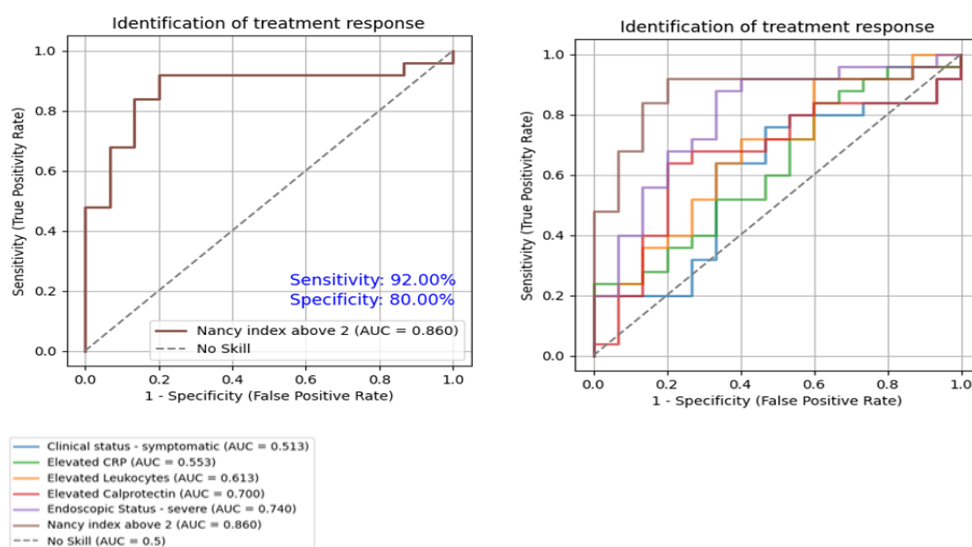


Figura 5. Analiza de regresie logistică, sensibilitatea și specificitatea indicelui Nancy și compararea cu parametri clinici, biochimici și endoscopici.

2.4 Concluzii

Există cateva motive care justifică alegerea noastră de a nu limita analiza histologică doar la un scor histologic, ci a investiga și parametri inflamatori individuali cu caracter acut și cronic. În studiul nostru, plasmocitoza bazală a fost o caracteristică ameliorată considerabil după tratament, în special la pacienții din grupul CU (prezentă în 55% din probe înainte de terapia biologică vs. 10% în timpul monitorizării). Dimensiunile reduse ale agregatelor limfoide în timpul tratamentului au fost de asemenea observate la pacienții

responderi, constatare în concordanță cu o altă cohortă de pacienți tratați cu Vedolizumab [31]. Prezența depleției de mucină a fost semnificativ redusă în probele biopsice obținute după tratament (40% vs 95%). Potrivit lui Villanacci *et al.*, restaurarea completă a expresiei de mucină ar trebui să fie considerată un marker histologic al vindecării mucoasei [32].

Conform analizei univariate, factorii asociați cu răspunsul la tratament au fost reprezentați de depleția pronunțată de mucină, ulceratii și agregate limfoide observate în probele index (înainte de tratament). Studiul subliniază de asemenea importanța indicelui Nancy, care este un instrument mai simplu, dar cu sensibilitate înaltă în evaluarea răspunsului la tratament. Considerăm că ameliorarea histologică a parametrilor individuali ar trebui să fie implementată ca obiectiv pe termen lung în ghidurile viitoare, alături de utilizarea scorului Nancy atât pentru colita ulcerativă, cât și pentru pacienții cu boala Crohn.

3. Analiza imunohistochimică în bolile inflamatorii intestinale - este subestimată importanța interleukinei-10?

3.1 Introducere

Fundamentele fiziopatologice implicate în exacerbarea inflamației prin expresia diferitelor citokine la nivelul mucoasei au evoluat în ultimele decenii. Interleukinele reprezintă o categorie particulară de citokine produse de macrofage, limfocite T, neutrofile, mastocite și celule epiteliale [33, 34]. Citokinele precum TNF- α , IL-1 β și IL-6, pot provoca leziuni tisulare [35-37], în timp ce IL-10 este de obicei recunoscută ca o moleculă antiinflamatorie [34, 38, 39]. Scopul acestui studiu a fost evaluarea prospectivă a parametrilor imunohistochimici ai principalelor citokine inflamatorii implicate în fiziopatologia BII. Literatura de specialitate prezintă o paucitate remarcabilă în ceea ce privește corelațiile imunohistochimice și histologice în probele biopsice de la pacienții cu BII. Prezentul studiu abordează aceste lacune importante, vizând în același timp și potențiala identificarea a unui subset de pacienți cu risc ridicat în funcție de caracteristicile imunohistochimice.

3.2 Materiale și metode

Am efectuat un studiu prospectiv de evaluare a parametrilor imunohistochimici (IHC) pe un lot de 46 de pacienți diagnosticați cu BII, în două etape diferite ale evoluției bolii, cu indicație de tratament biologic din cadrul Spitalului Clinic de Urgență București. În

paralel, un lot control de 10 pacienți "aparent sănătoși", non-BII (cu rezultat colonoscopic normal, prezentați în regim ambulatoriu) a fost de asemenea supus unei analize IHC similare pentru a crește puterea statistică. Cuantificarea manuală a testelor IHC și reproductibilitatea sistemelor de notare sunt foarte subiective [40], astfel că pentru a îmbunătăți acuratețea evaluării imunohistochimice și datorită numeroaselor tipuri celulare potențial secretante de citokine, a fost efectuată și o doua metodă de cuantificare semnificantativă a marcajelor IL-1 β , IL-6, TNF- α și IL-10, bazat pe densitatea optică integrată (IOD). În cazul Ki67 și P53 am utilizat pentru cuantificare indexul de proliferare IP-Ki67 și indexul de pozitivitate IP-P53, obținute prin raportarea celulelor epiteliale pozitive, la numărul total de celule epiteliale pe câmp microscopic de 40x. Pentru fiecare caz au fost numărate celulele pozitive pentru 5 campuri microscopice, care au avut marcajele cele mai mari (hot spot), ulterior media valorilor fiind cea utilizată pentru analiză.

3.3. Rezultate

3.3.1 Analiza imunohistochimică a TNF- α

Marcajele IHC au fost prezente la nivelul celulelor epiteliale (enterocite, celule mucinoase), la nivelul epiteliiilor normale, reactive și displazice, dar și la nivelul elementelor stromale. Cea mai crescută medie a IOD a fost observată în probele la nivelul cărora s-au obiectivat displazie, abcese, depleție de mucină și plasmocitoză bazală (Figura 6).

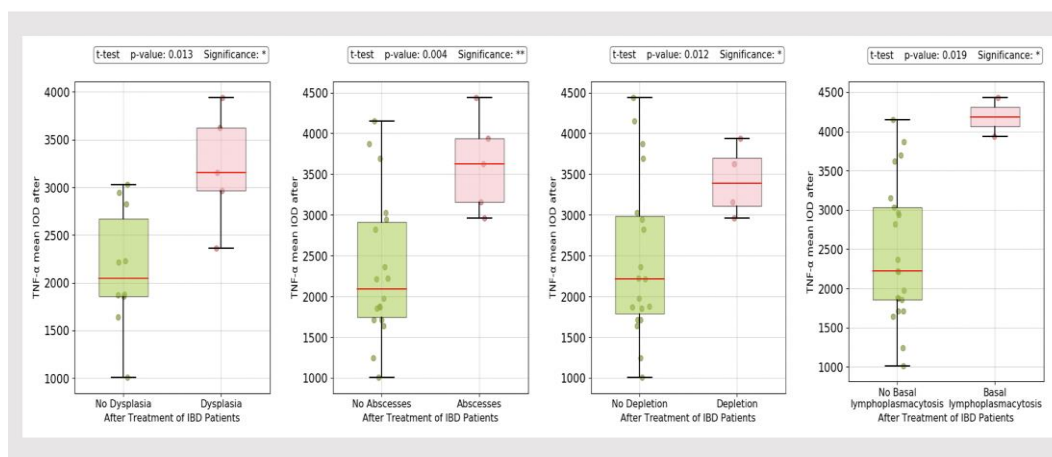


Figura 6. IOD medie a TNF- α la pacienții cu BII (displazie, abcese, depleție de mucină și plasmocitoză bazală).

