



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di Ricerca in**

**Tecnologie Avanzate in Chirurgia**

n. 10999

Coordinatore Prof. Angelo Filippini

Progetto di Ricerca:

**Fattori predittivi precoci nella pancreatite acuta:  
indici prognostici multiparametrici e ruolo di nuovi  
marcatori molecolari**

Dottorando: Dr.ssa Barbara BINDA

Tutor: Prof. Claudio MODINI

## INTRODUZIONE

La pancreatite acuta (PA) è un processo infiammatorio acuto del pancreas in cui si sviluppa una autodigestione della ghiandola pancreatica da parte degli enzimi digestivi in essa contenuti e che può coinvolgere i tessuti circostanti od organi distanti.

### Eziologia

La causa più comune di pancreatite acuta nei paesi sviluppati è la calcolosi biliare (circa il 40% del totale dei casi), ossia il passaggio di calcoli dalla colecisti in via biliare principale che determini una ostruzione dello sfintere di Oddi. La pancreatite è indotta dall'aumento della pressione all'interno dei dotti pancreatici con secondario danno cellulare e retrodiffusione degli enzimi pancreatici, attivati anche dalla presenza di sali biliari refluiti nel dotto pancreatico. Il ruolo dei succhi biliari nell'inizializzazione della pancreatite acuta è confermato da innumerevoli studi sperimentali che utilizzano l'infusione intraduttale di acido glicodesossicolico o di taurocolato di sodio per l'induzione di pancreatite acuta prevalentemente nei ratti.

Circa il 35% dei casi di pancreatite acuta riconosce una eziologia alcolica. Nella maggioranza dei casi si tratta di episodi di riesacerbazione di una pancreatite cronica su base alcolica, ma può manifestarsi anche secondariamente a un abuso occasionale di alcolici. L'etanolo determina un accumulo intracellulare degli enzimi digestivi e una loro prematura attivazione. A livello duttale inoltre, determina un aumento della quota

proteica del secreto a scapito di quella di bicarbonato, causando una maggiore viscosità del succo pancreatico e un conseguente aumento della pressione intraduttale; inoltre è responsabile di un aumento della permeabilità dei duttuli con secondaria retrodiffusione degli enzimi.

La pancreatite acuta post colangio-pancreatografia retrograda endoscopica rappresenta la terza causa in ordine di frequenza. Fondamentale nella prevenzione affidare questa procedura a mani esperte. Il trauma addominale rappresenta circa l'1,5% dei casi di pancreatite acuta con una prevalenza dei traumi penetranti rispetto a quelli chiusi.

Altre cause più rare di pancreatite acuta comprendono l'ipertrigliceridemia (con sviluppo di quadri clinici spesso severi), l'ipercalcemia (iperparatiroidismo primario o secondario, sindromi paraneoplastiche), la somministrazione di alcuni farmaci, alcune infezioni virali (coxsackievirus, CMV, EBV, VZV, HIV e molti altri) o batteriche (*Mycoplasma pneumoniae*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Mycobacterium tuberculosis*..), l'esposizione a tossine di origine industriale o animale (puntura di scorpione, morso di vipera), le neoplasie (prevalentemente per ostruzione del dotto pancreatico), le malformazioni congenite del pancreas o dei suoi dotti, determinate patologie autoimmunitarie o l'ipovascolarizzazione pancreatica (ipoperfusione in corso di shock emodinamico, ischemia del comparto addominale, malformazioni vascolari).

In circa il 10-30% dei casi non è possibile individuare alcun agente eziologico (pancreatite idiopatica) anche se vari studi

suggeriscono che circa il 70% delle pancreatiti idiopatiche siano in realtà causate da microlitiasi biliare misconosciuta.

### Epidemiologia

L'incidenza mondiale della pancreatite acuta varia da 5 a 80/100000 abitanti a seconda della regione considerata, con la maggiore incidenza registrata negli Stati Uniti d'America e in Finlandia (1). In Europa e in altre nazioni sviluppate, come Hong Kong, la maggior parte degli eventi riconosce un'eziologia biliare, mentre negli Stati Uniti d'America è più comune l'eziologia alcolica. Generalmente gli uomini si ammalano di pancreatite acuta più frequentemente delle donne prediligendo un'eziologia alcolica a quella biliare e viceversa. Gli appartenenti al ceppo afro-americano rappresentano la popolazione a maggior rischio di patologia con un rischio 10 volte superiore a quello dei bianchi americani (2).

L'età di massima incidenza della patologia varia con l'eziologia: insorgenza mediana tra i 31 e i 42 anni per la pancreatite alcol correlata, AIDS correlata o farmacologica; insorgenza mediana tra i 58 e i 69 anni per l'eziologia biliare, iatrogena o traumatica (3).

### Fisiopatologia

Nel pancreas vengono sintetizzati circa 15 tipi di differenti enzimi digestivi, primo fra tutti il tripsinogeno (precursore della tripsina), in forma di zimogeni o proenzimi che vengono immagazzinati in granuli altamente resistenti alle variazioni dell'ambiente esterno, così da prevenirne la rottura accidentale. Questi vengono riversati all'interno dei dotti pancreatici quando, al momento del pasto, una serie di segnali

bioumorali (stimoli vagali, polipeptide vasoattivo intestinale, colecistokinina, peptide rilasciante la gastrina, encefaline..) ne determinano il rilascio.

La causa scatenante della pancreatite acuta può essere qualsiasi evento che danneggi la cellula acinare e comprometta la corretta secrezione intraduttale dei granuli zimogeni.

Una volta che si è avviato il meccanismo di danno cellulare acinare, seguono una serie di eventi a cascata che comportano l'attivazione intracellulare del tripsinogeno in tripsina, la conseguente attivazione intracellulare degli altri proenzimi e l'estrusione delle vescicole secretorie attraverso la membrana baso-cellulare nell'interstizio. Qui il danno locale dovuto all'autodigestione tissutale viene amplificato dal richiamo di cellule infiammatorie da parte degli stessi frammenti molecolari così prodotti.

I neutrofilii richiamati e attivati in loco amplificano ulteriormente il fenomeno infiammatorio rilasciando anione superossido ed enzimi proteolitici (catepsine, collagenasi ed elastasi); anche i macrofagi coinvolti rilasciano citochine responsabili del processo infiammatorio locale e (nei casi più severi) sistemico.

Studi sperimentali dimostrano che il danno tissutale è mediato proprio dall'attivazione delle cellule infiammatorie come i neutrofilii, i macrofagi e i linfociti e dal rilascio nel contesto dei tessuti pancreatici di mediatori proinfiammatori come le interleukine (IL) 1, 6 e 8, e il Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). L'avvio del processo infiammatorio causa un aumento della permeabilità vasale pancreatica inducendo edema,

emorragia ed eventualmente necrosi parenchimale o del grasso peripancreatico. La cascata proinfiammatoria è fisiologicamente bilanciata a livello locale dal rilascio di citochine anti-infiammatorie, come l'IL-10, che tendono a contenere il processo (4). Se questo non riesce, il rilascio di citochine e mediatori dell'infiammazione nel torrente circolatorio, determina una iperattivazione del sistema immunitario e una alterazione della membrana endoteliale anche a carico di organi distanti dal primo focolaio infiammatorio con conseguente stravasamento di componenti ematici in vari tessuti e loro danneggiamento. Ciò può conseguentemente determinare complicanze sistemiche tra cui la sindrome da distress respiratorio acuto dell'adulto (ARDS), il versamento pleurico, l'emorragia gastrointestinale, la coagulazione intravasale disseminata, l'insufficienza cardiaca o renale, e trasformarsi infine in una risposta infiammatoria sistemica (*systemic inflammatory response syndrome, SIRS*). Tutto ciò può esitare in una sindrome da disfunzione multiorgano (*multi-organ dysfunction syndrome, MODS*) con conseguenze devastanti per l'intero organismo. La SIRS può a sua volta evolvere in sepsi per la contaminazione batterica o fungina del focolaio infiammatorio primario o degli organi bersaglio della risposta infiammatoria sistemica.

L'intestino rappresenta la fonte principale di contaminazione pancreatica e/o sistemica. L'alterazione del microcircolo intestinale insieme al rilascio di radicali liberi dell'ossigeno e all'acidificazione tissutale sono responsabili del danno della mucosa intestinale. Una volta alterata la barriera mucosa intestinale, i batteri e i miceti ivi contenuti

riescono a migrare all'esterno del lume intestinale mediante un processo chiamato traslocazione. Questa può avvenire per via transmurale, ematogena e linfatica con conseguente contaminazione di diversi siti corporei. Diversi fattori tra cui l'alterata motilità intestinale, l'immunosoppressione e l'overgrowth batterico promuovono questo fenomeno.

E' evidente pertanto che la pancreatite acuta può essere un fenomeno infiammatorio contenuto ed autolimitato così come può evolvere in un quadro clinico drammatico caratterizzato dallo sviluppo di complicanze locoregionali e sistemiche. L'evenienza o meno, durante tutte le fasi della malattia, di queste complicanze determina la classificazione dell'evento acuto in pancreatite acuta lieve o severa.

Nel tempo sono stati fatti vari tentativi di uniformare i criteri di definizione della severità della patologia al fine di individuare con certezza i casi gravi, rendere confrontabili i risultati tra le casistiche e migliorare l'interpretazione dei dati.

La classificazione proposta nel 1992 ad Atlanta (5) nel corso di una consensus conference a cui hanno partecipato 40 esperti internazionali di 6 discipline diverse provenienti da 15 paesi (Tab. I), è ancora oggi quella di riferimento nella pratica clinica come per la ricerca scientifica a livello internazionale.

Secondo la classificazione di Atlanta le complicanze locali della pancreatite acuta comprendono:

- la necrosi pancreatica intesa come la presenza di una o multiple aree di parenchima pancreatico non vitale, tipicamente associata alla

necrosi del grasso peripancreatico, che può ulteriormente complicarsi con l'infezione (necrosi infetta);

- la formazione in acuto di raccolte fluide intra e/o extra pancreatiche, prive di una parete fibrosa di tessuto di granulazione, localizzate in sede intra o peripancreatica; queste, nella metà dei casi, tendono alla risoluzione spontanea e nell'altra metà dei casi evolvono in ascessi o pseudocisti;

- la comparsa di pseudocisti ossia di raccolte di succo pancreatico delimitate da una parete fibrosa di tessuto di granulazione, che si evidenziano a circa 4 settimane dall'esordio sintomatologico dell'episodio infiammatorio acuto. Le pseudocisti hanno generalmente forma sferoidale o ovoidale e contenuto sterile;

- la formazione di ascessi come evoluzione di una raccolta acuta fluida o di una pseudocisti pancreatica.

Ulteriori complicanze addominali sono rappresentate dallo sviluppo di trombosi venose del circolo splancnico, dalla formazione di pseudoaneurismi prevalentemente dell'arteria splenica o mesenterica, e dallo sviluppo della sindrome compartimentale addominale a causa del massiccio sequestro di liquidi e/o sangue nel comparto addominale (intra o extra peritoneale).

Lo stesso simposio ha definito e quantificato le complicanze sistemiche che implicano la classificazione in pancreatite acuta severa dell'evento acuto (shock, insufficienza respiratoria, insufficienza renale, emorragia gastrointestinale, CID o gravi alterazioni metaboliche) (Tab. I).

<b>Diagnosi di PA severa</b>	<b>Criteri</b>
<u>Insufficienza d'organo/complicanze sistemiche</u>	
- <i>Cardiaca</i>	Pressione arteriosa sistolica $\leq 90$ mmHg
- <i>Polmonare</i>	PaO <sub>2</sub> $\leq 60$ mmHg
- <i>Renale</i>	Creatinina $> 2$ mg/dl dopo reidratazione
- <i>Sanguinamento gastrointestinale</i>	500 ml/24h
- <i>CID</i>	Piastrine $\leq 100.000$ mm <sup>3</sup> o fibrinog $< 1$ g/L
- <i>Scompenso metabolico</i>	Calcio $< 7,5$ mg/dl
<u>Complicanze locali</u>	- Raccolte fluide intra/extra pancr. precoci
	- Necrosi
	- Pseudocisti
	- Ascesso e necrosi infetta

**Tabella I.** Criteri di Atlanta 1992 per la definizione della pancreatite acuta severa (5)

La pancreatite acuta lieve comprende tutti i casi in cui non si manifestano tali complicanze. E' associata a una minima disfunzione d'organo e presenta meno dell'1% di mortalità; è caratterizzata da una rapida risoluzione spontanea del quadro clinico-laboratoristico con *restitutio ad integrum* della funzionalità pancreatica, e necessita esclusivamente di una terapia di supporto.

### Prognosi

Circa il 20-25% dei pazienti con pancreatite acuta sviluppa un quadro di pancreatite acuta severa; il tasso di mortalità è pari al 10-15% del totale. Questa percentuale si è andata riducendo negli ultimi 20 anni grazie all'evoluzione delle cure e del supporto intensivo che si può fornire a questi pazienti.

La morbilità e la mortalità sono largamente influenzate dalla comparsa di insufficienza in uno o più organi e dal grado di severità e reversibilità della stessa. Il 60% dei pazienti che muore durante la prima

settimana di malattia presenta un quadro di insufficienza polmonare grave.

Lo sviluppo di MODS, l'entità della necrosi pancreatica, l'infezione loco-regionale e la sepsi sono i fattori che maggiormente influenzano la mortalità nella PA. La MODS pare essere indotta dalle citochine e dai mediatori pro-infiammatori rilasciati in corso di SIRS, situazione presente in circa il 72-90% dei pazienti affetti da PA severa. Un'insufficienza d'organo singola (*Single Organ Failure: SOF*) si manifesta nel 25-37% e l'insufficienza multi organo (*Multi-Organ Failure: MOF*) nel 35-66% dei casi di MODS rispettivamente. Le insufficienze d'organo singole più frequentemente registrate in corso di MODS sono state l'insufficienza respiratoria (39,1-63%), cardiovascolare (23-37,7%), epatica (20,7%) e renale (5,8-13%) (6).

