



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

АНАЛИЗА ЦИТОКИНСКОГ ПРОФИЛА БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ ПАНКРЕАТИТИСОМ ЛЕЧЕНИМ У ИНТЕНЗИВНОЈ НЕЗИ

Овај пројекат је део макропројекта „Анализа фактора који доприносе настанку компликација и/или смртном исходу пацијената са акутним панкреатитисом леченим у интензивној нези“ који спроводи Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу у сарадњи са Клиничким центром «Крагујевац» у Крагујевцу.

Кључне речи :

акутни панкреатитис, цитокини, исход лечења

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак:

Акутни панкреатитис (АП) је једно од хируршких обољења са највећом стопом компликација и смртог исхода. Учесталост панкреасне некрозе се креће од 4 до 15%, а учесталост смртог исхода од 3.5 до 12%. Може се рећи да је АП обољење са непредвидивим исходом, при чему оптимална терапија може два до три пута смањити стопу компликација и морталитет. У основи акутног панкреатитиса је запаљенски процес са различитом морфолошком презентацијом која варира од интерстицијалног едема до конфлуентне некрозе и хеморагије, апсцеса и псеудоцисте.

Бројна базична и клиничка истраживања су показала да веома јак системски инфламаторни одговор, а не панкреатитис сам по себи, доводи до смртог исхода у случајевима тешког некротизирајућег панкреатитиса.

Иако је до сада доста рађено на факторима који су повезани са настанком компликација или смртог исхода акутног панкреатитиса, многи потенцијални фактори још нису изучавани у клиничко-епидемиолошким студијама. Циљ нашег истраживања био би да испита утицај промене цитокинског профила у серуму болесника и других епидемиолошких фактора на појаву смртог исхода и/или компликација акутног панкреатитиса.

Ово ће бити „случај-контрола“ студија, због релативно мале стопе компликација акутног панкреатитиса, као и због ограничености студије на само једно место истраживања. Популација из које ће се узимати и случајеви и контроле су пацијенти Клиничког центра Крагујевац, лечени од акутног панкреатитиса. Студија ће бити проспективна, а популацију ће чинити пацијенти лечени у интензивној нези оболели од акутног панкреатитиса у наредне 3 године. Случајеви ће бити пацијенти са смртним исходом и/или компликацијама у току акутног панкреатитиса. Контроле ће бити пацијенти са акутним панкреатитисом код којих је



установљена блага форма болести. Ова студија ће омогућити процену повезаности цитокинског профила и до сада неистражених фактора са настанком смртог исхода и/или компликација акутног панкреатитиса, чиме ће се створити услови за боље прилагођавање терапије потребама пацијената са акутним панкреатитисом.

Циљ истраживања:

Циљеви нашег истраживања су:

- 1) утврђивање повезаности нивоа проинфламаторних цитокина (интерлеукина 6, 8, 18 и туморског некротишућег фактора-алфа) у серуму са настанком компликација и/или смртог исхода пацијената оболелих од акутног панкреатитиса леченим у интензивној нези КЦ Крагујевац;
- 2) утврђивање утицаја нивоа антиинфламаторних цитокина (интерлеукина 10, ИЛ-10) на настанак компликација и/или смртог исхода код болесника са акутним панкреатитисом леченим у интензивној нези КЦ Крагујевац;
- 3) испитивање повезаности концентрације епидермалног фактора раста (ЕГФ) на појаву компликација и/или смртог исхода у оболелих од акутног панкреатитиса лечених у интензивној нези КЦ Крагујевац.

Актуелност истраживања:

Акутни панкреатитис је једно од хируршких обољења са највећом стопом компликација и смртог исхода. Учесталост панкреасне некрозе се креће од 4 до 15%, а учесталост смртог исхода од 3.5 до 12%, при чему оптималан третман пацијената може два до три пута смањити стопу компликација и морталитет¹.

