

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

EFICIENȚA DIAGNOSTICĂ A EXPLORĂRILOR
PARACLINICE ÎN PANCREATITA ACUTĂ

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF.UNIV.DR. IANCĂU MARIA

STUDENT-DOCTORAND:
TURMACU ELENA IRINA (CĂLUIANU)

CRAIOVA
2017

Cuprins

Introducere	3
Partea I. Stadiul cunoașterii	3
Partea a II-a. Contribuții proprii	3
Scop și obiective	3
Loturi luate în studiu	4
Metode de lucru	5
Rezultate obținute prin testările lotului inițial, de 70 pacienți, diagnosticați cu pancreatită acută	5
Rezultate obținute în urma testării lotului de pacienți la care s-a efectuat dozarea nivelului de procalcitonină	7
Rezultate obținute în urma testării imunohistochemice a lotului cu pancreatită acută, comparativ cu lotul martor.....	7
Concluzii.....	8
Bibliografie	10

Cuvinte cheie: limfocite T, limfocite B, VEGF-A, pancreatita acută.

Introducere

„Marea dramă abdominală“ a lui Dieulafoy – pancreatita acută, reprezintă o entitate patologică cu multiple dificultăți diagnostice, cu o etiologie multifactorială și repercursiuni funcționale asupra întregului organism.

În România, incidența acestei afecțiuni este de 30-50 la 100000 locuitori pe an, cu o proporție de 80% forma benignă și 15-20% forma necrotico hemoragică, iar mortalitatea în proporție de 30%-40%. Mecanismele fiziopatologice ce stau la baza declanșării procesului de autodigestie pancreatică sunt incomplet elucidate, cu toate că progresele privind etiopatogenia bolii au condus la noi abordări terapeutice cu implicații directe în evoluția bolii.

Am ales tema de cercetare doctorală menționată atât prin prisma datelor epidemiologice, cât și a utilizării explorărilor paraclinice în diagnosticul și urmărirea evoluției acestei entități patologice, importanța sa în practica medicală fiind de necontestat. Am structurat lucrarea în două componente, respectând cerințele în vigoare referitoare la redactarea unei teze de doctorat.

Partea I. Stadiul cunoașterii

Prima parte este structurată în trei mari capitole, care etaleză o documentare cât mai completă din literatura de specialitate.

Primul capitol conturează datele morfofiziologice pancreatice, expuse detaliat cu ajutorul bibliografiei consultate (clasică și modernă). Cel de-a doilea capitol este centrat pe descrierea complexă a afectării acute pancreatice, atât din punct de vedere al etiologiei, al manifestărilor clinice, cât și al managementului terapeutic adecvat. Ultimul capitol este o trecere în revistă a explorărilor paraclinice utilizate în conturarea diagnosticului pozitiv al afecțiunii acute pancreatice, folosind atât determinări de laborator, imunohistochimice, cât și imagistice.

Partea a II-a. Contribuții proprii

Scop și obiective

Partea a doua a tezei prezintă contribuțiile proprii, rezultate în urma cercetărilor efectuate, prin structurarea scopului și a obiectivelor studiului, descrierea materialului și a metodelor de lucru, etalând apoi sugestiv rezultatele și discutarea lor, prin prisma literaturii domeniului.

Scopul principal al cercetării noastre a fost evaluarea eficienței diagnostice a testelor de laborator, imagistice și imunohistochimice în afectarea inflamatorie acută pancreatică.

Pentru atingerea acestui scop ne-am propus următoarele obiective:

✓ Crearea unei baze de date, prin analiza retrospectivă a foilor de observație ale pacienților cu diferite grade de severitate a pancreatitei acute și etiologie diversă: biliară, alcoolică, postoperatorie.

✓ Evaluarea gradului de severitate a afectării inflamatorii acute pancreatice prin calcularea scorurilor multiparametrice specifice.

✓ Testarea nivelului plasmatic al procalcitoninei, la un sublot de pacienți cu pancreatită acută, ca marker al unui prognostic grav și al prezenței infectării zonei de necroză.

✓ Crearea unui lot de referință, obținut din specimene de țesut pancreatic, recoltate de la pacienți decedați prin abdomen acut chirurgical de cauză non-pancreatică și prelucrate ulterior prin imunomarcare.

✓ Realizarea unui lot pentru studierea modificărilor induse de inflamația acută pancreatică, a remodelării limfocitare și a participării VEGF-A, la aceste procese aspecte evidențiate prin imunomarcare cu anticorpi monoclonali specifici.