Grupul nostru a evaluat valoarea IOD medie pentru TNF- α înainte și după tratament la pacienții care au prezentat răspuns la tratament (*responderi*) față de *non-responderi*. Responderii au fost definiți printr-o scădere de ≥ 3 puncte a scorului Mayo (CU) sau o scădere

>2 puncte a indexului Harvey Bradshaw (HBI) față de valorile inițiale (BC), în conformitate cu definițiile utilizate anterior în studiile clinice [41, 42].

În mod relativ surprinzător, compararea imunoexpresiei TNF- α între cele două grupuri nu a condus la diferențe semnificative din punct de vedere statistic, în pofida faptului că grupul *non-responders* a prezentat o valoare TNF- α IOD medie ușor mai crescută înainte de tratament la pacienții cu CU. La pacienții cu BC, diferența a fost aproape neglijabilă. Valorile post-tratament au fost relativ similare în BC (Figura 7).

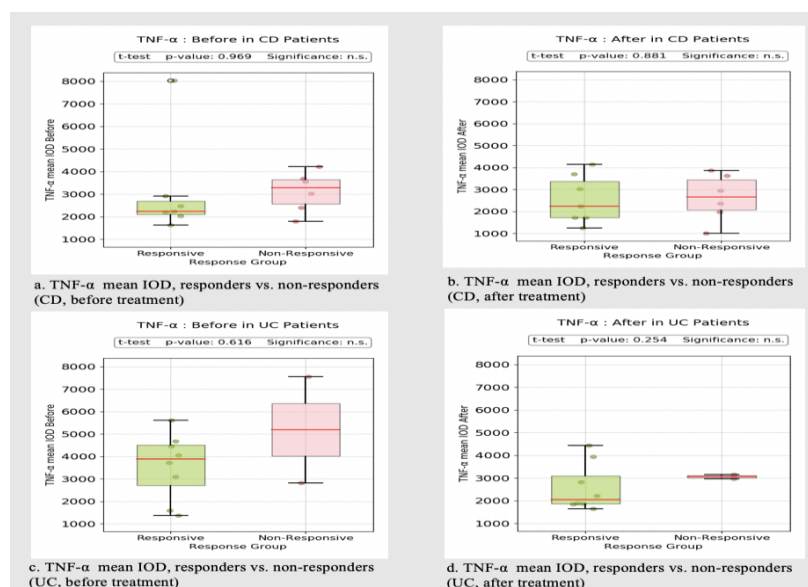


Figura 7. IOD medie pentru TNF- α înainte și după tratament.

O analiză similară în subgrupul de pacienți care a urmat terapie biologică anti-TNF- α (Infliximab și Adalimumab) nu a identificat de asemenea o diferență și nicio variație post-tratament cu impact statistic între *responderi* vs *non-responderi* (Figura 8).

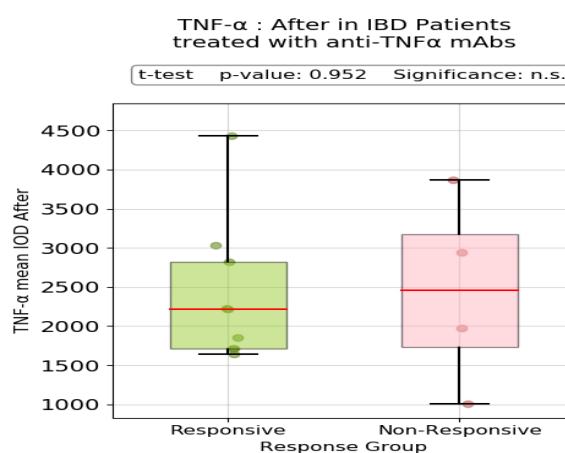


Figura 8. IOD medie pentru TNF- α post-tratament la pacienții tratați cu terapie anti-TNF- α (responders vs. non-responders).

A fost observată o corelație pozitivă ($R = 0.42$, $p = 0.04$) între valoarea calprotectinei și IOD asociat $\text{TNF-}\alpha$ pre-tratament (Figura 9, stânga). O relație similară poate fi observată și între $\text{TNF-}\alpha$ post-tratament și gradul displaziei ($R = 0.55$, $p\text{-valoare} = 0.006$) (Figura 9, dreapta).

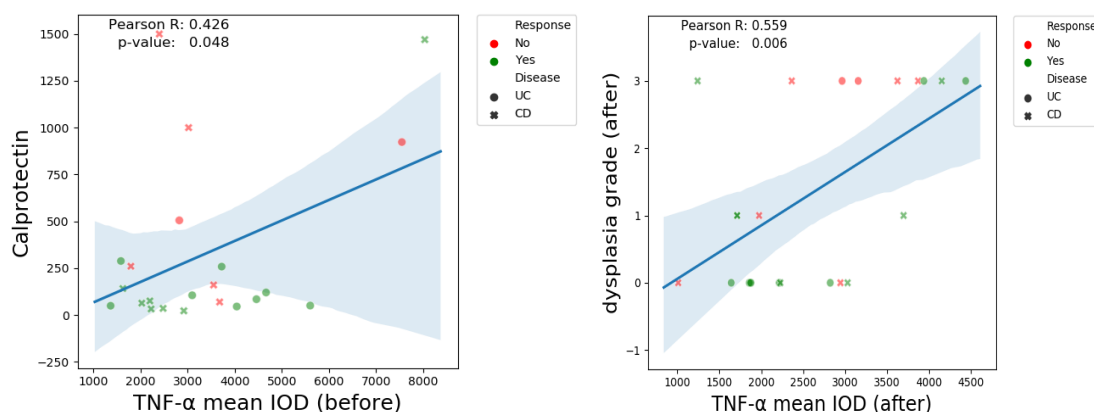


Figura 9. Coeficientul de corelație Pearson a IOD medie între $\text{TNF-}\alpha$ (înainte de tratament) și calprotectina fecală, respectiv gradul displaziei.

3.3.2 Analiza imunohistochimică a Interleukinei-1 β și IL-6

Expresia la nivelul mucoasei a IL-1 β și IL-6 a fost relativ constantă între evaluarea pre- și post-tratament, fără discrepante majore. Valorile IOD medii ale IL-1 β după tratament au avut tendința de a fi ușor mai crescute la pacienții BC fără răspuns terapeutic comparativ cu cei care au răspuns, dar a existat doar o diferență insignifiantă (Figura 10). În același timp, valorile IOD medii în cazul IL-6 au rămas relativ stabile între evaluările pre- și post-tratament atât la pacienții cu BC, cât și în cazul CU (Figura 11).

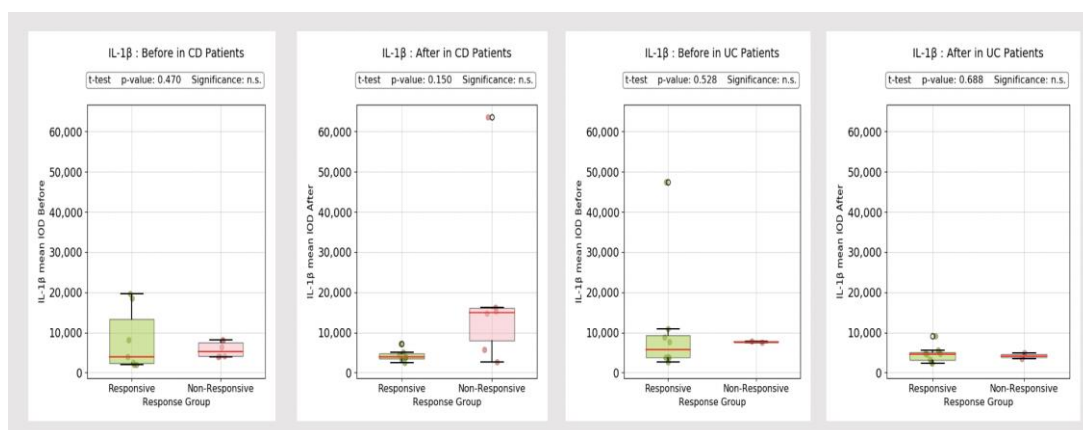


Figura 10. IOD medie pentru IL-1 β (grupul de control vs. grupul BII).