До сада је утврђен велики број фактора који доприносе или су само повезани са настанком компликација акутног панкреатитиса или са смртним исходом ове тешке болести²: (1) старост преко 55 година; (2) БМИ преко 30; (3) плеурална ефузија или плућни инфилтрати на пријему; (4) знаци инсуфицијенције органа на пријему; (5) стање хемодинамике (фреквенција срца, артеријски притисак); (6) оксигенација пацијента (фреквенција дисања, парцијални притисак кисеоника, брзина допремања кисеоника); (7) основне лабораторијске анализе (јонограм, пХ, креатинин, хематокрит, број леукоцита); (8) ректална температура; (9) претходна операција; (10) налаз на компјутеризованој томографији или нуклеарној магнетној резонанцији; (11) интерлеукин 6³; (12) реактивна једињења азота⁴; (13) Ц-реактивни протеин⁵; (14) прокалцитонин⁵; (15) серумски амилоид А⁶; (16) Интерлеукин 8⁵; (17) инхибиторни серумски маркер миграције макрофага⁷; (18) растворљиви интраћелијски адхезиони молекули (сИЦАМ-1)⁸; (19) интерлеукин 18⁹ и (20) матрикс металопротеиназа 9¹⁰.

Иако је до сада доста рађено на факторима који су повезани са настанком компликација или смртог исхода акутног панкреатитиса, многи потенцијални фактори још нису изучавани у



клиничко-епидемиолошким студијама: туморски некротишући фактор алфа, интерлеукин 10, епидермални фактор раста (који се такође ослобађају у току акутног панкреатитиса), макрофаг инфламаторни протеин 2¹¹, експресија антигена функције лимфоцита 1¹¹, мелатонин (за кога је показано да код пацова ублажава ток акутног панкреатитиса)¹², присуство и број појединих врста лимфоцита, мононуклеара¹³ или гранулоцита у току ове болести, гастроинтестинални хормони, П-селектин (чија инхибиција у експерименталним студијама ублажава ток акутног панкреатитиса)¹⁴ врста профилактичке антибиотске терапије, примена лекова пре појаве панкреатитиса, врсте и дозе лекова примењене за лечење акутног панкреатитиса, софистициранији хемодинамски параметри као што је ејекциона фракција, и друго. Такође, недовољно је изучаван утицај различитих комбинација прогностичких фактора, као и фактори повезани са настанком панкреасних псеудоциста, за које је до сада показана само веза са порастом алкалне фосфатазе у серуму изнад двоструке нормалне вредности¹⁵. Најзад, мутације неких гена су повезане са појавом панкреатитиса, али не и са његовим исходима: ген за трипсиноген (PRSS1), ген за трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (CFTR) и ген за глутатион-С-трансферазу¹⁶.

Ова студија ће омогућити процену повезаности до сада неистражених фактора са настанком компликација или смртог исхода акутног панкреатитиса, чиме ће се створити услови за боље прилагођавање терапије потребама пацијената са акутним панкреатитисом.

**Предмет и опис истраживања:
задачи, методологија, очекивани резултати**

Предмет нашег истраживања је утврђивање повезаности промене профила цитокина у серумима оболелих од акутног панкреатитиса са настанком компликација и/или смртог исхода.

Методолошки је изабрана врста студије „кејс-контрол“, односно „случај-контрола“ због релативно мале стопе компликација и смртних исхода акутног панкреатитиса, као и због ограничености студије на само једно место истраживања. Заправо ће у оквиру овог пројекта бити постављено неколико студија случај контрола, у зависности од дефиниције „случаја“.

Пошто ће студија бити проспективна, студијску популацију из које ће се узимати и случајеви и контроле чиниће пацијенти Интензивне неге Клиничког центра Крагујевац, лечени од акутног панкреатитиса у наредне 3 године.