Loturi luate în studiu

Cercetarea noastră, de tip retrospectiv, a fost efectuată la un lot de 70 pacienți cu diagnosticul de pancreatită acută, beneficiind de arhivele secțiilor chirurgicale ale Spitalului Clinic de Urgență Craiova și Spitalului Militar de Urgență „Dr. Stefan Odobleja” Craiova, iar colectarea informațiilor s-a efectuat în conformitate cu normele și principiile comisiilor de etică ale spitalelor menționate și Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, care și-au dat acordul pentru desfășurarea cercetării. Datele obținute au fost înscrise astfel încât informațiile care puteau identifica pacienții (nume, alte elemente de identificare) să fie excluse.

Un sublot din componența lotului inițial al studiului nostru a fost structurat din 20 de pacienți, în intervalul 2016-2017, la care am evaluat nivelul de procalcitonină serică.

Loturile constituite pentru evidențierea modificărilor imunohistochimice și a VEGF-A în pancreatita acută au fost reprezentate de:

Lotul martor, cu specimene de țesut pancreatic recoltate de la pacienți decedați prin abdomen acut chirurgical de cauză non-pancreatică, în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Județean de Urgență, Craiova, în număr de 8 și un lot de studiu, cu specimene de țesut pancreatic prelevate de la un număr de 21 pacienți decedați cu pancreatită acută. Acesta a fost împărțit în două subloturi, în funcție de data decesului: un sublot (PA1) fiind reprezentat de pacienții care au decedat în primele două săptămâni de la stabilirea diagnosticului, prin instalarea sindromului de disfuncție multiplă de organ (MODS) și cel de-al doilea (PA2), cu

pacienții care au decedat în următoarele luni, prin necroză extinsă retroperitoneală și/sau septicemie.

Metode de lucru

Pentru fiecare pacient implicat în acest studiu am efectuat examenul obiectiv general, pe aparate și sisteme, recoltarea probelor de laborator și stabilirea diagnosticului pozitiv al afecțiunii, prin coroborarea datelor clinice, de laborator și imagistice.

Probele de laborator efectuate au constat din: evaluarea componentelor hemoleucogramei (număr de leucocite, dozarea hemoglobinei, determinarea hematocritului), dozarea amilazemiei, a glicemiei, ureei, creatininei serice, transaminazelor hepatice, bilirubinei totale, directe și indirecte, procalcitoninei.

Explorarea paraclinică a cuprins și testarea ecografică, computer-tomografică și rezonanța magnetică nucleară la cei alergici la Iod, rezultatele fiind integrate în contextul clinic și de laborator al fiecărui pacient.

De asemenea, au fost efectuate scorurile multiparametrice de evaluare a severității afecțiunii și realizarea unor corelații în vederea previzionării evoluției afecțiunii acute pancreatice.

Datele obținute în urma testărilor efectuate au fost analizate și prelucrate statistic cu metode adecvate.

În cazul testării remodelării limfocitare și a VEGF-A la nivelul țesutului pancreatic s-au utilizat anticorpi monoclonali de șoarece anti-om, împotriva CD20, CD3 și VEGF-A. Ulterior imaginile au fost achiziționate cu un microscop Nikon 55i și am capturat o serie de imagini pentru fiecare caz studiat. Imaginile au fost prelucrate ulterior cu software-ul Image ProPlus ANS7, iar în ceea ce privește analiza expresiei imunohistochimice a VEGF-A, imaginile au fost analizate atât din punct de vedere al semnalului, cât și din punct de vedere al densității optice integrate (IOD). Pentru expresia imunohistochimică a limfocitelor marcate cu ajutorul anticorpilor anti CD3 și anti CD20 a fost calculat procentul de celule care au fost imunomarcate cu anticorpii menționați anterior, folosind softul Image ProPlus AMS 7, prin stabilirea procentului acestora din totalul stromei pancreatice sau parenchimului pancreatic sau ambele.

Rezultate obținute prin testările lotului inițial, de 70 pacienți, diagnosticați cu pancreatită acută

Cercetarea efectuată de noi și-a propus și îndeplinit scopul de a aprecia eficiența diagnostică a testelor paraclinice în pancreatita acută.

Am abordat majoritatea testelor de laborator și imagistice utilizate în practica medicală, pentru a stabili proporția modificării lor în cadrul lotului studiat.

Sumarizând, am constatat că, dintre testele de laborator, numărul de leucocite a depășit limitele normale la toți pacienții lotului (100%), valorile hemoglobinei au fost scăzute sub 12mg/dl la sublotul pacienților colecistectomizați (12.857% din lot). În același sens sunt modificările hematocritului, având valori scăzute (29.33%) tot la cei colecistectomizați.