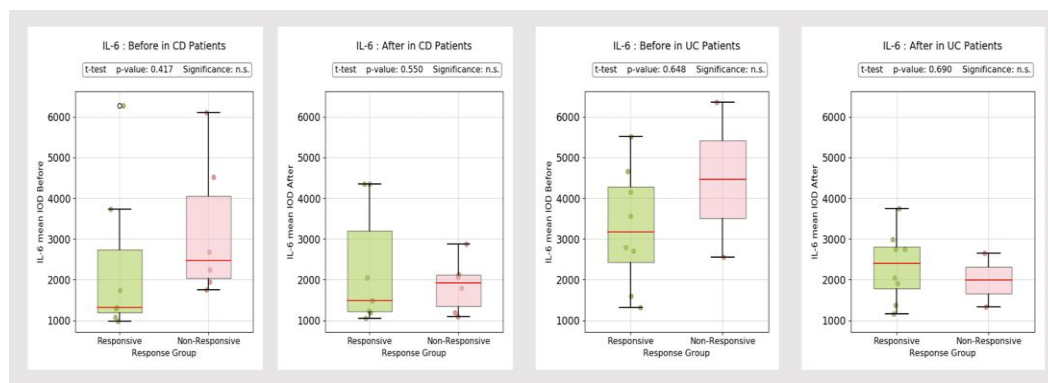


Figura 11. IOD medie pentru IL-6 (grupul de control vs. grupul BII).

3.3.3 Analiza imunohistochimică a Interleukinei-10

Valorile IOD medii ale IL-10 au fost remarcabil mai mari în grupul de control comparativ cu pacienții cu BC și CU (valoare $p = 0.001$) (Figura 12).

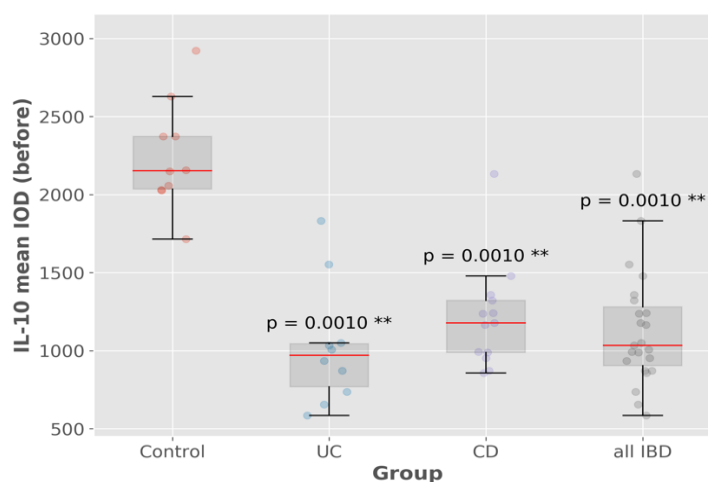


Figura 12. IOD medie a IL-10 (grupul de control vs. grupul BII).

În grupul de pacienți *responders*, IOD medie a IL-10 post-tratament a fost semnificativ mai mare comparativ cu evaluarea index la pacienții cu BC și CU (valoare $p = 0.001$). La pacienții cu BC *non-responders*, valorile IOD au fost relativ similare înainte și după tratament. În cazul grupului CU, valorile IOD au fost ușor mai mari post-tratament deși nu au atins pragul de semnificație statistică (valoare $p = 0.08$) (Figura 13). Valorile IOD medii ale IL-10 înainte de inițierea tratamentului au fost semnificativ mai scăzute la pacienții cu BII care au prezentat răspuns terapeutic față de non-responderi, cu o valoare $p < 0,001$ (figura 14). Nivelul IL-10 pre-tratament se corelează pozitiv în special cu indicele Nancy

post-tratament (valoare $p < 0.001$). Prin urmare, poate reprezenta un indicator util pentru a prezice eșecul terapiei biologice (Figura 15).

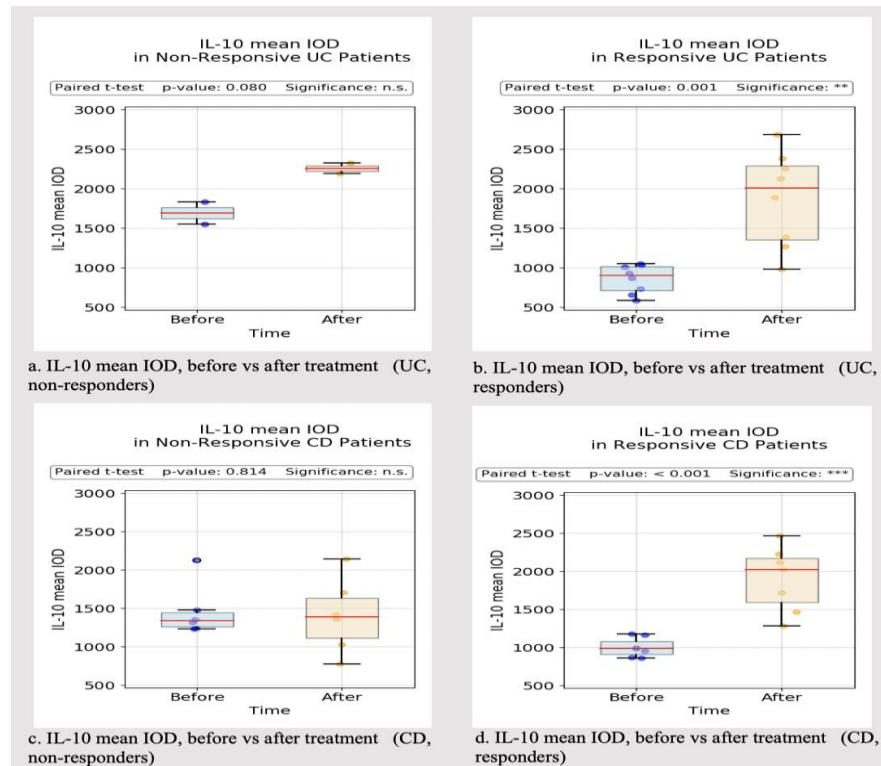


Figura 13. Valorile IOD medii ale IL-10 (pacienți BII responderi vs. non-responderi)

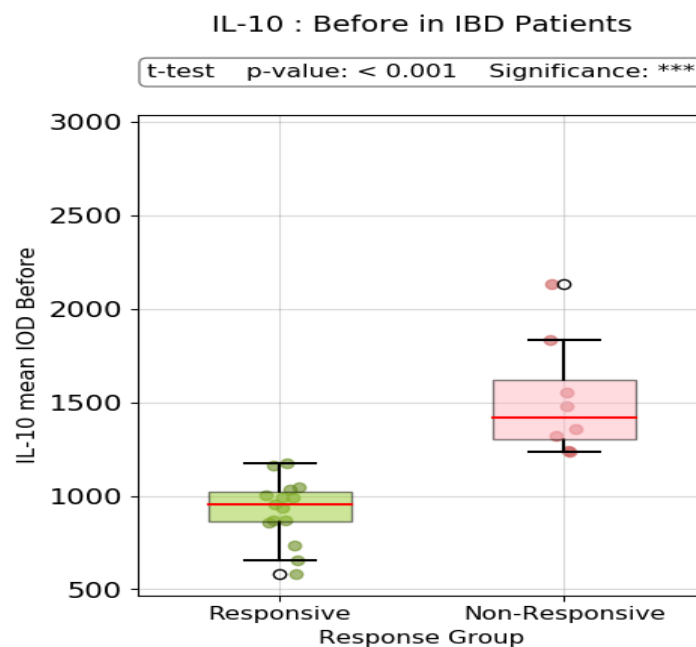


Figura 14. Valorile IOD medii ale IL-10 înainte de tratament (pacienții BII responderi vs. non-responderi)

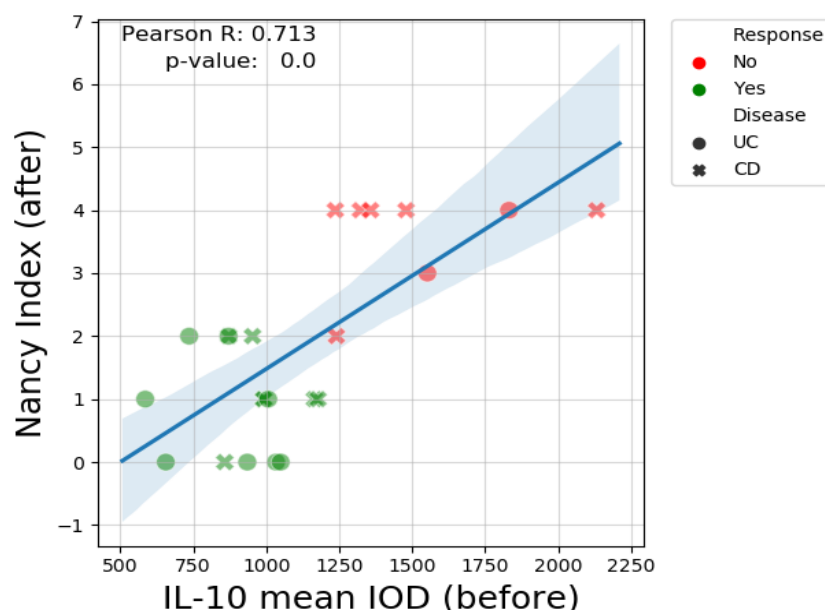


Figura 15. Coeficientul de corelație Pearson, IL-10 pre-tratament și indicele Nancy post-tratament.