Случајеви ће бити пацијенти оболели од акутног панкреатитиса и лечени у интензивној нези са смртним исходом (студија 1), са некрозом панкреаса (студија 2), са инфекцијом некрозе панкреаса (студија 3) или са настанком псеудоцисте (студија 4).

Контроле ће бити пацијенти са акутним панкреатитисом лечени у интензивној нези код којих није дошло до настанка неке од наведених компликација или смртог исхода. За сваки случај биће изабране по две контроле, које су усклађене са случајем по старости и полу.

Критеријуми за укључивање: пацијенти са утврђеном дијагнозом акутног панкреатитиса, хоспитализовани у интензивној нези.



Критеријуми за искључивање: пацијенти са постоперативним акутним панкреатитисом, труднице и пацијенти преведени из других установа у интензивну негу КЦ-а Крагујевац касније од 48 сати од почетка болести.

Величину узорка одређујемо на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 80%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за једносмерно тестирање нулте хипотезе и минималне разлике у вредностима посматраних варијабли од 20% (за категоријска обележја), при чему је учесталост одређене вредности категоријске варијабле у контролној групи 20%. Уз такве параметре, потребно је укупно 148 пацијената у обе групе¹⁷. Пацијенти ће бити дистрибуирани међу групама у односу 1:2 (на сваког пацијента који спада у групу случајева долази још два пацијента који су контроле).

За сваки случај ће из преосталих чланова студијске популације бити изабрани пацијенти истог пола и сличне старости (± 1 година). Од изабраних пацијената истог пола и сличне старости биће случајно изабране 2 контроле коришћењем RANDBETWEEN функције Микрософт Ексцел-а.

Варијабле које ће бити праћене су:

- а. Смртни исход – утврђује се на основу потврде о смрти из историје болести пацијента.
- б. Некроза панкреаса – утврђује се ЦТ прегледом са контрастом или нуклеарном магнетном резонанцом.
- в. Инфекција некрозе – утврђује се апирацијом места некрозе танком иглом или присуством мехурића гаса на ЦТ прегледу.
- г. Псеудоциста панкреаса – Утврђује се ЦТ прегледом.
- д. Вредности рутинских хематолошких тестова (хематокрит, број еритроцита, леукоцита, тромбоцита, леукоцитарна формула, МЦХЦ, МЦХ и МЦВ) – утврђују се увидом у историју болести пацијента.
- ђ. Вредности рутинских биохемијских тестова (гликемија, уреа, креатинин, билирубин укупни и директни, аминотрансферазе, алкална фосфатаза, амилаза, липаза, натријум, калијум, калцијум, хлор, бикарбонати, пХ крви, Ц-реактивни протеин и прокалцитонин) – утврђују се увидом у историју болести пацијента.
- е. Индекс телесне масе - израчунава се као количник тежине пацијента у килограмима и квадриране висине пацијента у метрима.
- ж. Вредности АПАЦХЕ 2 скорa – утврђују се у првих 48 сати од пријема.
- з. Ниво триглицерида и холестерола у плазми - утврђују се увидом у историју болести пацијента.



и. Нивои цитокина (интерлеукина 6, 8, 10 и 18, туморског некротишућег фактора алфа и епидермалног фактора раста) у серуму на пријему и трећег дана од пријема болесника - утврђују се мерењем ЕЛИСА техником, применом комерцијалних китова.

ј. Рендгенграфија грудног коша са утврђивањем излива или консолидација паренхима – ради се на пријему пацијента и потом према захтевима ординирајућих лекара. Налаз се утврђује увидом у историју болести пацијента.

л. Коморбидитет (врста акутне или хроничне болести која прати панкреатитис) – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

љ. Профилактичка примена антибиотика од пријема пацијента – утврђују се врста и доза антибиотика, пут примене и дужина примене, на основу увида у историју болести пацијента.

м. Примена нестероидних антиинфламаторних лекова – утврђују се врста и доза НСАИЛ, пут примене и дужина примене, на основу увида у историју болести пацијента.