Dozarea amilazemiei, test considerat de importanță majoră în diagnosticul pancreatitei acute, a relevat niveluri serice ale enzimei ce depășesc normalul de cel puțin trei ori limita superioară fiziologică, la toți pacienții integrați în lotul studiat (100%).

Glicemia, deși în relație cu componenta endocrină pancreatică, poate ilustra tulburări în secreția insulinică, cu implicare în troficitatea țesutului și chiar în modificarea secreției enzimatice digestive. Aceste motive au inclus determinarea glicemiei în testele de laborator efectuate în suspiciunea unei pancreatite acute. La lotul nostru, niveluri anormale ale testului au fost înregistrate la 47 pacienți (67.1%) la internare, dintre care 32 cu diabet zaharat tip II, diagnosticat anterior.

Având în vedere prezența, ca patologie asociată, a unei afecțiuni biliare, s-a efectuat lotului de pacienți dozarea transaminazelor hepatice – GOT și GPT, care la internare au prezentat valori depășind normalul la 40 pacienți, cei din sublotul cu colecistită cronică microlitiazică având nivelurile cele mai mari.

Afecțiunea biliară, asociată interesării inflamatorii acute pancreatice, include în gama testărilor de laborator dozarea transaminazelor, împreună cu dozarea serică a pigmentilor biliari. Paleta testărilor de laborator cuprinde și dozarea ureei și creatininei plasmaticice, pentru evidențierea unei eventuale insuficiențe multiple de organ, care reclamă instituirea unei conduite terapeutice complexe.

Pacienților incluși în lotul de studiu li s-au efectuat și testări ecografice și computer tomografice, în cadrul cărora au fost evidențiate 62 de cazuri cu modificări ale imaginii pancreatice cu diferite grade de complexitate, la 32 dintre aceștia existând aspecte ce demonstrează prezența complicațiilor, prin interesări extrapancreatice.

Existența unei game extrem de extinse a testărilor efectuate în vederea stabilirii diagnosticului de pancreatită acută, a gradului de severitate a acesteia, a impus calcularea unor scoruri multiparametrice, dintre cele mai uzitate fiind Ranson, modificat de Imre, Marshall, Balthazar și EPIC, care folosesc atât rezultatele testelor de laborator, efectuate inițial și în evoluție, cât și pe cele furnizate de explorarea imagistică.

În cercetarea noastră au fost calculate toate cele 4 scoruri menționate, clasificând pacienții în clase de severitate, aferente fiecărui scor.

Rezultate obținute în urma testării lotului de pacienți la care s-a efectuat dozarea nivelului de procalcitonină

Dozarea nivelurilor plasmaticice ale procalcitoninei, efectuată la 20 dintre pacienții din lotul studiat (8 cu pancreatită acută moderat severă și 12 având formă severă) a conturat valori crescute la 13 pacienți (65%), susținând prezența unei necroze infectate

Am analizat legăturile dintre valorile procalcitoninei și scorurile multiparametrice calculate în pancreatita acută, pentru a investiga disfuncția de organ(Marshall, EPIC), sau tipul de evoluție (Ranson), folosind coeficientul de corelație r Pearson. Toate valorile coeficienților de corelație au fost înalt semnificative ($p < 0.001$), corelația cea mai importantă fiind între scorul Ranson și procalcitonină ($r = 0.918$). Corelația cu scorul EPIC a înregistrat valoarea $r = 0.797$, respectiv cu scorul Marshall $r = 0.736$.

Rezultate obținute în urma testării imunohistochemice a lotului cu pancreatită acută, comparativ cu lotul martor

Procentul limfocitelor T, în cazul pacienților din lotul martor, a fost mai mare ($27.53 \pm 7.60\%$ pentru stroma pancreatică și $3.03 \pm 0.83\%$ pentru parenchimul pancreatic) decât în cazul pacienților din subplotul PA1 ($18.4 \pm 7.22\%$ pentru stroma pancreatică și $2.67 \pm 0.70\%$ pentru parenchimul pancreatic) sau în cazul pacienților din subplotul PA2 ($19.02 \pm 6.51\%$ pentru stroma pancreatică și $2.48 \pm 0.54\%$ pentru parenchimul pancreatic).

Procentul limfocitelor B, în cazul pacienților din lotul martor, a fost mai mare ($15.66 \pm 6.51\%$ pentru stroma pancreatică și $2.66 \pm 0.74\%$ pentru parenchimul pancreatic) decât în cazul pacienților din subplotul PA1 ($8.52 \pm 7.06\%$ pentru stroma pancreatică și $2.08 \pm 0.89\%$ pentru parenchimul pancreatic) sau în cazul pacienților din subplotul PA2 ($8.15 \pm 6.22\%$ pentru stroma pancreatică și $2.23 \pm 0.58\%$ pentru parenchimul pancreatic).