Una recente review su 121 pazienti di Buter et al ha evidenziato che la maggior parte dei pazienti con insufficienza d'organo transitoria presenta un esito favorevole contrariamente a quelli con insufficienza d'organo persistente (>48 ore) o ingravescente, individuando in queste due ultime evenienze validi fattori predittivi indipendenti di mortalità (7).

La mortalità in corso di pancreatite acuta segue una distribuzione bimodale: un primo picco di mortalità si manifesta entro la prima settimana dall'esordio ed è generalmente conseguente allo sviluppo di una precoce disfunzione multiorgano, severa e irreversibile, correlata con il quadro di risposta infiammatoria sistemica (*systemic inflammatory response syndrome, SIRS*); il secondo si evidenzia a distanza di circa 2

settimane dall'esordio ed è dominato dalla sepsi e dalle sequele dell'insufficienza d'organo.

## **PRINCIPALI INDICI PROGNOSTICI MULTIPARAMETRICI**

I progressi ottenuti negli ultimi 25 anni nelle tecniche rianimatorie e di terapia intensiva, hanno permesso un miglioramento complessivo della prognosi dei pazienti affetti da pancreatite acuta. Considerata la rapida evoluzione che possono presentare i pazienti con pancreatite acuta severa verso le complicanze locali e l'insufficienza multiorgano, poter predire precocemente il grado di severità dell'evento acuto, permetterebbe di indirizzare tempestivamente i casi più gravi verso un trattamento di tipo intensivistico, prima che si manifestino le complicanze predette.

Nel corso del tempo vari indici prognostici basati su valutazioni cliniche, laboratoristiche e/o radiologiche sono stati creati o adattati alla pancreatite acuta per predire l'outcome di questi pazienti. L'indice prognostico ideale dovrebbe essere rapido da calcolare, facilmente riproducibile, economico, scarsamente invasivo (considerata l'elevata incidenza di casi lievi) e molto accurato. Ad oggi un indice che riassume adeguatamente tutte queste caratteristiche non è stato ancora validato.

Gli indici prognostici multiparametrici più diffusi nella pratica clinica sono ad oggi i criteri di Ranson, l'Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Score e il CT Severity Index (CTSI) o Balthazar Score.

Il **Ranson score** è un indice prognostico multiparametrico creato appositamente per la stratificazione dei pazienti con pancreatite acuta in relazione alla severità predetta. E' stato proposto originariamente nel 1974 da Ranson e colleghi per i casi di pancreatite a eziologia alcolica; nel 1979 è stato modificato dallo stesso autore per adattarlo ai casi di pancreatite acuta biliare. Prevede la valutazione di 11 parametri clinico-laboratoristici, all'accesso (5 parametri) e a 48 (6 parametri) ore dal ricovero (vedi Tabella II). E' un indice facile da calcolare, ma necessita di 48 ore di tempo per concluderne il calcolo. La mortalità predetta è trascurabile per i pazienti con un Ranson di 0-2, pari al 10-20% nei pazienti con un valore tra 3 e 5 ed è superiore al 50% per i pazienti con uno score maggiore di 5. Un valore di Ranson  $\geq 3$  è considerato predittivo di pancreatite acuta severa. Secondo i dati presenti in letteratura la sensibilità dei criteri di Ranson varia tra il 70 e l'80% (8-13).

	<b>PA biliare</b>	<b>PA non biliare</b>
<b>Criteri all'ingresso</b>		
- Età (anni)	>70	>55
- Leucociti/mmc	>18.000	>16.000
- Glicemia (mg/dL)	>220	>200
- LDH (UI/100mL)	>400	>350
- AST (U/100mL)	>250	>250
<b>Criteri a 48 ore</b>		
- Riduzione HT (punti %)	>10	>10
- Aumento BUN (mg/100m/L)	>2	>5
- PO2 arteriosa (mmHg)	>60	<60
- Defici basi (mEq/L)	>5	>4
- Sequestro liquidi (L)	>4	>6

**Tabella II.** Criteri di Ranson (8-9)

**L'Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II)** è un sistema di classificazione della severità di malattia proposto nel 1985 da Knaus per predire il rischio di morbidità e mortalità in un ampio spettro di patologie in fase acuta all'ingresso in terapia intensiva (14). Nel 1989 è stato applicato alla pancreatite acuta da Larvin e McMahon.

E' basato sulla valutazione di 12 parametri clinico-laboratoristici e sull'età del paziente, con correzioni per la presenza di malattie croniche e di insufficienze d'organo coesistenti o sopraggiunte. E' un sistema di valutazione della criticità della condizione clinica del paziente più complesso rispetto ai criteri di Ranson ma alcuni autori lo preferiscono perchè può essere calcolato immediatamente all'ingresso del paziente (15-18) e può eventualmente essere ulteriormente stimato durante le varie fasi della malattia. Alcuni autori hanno infatti riscontrato una associazione significativa tra gli elevati valori di APACHE II score all'ingresso, lo sviluppo di PA severa e la mortalità da questa derivata (16,19); altri hanno evidenziato una associazione all'ingresso solo tra i valori di APACHE II e lo sviluppo di insufficienza d'organo, riportando invece un'associazione significativa anche per la comparsa di necrosi e per lo sviluppo di mortalità qualora lo score venga calcolato a 48 ore dall'accesso (20).

Il valore predittivo positivo e la sensibilità dell'APACHE II score per la pancreatite acuta severa riportati in letteratura variano tra il 28 e il 67% e il 63 e 71% rispettivamente (21).

La maggior parte degli autori, compresi gli autori della classificazione di Atlanta già citati, considera un APACHE II score  $\geq 8$  un valore predittivo di pancreatite acuta severa.

**Il Balthazar Score o Computed Tomography Severity Index (CTSI)** è stato introdotto nel 1990 da Balthazar e Ranson nella pratica clinica. È un sistema di stadiazione radiologica della pancreatite acuta che utilizza la tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto endovenoso eseguita precocemente (entro le 72 ore dall'esordio dell'evento acuto) per valutare l'estensione del processo infiammatorio ghiandolare e perigliandolare e l'eventuale formazione di raccolte fluide e/o di aree di necrosi pancreatica/peripancreatica. Il CTSI assegna un punteggio alle diverse alterazioni morfologiche (vedi Tabella III) e correla il punteggio ottenuto, in termini probabilistici, allo sviluppo di complicanze e/o di mortalità.

La presenza di necrosi è considerata uno dei fattori prognostici più significativi per lo sviluppo di infezione pancreatica (fino all'80% di rischio), insufficienza multiorgano e morte. La prevalenza dell'insufficienza d'organo aumenta con l'estensione della necrosi sterile e questo è rispecchiato dal maggior peso attribuito dallo score alla presenza di necrosi rispetto agli altri parametri.

Il CTSI correla significativamente con la severità e la mortalità della pancreatite acuta, con la durata dell'ospedalizzazione e con la necessità di eseguire una necrosectomia (22-25). Un limite del CTSI è quello di essere basato sulla valutazione delle complicanze locali senza

considerare il grado di risposta infiammatoria sistemica e il conseguente coinvolgimento precoce di altri organi anche in assenza di un eclatante coinvolgimento locoregionale.

<b>Grado</b>	<b>Evidenza radiologica</b>	<b>Punteggio</b>
A	Pancreas normale	0
B	Ingrandimento del pancreas	1
C	Infiammazione coinvolgente il pancreas e il grasso peripancreatico	2
D	Singola raccolta fluida o flemmone	3
E	Due o più raccolte fluide o flemmoni	4
<b>Grado di necrosi pancreatica</b>	Assenza di necrosi	0
	Necrosi di < 30%	2
	Necrosi del 30-50%	4
	Necrosi >50%	6

<b>severity index</b>	<b>mortalità</b>	<b>morbilità</b>
0-1	0%	0%
2-3	3%	8%
4-6	6%	35%
7-10	17%	92%

**Tabella III.** Computer Tomography Severity Index (Balthazar Score)

Un Balthazar Score > 3 viene considerato predittivo dello sviluppo di una pancreatite acuta severa.

## **MARCATORI MOLECOLARI**

Negli ultimi 20 anni, la migliore conoscenza dei meccanismi fisiopatologici dei processi infiammatori correlati alla progressione della malattia, ha spinto numerosi autori a ricercare marker biochimici

specifici, che possano aiutare ad individuare precocemente i pazienti con pancreatite acuta severa con la stessa finalità degli altri indici prognostici: selezionare i pazienti che necessitano di cure intensive già all'esordio dell'evento acuto.

L'identificazione di marker molecolari specifici inoltre, sta guidando la sperimentazione verso l'utilizzo di antagonisti molecolari che possano interrompere la cascata infiammatoria responsabile delle più drammatiche evoluzioni della pancreatite acuta.

In particolare, in questo studio, sulla scorta dei numerosi studi comparsi in letteratura, abbiamo valutato le concentrazioni di Proteina C Reattiva (PCR) e Metalloproteinasi-9 (MMP-9) nei pazienti affetti da pancreatite acuta al fine di valutarne il ruolo come fattori predittivi precoci di severità.

### **Proteina C Reattiva**

La PCR è una glicoproteina a struttura pentamerica con peso molecolare pari a 100 kD. Fa parte della famiglia delle proteine della fase acuta ed è sintetizzata dagli epatociti in seguito a insulti infiammatori di varia natura. Un aumento della sua concentrazione rappresenta una risposta aspecifica a diversi tipi di danno tissutale. La sua produzione è indotta dal rilascio di IL-1, IL-6 e TNF  $\alpha$ .

E' un indice estremamente sensibile di infiammazione e ha guadagnato un ruolo nella diagnosi e nella stratificazione per severità di varie patologie, anche in relazione alla relativa diffusione ed economicità dei sistemi di dosaggio.

La rapida risposta della PCR alle variazioni di intensità del processo infiammatorio, ne hanno suggerito l'impiego anche nell'inquadramento e nel monitoraggio della pancreatite acuta. Vari studi hanno dimostrato che le concentrazioni sieriche di PCR sono predittive della progressione della malattia da lieve a severa.

Dopo anni di discussioni in letteratura ancora non esiste un accordo universale sul cut-off da utilizzare nella stima della pancreatite acuta. Cut-off variabili tra 110 e 300 mg/L sono stati variabilmente considerati in diversi studi per determinare la soglia di sensibilità di questo marcatore per lo sviluppo generico di PA severa o delle complicanze specifiche di malattia (necrosi, raccolte endoaddominali, sepsi). Alfonso et al in uno studio su 157 pazienti affetti da pancreatite acuta, hanno evidenziato che un valore di PCR > di 200 mg/L a 72 ore dall'esordio indica un'elevata probabilità di sviluppo di necrosi pancreatica (26). Simili risultati sono stati riportati anche in studi di minori dimensioni (27). Valori maggiori di 120 mg/L sono ritenuti in grado di identificare tra il 67 e il 100% dei pazienti che svilupperanno necrosi pancreatica.

In termini generali più basso è il valore cut-off che viene scelto, più alti sono la sensibilità e il valore predittivo negativo del test; al contrario, più alto è il cut-off e maggiore risulta la specificità e il valore predittivo positivo del test.

La Consensus Conference di Santorini del 1999 e la maggior parte degli autori raccomandano un cut-off di 150 mg/L come fattore predittivo per lo sviluppo di una pancreatite acuta severa (17,28-34).

Inoltre è stato studiato l'andamento delle concentrazioni sieriche di PCR nel tempo, per individuare il momento in cui questo marcatore possa essere considerato un più affidabile indice prognostico (18,30). Vari studi hanno dosato la PCR a 24, 48 e 72 ore dal momento del ricovero ottenendo valori variabili di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) (Tab. IV) (31-34).

**Tabella IV.** Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo Positivo (VPP) e Valore Predittivo Negativo (VPN) del dosaggio della PCR a 0-24-48 e 72 ore dal ricovero nei pazienti affetti da pancreatite acuta in un'analisi su 11 studi specifici (Al Bahrani 31).

	<b>Tempo 0</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Sensibilità</b>	38-61%	44-83%	57-89%	83-90%
<b>Specificità</b>	89-90%	70-96%	55-82%	60-84%
<b>VPP</b>	59-78%	42-89%	37-73%	75-86%
<b>VPN</b>	78-79%	76-91%	80-94%	69-92%

La maggior parte degli autori concorda con l'ipotesi che i valori di PCR non riflettano la severità della pancreatite acuta prima di 48-72 ore dall'esordio (13,35).

### **Metalloproteinasi di Matrice-9**

Le metalloproteinasi di matrice (MMP) sono una famiglia di circa 25 enzimi che condividono sequenze omologhe e che intervengono nella degradazione della matrice extracellulare. Sono endopeptidasi  $Zn^{2+}$  dipendenti, in grado di degradare vari componenti della matrice

extracellulare, compresi il collagene di tipo I (interstiziale), di tipo IV (lamina basale), la fibronectina, la laminina e la gelatina. Le MMP vengono secrete come proenzimi e attivate in sede extracellulare con una proteolisi limitata e sono inibite da inibitori tessuto-specifici (tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP's). In condizioni fisiologiche, l'attività delle MMP è regolata a vari livelli: trascrizione, attivazione dei precursori zimogeni, interazione con specifiche componenti della matrice extracellulare, inibizione da parte di inibitori specifici. Le MMP sono coinvolte in vari processi come l'organogenesi, la guarigione delle ferite, l'invasione delle cellule infiammatorie, il rimodellamento tissutale e l'angiogenesi. Una perdita di controllo nell'attività di regolazione di questi enzimi può esitare in processi patologici come artrite, cancro, aterosclerosi, aneurismi, nefrite e fibrosi.