3.4 Concluzii

TNF- α este o citokină cu rol central în fiziopatologia BII, iar terapia anti-TNF- α reduce inflamația și ajută la vindecarea mucoasei [43]. În studiul nostru, pacienții din grupul CU au avut o expresie TNF- α mai mare comparativ cu pacienții cu BC. Nu există date clare care să compare nivelul de TNF- α la nivelul mucoasei la pacienții cu CU față de pacienții cu BC, dar analizele anterioare au sugerat că nivelurile TNF- α de la nivelul mucoasei inflamate înainte de inițierea terapiei ar putea prezice răspunsul la tratament, în timp ce nivelurile post-tratament ar putea fi considerate un indice al eficacității tratamentului anti-TNF- α [44, 45, 46]. În studiul nostru, expresia TNF- α a fost semnificativ mai crescută la pacienții din grupul CU comparativ cu pacienții cu BC. Cea mai mare densitate optică integrată a fost observată la pacienții cu displazie, abcese, depleție de mucină și plasmocitoză bazală. *Non-responderii* au prezentat o expresie a TNF- α mai mare înainte și după tratament atât în CU, cât și în BC, comparativ cu *responderii*. În mod contrar, aceeași analiză efectuată în subpopulația tratată cu terapie anti-TNF- α (Infliximab și Adalimumab) nu a evidențiat o diferență substanțială în expresia TNF- α între *responderi* și *non-responderi*. IL-1 β și IL-6 sunt citokine importante cu rol atât în inflamația intestinală, cât și în cancerul colorectal [47]. În grupul nostru de pacienți am observat o corelație pozitivă între valorile IOD medii ale IL-6 și TNF- α . Evaluarea IL-1 β a relatat niveluri similare pre- și post-tratament în CU, în timp ce, pentru pacienții cu BC, valorile post-tratament au fost mai mari la non-responderi.

În contrast cu citokinele inflamatorii prezentate anterior, IL-10 exercită efecte imunosupresoare asupra celulelor dendritice și macrofagelor prin inhibarea rolului lor de a stimula celulele T efectoare [48, 49]. Grupul control a avut niveluri semnificativ crescute ale expresiei IL-10 la nivelul mucoasei comparativ cu pacienții cu BII. În cohorta BII, pacienții *non-responderi* au avut niveluri mai ridicate înainte de tratament în comparație cu cei care au răspuns la tratament. Expresia IL-10 post-tratament în această categorie a fost relativ similară în BC și doar ușor mai crescută în CU, deși acest lucru nu a prezentat semnificație statistică (valoarea $p = 0.08$). În schimb, în grupul de pacienți *responderi*, atât pacienții din cohorta CU, cât și cei cu BC s-a obiectivat pre-tratament o imunopozitivitate IL-10 foarte scăzută și o creștere vizibilă a valorilor IOD post-tratament ($p = 0.001$). A existat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic (valoare $p < 0.001$) în valorile IOD medii ale IL-10 înainte de tratament între *responderi* și *non-responderi* la pacienții cu BII. O observație interesantă poate fi făcută atunci când se evaluează relația dintre valorile IL-10 IOD pre-tratament și indicele Nancy post-tratament. A existat o corelație pozitivă clară (valoarea Pearson $R = 0.71$) între acești doi indici, susținând astfel ideea că expresia imunohistochimică ridicată pentru IL-10 înainte de tratament prezice eșecul terapiei biologice. Practic, o evoluție prelungită a bolii este asociată cu o expresie slabă a IL-10 în probele de biopsie post-tratament, care, cel puțin în studiul nostru, reprezintă o caracteristică a lipsei de răspuns la tratament. Expresia ridicată a interleukinei-10 înainte de tratament este asociată cu eșecul terapiei biologice, cu activitatea inflamatorie histologică și o durată mai lungă a bolii. Aceasta servește drept instrument util pentru identificarea unui subgrup de pacienți cu BII cu risc ridicat care necesită terapii biologice inițiate precoce și pentru orientarea unei strategii de supraveghere intensivă.

4. Rolul chirurgiei în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale în era tratamentului biologic: un studiu multicentric în România

4.1 Introducere

Bolile inflamatorii intestinale sunt afecțiuni idiopatice caracterizate prin activarea cronică și alterarea răspunsului imun de la nivelul tractului digestiv la persoane susceptibile genetic. Deși terapia biologică a devenit un pilon central în managementul acestor afecțiuni odată cu aprobarea de către FDA în 1998 a tratamentului cu Infliximab, aproximativ jumătate dintre pacienți vor necesita tratament chirurgical la 10 ani de la diagnostic și

aproximativ o treime vor suferi o a doua intervenție chirurgicală în următorii 5 ani [50]. În cazul BC, intervențiile chirurgicale sunt în general necesare pentru tratarea complicațiilor (precum stricturile fibroase, afectare perianală), iar în CU chirurgia se impune în cazurile de colită fulminantă refractară la tratamentul medicamentos. Există date contradictorii în ceea ce privește rolul tratamentului biologic în reducerea ratelor de recurență postoperatorie a bolii și necesitatea intervențiilor chirurgicale secundare [51]; unele studii au obiectivat ameliorarea remisiei endoscopice postoperatorii [52], însă alte date nu au evidențiat superioritatea terapiei biologice [53]. Devine astfel necesară analiza obiectivă și elucidarea cauzelor pentru care ponderea efectuării intervențiilor chirurgicale se menține la un nivel crescut, în pofida ameliorării ratelor de vindecare mucosală și histologică. Astfel, ne propunem să identificăm factorii de risc și să analizăm impactul terapiei biologice asociat tratamentului chirurgical în BII.

4.2 Materiale și metode

Studiul este tip cohortă, retrospectiv, multicentric, fiind înrolați pacienți cu BII din trei centre terțiare din București, România (Institutul Clinic Fundeni, Spitalul Clinic de Urgență București și Spitalul Clinic de Urgență Sfântul Ioan). Toate datele au fost colectate retrospectiv din dosarele medicale ale pacienților (spitalizați între ianuarie 2017 și iunie 2021) și au fost păstrate anonime și în conformitate cu Declarația de la Helsinki. Au fost incluși în studiu pacienții cu vârsta mai mare de 18 ani cu diagnostic histopatologic de boală Crohn sau colită ulcerativă care au suferit o intervenție chirurgicală legată de BII. Dintr-un total de 540 de cazuri identificate, au fost incluși 56 de pacienți care au suferit intervenții chirurgicale în perioada menționată. Au fost urmate recomandările ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) și BSG (The British Society of Gastroenterology) în ceea ce privește managementul terapeutic al BII.