Analizând expresia VEGF-A în țesutul pancreatic al pacienților din lotul martor, dar și din lotul bolnavilor decedați cu pancreatită acută, putem spune că acesta tinde să apară tot în acini, la periferia acestora, la granițe cu țesutul conjunctiv stromal, în timp ce insulele sunt foarte puțin imunomarcate pentru VEGF-A.

În ceea ce privește aria semnalului pentru VEGF-A, am constatat că aceasta a fost mai mică în lotul martor ($4140.63 \pm 943 \mu\text{m}^2$) decât în lotul bolnavilor-PA ($4524.94 \pm 745 \mu\text{m}^2$), înregistrându-se o diferență statistic semnificativă ($p = 0.042$).

Pe de altă parte, în ceea ce privește densitatea optică integrată pentru VEGF-A, am constatat că aceasta a fost mai mică în lotul martor (589937.2 ± 65469.47) decât în lotul bolnavilor - PA (639784.9 ± 63208.13), înregistrându-se o diferență statistic semnificativă ($p=0.035$). Pe de altă parte, în ceea ce privește densitatea optică integrată pentru VEGF-A, am constatat că aceasta a fost mai mică în lotul martor (589937.2 ± 65469.47) decât în lotul bolnavilor - PA (639784.9 ± 63208.13), înregistrându-se o diferență statistic semnificativă ($p=0.035$).

Concluzii

Interpretarea datelor, rezultate în urma coroborării datelor clinice cu cele ale testelor de laborator, imagistice și imunohistochemice, a dus la formularea concluziilor ce urmează.

-toți pacienții incluși în lotul studiat, 73 de pacienți inițial, dintre care 3 excluși pentru părăsirea unității spitalicești, lotul rămas fiind de 70 pacienți, au prezentat o patologie asociată biliară de tip colecistită cronică alitiatică (30), colecistită cronică microlitiatică (31), iar 9 dintre ei au fost colecistectomizați pentru înlăturarea elementului agravant. Astfel, afecțiunile biliare se prefigurează într-un factor predispozant al interesării inflamatorii pancreatice.

-dintre parametrii hemoleucogramei, au fost determinați: numărul leucocitelor, valorile hematocritului și cantității de hemoglobină, în primele trei zile de la internare. Evolutiv s-a remarcat: o scădere semnificativă a lor.

-variațiile valorilor glicemiei au marcat o reducere a lor în a doua zi de la internare, la întreg lotul de pacienți, comparativ cu cele de la internare.

-deosebit de importante pentru stabilirea diagnosticului de pancreatită acută au fost valorile amilazemiei pancreatice, care au înregistrat creșteri de peste 3 ori limitele normale, cu scăderi semnificative statistic față de internare, cu un trend descendent atât în ziua a doua, cât și în ziua a treia.

- Ecografia abdominală reprezintă un test de rutină indispensabil în evaluarea pacienților cu afectare atât biliară, cât și pancreatică; în studiul nostru a fost efectuată la toți pacienții, cu stabilirea etiologiei microlitiatice la un număr de 31 cazuri, dintre cele 70 incluse în studiu.

- Examenul computer tomografic, realizat atât la internare cât și în evoluție, pentru confirmarea precoce a reacției inflamatorii pancreatice și previzionarea apariției complicațiilor, a pus în evidență un număr de 38 cazuri de afectare acută pancreatică, cei din clasele Balthazar C, D și E.

- Coroborând rezultatele testărilor de laborator, am calculat scorul multiparametric Ranson, modificat de Imre, pentru aprecierea severității pancreatitei acute și s-au obținut următoarele categorii: pancreatita acută cu evoluție benignă și prognostic favorabil (21.13%), pancreatita acută

moderat-severă cu risc de complicații (50.70%), pancreatita acută forma severă (25.13%) și 2.82% pacienții decedați. Acest scor s-a corelat cu hematocritul, existând o corelație inversă semnificativă statistic - coeficient Pearson $r=-0.339$, $p<0.05$.

Un alt scor definind severitatea pancreatitei acute a fost scorul Marshall, semnalând disfuncțiile de organ, înregistrându-se 73.24% dintre cazuri cu insuficiență de organ (sau multiorganică).