н. Примена осталих лекова – утврђују се врста и доза осталих лекова, пут примене и дужина примене, на основу увида у историју болести пацијента.

њ. Пушење (више од 5 цигарета дневно у последњих годину дана). Ова варијабла се утврђује анкетирањем пацијента.

о. Уношење алкохола - навести врсту, количину и учесталост. Ова варијабла се утврђује анкетирањем пацијента.

п. Врста интравенског катетера (централни или периферни) – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

р. Дужина коришћења интравенског катетера (централног или периферног) – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

с. Вештачка вентилација пацијента – постојање и дужина – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

т. Старост пацијента у годинама – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

ћ. Пол пацијента – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

у. Операција због панкреатитиса (врста, време од пријема пацијента, трајање) – утврђује се увидом у историју болести пацијента.

ф. Значајна комедикација у последњих годину дана. Навести хроничну терапију, врсту лека, дозу, трајање терапије.

х. Степен образовања. Ова варијабла се утврђује анкетирањем пацијента.

ц. Уношење кафе – дневна количина, колико дуго. Ова варијабла се утврђује анкетирањем пацијента.



ч. Коришћење антибиотика код куће у последњих месец дана – утврђује се анкетом.

ц. Коришћење кортикостероида или других имуносупресива у последњих месец дана – утврђује се анкетом.

Прикупљени подаци ће бити организовани и унесени у табелу статистичког програма СПСС верзија 18. Подаци ће прво бити обрађени дескриптивно; за континуалне варијабле ће бити одређене мере централне тенденције и мере варијабилитета, а за категоријске варијабле учесталост појединих категорија. Значајност разлике у вредностима континуалних варијабли између случајева и контрола ће бити тестирана студентовим Т-тестом за независне узорке (ако постоји нормална расподела вредности на основу Колмогоров-Смирновљевог теста) или Ман-Витнијевим тестом (ако нема нормалне расподеле). Значајност разлике у процентуалној заступљености појединих категорија између случајева и контрола ће бити тестирана Хи-квадрат тестом (или Фишеровим тестом код мале учесталости појединих категорија). Утицај већег броја независних и збуњујућих варијабли на категоријски исход (као и интеракција између предикторских варијабли) ће бити испитан помоћу логистичке регресије. Максимални ниво прихватљиве вероватноће нулте хипотезе који ће бити коришћен у овој студији је 0.05.

У спровођењу ове студије поштоваће се принципи Хелсиншке декларације о заштити права субјеката истраживања, као и принципи Добре клиничке праксе.

Значај истраживања:

Ова студија ће омогућити процену повезаности нивоа цитокина и до сада неистражених фактора са настанком компликација или смртог исхода акутног панкреатитиса, чиме ће се створити услови за боље прилагођавање терапије потребама пацијената са акутним панкреатитисом.

Очекивани резултат ове студије је да покаже да су до сада неистражени фактори и цитокини који су праћени овом студијом повезани са настанком смртог исхода и/или компликација код пацијената са акутним панкреатитисом.

На тај начин ће се створити услови за боље прилагођавање терапије потребама пацијената са акутним панкреатитисом како би се компликације и смртност svelи на минимум.

Временски оквир:

Студија ће се изводити у периоду од наредне три године, односно до децембра 2014. год. и обухватиће све пацијенте који су у том временском интервалу лечени од акутног панкреатитиса у Интензивној нези Клиничког центра у Крагујевцу.