4.3 Rezultate

Mai mult de jumătate (66%) dintre pacienții incluși în studiu au fost diagnosticați între 20 și 40 de ani. Această observație ar putea confirma rezultatele studiilor prospective care indică vârstă tânără la diagnostic ca fiind factor predictiv negativ pentru evoluția BII alături de un nivel pre-tratament scăzut al IL-10 [54] precum și pentru necesitatea intervențiilor chirurgicale [55]. Dintre pacienții diagnosticați cu BII, 10.37% (56/540) au necesitat cel puțin o intervenție chirurgicală pe parcursul evoluției bolii. Majoritatea pacienților (45 de pacienți, 80.35%) care au suferit intervenții chirurgicale erau cunoscuți cu

BC. În ceea ce privește fenotipul bolii, aproape jumătate dintre pacienții cu BC operați (22/45 pacienți, 48.8%) au prezentat afectare ileocolonică (L3 Montreal), urmată de afectarea colonică (16 pacienți, 35.5%) și ileală (7 pacienți, 15.5%). Cel mai frecvent comportament al BC a fost cel stenoizant (55%), urmat de boala penetrantă (45%); aproape o treime din ultimul subgrup a asociat afectare perianală. Conform așteptărilor, majoritatea pacienților cu diagnostic de CU care au fost supuși unei intervenții chirurgicale prezentau afectare extinsă (pancolită/E3 Montreal) (7/11 pacienți, 63.6%). Un singur pacient a prezentat afectare limitată (proctită). În mod similar, date din Elveția indică OR de 2.5 pentru intervenția chirurgicală la pacienții cu afectare extinsă [54]. S-a demonstrat în contrapondere rolul benefic al răspunsului la tratament în cazul pacienților cu depleție de mucină, ulceratii și agregate limfoide [55].

Vârsta medie a pacienților care au suferit intervenții chirurgicale a fost de 35.1 ± 13.3 ani. Media de diagnostic a BII a fost de 32.6 ± 13.3 ani, astfel că a existat un interval < 3 ani între diagnostic și momentul primei intervenții chirurgicale. În plus, jumătate dintre intervențiile chirurgicale au fost efectuate în primul an de la diagnostic. Dintre intervențiile chirurgicale, mai mult de jumătate (51.8%) au fost efectuate în regim de urgență, iar 48.2% în regim elective. Cea mai frecventă indicație de intervenție chirurgicală a fost reprezentată de ocluzia intestinală (44%) - stenozele ileonului terminal și ale valvei ileocecale au fost cele mai frecvente situsuri ale obstrucției (64%), urmate de colonul sigmoid (16%), ileocolon (12%) și jejun (4%). Stenoze multiple au fost obiectivate la un singur pacient (4%). Perforația, colita fulminantă și formarea de fistule/abcese se situează pe locul al doilea ca frecvență pentru efectuarea intervenției chirurgicale în urgență, reprezentând un total de 40%.

Toate perforațiile (8/8) au fost înregistrate la pacienți cu BC cu fenotip stenoizant și penetrant. Două dintre acestea cazuri au prezentat caracter iatrogenic, după dilatare endoscopică cu balon a unor stenoze la pacienți cu afectare ileo-colonică. În ambele cazuri, s-a efectuat colectomie segmentară cu formarea unei stome iar rezultatul postoperator a fost unul favorabil. În cazul CU, colita fulminantă a fost raportată la 8 pacienți. Este important de menționat faptul că pentru majoritatea pacienților (6/8) se inițiasse tratament biologic anti-TNF înainte de apariția complicației. Tratamentul chirurgical a fost reprezentat de colectomia subtotală sau proctocolectomie cu ileostomie. Rata mortalității a fost de 1.8% (1 caz). Decesul raportat a fost cauzat de peritonita generalizată prin perforația unei mase inflamatorii de la nivelul ileonului terminal al unui pacient cunoscut cu BC. Se remarcă faptul că pacienții cu terapie biologică inițiată înainte de intervenția chirurgicală au avut o

vârstă medie mai mică la momentul diagnosticării BII ($p = 0.005$) și de asemenea și la momentul efectuării intervenției chirurgicale ($p = 0.005$). În plus, am identificat un număr semnificativ mai mare de pacienți cu BC fără terapie biologică preoperatorie care au necesitat intervenție chirurgicală; la spectrul opus, în CU majoritatea pacienților au fost refractari la terapia biologică și au fost supuși ulterior intervenției chirurgicale ($p = 0.016$). În mod surprinzător, nu au existat diferențe semnificative statistic între cele trei grupuri în ceea ce privește fenotipul BII, manifestările extraintestinale, tipul intervenției chirurgicale și complicațiile postoperatorii.

Am comparat, de asemenea, variabilele menționate anterior între pacienții cu BC și CU (Tabelul 1). Constatarea semnificativă din punct de vedere statistic ($p < 0.001$) a fost asocierea fenotipului BII cu o implicare ileocolonică în BC (L3) și a CU extinse (E3) cu risc riscul crescut de intervenție chirurgicală. Momentul inițierii tratamentului biologic, tipul de intervenție chirurgicală (electivă/urgentă) și complicațiile postoperatorii nu par să influențeze rata intervențiilor chirurgicale între cele două grupuri.

Tabelul 1. Compararea subgrupurilor BC și CU.

Variabila	BC (n=45)	CU (n =11)	Valoare <i>p</i>
Sex (M/F (%))	51.1/ 48.9%	54.5/ 45.5%	0.838
Vârstă (medie $\pm$ DS)	32.44 $\pm$ 14.41	33.55 $\pm$ 8.11	0.809
Vârsta la momentul intervenției (medie $\pm$ DS)	35.09 $\pm$ 14.48	35.64 $\pm$ 8.04	0.905
Fumător (da/nu)	13.3/ 86.7	0/ 100%	0.334
Tratament biologic (da/nu)	80/ 20%	90.9/ 9.1%	0.667
Momentul inițierii tratamentului biologic (< 3 luni / > 3 luni)	41.7/ 58.3%	60/ 40%	0.475
Fenotipul BII			
L1/L2/L3	15.5/ 35.5/ 48.89%	/	<0.001
E1/E2/E3	/	9.1/ 27.3/ 63.6%	
Manifestări extraintestinale (da/nu)	22.2 / 78.8%	9.1/ 90.9%	0.434

Tipul operației (electivă/în urgență)	48.9/ 51.1%	45.5/ 54.5%	0.883
Complicații postoperatorii precoce (da/nu)	20/ 80%	18.2/ 81.8%	0.631
Complicații postoperatorii tardive (da/nu)	12/33 (26.7/73.3%)	36.4/ 63.6%	0.711

4.4 Concluzii

Există câteva observații care ar putea explica rata mai scăzută a intervențiilor chirurgicale în studiul actual. În primul rând, intervalul de analiză retrospectivă a fost mai scurt pentru cohorta noastră (60 de luni) comparativ cu studiile menționate anterior. În al doilea rând, a existat un răspuns eficient al Infliximab pentru vindecarea fistulelor (în 70% din cazuri s-a observat închiderea fistulei într-o perioadă medie de timp de 12 săptămâni). În al treilea rând, în aproximativ 20% din cazuri a fost preferată o abordare terapeutică intensivă, cu inițierea precoce a terapiei biologice (*top-down approach*) la pacienții cu boală inflamatorie cu factori de risc pentru o evoluție potențial agresivă. Există date care indică faptul că introducerea precoce a tratamentului biologic poate ameliora răspunsul terapeutic printr-o remisiune mai rapidă, prin scăderea necesarului de corticosteroizi și prin reducerea sau întârzierea necesității unei intervenții chirurgicale.

Cu toate acestea, a fost observată o rată ridicată de intervenții chirurgicale în primul an de la diagnostic, aproximativ jumătate fiind efectuate în acest interval. Au fost analizate datele pacienților, iar vârsta tânără la diagnostic, implicarea ileală și semnele clinice/endoscopice de modificări stenoizante au fost principalii factori care au contribuit la evoluția fulminantă a bolii. Se remarcă o rata crescută a complicațiilor postoperatorii, în principal legate de stomă. Aceasta ar putea fi determinată de faptul că aproape jumătate dintre intervențiile chirurgicale (48%) au fost efectuate în regim de urgență (<48-72 h de la prezentarea la camera de gardă). Comparativ cu alte studii, numărul intervențiilor chirurgicale în regim de urgență a fost semnificativ mai mare. În studiul nostru terapia biologică a fost inițiată înainte de momentul operator la doar 28.5% dintre pacienți, comparativ cu 53.5% după operație. Este justificată astfel întrebarea dacă inițierea timpurie a terapiei biologice ar fi adus un beneficiu suplimentar. Infliximab și Adalimumab au reprezentat agenții biologici cel mai frecvent utilizați. Conform ghidurilor AGA (American Gastroenterological Association) inițierea precoce a terapiei biologice în termen de 8 săptămâni după operație este considerată sigură și benefică [56]. Studiul de față a arătat

faptul că terapia biologică nu a avut un impact semnificativ statistic asupra tipului de intervenție chirurgicală (în urgență vs. electivă) și nu a avut nicio influență în ceea ce privește complicațiile postoperatorii precoce sau tardive.