- Folosind și datele furnizate de imagistică s-au calculat scorurile Balthazar și EPIC. Prin calcularea scorului Balthazar s-au obținut următoarele clase de severitate: A (11.43%), B (34.29%), C (24.29%), D (17.14%) și E (14.29%). Indexul de severitate computer tomografic (EPIC) calculat a realizat următoarele clase: forma ușoară (15.49%), 36.62% cu forma moderată și 47.89% cu forma severă, cu complicații.

- Efectuarea dozării nivelului plasmatic al procalcitoninei, la un eșantion de 20 pacienți din lotul studiat, a arătat depășirea limitei normale a parametrului la 65% dintre cei testați, indicând prezența unei necroze pancreatice infectate și un prognostic nefavorabil.

- Studiul a 21 specimene de țesut pancreatic, recoltate de la pacienți decedați prin pancreatita acută (insuficiență multiplă de organ, necroză extinsă retroperitoneală și/ sau septicemie), prin imunomarcare cu anticorpi monoclonali anti CD3 pentru limfocitele T și anti CD20 pentru limfocitele B, a evidențiat scăderea numărului limfocitelor T și B în stroma pancreatică față de lotul de referință, (ce a inclus 8 specimene de țesut pancreatic de la pacienți decedați prin abdomen acut de cauză non-pancreatică), diferență semnificativă statistic $p=0.013$ și respectiv 0.016.

- Realizând și imunomarcarea pentru VEGF-A, s-a înregistrat o absență a expresiei acestuia în porțiunea endocrină insulară pancreatică și niveluri mai mari ale imunomarcării, față de lotul de referință, la cei cu pancreatită acută ($p=0.042$). Creșterea expresiei imunohistochimice a VEGF-A poate constitui o țintă în patogenia și evoluția pancreatitei acute și se poate asocia previzibil cu procesul inflamator pancreatic.

- Caracteristicile de originalitate ale studiului nostru cuprind: **urmărirea și prelucrarea evolutivă a datelor testărilor de laborator, imagistice precum și evidențierea, prin imunohistochimie, a remodelării limfocitare și a participării VEGF-A la modificările componentelor pancreatice în afectarea acută a lor.**

În stabilirea diagnosticului de afectare inflamatorie acută pancreatică cât și a severității pancreatitei, nu se poate absolutiza doar modificarea unui singur parametru, ci este necesară coroborarea a multipli parametri testați, grupați sau nu în scoruri, pentru un diagnostic de

certitudine și încadrarea în clase de severitate, cu conturarea unor planuri terapeutice adecvate fiecărei categorii și elaborarea prognosticului.

Bibliografie

- [1]. Beuran M, Negoii I. Surgical Anatomy of the Abdomen. Ed. Academiei Române, 2016 București: 172-5.
- [2]. Standring S, Gray's Anatomy, 41st Edition, The Anatomical Basis of Clinical Practice. Ed. Elsevier, 2016: 1179-80.
- [3]. Isaji S. Revised 7th edition of the General Rules for the Study of Pancreatic Cancer by Japan Pancreas Society -revised concepts and updated points. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi. 2017;114(4): 617-626.
- [4]. Hăulică I. Fiziologie umană. Ediția a III-a. Ed. Medicală, București, 2009: 681-5.
- [5]. Marin'o CR, and Gorelick FS. Pancreatic and salivary glands In: Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology. Ed. Elsevier Third 3 Edition, 2017: 879-94.
- [6]. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 13th Ed Elsevier, 2016:825-7.
- [7]. Crețu D, Hulpuș R, Sabău D. Aspecte de Etiopatogenie în Pancreatita Acută. Acta Medica Transilvanica, Iunie 2011: 2(2): 91-4.
- [8]. Algul H, Weber A, Huber W, Roland M, Schmid II. Acute pancreatitis In: Yamada's Textbook of Gastroenterology. Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2016: 1655-60.
- [9]. Cochior D, Constantinoiu S, Ungureanu DF. In Pancreatita acută. Abordare clinico-paraclinică pe baza factorilor determinanți. Ed. Universitară "Carol Davila", București 2014: 69-70.
- [10]. Lévy P. Recommandations internationales sur la pancréatite aiguë. POST'U 2015:20-3.
- [11]. Thoeni RF. The revised Atlanta classification of acute pancreatitis: its importance for the radiologist and its effect on treatment. Radiology. 2012 Mar;262(3):751-64.
- [12]. Pallisera A, Jorba R, Ramia JM, Rodriguez JA, Subirana H, Ortiz de Zarate L, Gonzales JA, Navarro S. Biological markers of severity in acute pancreatitis. Volume 9 Issue 4 Aug, 2014:555-5.