Tra le MMP, le collagenasi di tipo IV (MMP-2 e MMP-9 [gelatinasi]) sono particolarmente importanti nell'infiltrazione tissutale dei PMN durante i processi infiammatori, a causa dell'elevata concentrazione di collagene di tipo IV nel contesto della membrana basale vascolare.

L' IL-1 e il  $TNF\alpha$  aumentano la produzione e la secrezione di queste MMP mentre, varie chemokine come l'interferon  $\gamma$ , l'IL-4 e il  $TGF\beta$  ne inibiscono la produzione.

Modelli animali utilizzati per lo studio dell'insufficienza multiorgano, hanno indicato i leucociti polimorfonucleati (PMN) come il mediatore cellulare implicato nel danno d'organo. Affinché i polimorfonucleati inducano il danno, è necessario che aderiscano alla

superficie cellulare endoteliale e attraversino l'endotelio accumulandosi nella sede dell'infiammazione. Un passo critico nell'invasione tissutale da parte dei PMN è la digestione della membrana basale e della circostante matrice extracellulare (36). Questo processo necessita di un'azione coordinata da parte di vari enzimi proteolitici, compresi le serin-proteasi PMN-derivate e le metalloproteinasi di matrice. Il rilascio di questi enzimi da parte dei PMN, conduce a un aumento della permeabilità vasale e quindi a un aumento dell'infiltrazione dei PMN, dell'edema interstiziale, del rimodellamento tissutale e, da ultimo, all'instaurazione del danno d'organo.

In un sistema che si autosostiene, le MMP attivate richiamano altri neutrofili dal torrente circolatorio e ne causano a loro volta l'attivazione così che questi possano aderire alla membrana basale, liberare ulteriori quantità di MMP e migrare nei tessuti sede di infiammazione amplificando ulteriormente il processo.

L'osservazione che le MMP hanno un ruolo centrale nel rimodellamento tissutale e possono contribuire all'instaurarsi dell'insufficienza d'organo, ha spinto vari autori a studiare il ruolo delle MMP nella pancreatite acuta.

Studi recenti hanno dimostrato che il livello di MMP-9 correla con il grado di severità della patologia. La maggior parte di questi studi è ancora di tipo sperimentale su animali da laboratorio.

Muhs et al hanno evidenziato che l'attività delle MMP-2 e MMP-9 è aumentata dopo l'induzione sperimentale della pancreatite acuta, nel fluido peritoneale e nell'omogenizzato polmonare di ratti. L'incremento

dell'attività delle MMP è risultato correlato al danno pancreatico valutato istologicamente e al danno polmonare evidenziato dall'aumento della permeabilità microvascolare polmonare studiato mediante colorazioni vitali (37). Keck et al hanno evidenziato un legame diretto tra l'attivazione e la tras migrazione neutrofila, la distruzione della membrana basale vasale polmonare e l'incremento della concentrazione di MMP-9 negli alveoli polmonari di ratti con ARDS da pancreatite acuta indotta sperimentalmente (38).

Chen et al, in uno dei pochi studi clinici presenti in letteratura, hanno valutato i livelli di MMP-9, nel siero di 10 pazienti affetti da pancreatite lieve, 10 pazienti affetti da pancreatite severa e nel siero di 10 pazienti arruolati come gruppo di controllo. La concentrazione di MMP-9 è risultata significativamente più alta nei pazienti affetti da pancreatite rispetto al gruppo di controllo e significativamente più alta nei pazienti con pancreatite severa rispetto ai pazienti con pancreatite lieve a 1 ora dal ricovero. A 48 ore dal ricovero gli autori non hanno evidenziato differenze significative tra i pazienti sani e quelli affetti da pancreatite lieve, mentre hanno dimostrato ancora una concentrazione significativamente più alta nei pazienti affetti da malattia severa (39).

Guo et al, in un recentissimo ulteriore studio clinico esperito su 35 pazienti affetti da pancreatite acuta severa, hanno identificato la concentrazione sierica di MMP-9 come fattore di rischio statisticamente significativo per lo sviluppo di necrosi pancreatiche, riflettendo pertanto la gravità della malattia (40).

Vari studi hanno peraltro confermato il ruolo della MMP-9 nel reclutamento e nell'infiltrazione dei neutrofilo a livello pancreatico e a livello polmonare a seguito di induzione sperimentale della PA nel ratto, dimostrando una netta riduzione del danno tissutale pancreatico (valutato istologicamente), del leakage alveolare e dell'attività mieloperossidasi polmonare nei ratti pretrattati con potenti inibitori delle MMP (BB-94) o in ratti privati del gene per le MMP stesse (41-43). Ciò, oltre confermare il ruolo di queste endopeptidasi nella patogenesi del danno tissutale locale e della risposta infiammatoria sistemica, aprono uno spiraglio nella possibilità di individuare una nuova strategia farmacologica nel trattamento della pancreatite acuta.

## **OBIETTIVO DELLA RICERCA**

Lo studio si prefigge l'obiettivo di valutare il ruolo prognostico della proteina C reattiva e della MMP-9, accanto ai più comuni indici prognostici multiparametrici, nella stratificazione precoce della severità della pancreatite acuta.

## **MATERIALI E METODI**

Da dicembre 2006 a dicembre 2011 sono stati ricoverati presso il Dipartimento Emergenza e Accettazione dell'Azienda Policlinico Umberto I, e considerati per l'arruolamento nello studio, 91 pazienti ( 51 uomini e 40 donne, età media 67,9 anni, range 22-94, mediana 66) con diagnosi di pancreatite acuta.

Sono stati esclusi dallo studio 26 pazienti, 20 per la non corretta esecuzione dei prelievi previsti, 4 per la presenza contemporanea di patologia neoplastica e la possibile interferenza con i valori di MMP-9 e PCR (1 linfoma non hodgkin, 1 micosi fungoide, 1 ca del retto e 1 glioblastoma recidivo), 2 perché dimessi contro il parere dei sanitari nelle prime 24 ore dal ricovero.

Sono stati pertanto arruolati per l'analisi prospettica prevista dallo studio 65 pazienti (34 uomini, 31 donne).

La diagnosi di pancreatite acuta si è basata sul riscontro dei segni e sintomi clinici caratteristici della malattia, su un riscontro laboratoristico di un rialzo delle amilasi sieriche pari ad almeno 3 volte il limite superiore della norma, sull'esclusione di altre potenziali cause di dolore addominale e/o sull'evidenza radiologica di alterazioni infiammatorie più o meno severe a carico del parenchima pancreatico.

I pazienti sono stati sottoposti all'ingresso, ai prelievi di laboratorio necessari per l'inquadramento diagnostico: esame emocromocitometrico, glicemia, assetto elettrolitico, funzionalità renale, test di funzionalità epatica e pancreatico, dosaggio dell'LDH, emogasanalisi arteriosa; quando necessario, è stato valutato l'assetto lipidico. La proteina C reattiva è stata dosata nelle prime 24 ore e a 48 ore dal ricovero.

Un sottogruppo di 26 pazienti (15 uomini e 11 donne) è stato sottoposto al dosaggio della MMP-9 nelle prime 24 ore e, in 12 di questi pazienti, a 48 ore dal ricovero. I campioni sono tutt'ora disponibili per il dosaggio della MMP-9 nei restanti pazienti in un prossimo studio clinico.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TC dinamica con mezzo di contrasto entro le prime 72 ore dal ricovero, ad esclusione dei pazienti con alterazione significativa della funzionalità renale (1) o nota allergia al mezzo di contrasto iodato (1). In questi pazienti si è proceduto con l'esecuzione di una TC senza mdc in urgenza e con la successiva esecuzione di una risonanza magnetica con valutazione colangiografica (RMN e colangio-RMN). Gli esiti degli esami radiologici sono stati valutati secondo la classificazione di Balthazar per la definizione del CTSI, da radiologi non edotti del grado di severità oggettivo dell'evento acuto.

Durante il ricovero sono state attuate le procedure terapeutiche standard ed eseguiti gli esami clinici, laboratoristici e radiologici ritenuti necessari dal personale medico del reparto.

I parametri demografici, l'eziologia, i punteggi del Ranson, dell'APACHE II a 0 e 48 ore dal ricovero e del Balthazar score, il dosaggio di PCR, amilasi e lipasi, i giorni di ricovero ospedaliero e in ICU, lo sviluppo di ogni complicanza, la comparsa di insufficienza d'organo, la sua durata, la presenza di necrosi e/o la formazione di raccolte fluide, ascessi o pseudocisti, la necessità di intervento chirurgico e/o di procedure di radiologia interventistica e l'esito finale sono stati registrati in un database predisposto appositamente.

La pancreatite è stata considerata severa nei casi in cui si sia manifestata un'insufficienza d'organo persistente (>48 ore) o una o più complicanze addominali secondo i criteri di Atlanta del 1992 (Vedi Tab. I). I restanti casi sono stati considerati pancreatiti lievi.

Un punteggio di Ranson  $\geq 3$ , un APACHE II score  $\geq 8$ , un valore di CTSI  $> 3$  e/o un valore di PCR  $\geq 150$  mg/L sono stati considerati predittivi di pancreatite acuta severa. La scarsità di dati ad oggi disponibili in letteratura, non ci ha permesso di individuare un cut-off della concentrazione della MMP-9 e quindi la valutazione è stata eseguita come confronto tra le medie dei valori calcolati.

E' stato ottenuto da tutti i pazienti arruolati un consenso informato per l'esecuzione dei prelievi e degli esami in oggetto.

### **Prelievi**

I campioni di sangue periferico per il dosaggio della PCR sono stati prelevati con le normali procedure per la raccolta e la conservazione del siero e del plasma con eparina Li o EDTA. I campioni sono stati analizzati immediatamente con il metodo "Proteina C-Reattiva ad Intervallo esteso" (RCRP). Il metodo RCRP è basato su una tecnica immunologica turbidimetrica con amplificazione delle particelle.

I campioni di sangue periferico per il dosaggio della MMP-9 sono stati prelevati con le normali procedure per la raccolta e la conservazione del plasma con eparina, centrifugati a 4000 g per 10 minuti e quindi conservati in congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi. Le concentrazioni plasmatiche sono state determinate con metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) secondo le indicazioni della casa produttrice del kit (RayBio® Human MMP-9 ELISA Kit cat#:ELH-MMP9-001).

## ANALISI STATISTICA

I dati vengono sintetizzati attraverso delle statistiche descrittive al fine di ottenere una rappresentazione sintetica dell'informazioni raccolte. A seconda della tipologia della variabile in esame—quantitativa o qualitativa—vengono sintetizzati in termini di media aritmetica  $\pm$  relativa deviazione standard (DS), o in termini di percentuale. Al fine di eliminare l'eventuale influenza di valori anomali si è deciso di affiancare alla media una ulteriore misura di tendenza centrale, la mediana, nota come misura insensibile ai cosiddetti outliers. Sono stati inoltre costruiti dei boxplot (box and whiskers plot) di alcune variabili chiave al fine di avere una rappresentazione grafica della distribuzione delle singole variabili. L'idea è quella di individuare attraverso una “scatola”—il box appunto—le osservazioni centrali che risultano comprese entro il primo e il terzo quartile della distribuzione e, con delle code uscenti dalla scatola, le osservazioni più estreme, gli outliers appunto.

Al fine di individuare eventuali differenze significative tra le variabili rilevate nei due gruppi di pazienti con pancreatite acuta e severa sono stati effettuati test sulle medie o sulle proporzioni, anche in questo caso in relazione alla tipologia di variabile in esame. In particolare, sono stati effettuati dei test t di student con varianza diversa e test esatti di Fisher. Un valore di p.value pari a  $P < 0,05$  è stato considerato un valore significativo. Di conseguenza, l'analisi univariata sulla differenza delle medie ha permesso di valutare la potenziale associazione di ciascuna variabile con lo sviluppo di PA. È stato successivamente applicato un

modello di regressione logistica multivariata per valutare i fattori significativi per lo sviluppo di pancreatite acuta severa e la loro potenziale predittività statistica.

## **RISULTATI**

Dei 65 pazienti arruolati 34 erano uomini (52,3%) e 31 donne (47,7%) con un'età media di 60,5 anni (range: 21-94 anni, mediana 66). L'eziologia è risultata nel 75,4% dei casi biliare, nel 6,1% alcolica, nel 3,1% dislipidemia (ipertrigliceridemia); nel restante 15,4% non è stata individuata alcuna causa specifica di malattia (pancreatite idiopatica). La degenza media è stata di  $16,9 \pm 15,2$  giorni (range 3-93, mediana 12).

Sono stati riscontrati 17 casi (26,1%) di pancreatite acuta severa: 13 maschi (76,5%), 4 femmine (23,5%), età media 68,1 anni (range 32-93, mediana 68). In 10 casi l'eziologia dei pazienti con PA severa è stata considerata biliare (58,9%), in 2 casi alcolica (11,8%), in 4 casi idiopatica (23,5%) e in un caso da ipertrigliceridemia (5,8%).

I restanti 48 casi (73,9%) sono stati considerati pancreatiti acute lievi: 21 uomini (43,7%), 27 donne (56,2%), età media 57,7 anni (range 21-94, mediana 63). L'eziologia è risultata in 39 pazienti biliare (81,2%), in 2 casi alcolica (4,20%), in 6 idiopatica (12,50%) e in 1 caso da ipertrigliceridemia (2,10%).

I dati demografici, l'eziologia, la durata dell'ospedalizzazione e la mortalità sono riportati sinteticamente in Tabella V.