În concluzie, managementul pacienților cu boală inflamatorie intestinală este de înaltă complexitate, cu anumite particularități individuale care impun adesea o abordare multidisciplinară. Evoluția imprevizibilă a bolii și eforturile clinicienilor pentru menținerea remisiunii endoscopice/histologice pe termen lung stă la baza dezvoltării de molecule terapeutice noi. Este esențial să identificăm factorii de prognostic negativ care pot conduce la un comportament agresiv al bolii și, nu în ultimul rând, stabilirea indicațiilor și a momentului oportun de inițiere a terapiei biologice și al intervenției chirurgicale pentru a asigura cea mai bună îngrijire medicală pentru pacienți.

5. Concluzii și contribuții personale

5.1 Concluzii

Bolile inflamatorii intestinale au cunoscut cel mai semnificativ progres în domeniul terapeutic dintre patologiiile gastrointestinale din ultimele două decade, beneficiind de apariția a numeroase molecule cu acțiune concertată asupra principalelor citokine implicate în fiziopatogenia lanțului imunogenic. În paralel, țintele terapeutice au căpătat gradual un caracter stringent, fiind intens dezbătut beneficiul remisiunii histologice.

Inducția și menținerea remisiunii bolii rămân componente esențiale ale managementului terapeutic, alături de strategia de monitorizare. Ameliorarea recăderilor s-a remarcat în cazul unei determinări seriate de markeri inflamatori (calprotectină și proteina C reactivă), cu escaladarea terapiei (*step-up*) în cazul elevării acestora chiar și sub persistența semnelor de remisiune clinică. Absența remisiunii microscopice reprezintă un marker de vindecare incompletă ce predispune la pierderea răspunsului terapeutic. În contrapondere, sunt discutabile cost-eficiența și riscurile adverse asociate expunerii unor succesiuni de molecule biologice în cazul în care pragul de switch terapeutic ar fi reprezentat de obținerea remisiunii histologice complete. Astfel, au existat nuanțări care invocă o abordare axată asupra fenomenului de "ameliorare histologică", cu analiza individuală și compararea temporală între parametri histopatologici cu caracter inflamator. Considerăm că aceasta reprezintă un compromis optim privind prognosticul pe termen lung și a reprezentat una dintre temele abordate în cadrul lucrării curente. Anumiți parametri precum plasmocitoza

bazală nu sunt componente ale scorurilor histologice, însă au dovedit o asociere clară cu riscul de recidivă clinică. În cadrul studiului nostru, plasmocitoza bazală, agregatele limfoide și depleția de mucină au reprezentat modificările histopatologice cu cea mai importantă ameliorare în urma tratamentului biologic la pacienții cu răspuns clinic și biologic. Am pledat de asemenea pentru simplificare și uniformizare în raportarea rezultatelor histopatologice, existând discrepanțe majore la nivel global privind practica curentă. Considerăm că scorul Nancy reprezintă o abordare practică și în pofida simplității a fost dovedită validitatea în comparație cu scorul Geboes și îndeplinește criteriile necesare pentru utilizarea de rutină în colita ulcerativă, dar și în boala Crohn.

Absența remisiunii endoscopice și histologice sunt responsabile pentru persistența ratelor crescute de intervenții chirurgicale, astfel că ne-am propus să realizăm unul dintre puținele studii din România care investighează caracteristicile clinice, biologice și terapeutice ale acestei subpopulații refractare la terapia biologică. Majoritatea intervențiilor chirurgicale au fost efectuate în primul an de la diagnostic, fiind aduse în discuție drept posibile explicații latență diagnostică precum și temporizarea primei evaluări medicale în cazul pacienților cu debut insidios. Nu a fost identificată o relație cauză-efect între terapia biologică și complicațiile postoperatorii, acestea din urmă fiind corelate mai degrabă cu intervențiile efectuate în regim de urgență.

Un alt punct major de interes al tezei de doctorat a fost reprezentat de dinamica alterării expresiei imunohistochimice a principalelor citokine implicate în bolile inflamatorii intestinale, precum și identificarea unor markeri cu rol prognostic. Imunoexpresia citokinelor inflamatorii a fost urmărită înainte și după efectuarea tratamentului biologic, fiind realizate teste comparative și între subgrupurile de pacienți responderi și non-responderi. Contrar cu datele din literatură prezentate anterior care au sugerat că nivelurile TNF- α de la nivelul mucoasei înainte de inițierea terapiei ar putea prezice răspunsul la tratament, în timp ce nivelurile post-tratament sunt considerate un indice al eficacității tratamentului anti-TNF- α , nu am identificat în studiul curent diferențe care să atingă pragul de semnificație statistică între pacienții responderi și non-responderi și nici între subgrupurile de pacienți care au urmat terapie de tip anti-TNF- α în raport cu celelalte clase de molecule biologice.

Analiza imunohistochimică a IL-10 a obiectivat un nivel semnificativ mai crescut al expresiei în grupul de pacienți control comparativ cu BII. În cadrul cohortei BII, pacienții non-responderi au prezentat pre-tratament un nivel semnificativ mai ridicat în raport cu pacienții care au prezentat răspuns terapeutic. În grupul de pacienți responderi s-a obiectivat

pre-tratament imunopozitivitatea foarte scăzută a IL-10 și o creștere marcată a valorilor IOD post-tratament. Astfel, un nivel ridicat al IL-10 înainte de inițierea tratamentului reprezintă un factor de prognostic negativ pentru evoluția pacientului cu boală inflamatorie. Am obiectivat de asemenea o corelație pozitivă între valoarea IOD a IL-10 pre-tratament și indicele Nancy post-tratament, fiind astfel confirmat rolul prognostic negativ al imunoexpresiei ridicate a IL-10. În același timp, o evoluție îndelungată a bolii este asociată cu un nivel scăzut al IOD IL-10 post-tratament, ceea ce reprezintă în lotul nostru de studiu o caracteristică a lipsei de răspuns la tratament. Datele actuale indică evoluția lungă a bolii drept factor predictiv negativ în BC și CU, iar expresia IL-10 ar putea constitui una dintre explicațiile imunopatogenice.

5.2 Contribuții personale

- Studiul nostru a aprofundat analiza imunohistochimică a markerilor inflamatori, cu scopul de a evalua prospectiv impactul terapiei biologice în timpul tratamentului și de a identifica markeri cu rol prognostic/predictivi ai răspunsului la tratament. Valorile medii ale IL-10 la momentul evaluării index (înainte de inițierea tratamentului biologic) au fost semnificativ mai scăzute la pacienții care au prezentat răspuns clinic și biologic, comparativ cu non-responderii. Astfel, expresia ridicată a interleukinei-10 înainte de tratament este asociată cu eșecul terapiei biologice, cu activitatea inflamatorie histologică și o durată mai lungă a bolii. Aceasta servește drept instrument util pentru identificarea unui subgrup de pacienți cu BII cu risc ridicat care necesită terapii biologice inițiate precoce și pentru orientarea unei strategii de supraveghere intensivă. Aceste date pot fi extrapolate în viitoare studii multicentrice pentru a identifica noi markeri de prognostic la tratament.
- În studiul actual, supraexpresia indicelui de pozitivitate p53 și a indicelui de proliferare Ki-67 a fost observată la pacienții cu displazie, abcese și depleție de mucină, cu o diferență semnificativă între pacienții *responderi* la tratament și *non-responderi*. Considerăm că pacienții cu reactivitate imunohistochimică marcată a p53 și Ki-67 ar trebui să urmeze un protocol strict de supraveghere, chiar și în absența altor factori considerați în mod tradițional cu risc ridicat pentru CCR (colita extinsă, istoricul familial de CCR).
- Datele din studiul curent infirmă alte ipoteze prezentate anterior care menționează un potențial rol prognostic al imunoexpresiei mucoale TNF- α pre- și post-tratament; nu am identificat diferențe statistice între pacienții *responderi* și *non-responderi*. De

asemenea, absența unui prag de semnificație a fost observată și între subgrupurile de pacienți cu terapie țintită anti-TNF- α în raport cu terapiile de tip anti-interleukină, inhibitorii JAK sau anti-integrină.