Литература

1. Wall I, Badalov N, Baradarian R, Iswara K, Li JJ, Tenner S. Decreased mortality in acute pancreatitis related to early aggressive hydration. *Pancreas* 2011; 40(4): 547-50.
2. Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(5): 675-84.
3. Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. *Crit Care Med* 1999; 27: 749-755.
4. Mettu SR, Wig JD, Khullar M, Singh G, Gupta R. Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 506-513.
5. Dambrauskas Z, Pundzius J, Barauskas G. Predicting development of infected necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42: 441-449.
6. Mayer JM, Raraty M, Slavin J, Kemppainen E, Fitzpatrick J, Hietaranta A, Puolakkainen P, Beger HG, Neoptolemos JP. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 163-171.
7. Rahman SH, Menon KV, Holmfield JH, McMahon MJ, Guillou JP. Serum macrophage migration inhibitory factor is an early marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Ann Surg* 2007; 245: 282-289.
8. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective study. *Gastroenterology* 1986; 91: 433-438.
9. Wereszczynska-Siemiatkowska U, Mroczo B, Siemiatkowski A, Szmitekowski M, Borawska M, Kosel J. The importance of interleukin 18, glutathione peroxidase, and selenium concentration changes in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 642-650.
10. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
11. Awla D, Abdulla A, Zhang S, Roller J, Menger MD, Regnér S, Thorlacius H. Lymphocyte function antigen-1 regulates neutrophil recruitment and tissue damage in acute pancreatitis. *Br J Pharmacol* 2011; 163(2): 413-23.
12. Jaworek J, Zwirska-Korczala K, Szklarczyk J, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Jaworek AK, Tomaszewska R. Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep.* 2010; 62(5): 864-73.
13. Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(32): 3995-4002.
14. Hackert T, Büchler MW, Werner J. Targeting P-selectin in acute pancreatitis. *Expert Opin Ther Targets.* 2010; 14(9): 899-910.
15. Diculescu M, Ciocirlan M, Ciocirlan M, Stănescu D, Ciprut T, Marinescu T. Predictive factors for pseudocysts and peripancreatic collections in acute pancreatitis. *Rom J Gastroenterol* 2005; 14(2): 129-34.
16. Khan AS, Latif SU, Eloubeidi MA. Controversies in the etiologies of acute pancreatitis. *JOP* 2010; 11(6): 545-52.
17. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, et al. *Designing Clinical research.* 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
18. Digalakis MK, Katsoulis IE, Biliri K, Themeli-Digalaki K. Serum profiles of C-reactive protein, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in patients with acute pancreatitis. *HPB Surgery* 2009; 1-5.
19. Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Digestive Disease and Sciences.* 1997; 42:1469-1472.
20. Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, et al. Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice. *Gut* 1998; 43:408-413.



21. Perejaslov A, Chooklin S, Bihalsky I. Implication of interleukin 18 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2008;55(86-87): 1806-1813
22. Martín MA, Saracíbar E, Santamaría A, Arranz E, Garrote JA, Almaraz A, del Olmo ML, García-Pajares F, Fernández-Orcajo P, Velicia R, Blanco-Quirós A, Caro-Patón A. Interleukin 18 (IL-18) and other immunological parameters as markers of severity in acute pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 12: 768-73
23. Chooklin S. Pathogenetic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;8(2): 186-192
24. Yuan BS, Zhu RM, Braddock M, Zhang XH, Shi W, Zheng MH. Interleukin-18: a pro-inflammatory cytokine that plays an important role in acute pancreatitis. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 10: 1261-71
25. Waltenbaugh C, Doan T, Melvold R, Viselli S. *Immunology*. 2008. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. p. 68
26. Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol* 2008; 14(41): 6273-6275
27. Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock* 2007;28: 130-140
28. Laveda R, Martinez J, Munoz C, et al. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005;11(34): 5309-5313
29. Mirkovic D, Surbatovic M, Filipovic N, Radakovic S. Predictive value of pro- and anti-inflammatory cytokines in assessing severity and outcome of acute pancreatitis. *Jugoslav Med Biohem* 2005;24(4): 253-257
30. Purkayastha S, Chow A, Athanasion T, Cambaroudis A, Panesar S, Kinross J, Tekkis P, Darzi A. Does serum procalcitonin have a role in evaluating the severity of acute pancreatitis? A question revisited. *World J Surg* 2006;30: 1713-1721