	<b>PA Lieve (n=48)</b>	<b>PA Severa (n=17)</b>	<b>PA Totale (n=65)</b>
<b>Genere</b>			
- Maschi	21 (43,7%)	13 (76,5%)	34 (52,3%)
- Femmine	27 (56,2%)	4 (23,5%)	31 (47,7%)
<b>Età</b>	57,7 (22-94) [63]	68,1 (32-93) [68]	60,5 (21-94) [66]
<b>Eziologia</b>			
- Biliare	39 (81,2%)	10 (58,9%)	49 (75,4%)
- Alcolica	2 (4,2%)	2 (11,8%)	4 (6,1%)
- Dislipidemia	1 (2,1%)	1 (5,8%)	2 (3,1%)
- Idiopatica	6 (12,5%)	4 (23,5%)	10 (15,4%)
<b>Degenza</b>	12,0 (4-39)	30,9 (3-93)	16,9
<b>Mortalità</b>	--	3 (17,6%)	3 (4,6%)

**Tabella V.** Dati demografici. Età: media anni (range) [mediana], degenza: media giorni (range) [mediana]; Genere, Eziologia, Mortalità: n (%). PA: pancreatite acuta.

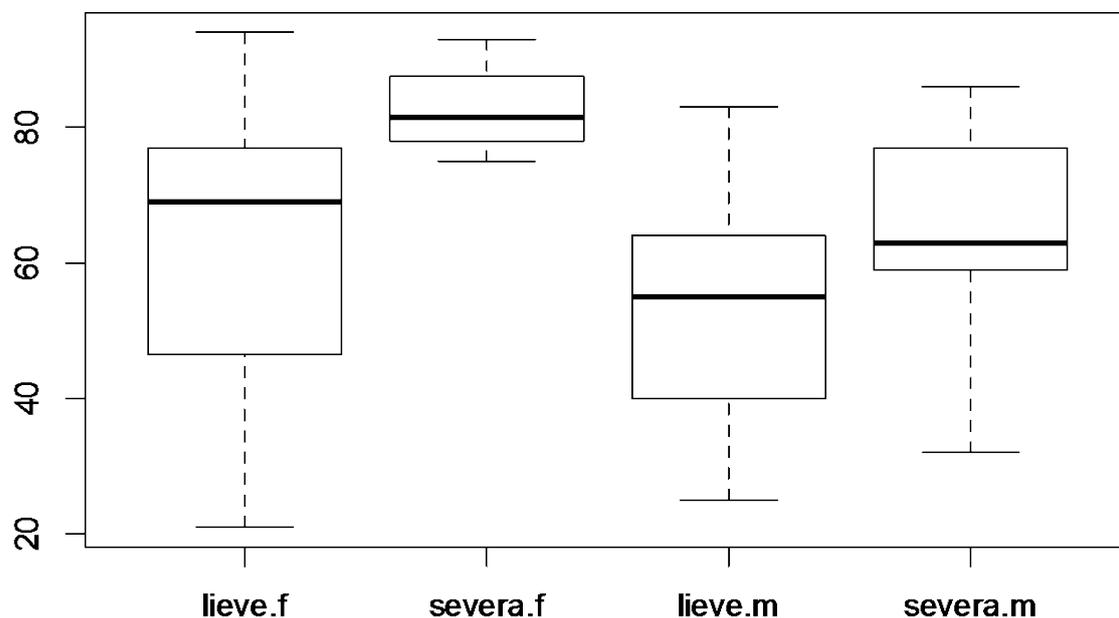
Non si sono rilevate differenze significative nell'incidenza delle diverse eziologie nei due gruppi ( $p=0,2774$ ).

I valori dei principali parametri calcolati, corredati di valori medi, Deviazione Standard (DS), mediana e distribuzione in quartili sono riportati in Tabella VI.

Come precedentemente osservato, la distribuzione statistica delle variabili in esame e' rappresentata graficamente attraverso *box plot*. Questo tipo di rappresentazione grafica descrive la distribuzione in esame senza alcuna assunzione sulla sottostante distribuzione statistica, pertanto si configura come una semplice analisi descrittiva di tipo grafico che pero' ha un elevato contenuto informativo sia in termini di differenze tra i sottogruppi della popolazione considerata sia in termini di individuazione di outliers. La linea spessa rappresenta la *mediana* della distribuzione; le linee estreme del box il primo e il terzo quartile; la distanza tra il terzo ed il primo quartile, *distanza interquartilica*, è una misura della distribuzione del campione e il 50% delle osservazioni sono

comprese tra questi 2 valori. Le linee tratteggiate che partono dal bordo del box (whiskers-baffi) individuano gli intervalli in cui sono posizionati i valori minori del primo (Q1) e maggiori del terzo (Q3) quartile; i punti estremi dei *baffi* evidenziano i *valori adiacenti superiore (VAS) e inferiore(VAI)*. Se si indica con  $r = Q3-Q1$  la differenza interquartilica, il VAI è il valore più piccolo  $\geq a Q1-1,5r$ , mentre il VAS è il valore più grande  $\leq a Q3+1,5r$ . I valori esterni a questi limiti (anomali o outlier), se presenti, vengono segnalati individualmente come piccoli cerchi. Questi valori rappresentano una “anomalia” rispetto alla maggior parte dei valori osservati e pertanto vengono identificati fornendo informazioni ulteriori sulla dispersione e sulla forma della distribuzione (DA: William S. Cleveland, *Visualizing Data*. At&T Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey, 1993).

## Eta' dei pazienti



**Fig.1** Box and whisker plot. Confronto tra i valori dell'età dei pazienti affetti da PA lieve e severa distinti per sesso. f = femmina; m = maschio.

La distribuzione dei valori dell'età suddivisa per sesso e per gruppo di appartenenza (PA lieve vs PA severa) (Fig.1) mostra come i pazienti più anziani siano concentrati tra quelli con patologia severa e, in particolar modo tra le donne di questo gruppo. Inoltre si può notare come la variabilità nel contesto dei gruppi (distanza interquartilica) sia notevolmente più ampia nei pz con PA lieve. L'analisi inferenziale tra i due campioni conferma il dato deducibile per via intuitiva dal boxplot, dimostrando una differenza significativa tra l'età dei pazienti affetti da pancreatite severa e lieve ( $68,12 \pm 16,07$  vs  $57,75 \pm 20,32$ ;  $p < 0,05$ ).

Si sono avuti 3 decessi con una mortalità totale del 4,6%, tutti registrati nel gruppo pancreatite severa con una mortalità relativa del 17,6%.

Nel gruppo pancreatite severa 6 pazienti hanno sviluppato necrosi pancreatica (35,3%), in 3 casi (17,6%) si sono evidenziate raccolte intra/peripancreatiche infette (un decesso per insufficienza cardiaca e shock settico a 60 giorni dal ricovero) che sono state trattate mediante drenaggio e necrosectomia percutanea, in 1 caso (5,9%) si è assistito alla formazione di pseudocisti, in 5 pazienti (29,4%) si sono evidenziate raccolte intra/peripancreatiche non infette, in 2 casi (17,8%) si è sviluppato un quadro di MODS/MOF con decesso entro la prima settimana dall'esordio rispettivamente a 3 e 7 giorni dal ricovero; in 7 pazienti (41,2%) si è assistito a quadri di insufficienza d'organo persistente (durata > 48 ore): 1 caso di insufficienza cardiaca e sepsi deceduto a 60 giorni (già descritto), 2 casi di insufficienza renale, 3 casi di insufficienza respiratoria, 1 caso di emorragia gastrointestinale che ha necessitato l'esecuzione di una esofago-gastro-duodenoscopia d'urgenza con reperto di ulcera duodenale da stress, 1 caso di insufficienza midollare con anemia aplastica, 1 caso di insufficienza multiorgano - renale, polmonare e metabolica- regredita con terapia medica. Un solo paziente è stato trasferito in terapia intensiva durante il ricovero e lì è deceduto per MOF (lo stesso paziente già riportato, deceduto a 3 giorni dal ricovero). Dei 3 pazienti deceduti 2 presentavano necrosi alla TC eseguita all'ingresso (1<30%, 1 >50%). Nel terzo paziente una seconda

TC eseguita a 1 settimana dal ricovero per peggioramento del quadro clinico dimostrava la presenza di necrosi <30%.

Nei pazienti affetti da pancreatite acuta lieve si è registrato lo 0% di mortalità e di complicanze maggiori (per definizione) e nel 12,5% dei casi si è assistito alla comparsa di complicanze minori (6 pazienti): 3 casi di versamento pleurico monolaterale, 1 caso di innalzamento della creatininemia transitorio (<48h) risoltosi con adeguata idratazione, 1 caso di aritmia cardiaca (flutter) che ha necessitato il posizionamento di un PM cardiaco non in urgenza, 1 caso di pneumotorace iatrogeno (post posizionamento di catetere venoso centrale). In tutti i casi si è assistito alla completa risoluzione del quadro clinico con progressiva normalizzazione dei parametri di laboratorio.

Nessun paziente è stato sottoposto a intervento chirurgico d'urgenza per le complicanze della pancreatite acuta. 17 pazienti (26,1%) di cui 15 con PA lieve e 2 con PA severa sono stati sottoposti a intervento di colecistectomia (14 interventi videolaparoscopici di cui uno convertito e 2 laparotomici) durante il primo ricovero (14) o in un ricovero successivo (1) a distanza di circa un mese dal primo. 6 pazienti hanno rifiutato l'intervento di colecistectomia in relazione all'età e al rischio operatorio, 10 pazienti avevano già subito un intervento di colecistectomia. 24 pazienti (36,9%) di cui 19 con PA lieve e 5 con PA severa sono stati sottoposti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica operativa.

La degenza media per i pazienti affetti da pancreatite acuta severa è stata di  $30,9 \pm 22,8$  giorni (range 3-93, mediana 20) vs  $12,04 \pm 6,4$  giorni

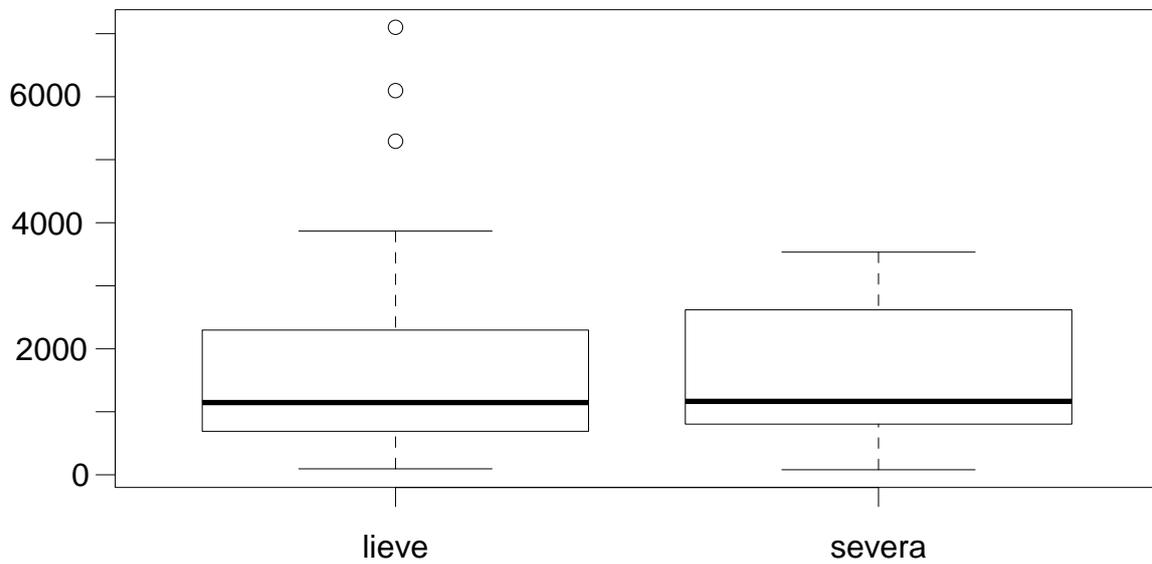
(range 4-39, mediana 10,5) nei pazienti affetti da patologia lieve con un aumento significativo della durata del ricovero per i pazienti con patologia severa ( $p=0,004$ ).

I valori di amilasemia dosati al momento del ricovero hanno mostrato una variabilità molto ampia (distanza interquantilica) all'interno del campione, con una distribuzione delle osservazioni che si sovrappone ampiamente tra i due gruppi e una mediana quasi coincidente (mediana PA lievi 1148,5 UI/L; mediana PA severe 1166,5 UI/L); si nota anche una presenza cospicua di valori anomali (Fig.2).

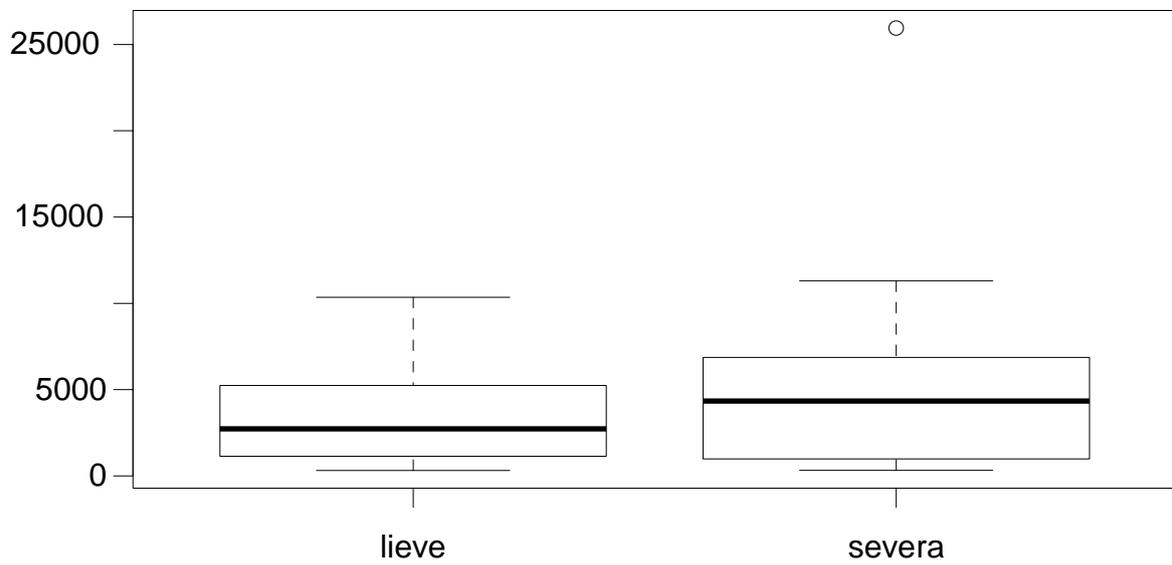
Lo stesso si dica per la distribuzione dei valori di lipasemia al momento del ricovero (Fig.2).