- Complexitatea scorurilor histologice reprezintă o barieră în implementarea remisiunii histologice drept obiectiv pe termen lung. În opinia noastră, indicele Nancy ar putea fi implementat mai ușor în practica curentă. Studiul axat asupra analizei histopatologice înainte și după terapia biologică dovedește acuratețea acestuia în evaluarea răspunsului la tratament, obținând cel mai înalt scor în ceea ce privește acuratețea, sensibilitatea și specificitatea.
- Pledăm pentru implementarea pe scară largă a conceptului de "ameliorare histologică", întrucât acesta reprezintă în opinia noastră un raport echitabil între prognosticul pe termen lung și o expunere excesivă la multiple linii de terapii biologice, în cazul unor pacienți care nu îndeplinesc rigurozitatea conceptului de vindecare histologica completă. În cadrul cercetării curente, anumite trăsături histologice individuale precum depleția de mucină, agregatele limfoide și ulcerările pot prezice răspunsul la tratament. Se confirmă astfel importanța evaluării prospective a parametrilor histologici individuali care poate conduce la o abordare mai practică și mai facilă de implementat în practica generală.
- Absența remisiunii endoscopice/histologice crește riscul intervențiilor chirurgicale, astfel că am considerat necesar să realizăm analiza unui lot de pacienți cu istoric chirurgical. Am identificat un număr semnificativ mai mare de pacienți cu BC fără terapie biologică preoperatorie care au necesitat intervenție chirurgicală; în contrapondere, în CU majoritatea pacienților au fost refractari la terapia biologică și au fost supuși ulterior intervenției chirurgicale, fără a exista însă o diferență semnificativă a terapiei biologice între momentul pre- și post-operator. Nu a fost obiectivată nicio influență a terapiei biologice în ceea ce privește fenotipul BII, manifestările extraintestinale sau tipul intervenției chirurgicale (de urgență/electivă). Complicațiile postoperatorii tind de asemenea să aibă mai curând legătură cu operațiile efectuate în regim de urgență; terapia biologică nu a avut un impact semnificativ statistic.

BIBLIOGRAFIE

1. Manrai, M.; Jha, A.A.; Dawra, S.; Pachisia, A.V. Biologics, Small Molecules and More in Inflammatory Bowel Disease: The Present and the Future. *Future Pharmacol.* 2024, 4, 279-316. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol4010017>
2. Goldiș A, Lupușoru R, Gheorghe L, Gheorghe C, Trifan A, Dobru D, Cijevski C, Tanțău A, Constantinescu G, Iacob R, Goldiș R, Diculescu M. Geographic Distribution, Phenotype and Epidemiological Tendency in Inflammatory Bowel Disease Patients in Romania. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Oct 20;55(10):704. doi: 10.3390/medicina55100704. PMID: 31635181; PMCID: PMC6843626.
3. Höie O , Wolters F , Riis L , et al Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1692–701.doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01265.x
4. Mitrev N, Vande Casteele N, Seow CH, IBD Sydney Organisation and the Australian Inflammatory Bowel Diseases Consensus Working Group. Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Dec;46(11-12):1037-1053.
5. A.D. Frolkis, Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology* 2013 Nov;145(5):996-1006. doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.041.Epub 2013 Jul 27.
6. Asher Kornbluth, Infliximab Approved for Use in Crohn's Disease: A Report on the FDA GI Advisory Committee Conference, *Inflammatory Bowel Diseases*, Volume 4, Issue 4, 1 November 1998, Pages 328–329, <https://doi.org/10.1097/00054725-199811000-00014>
7. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2462-76. doi: 10.1056/NEJMoa050516
8. Christian Maaser, Andreas Sturm, Stephan R Vavricka, Torsten Kucharzik, Gionata Fiorino, Vito Annese, Emma Calabrese, Daniel C Baumgart, Dominik Bettenworth, Paula Borralho Nunes, Johan Burisch, et al. , ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 13, Issue 2, February 2019, Pages 144–164K, <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy113>
9. Chen, X., Xiang, X., Xia, W. et al. Evolving Trends and Burden of Inflammatory Bowel Disease in Asia, 1990–2019: A Comprehensive Analysis Based on the Global Burden of Disease Study. *J Epidemiol Glob Health* (2023). <https://doi.org/10.1007/s44197-023-00145-w>
10. Sleisenger and Fordtran's, *Gastrointestinal and Liver Disease* 11 edition. Epidemiology, pathogenesis and diagnosis of inflammatory bowel diseases, Chapter 115, Pages 1868-1897.

- 11 Korelitz BI. Mucosal healing as an index of colitis activity: back to histological healing for future indices. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1628–1630.
- 12 Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;32:174–178.
- 13 Travis SPL, Higgins PDR, Orchard T, et al. Review article: defining remission in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:113–124.
- 14 Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 2007;133:1099–1105.
15. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D'Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM, Bettenworth D, Sandborn WJ, Sands BE et al. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology*. 2021 Apr;160(5):1570-1583. doi: 10.1053/j.gastro.2020.12.031.
16. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Diamond R, Rutgeerts P, Tang LK, Cornillie FJ, Sandborn WJ. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut*. 2014;63:88–95.
- 17 Jharap B, Sandborn WJ, Reinisch W, D'Haens G, Robinson AM, Wang W, Huang B, Lazar A, Thakkar RB, Colombel JF. Randomised clinical study: discrepancies between patient-reported outcomes and endoscopic appearance in moderate to severe ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42:1082–1092
18. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, Stokkers P, Hommes D, Rutgeerts P, Vermeire S, D'Haens G Belgian Inflammatory Bowel Disease Research Group; North-Holland Gut Club. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2010;138:463–468
19. Moriichi K, Fujiya M, Okumura T. The endoscopic diagnosis of mucosal healing and deep remission in inflammatory bowel disease. *Dig Endosc*. 2021 Nov;33(7):1008-1023. doi: 10.1111/den.13863. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33020947.
20. Alipour O, Gualti A, Shao L, Zhang B. Systematic review and meta-analysis: real-world data rates of deep remission with anti-TNF α in inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol*. 2021 Aug 3;21(1):312. doi: 10.1186/s12876-021-01883-6. PMID: 34344314; PMCID: PMC8335971.
21. Ungaro RC, Yzet C, Bossuyt P, Baert FJ, Vanasek T, D'Haens GR, Joustra VW, Panaccione R, Novacek G, Reinisch W, Armuzzi A, Golovchenko O, Prymak O, Goldis A, Travis SP, Hébuterne X, Ferrante M, Rogler G, Fumery M, Danese S, Rydzewska G, Pariente B, Hertervig E, Stanciu C, Serrero M, Diculescu M, Peyrin-Biroulet L, Laharie D, Wright JP, Gomollón F, Gubonina I, Schreiber S, Motoya S, Hellström PM, Halfvarson J, Butler JW, Petersson J, Petralia F, Colombel JF. Deep Remission at 1 Year Prevents

Progression of Early Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):139-147. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.039. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224129; PMCID: PMC7751802.

22. Leung CM, Tang W, Kyaw M, Niamul G, Aniwaniwan S, Limsrivilai J, Wang YF, Ouyang Q, Simadibrata M, Abdullah M, Ong DE, Yu HH, Zhang J, Ching J, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Ng SC. Endoscopic and Histological Mucosal Healing in Ulcerative Colitis in the First Year of Diagnosis: Results from a Population-based Inception Cohort from Six Countries in Asia. *J Crohns Colitis*. 2017 Dec 4;11(12):1440-1448. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx103. PMID: 28961760.

23 Villanacci V, Antonelli E, Geboes K, Casella G, Bassotti G. Histological healing in inflammatory bowel disease: a still unfulfilled promise. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 21;19(7):968-78. doi: 10.3748/wjg.v19.i7.968. PMID: 23467585; PMCID: PMC3582008.

24 Villanacci V, Del Sordo R, Mino S, Locci G, Bassotti G. Histological healing in IBD: Ready for prime time? *Dig Liver Dis*. 2025 Jan 18:S1590-8658(25)00040-4. doi: 10.1016/j.dld.2025.01.039. Epub ahead of print. PMID: 39828441.