Il test sulle medie relativa ai valori di amilasi e lipasi tra pazienti con PA lieve e severa, non ha dimostrato differenze statisticamente significative (amilasi:  $1676,3 \pm 1542,6$  vs  $1644,3 \pm 1133,4$ ;  $p=0,93$ ; lipasi:  $3417,6 \pm 2749,8$  vs  $5533,1 \pm 6388,3$ ;  $p=0,218$ ) confermando il ruolo diagnostico ma assolutamente non prognostico di questi valori, già evidente da una prima analisi descrittiva dei dati e già ampiamente accettato in letteratura.

### amilasi



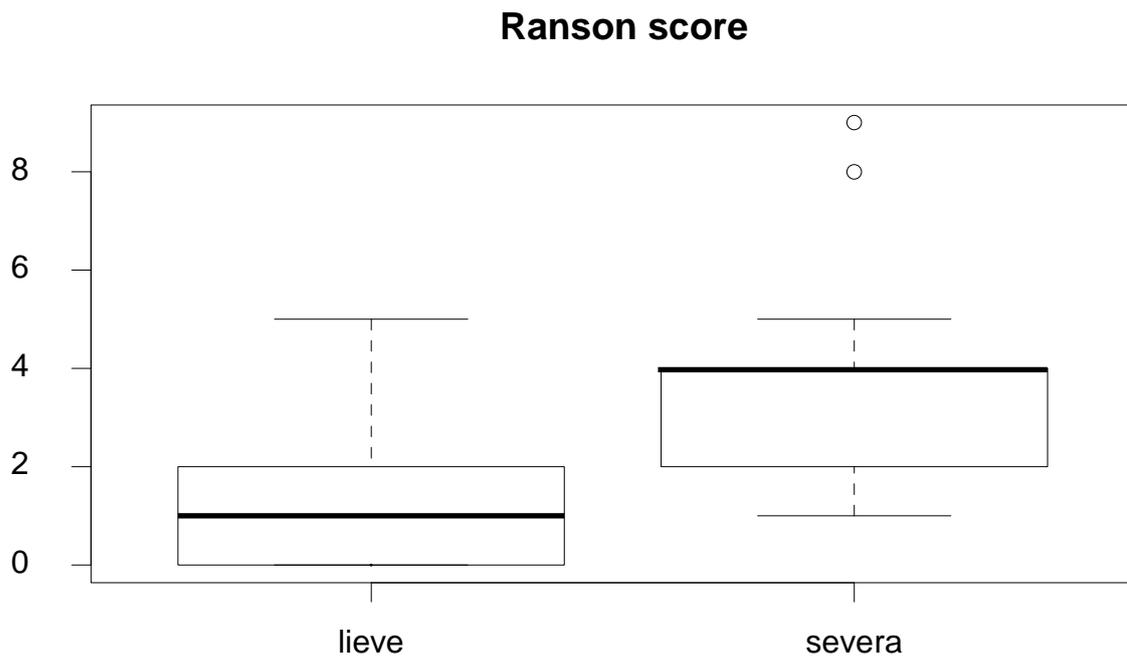
### lipasi



**Fig.2** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzione dei valori di amilasemia e lipasemia (UI/L) tra i pazienti affetti da PA lieve e severa

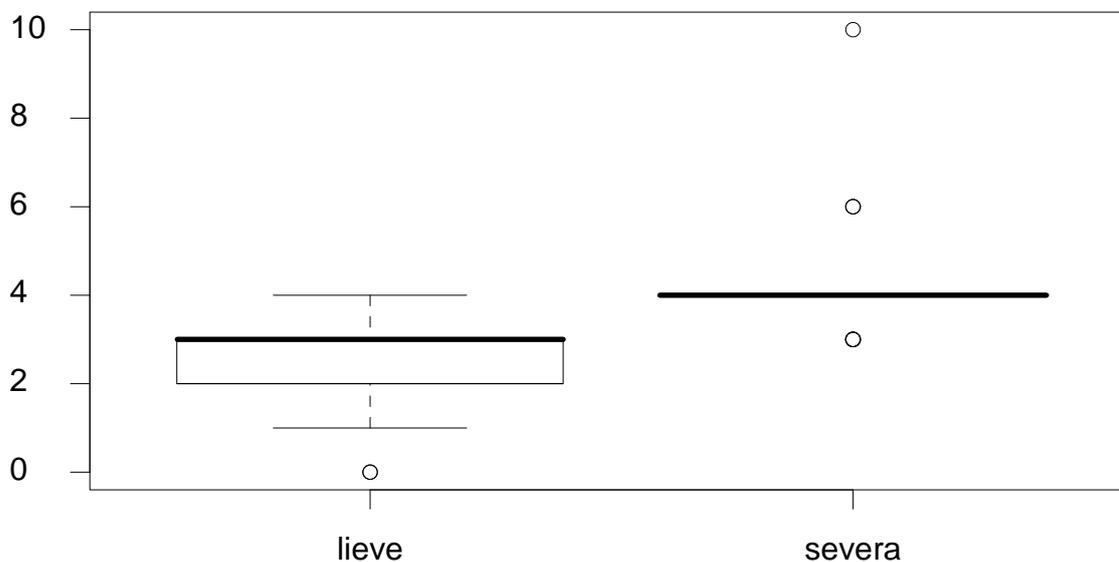
La rappresentazione grafica dei valori del Ranson score (Fig.3) confrontati per severità, mostra la chiara prevalenza di valori elevati tra i pazienti con PA severa, con una netta asimmetria negativa in questa distribuzione (mediana=4 coincidente con Q3 e valori anomali > di VAS) (Fig.2).

I test statistici sulle medie relativi ai punteggi del Ranson score hanno dimostrato un aumento significativo dei valori nei pazienti affetti da PA severa rispetto ai pazienti con PA lieve:  $3,8 \pm 2,0$  vs  $1,31 \pm 1,1$ ;  $p < 0,001$ .



**Fig.3** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzione dei valori di Ranson score tra i pazienti affetti da PA lieve e severa

## Balthazar score



**Fig.4** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzioni dei valori del Balthazar score tra i pazienti affetti da PA lieve e severa

Per quanto riguarda il Balthazar score, la rappresentazione grafica (Fig.4) mostra anche in questo caso una differenza piuttosto chiara tra i due campioni, con valori più alti nel gruppo della PA severa. Inoltre nel box-plot relativo alla PA severa si evidenzia una netta simmetria della distribuzione con variabilità estremamente ridotta ( $Q3-Q1=0$ ) e con sovrapposizione del valore mediano (4), con Q1 e Q3, che risultano peraltro coincidenti con il cut-off dell'indice in questione. Tutti i valori esterni a questa linea viene conseguentemente considerato outlier. La distribuzione dei valori fra i pazienti con PA lieve mostra invece una asimmetria negativa.

I pazienti con patologia severa hanno registrato un punteggio medio di Balthazar score significativamente più elevato rispetto a quelli con patologia lieve:  $4,3 \pm 1,6$ , vs  $2,1 \pm 0,9$ ;  $p < 0,001$ .

La distribuzione grafica (Fig.5) dei valori dell'APACHE II score tra i due gruppi in studio al momento del ricovero, mostra un range interquartile (Q1-Q3) chiaramente superiore nel gruppo della PA severa, mantenendo sovrapposizioni solo degli estremi dei valori.

L'APACHE II score misurato al momento del ricovero ha evidenziato valori medi di  $10 \pm 3,8$  nei pazienti con PA severa vs  $5,1 \pm 3,4$  in quelli con PA lieve;  $p < 0,001$ .

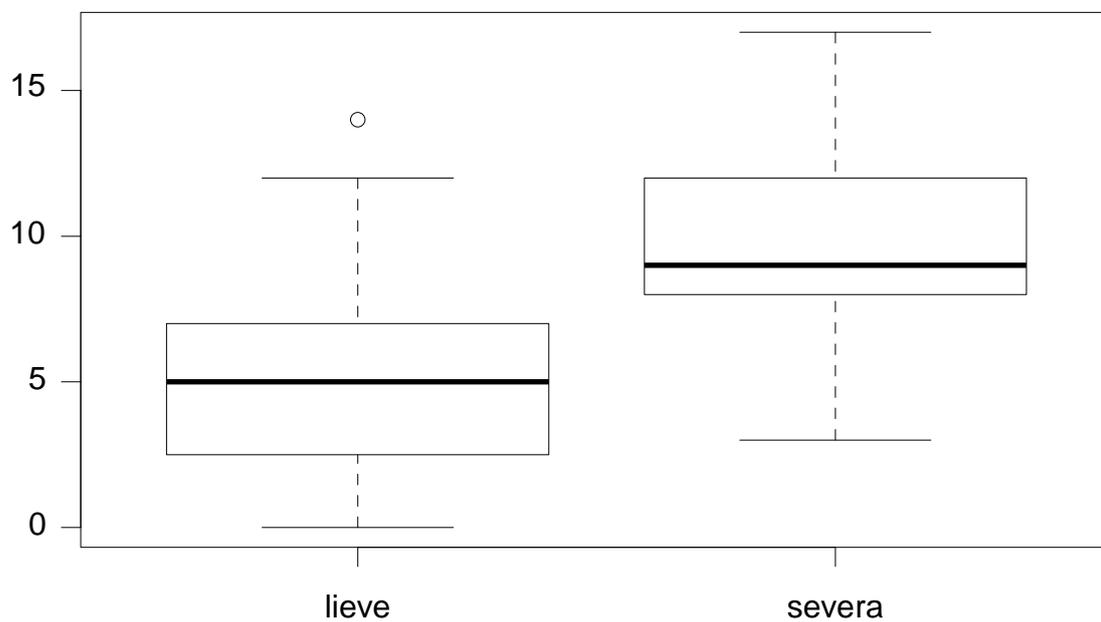
Lo stesso parametro valutato a 48 ore dal ricovero e descritto nel secondo box plot in Fig.5, pur confermando valori maggiori nel gruppo della PA severa, mostra una maggiore sovrapposizione dei due campioni per quanto riguarda il range interquartile. La valutazione inferenziale dei valori di Apache II score a 48 ore ha evidenziato ancora una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ma meno evidente ( $10,5 \pm 7$  vs  $4,7 \pm 3,3$ ;  $p = 0,04$ ).

In tutti i pazienti con PA lieve l'APACHE II score è diminuito o è rimasto stabile a 48 ore dal ricovero. Tra i pazienti con PA severa, in 11 casi (64,7%) l'APACHE II score è rimasto invariato o è diminuito, in 6 (35,3%) è aumentato a 48 ore; tra questi ultimi, 3 pazienti (50%) sono deceduti.

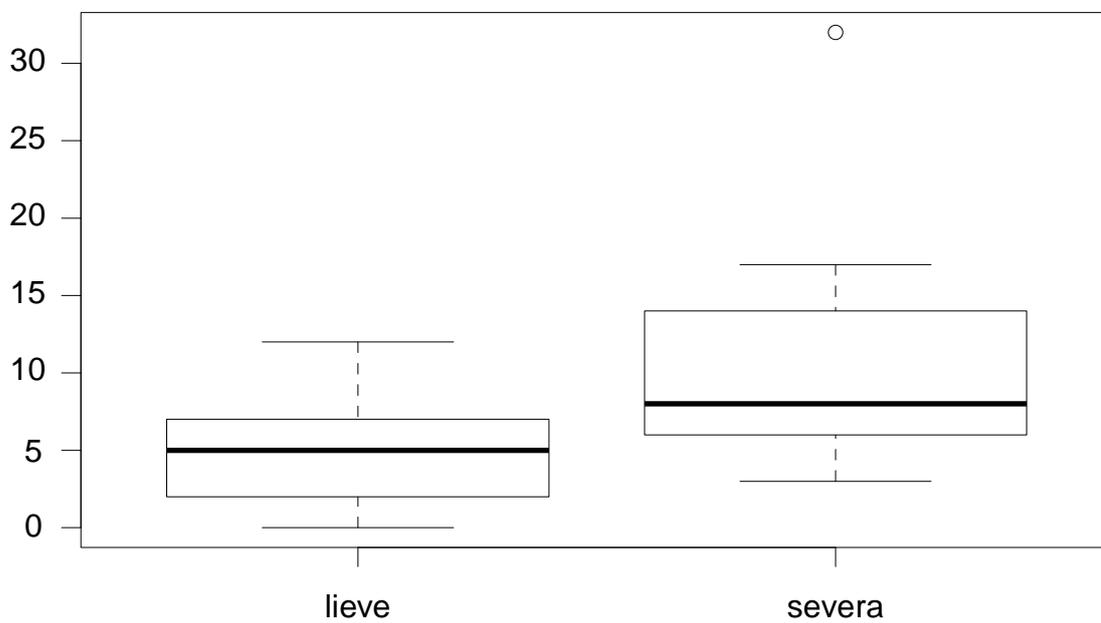
In particolare, il valore medio dell'APACHE II score nei pazienti con PA severa che sono sopravvissuti non è variato a 0 e 48 ore (9); nei

pazienti deceduti invece questo indice è aumentato da 15 a 21 nell'intervallo di tempo considerato. Questi risultati, pur scarsamente rappresentativi data l'esigua numerosità del campione, suggeriscono, in accordo con alcuni lavori pubblicati in letteratura (20), che il peggioramento dell'APACHE II score a 48 ore dal ricovero può identificare un sottogruppo di pazienti con un outcome peggiore.

### Apache II score all'ingresso

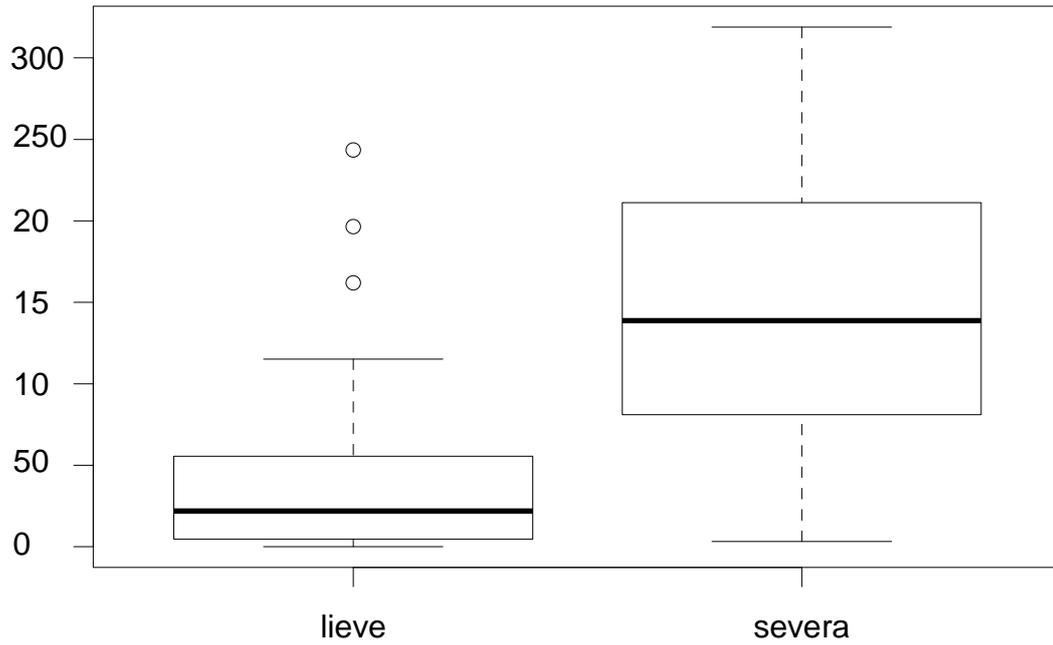


### Apache II score 48h

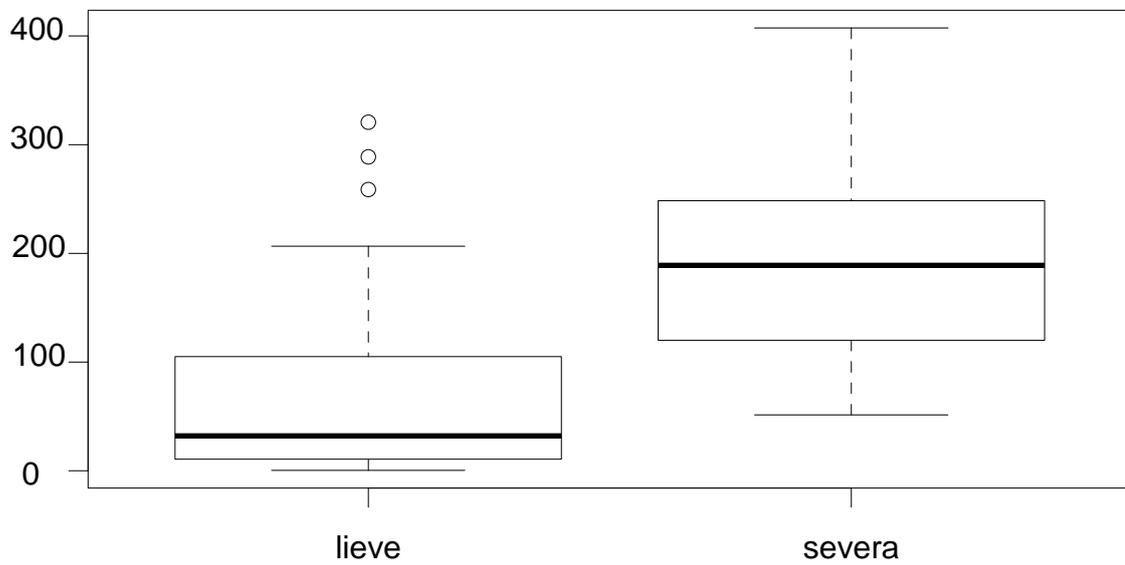


**Fig.5** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzioni dei valori di APACHE II score tra pazienti affetti da PA lieve e severa rispettivamente all'ingresso e a 48 ore dal ricovero.

### PCR all'ingresso



### PCR 48h



**Fig.6** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzioni dei valori di PCR tra i pazienti affetti da PA lieve e severa rispettivamente all'ingresso e a 48 ore dal ricovero.

La distribuzione dei valori di PCR a 0 e 48 ore dal ricovero (Fig 6) mostra in entrambi i casi una netta differenza tra i gruppi PA severa e lieve in assenza di sovrapposizione dei valori contenuti nei box (range interquartilico).

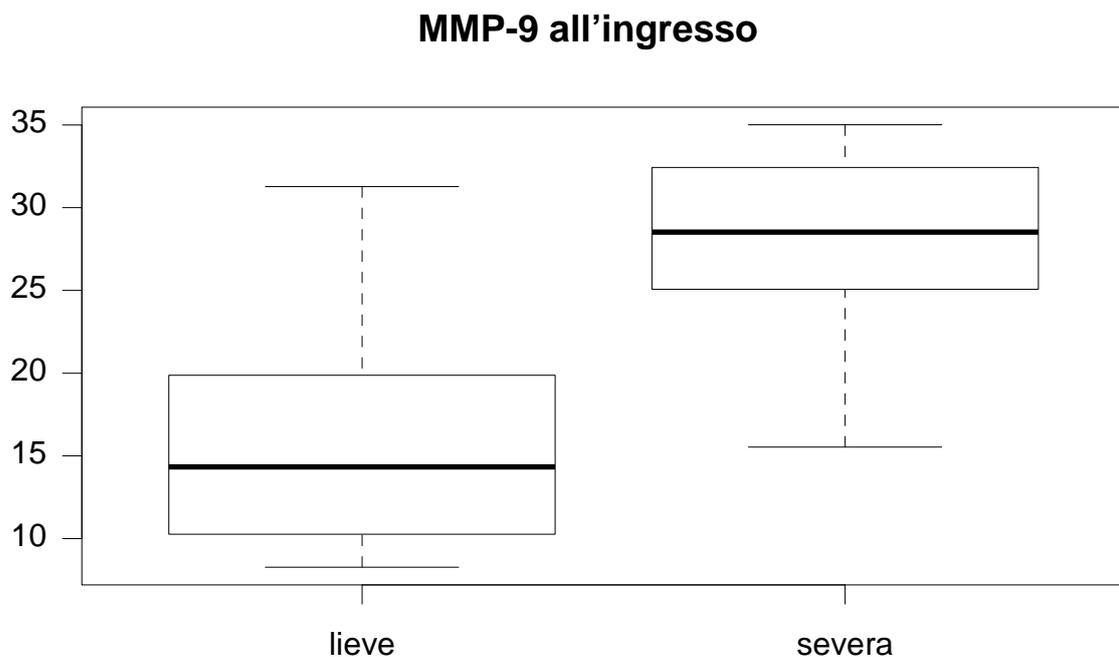
I valori medi di proteina C reattiva sono risultati significativamente più alti nei pazienti affetti da pancreatite acuta severa nelle prime 24 ore ( $141,4 \pm 94$  mg/L vs  $42,6 \pm 55,6$  mg/L;  $p=0,001$ ) e a 48 ore dal ricovero ( $194,9 \pm 87,2$  mg/L vs  $71,1 \pm 81,5$  mg/L;  $p<0,001$ ).

Dei 26 pazienti compresi nel gruppo sottoposto al dosaggio dell'MMP-9 all'ingresso, 15 sono uomini e 11 donne con un'età media di 62,1 anni (range 21-93 anni); tra questi, 15 pazienti hanno presentato una PA lieve e 11 severa. Osservando il box-plot in fig.7 risulta evidente come la maggior parte dei valori di MMP-9 al tempo 0 (50% delle osservazioni centrali intorno alla mediana-valori contenuti nei box) siano complessivamente più elevati nei pazienti con PA severa rispetto a quelli con PA lieve, con un valore della mediana quasi doppia nel gruppo PA severa e con una dispersione contenuta in entrambi i gruppi.

I valori medi di MMP-9 sono risultati rispettivamente di  $27,6 \pm 6,3$  ng/ml nei pazienti affetti da PA severa e  $16,2 \pm 7,7$  ng/ml in quelli con PA lieve con un p-value molto significativo ( $p<0,001$ ).

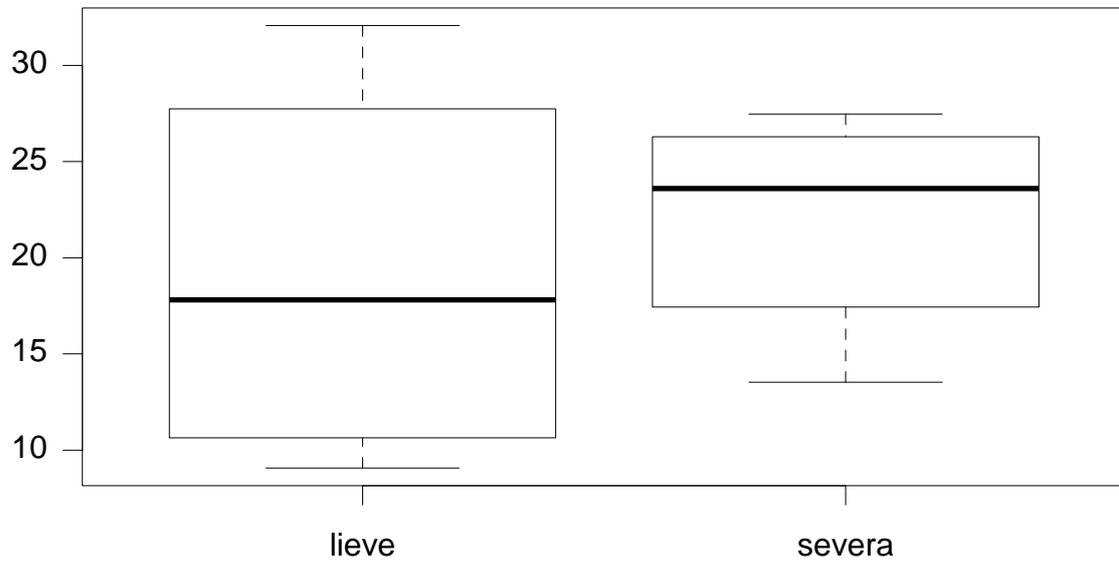
Il dosaggio dell'MMP-9 a 48 ore dal ricovero è stato eseguito su 12 pazienti (tra quelli già sottoposti allo stesso test all'ingresso) di cui 6 uomini e 6 donne con un'età media di 67,3 (range 29-93) anni. In 4 casi si trattava di PA lieve e in 8 di PA severa. La distribuzione grafica delle

osservazioni (Fig.8) mostra una evidente sovrapposizione dei valori compresi tra il primo e il terzo quartile tra i due gruppi e una considerevole dispersione delle concentrazioni di MMP-9 soprattutto tra i pazienti con pancreatite acuta lieve; tutti i valori del gruppo della pancreatite severa risulta compreso nel range dei valori del gruppo PA lieve. Il test sulle medie non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i 2 gruppi ( $21,9 \pm 5,1$  severa vs  $19,1 \pm 10,5$  lieve;  $p = 0,6$  n.s.).



**Fig.7** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzioni dei valori di MMP-9 tra i pazienti affetti da PA lieve e severa all'ingresso

### MMP-9 48h



**Fig.8** Box and whisker plot. Confronto delle distribuzioni dei valori di MMP-9 tra i pazienti affetti da PA lieve e severa a 48 ore dal ricovero

**Tabella VII.** Confronto tra indici prognostici espressi come valore medio $\pm$ DS.  
T0:all'ingresso; 48h: 48 ore dal ricovero; N: campione complessivo; n: sottogruppi di valutazione rispettivamente di MMP-9 all'ingresso e a 48 ore.

	<b>PA Lieve</b>	<b>PA Severa</b>	<b>P value</b>
	<b>N=48</b>	<b>N=17</b>	
<b>Ranson</b>	1,3 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 2,0	<0,001
<b>Balthazar</b>	2,1 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 1,6	<0,001
<b>APACHE II T0</b>	5,1 $\pm$ 3,4	10 $\pm$ 3,8	<0,001
<b>APACHE II 48h</b>	4,7 $\pm$ 3,3	10,5 $\pm$ 7	0,004
<b>PCR (mg/L) T0</b>	42,6 $\pm$ 55,6	141,4 $\pm$ 94,0	0,001
<b>PCR (mg/L) 48h</b>	71,1 $\pm$ 81,5	194,9 $\pm$ 87,2	<0,001
<b>MMP-9(ng/ml) T0</b>	<b>n=15</b>	<b>n=11</b>	
	16,2 $\pm$ 7,7	27,6 $\pm$ 6,3	<0,001
<b>MMP-9(ng/ml) 48 h</b>	<b>n=6</b>	<b>n=6</b>	
	19,1 $\pm$ 10,5	21,9 $\pm$ 5,1	0,6

Complessivamente tutti gli indici multiparametrici hanno mostrato valori medi significativamente superiori nei casi di PA severa, rispetto ai casi di PA lieve; lo stesso è stato osservato per la PCR valutata a 0 e a 48 ore dal ricovero. Per quanto riguarda la MMP-9 la differenza è risultata estremamente significativa per il dosaggio eseguito al momento del ricovero perdendo di significatività nel dosaggio tardivo (Vedi Tab. VII). Questo identificherebbe la MMP-9 come fattore predittivo estremamente precoce ma temporaneo della gravità della malattia. In un lavoro già riportato (39) in precedenza, venivano ottenuti risultati simili, con valori significativamente più elevati nei pazienti con PA severa rispetto ai lievi e nei pazienti con PA lieve rispetto ai controlli al tempo

0. In questo studio però, a differenza del nostro, la significatività statistica veniva confermata a 48 ore dal ricovero nel confronto tra PA severa e gli altri due gruppi.