25. Kellermann L, Riis LB. A close view on histopathological changes in inflammatory bowel disease, a narrative review. *Dig Med Res* 2021;4:3.

26. Lang-Schwarz C, Agaimy A, Atreya R, Becker C, Danese S, Fléjou JF, Gäßler N, Grabsch HI, Hartmann A, Kamarádová K, Köhl AA, Lauwers GY, Lugli A, Nagtegaal I, Neurath MF, Oberhuber G, Peyrin-Biroulet L, Rath T, Riddell R, Rubio CA, Sheahan K, Tilg H, Villanacci V, Westerhoff M, Vieth M. Maximizing the diagnostic information from biopsies in chronic inflammatory bowel diseases: recommendations from the Erlangen International Consensus Conference on Inflammatory Bowel Diseases and presentation of the IBD-DCA score as a proposal for a new index for histologic activity assessment in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch*. 2021 Mar;478(3):581-594.

27. Laterza L, Piscaglia AC, Minordi LM, et al. Multi-parametric evaluation predicts different mid-term outcomes in Crohn's disease. *Dig Dis* 2018;36:184–193.

28. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Apr;8(4):357-63. doi: 10.1016/j.cgh.2010.01.001. Epub 2010 Jan 21. PMID: 20096379.

29. Freeman HJ. Use of the Crohn's disease activity index in clinical trials of biological agents. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul 14;14(26):4127-30. doi: 10.3748/wjg.14.4127. PMID: 18636655; PMCID: PMC2725371.

30. Best WR. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Apr;12(4):304-10. doi: 10.1097/01.MIB.0000215091.77492.2a. PMID: 16633052.

31. Canales-Herrerias P, Uzzan M, Seki A, Czepielewski RS, Verstockt B, Livanos A, Raso F, Dunn A, Mehandru S. Gut-associated lymphoid tissue attrition associates with response

to anti- $\alpha 4\beta 7$ therapy in ulcerative colitis. *bioRxiv* [Preprint]. 2023 Jan 20:2023.01.19.524731. doi: 10.1101/2023.01.19.524731. Update in: *Sci Immunol*. 2024 Apr 19;9(94):eadg7549. doi: 10.1126/sciimmunol.adg7549.

32. Leoncini, G.; Cari, L.; Ronchetti, S.; Donato, F.; Caruso, L.; Calafà, C.; Villanacci, V. Mucin Expression Profiles in Ulcerative Colitis: New Insights on the Histological Mucosal Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1858. <https://doi.org/10.3390/ijms25031858>

33. Vebr, M.; Pomahačová, R.; Sýkora, J.; Schwarz, J. A Narrative Review of Cytokine Networks: Pathophysiological and Therapeutic Implications for Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Biomedicines* 2023, 11, 3229

34. Kany, S.; Vollrath, J.T.; Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 6008

35. Torres, J.; Mehandru, S.; Colombel, J.F.; Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *Lancet* 2017, 389, 1741–1755

36. Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014, 14, 329–342

37. Saravia, J.; Chapman, N.M.; Chi, H. Helper T cell differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* 2019, 16, 634–643

38. Yang, W.; Liu, H.; Xu, L.; Yu, T.; Zhao, X.; Yao, S.; Zhao, Q.; Barnes, S.; Cohn, S.M.; Dann, S.M.; et al. GPR120 Inhibits Colitis Through Regulation of CD4⁺ T Cell Interleukin 10 Production. *Gastroenterology* 2022, 162, 150–165

39. Lu, Q.; Yang, M.-F.; Liang, Y.-J.; Xu, J.; Xu, H.-M.; Nie, Y.-Q.; Wang, L.-S.; Yao, J.; Li, D.-F. Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *J. Inflamm. Res.* 2022, 15, 1825

40. Wang, C.J.; Zhou, Z.G.; Holmqvist, A.; Zhang, H.; Li, Y.; Adell, G.; Sun, X.F. Survivin expression quantified by Image Pro-Plus compared with visual assessment. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2009, 17, 530–535.

41. Sprakes, M.B.; Hamlin, P.J.; Warren, L.; Greer, D.; Ford, A. Adalimumab as second line anti-tumour necrosis factor alpha therapy for Crohn's disease: A single centre experience. *J. Crohn's Colitis* 2011, 5, 324–331.

42. Panés, J.; Colombel, J.-F.; D'Haens, G.R.; Schreiber, S.; Panaccione, R.; Peyrin-Biroulet, L.; Loftus, E.V.; Danese, S.; Tanida, S.; Okuyama, Y.; et al. Higher vs. Standard Adalimumab Induction and Maintenance Dosing Regimens for Treatment of Ulcerative Colitis: SERENE UC Trial Results. *Gastroenterology* 2022, 162, 1891–1910

43. 323. Danese, S.; Vuitton, L.; Peyrin-Biroulet, L. Biologic agents for IBD: Practical insights. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015, 12, 537–545.

44. Cui, G.; Fan, Q.; Li, Z.; Goll, R.; Florholmen, J. Evaluation of anti-TNF therapeutic response in patients with inflammatory bowel disease: Current and novel biomarkers. *EBioMedicine* 2021, 66, 103329
45. Cui, G.; Florholmen, J.; Goll, R. Could Mucosal TNF Transcript as a Biomarker Candidate Help Optimize Anti-TNF Biological Therapy in Patients with Ulcerative Colitis? *Front. Immunol.* 2022, 13, 881112
46. Schmidt, C.; Giese, T.; Hermann, E.; Zeuzem, S.; Meuer, S.C.; Stallmach, A. Predictive Value of Mucosal TNF-Alpha Transcripts in Steroid-Refractory Crohn's Disease Patients Receiving Intensive Immunosuppressive Therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007, 13, 65–70
47. Velikova, T.V.; Miteva, L.; Stanilov, N.; Spassova, Z.; Stanilova, S.A. Interleukin-6 compared to the other Th17/Treg related cytokines in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2020, 26, 1912–1925
48. Schmidt, A.; Oberle, N.; Krammer, P.H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 2012, 3, 51.
49. Mittal, S.K.; Cho, K.J.; Ishido, S.; Roche, P.A. Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 27158–27167.
50. Whelan, G.; Farmer, R.G.; Fazio, V.W.; Goormastic, M. Recurrence after surgery in Crohn's disease. Relationship to location of disease (clinical pattern) and surgical indication. *Gastroenterology* 1985, 88, 1826–1833
51. Wong, D.J.; Roth, E.M.; Feuerstein, J.D. Surgery in the age of biologics. *Gastroenterol. Rep.* 2019, 7, 77–90.
52. Savarino, E.; Bodini, G.; Dulbecco, P.; Assandri, L.; Bruzzone, L.; Mazza, F.; Frigo, A.C.; Fazio, V.; Marabotto, E.; Savarino, V. Adalimumab is more effective than azathioprine and mesalamine at preventing postoperative recurrence of Crohn's disease: A randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 2013, 108, 1731–1742.
53. Magro, F.; Santos-Antunes, J.; Vilas-Boas, F.; Rodrigues-Pinto, E.; Coelho, R.; Ribeiro, O.S.; Lopes, S.; Macedo, G. Crohn's disease outcome in patients under azathioprine: A tertiary referral center experience. *J. Crohn's Colitis* 2014, 8, 617–625
54. Manser, C.; Borovicka, J.; Seibold, F. Risk factors for complications in patients with ulcerative colitis. *Eur. Gastroenterol. J.* 2016, 4, 281–287
55. **Pavel C.**, Constantinescu G., Enache V., Becheanu G., Stan-Ilie M., Sandru V., Plotogea O-M., Constantinescu A., Gheonea D-I., Ungureanu BS., Liscu H-D., Diculescu M-M., Stepan A-E. Pathology assessment of inflammatory bowel disease - prospective study from two referral centers. *RJME*, 2025, 66(1): in press; doi:10.47162/RJME.66.1.y

56. Nguyen, G.C.; Loftus, E.V.; Hirano, I.; Falck-Ytter, Y.; Singh, S.; Sultan, S.; Flamm, S.L.; Lim, J.K.; Rubenstein, J.H.; Smalley, W.E.; et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Management of Crohn's disease after surgical resection. *Gastroenterology* 2017, 152, 271–275.