### *Analisi Statistica predittiva*

Dopo aver analizzato singolarmente i singoli fattori di rischio e aver verificato la differenza tra i due sottogruppi di pazienti, si è cercato di individuare i principali fattori di rischio di pancreatite acuta attraverso un particolare modello statistico che ci permette di effettuare un'analisi di tipo statistico-predittivo. Data la natura dicotomica della nostra variabile risposta  $y$  (pancreatite lieve e pancreatite severa), la scelta è caduta su un modello statistico lineare generalizzato e, in particolare, su un modello logistico lineare.

Un modello logistico modella la probabilità che  $y_i = 1$ , ovvero probabilità di pancreatite severa, seguendo la seguente equazione su scala logistica:

$$\Pr(y_i = 1) = \text{logit}^{-1}(X_i\beta)$$

sotto l'ipotesi che outcome  $y_i = 1$  siano tra loro indipendenti date queste probabilità. Ci riferiamo a  $(X\beta)$  come al predittore lineare, ovvero una combinazione lineare dei predittori che appartiene ad un supporto continuo. La funzione  $\text{logit}^{-1}(x) = \frac{e^x}{1+e^x}$  trasforma valori continui in valori che stanno nell'intervallo  $[0, 1]$ , il che risulta necessario dal momento che le probabilità devono essere comprese tra 0 e 1. In maniera del tutto simile, il modello può essere scritto come:

$$\Pr(y_i = 1) = p_i$$

$$\text{logit}(p_i) = \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta}$$

dove  $\text{logit}(x) = \log\left(\frac{x}{1-x}\right)$  è una funzione che mappa l'intervallo  $(0,1)$  sull'intervallo  $(-\infty, \infty)$ . In questa tesi si è preferito lavorare con il  $\text{logit}^{-1}$  dal momento che ci sembra più naturale focalizzare l'attenzione sulla trasformazione dei valori continui in probabilità piuttosto che viceversa.

In questo lavoro, i modelli sono stati stimati mediante la funzione `bayesplor`, presente nella *library Arm* (44) presente nel pacchetto statistico open source R (45).

La funzione permette di stimare un modello logistico anche in presenza di numerosità campionaria bassa, basandosi su una procedura inferenziale di tipo bayesiano (Gelman e Hill, 2007, 46).

A tale proposito, preso atto della ridotta numerosità campionaria, sono stati inseriti nel modello quali fattori di rischio, soltanto quelli che la letteratura riporta come fattori predittivi importanti e solo dopo aver proceduto per tentativi utilizzando molteplici modelli statistici atti ad individuare quali, tra i fattori predittivi indicati, avessero effettivamente una validità statistica nel campione. Ovviamente l'età e il sesso, uniche variabili di controllo rilevate nei 65 pazienti sotto analisi, sono state inserite nel modello quali fattori di controllo. Il “controllo” rispetto a queste variabili ha permesso di individuare l'effettivo apporto dato dai predittori in termini di previsione della pancreatite severa, eliminando l'eventuale influenza dovuta a variazioni di età e a differenze di sesso.

In conclusione sono stati stimati due modelli, un primo modello è relativo all'insieme complessivo dei 65 pazienti in cui sono stati considerati come fattori di rischio la PCR e il Ranson score. Il secondo modello invece fa riferimento al sottoinsieme dei 26 individui sui quali è stato considerato il valore di MMP-9 (Tabella A e B).

**Tabella A:** Output di R (pacchetto statistico open source) relativo alla stima di un modello logistico per la stima della probabilità di avere una pancreatite severa in funzione dei fattori predittivi sulla totalità dei pazienti in esame.

```
bayesglm (formula = factor(patologia) ~ male +
rescale(eta) + pcr.48.sd + ranson.tot.sd, family =
binomial(link = "logit"), data = dati.new)
```

Deviance Residuals:

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-1.029659	0.847314	-1.215	0.2243
male	1.706024	1.054638	1.618	0.1057
rescale(eta)	0.868001	1.436793	0.604	0.5458
pcr.48.sd	0.010940	0.004965	2.204	0.0276 *
ranson.tot.sd	1.024093	0.488301	2.097	0.0360 *

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.'  
0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 70.169 on 57 degrees of freedom  
Residual deviance: 33.313 on 53 degrees of freedom  
(7 observations deleted due to missingness)  
AIC: 43.313

Come si evince dalla stima del modello di regressione logistico entrambi i fattori di rischio, PCR dosata a 48 ore (pcr.48) e Ranson score (ranson), sono risultati essere statisticamente significativi e con un elevato impatto predittivo in termini di pancreatite acuta. Entrambi i fattori di rischio considerati sono stati introdotti nel modello dopo essere stati standardizzati in base ai loro valori cut-off. Questo tipo di standardizzazione risulta particolarmente utile in termini di interpretazione del modello, permettendo di valutare l'intercetta del modello il cui valore—dopo essere trasformato su scala probabilistica—permette di valutare la probabilità che un individuo medio sia affetto da pancreatite acuta. L'individuo medio in questo caso, è un individuo di sesso femminile, di età media e pari a 60 anni e con valori di pcr.48 e Ranson score pari, rispettivamente a 150mg/L e 3.

Quindi la probabilità stimata di un individuo medio è valutabile come:

$\text{logit}^{-1}(-1.029659) = 0.26$ , pari ad una probabilità stimata del 26%.

L'effetto della pcr.48 risulta essere positivo, ovvero all'aumentare del valore della pcr.48 aumenta anche la probabilità di avere una pancreatite severa e risulta pari, *ceteris paribus*, a 0.21%. Ovvero se aggiungiamo 1 al valore della pcr.48, la probabilità che il paziente abbia una pancreatite severa aumenta dello 0.21%, probabilità che diventa circa del 20% per una variazione di 100 punti di pcr.48 (osserviamo che il valore non preciso deriva dal fatto che la funzione logistica non è lineare e pertanto non si muove seguendo una schema ad incrementi lineari). In

altri termini considerando due pazienti entrambi di età media 60 anni con valori di pcr.48 pari rispettivamente a 150 (il valore soglia) e 250 (valore soglia più deviazione standard) mg/L, il secondo ha una probabilità di avere una pancreatite severa più alta di circa il 20%<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Valore calcolato per una paziente donna di anni 60 e con valore di ranson pari a 3 e valore di pcr.48 pari a 150 mg/L.

hi=0

pred<- -1.029659 + 0.01093996\*hi##valore del predittore lineare intorno allo zero, ovvero intorno al valore di pcr48 pari a 150.

derivata<-0.01093996 \* exp(pred)/(1+exp(pred))^2  
derivata\*100

Data la non linearità della funzione logistica per calcolare il valore esatto della probabilità in due punti risulta indispensabile calcolarlo attraverso la seguente formula:

lo=150

hi=250

delta<-(invlogit(-1.029659 + 0.01093996\*hi)-  
invlogit(-1.029659 + 0.01093996\*lo))  
print(delta)\*100

In modo del tutto simile è possibile valutare l'effetto predittivo del fattore di rischio Ranson score (ranson). Il suo effetto è di segno positivo, ovvero all'aumentare del valore del ranson aumenta la probabilità di avere una pancreatite di tipo severo. Il suo effetto risulta pari al 20% e varia in base ad una funzione non lineare. Ovvero, dati due pazienti che, a parità di altre condizioni, hanno un valore di ranson diverso, pari a 1.5 e a 2.5 rispettivamente, il secondo paziente ha una

probabilità più elevata di circa il 20% di avere una pancreatite di tipo severo. Due pazienti con simili condizioni, che riportano rispettivamente valori 0 e 9 di ranson (minimo e massimo valore rilevato nei pazienti) hanno una differenza in termini di probabilità di avere una pancreatite severa pari a circa il 73%.

Le performance statistiche del modello, sia in termini di errori standard dei coefficienti, che di tasso di errore stimato (il tasso d'errore è pari alla percentuale di casi in cui è sbagliata la previsione), sono sufficientemente buone per poter concludere che il modello stimato può essere considerato un utile strumento di previsione di pancreatite severa.

In **Tabella B** si riporta l'output di R (pacchetto statistico open source) relativo al secondo modello stimato sul sottoinsieme dei pazienti in cui è stato misurato il valore di MMP-9 all'ingresso.

```
bayesglm(formula = factor(patologia) ~ male +
rescale(eta) +
  pcr.48.sd + ranson.tot.sd + MMP.9.0.sd, family =
binomial(link = "logit"), data = dati.new)
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	1.205358	1.385289	0.870	0.3842
male	0.112264	1.531439	0.073	0.9416
rescale(eta)	-0.164892	1.572297	-0.105	0.9165
pcr.48.sd	0.007233	0.008950	0.808	0.4190
ranson.tot.sd	1.449955	0.634855	2.284	0.0224 *
MMP.9.0.sd	0.154121	0.087719	1.757	0.0789 .

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.'  
0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be

1)

Null deviance: 33.1042 on 23 degrees of freedom  
Residual deviance: 6.4266 on 24 degrees of freedom  
(41 observations deleted due to missingness)  
AIC: 18.427

Number of Fisher Scoring iterations: 38

Anche in questo caso le performance statistiche ci rassicurano sulla validità del modello in termini predittivi. Come già precedentemente osservato, abbiamo limitato il numero dei predittori inserendo quelli che abbiamo ritenuto più importanti dopo numerosi tentativi eseguiti su diversi modelli statistici.

Il predittore pcr.48 perde di significatività statistica ma il suo segno rimane comunque positivo e quindi coerente con il modello precedente. Questo risultato potrebbe derivare dal fatto che un insieme così limitato di persone non permette di valutare l'effetto di tre predittori così importanti congiuntamente. Il fatto che comunque il suo segno sia quello atteso ci ha fatto decidere di lasciarlo in ogni caso nel modello, credendo di poter stimare in futuro lo stesso modello con un campione di numerosità più consistente.

Il fattore ranson risulta ancora significativo e con effetto positivo, ma di entità superiore rispetto al modello precedente. Modello in cui, si ricorda, anche pcr.48 risultava significativo. In termini di interpretazione possiamo dire che, confrontando due individui con caratteristiche simili (sesso maschile, anni 60, pcr.48 pari a 150 mg/L e MMP-9 pari a 21 ng/ml (valore pari alla media complessiva dei pazienti), una differenza di

1 nel livello del ranson comporta una differenza in termini di probabilità del circa 26%, contro il 20% del modello precedente.

Del tutto nuovo è l'effetto del fattore MMP-9. A parità di condizioni, una differenza di un punto del fattore MMP-9, implica una differenza in termini probabilistici di circa il 3% (pari a 2.7% intorno alla media per raggiungere un massimo del 3.8% quando ci si allontana dalla media). In particolare, se si vuole valutare la probabilità di un paziente con valore di MMP-9 pari a 27 (media nel gruppo PA severa) si stima una probabilità pari al 90% tenendo le altre variabili ferme ai loro valori cut-off e l'età al suo valore medio.

Tutta l'analisi statistica è stata effettuata con il software statistico open source R (45).

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La pancreatite acuta è una malattia che riconosce numerose cause, una patogenesi ancora in parte oscura, pochi rimedi efficaci e un'evoluzione spesso imprevedibile: da una forma lieve con completa *restitutio ad integrum* delle funzioni ghiandolari sino alla completa insufficienza endocrina/esocrina pancreatica, all'insufficienza multiorgano, alla sepsi, al decesso.

L'obiettivo della ricerca è stato quello di evidenziare gli indici prognostici più affidabili nella valutazione precoce del grado di severità della malattia tra quelli più comunemente utilizzati nella pratica clinica e di indagare il ruolo della proteina c reattiva e della MMP-9 come nuovi indici predittivi precoci.

Lo studio ha confermato il valore prognostico dei principali indici multiparametrici e dei due indici monofattoriali proposti nello studio che sono risultati tutti (tranne l'MMP-9 dosata a 48 ore dal ricovero) significativamente correlati, nei loro valori medi, allo sviluppo di pancreatite acuta severa.

L'applicazione di un modello di regressione logistico multivariato all'intero campione, ci ha permesso di definire la proteina C reattiva dosata a 48 ore dal ricovero, come l'indice prognostico più efficace nel predire la severità della malattia confermando un dato riportato da numerosi autori in letteratura (13-35).

La PCR è un valido indice di flogosi e varia significativamente con il variare del quadro patologico ma non raggiunge l'acme del suo valore prima di circa 48 ore, per poi mantenerlo per circa una settimana e poi iniziare a decrescere (47). In questo intervallo di tempo risulta un indice prognostico estremamente affidabile nella previsione dello sviluppo di un attacco severo di pancreatite severa.

L'analisi multivariata ha permesso inoltre di identificare anche il Ranson score, quale predittore significativo dello sviluppo di pancreatite severa.

Il ruolo dell'MMP-9 nell'evoluzione della pancreatite acuta è ancora oggetto di ricerche sperimentali che stanno valutando il suo esatto coinvolgimento nell'induzione e amplificazione del danno parenchimale pancreatico nonché nello sviluppo del danno d'organo a distanza nell'ambito della risposta infiammatoria sistemica. Inoltre numerosi studi sperimentali in vitro o in vivo si stanno concentrando sul ruolo degli

inibitori specifici e aspecifici delle MMP come possibile target terapeutico nella pancreatite acuta. La somministrazione di inibitori delle MMP ha dimostrato di indurre una riduzione della adesione endoteliale e dell'infiltrazione neutrofila in ambito pancreatico (42), così come dello sviluppo di edema, emorragia e infiltrazione neutrofila a livello polmonare (pancreatitis associated lung injury PALI) (48). Parallelamente la ricerca si è incentrata sul ruolo prognostico dell'MMP-9 in relazione agli elevati valori di questa endopeptidasi riscontrati nel siero e negli omogenizzati pancreatici o polmonari di modelli animali di pancreatite acuta sperimentale.

Esistono tuttavia ben pochi studi clinici che abbiano valutato la capacità predittiva delle concentrazioni plasmatiche di MMP-9 nell'uomo. I risultati del nostro studio dimostrano, seppure in un numero limitato di pazienti, il valore prognostico della MMP-9 dosata all'esordio della patologia.

L'applicazione di un secondo modello di regressione logistica sul gruppo di 26 pazienti in cui è stata dosata l'MMP-9, ha infatti individuato in quest'ultima, e ancora una volta nel Ranson score, i due indici prognostici indipendenti più sensibili nell'individuazione predittiva dei pazienti che svilupperanno una pancreatite acuta severa, con una sensibilità estremamente marcata dell'MMP-9 (a parità di condizioni una differenza di un punto di MMP-9 implica una differenza in termini probabilistici di circa il 3%) che risulta peraltro l'indice più precoce nella valutazione del rischio.

Ulteriori studi, su un numero più ampio di pazienti, saranno necessari per confermare il dato e valutare l'ambito di applicazione di questo indice prognostico. Altrettanto, studi più ampi potranno o meno confermare l'inutilità del dosaggio dell'MMP-9 durante l'evoluzione della patologia come sembrerebbe evincersi dalla nostra ricerca.

L'individuazione e la stima di modelli di regressione logistica multivariati, ci ha permesso di prevedere la probabilità di avere una evoluzione in pancreatite acuta severa in base alle variabili rilevate, permettendoci di individuare quali, tra queste variabili, sono quelle dotate di maggiore potere predittivo. Il vantaggio è, ovviamente, quello di poter "controllare" gli effetti conseguenti alla presenza di più fattori (variabili), cosa che solo un'analisi multivariata permette di effettuare.

In secondo luogo, la stima di un modello di questo tipo mette a disposizione uno strumento riutilizzabile nella pratica clinica per la stratificazione dei pazienti in termini di previsione prognostica. Ossia, dato un paziente specifico (X), con determinati valori definiti per le variabili osservate, è possibile applicare il modello e determinare la probabilità di X di sviluppare una patologia severa. Lungi dal volere interpretare i modelli in questione come nuovi indici multiparametrici da applicare diffusamente nella pratica clinica, indubbiamente l'individuazione di strumenti predittivi complessi su base matematica-statistica potrebbe essere un indirizzo futuro per la valutazione probabilistica dell'evoluzione della patologia.

Senza dubbio il numero ridotto di casi, soprattutto per quanto riguarda il modello stimato per il gruppo MMP-9, ne riduce la precisione e quindi l'affidabilità e riproducibilità su ampia scala.

L'estensione dello studio a un maggior numero di pazienti permetterebbe infatti di migliorare la precisione delle stime di severità, di aumentare il numero di predittori nei singoli modelli, nonché di introdurre nuovi fattori predittivi tra le variabili considerate (peso, patologie associate, evenienza di complicanze specifiche..) senza che questo determini una perdita di efficacia del modello (minore è il numero delle osservazioni e minori sono i vincoli che si possono imporre al modello, pena la sua non applicabilità dovuta a problemi di stima statistica) e, non ultimo, di poter valutare eventuali interazioni tra le singole variabili.

Per concludere, il Ranson score, la PCR dosata a 48 ore dal ricovero e la MMP-9 dosata all'ingresso, risultano in questo studio, gli indici prognostici più affidabili nella previsione di pancreatite acuta severa.

## **RINGRAZIAMENTI E COLLABORAZIONI**

Si ringrazia sentitamente per il prezioso contributo:

- il Prof Gandolfo, la Dr.ssa AM Santulli e tutto lo staff del laboratorio analisi del Dipartimento Emergenza Accettazione dell'Azienda Policlinico Umberto I per la processazione e la conservazione dei campioni, nonché per il dosaggio specifico della PCR;

- la Dottoressa Alessandra Cucina (Dipartimento di Chirurgia Pietro Valdoni Università "Sapienza" Roma), il Dottor Fabrizio D'Anselmi (Dipartimento di Medicina Sperimentale Università "Sapienza" Roma) e la Dottoressa Sara Proietti (Dipartimento di Medicina e Clinica Molecolare Università "Sapienza" Roma) del Laboratorio Castro Laurenziano, per la parte sperimentale dello studio correlata al dosaggio della MMP-9;

- la Professoressa Maria Grazia Pittau, (Professore Associato Statistica Economica, Dipartimento Scienze Statistiche Università "Sapienza" Roma) per l'interpretazione e per la complessa elaborazione

statistica dei dati così come resa integralmente nel capitolo *Analisi statistica predittiva*.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bank PA Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis *Gastrointest Endosc* 2002;56(6suppl):S226-30
2. Akhtar AJ, Shaheen M Extrapancreatic manifestations of acute pancreatitis in African-American and Hispanic patients *Pancreas* 2004;29(4):291-7
3. Morinville VD, Barmada MM, Lowe ME Increasing incidence of acute pancreatitis at an American pediatric tertiary care center: is greater awareness among physicians responsible? *Pancreas* 2010;39(1):5-8
4. Frossard et al. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:162-170

5. Bradley EL III ed: A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993;**128**:586–90
6. Al Mofleh IA Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factor *World J Gastroenterol* 2008;14(5):675-684
7. Buter A, Imrie CW, Carter CR et al. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis *Br J Surgery* 2002;89,298-302
8. Ranson HJ, Rifkind KM, Roses DF et al. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974;139:69-81
9. Ranson HJ The timing of biliary surgery in acute pancreatitis *Ann Surg* 1979 May;189(5):654-63
10. Ranson HJ. Etiological and prognostic factors in human acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1982;77:633-88
11. De Bernardinis M, Violi V, Roncoroni L, Boselli AS et al. Discriminant power and information of Ranson's prognostic signs in acute pancreatitis: a meta-analytic study. *Crit Care Med* 1999;27:2272-83
12. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J et al. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut* 1984;25(12):1340-6
13. Hirota M, Takada T, Kawarada Y et al JPN guidelines for the management of acute pancreatitis: severity assessment of acute pancreatitis *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006;13:33-41

14. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP e Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13(10):818-29
15. British Society of Gastroenterology: United Kingdom guide-lines for the management of acute pancreatitis. *Gut* 1998;42:S1-13
16. Larvin M, McMahon MJ APACHE II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis. *Lancet* 1989;22;2(8656):201-5
17. Derveins C, Johnson CD, Bassi C et al. Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini Consensus Conference. *Int J Pancreatol* 1999;25:195-210
18. Wilson C, Heath DI, Imrie CW: Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of APACHE II, clinical assessment and multiple factor scoring system. *Br J Surg* 1990;77:1260-1264
19. Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ et al Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis *BR J Surg* 2006;93:738-744
20. Khan AA, Parekh D, Cho Y et al Improved prediction of outcome in patients with severe acute pancreatitis by the APACHE II score at 48 hours after hospital admission compared with the APACHE II score at admission *Arch Surg* 2002;137:1136-1140
21. Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, Vardas E et al Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson

- criteria and APACHE II and APACHE III scoring systems in predicting acute pancreatitis outcome J Clin Gastroenterol 2003;36(3):253-260
22. Balthazar EJ, Robinson DL, et al. Acute pancreatitis: Value of CT in establishing prognosis. Radiology. 1990; 174: 331-336
  23. Balthazar EJ, Ranson JH, Naidich DP: Acute pancreatitis: prognostic value of CT. Radiology 1985 Sep; 156(3): 767-72
  24. Kempainen E, Sainio V, Haapiainen R et al. Early localization of necrosis by contrast-enhanced computed tomography can predict outcome in severe acute pancreatitis. Br J Surg 1996;83:924-9
  25. Larvin M, Chalmers AG, McMahon MJ. Dynamic contrast-enhanced computed tomography: a precise technique for identifying and localizing pancreatic necrosis. BMJ 1990;300:1425
  26. Alfonso V, Gomez F, Lopez A et al. Value of C-reactive Protein level in the detection of necrosis in acute pancreatitis. Gastroenterol Hepatol.2003;26:288-93
  27. Rau B, Cebulla M, Uhl W et al. The clinical value of human pancreas-specific protein procarboxypeptidase B as an indicator of necrosis in acute pancreatitis: comparison to CRP and LDH. Pancreas 1998;17:134-9
  28. Frossard JL, Hadengue A, Pastor CM New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans Am J Respir Crit Care Med 2001;164:162-170

29. Hämäläinen MT, Grönroos P, Grönroos GM Do normal leucocyte count and c-reactive protein on admission to hospital exclude a life-threatening attack of acute pancreatitis? *Scan J Surg* 2002;91:353-356
30. Pezzilli R, Billi P, Miniero R et al. Serum interleukin-6, interleukin-8, and beta 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with Serum C-reactive protein. *Dig Dis Sci* 1995;40:2341-8
31. Al-Bahrani AZ, Ammori BJ. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. *Clinica Chimica Acta*.2005;362,26-48
32. Mayer AD, McMahon MJ, Bowen M et al. C reactive protein: an aid to assessment and monitoring of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 1984;37:207-211
33. Mayer JM, Raraty M, Slavin J et al. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002;89:163-171
34. Neoptolemos JP, Kemppainen EA, Majer JM et al. Early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide: a multicenter study. *Lancet* 2000;355:1955-60
35. Simoes M, Alves P, Esperto H et al Predicting acute pancreatitis severity: comparison of prognostic scores *Gastroenterology Research* 2011;4(5):216-222
36. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 1985 ;65 :513

37. Muhs BE, Sundeep P, Herman Y et al. Increased matrix metalloproteinases expression and activation following experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001;101:21-28
38. Keck T, Balcom JH 4th, Fernandez-del Castillo C et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):188-201
39. Chen P, Yuan Y, Wang S et al Serum matrix metalloproteinase 9 as a marker for the assessment of severe acute pancreatitis. *Tohoku J Exp Med* 2006;208:261-266
40. Guo J, Xue P, Yang XN et al Serum matrix metalloproteinase-9 is an early marker of pancreatic necrosis in patients with severe acute pancreatitis *Hepato-Gastroenterology* 2012;59:1594-1598
41. Muhs BE, Patel S, Yee H et al Inhibition of matrix metalloproteinases reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis *J Surg Res* 2002;109:110-117
42. Awla D, Adbulla A, Syl I et al Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is a potent activator of trypsinogen in acinar cells in acute pancreatitis *JLB* 2012;91:711-719
43. Tracy TF Acute pancreatitis and neutrophil gelatinase MMP9: don't get me started! *JLB* 2012;91:682-684
44. Gelman A, Hill J Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models Cambridge University Press; Cambridge, 2007

45. R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL; <http://www.R-project.org/>.
46. Gelman A, Su YS, Yajima M, Hill J, Pittau MG, Kerman J, Zheng T Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models, R Package, 2010
47. Wilson C, Heads A, Shenkin A, Imrie CW C-reactive protein, antiproteases and complement factors objective markers of severity in acute pancreatitis BJS 1989;76(2):177-181
48. Sochor M, Richter S, Schmidt A Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with doxycycline reduces pancreatitis-associated lung injury Digestion2009;80:65-73

**Tab. VI.** Tabella riassuntiva dei valori stimati. DS Deviazione Standard; Q Quantili (distribuzione dei valori: i dati più significativi sono rappresentati nei grafici successivi); Età: anni; Degenza: giorni; PCR: mg/L; MMP9: ng/ml

	Media PA tot±DS mediana	Media PA lieve±DS mediana	Media PA sever±DS mediana	Q. tot 0%	Q. tot 25%	Q. tot 50%	Q. tot 75%	Q. tot 100%	Q. lieve 0%	Q. lieve 25%	Q. lieve 50%	Q. lieve 75%	Q. lieve 100%	Q. severa 0%	Q. severa 25%	Q. severa 50%	Q. severa 75%	Q. severa 100%
<b>Età</b>	60,5±19,7 (66)	57,7±20,3 (63)	68,1±16,0 (68)	21	48	66	75	94	21	42,2	63	72,2	94	32	61	68	81	93
<b>Degenza</b>	16,9±15,2 (12)	12,1±6,4 (10,5)	30,9±22,9 (20)	3	9	12	17	93	4	8	10,5	14	39	3	15	20	44	93
<b>Ranson</b>	1,9±1,8 (2)	1,3±1,1 (1)	3,8±2,0 (4)	0	1	2	3	9	0	0	1	2	5	1	2	4	4	9
<b>Balthazar</b>	2,7±1,5 (3)	2,1±0,9 (2)	4,3±1,6 (4)	0	2	3	3	10	0	2	2	3	4	3	4	4	4	10
<b>Apachello</b>	6,4±4,1 (6)	5,1±3,4 (5)	10±3,8 (9)	0	3	6	9	17	0	2,7	5	7	14	3	8	9	12	17
<b>Apachello 48h</b>	6,2±5,2 (6)	4,7±3,3 (5)	10,5±7 (8)	0	2	6	8	32	0	2	5	7	12	3	6	8	14	32
<b>PCR 0</b>	71,1±81,6 (28,3)	42,6±55,6 (21,9)	141,45±94,0 (138,7)	0	7,1	28,3	113,0	318,9	0	5,1	21,9	54,7	243,4	3,2	81,1	138,7	211,2	318,9
<b>PCR 48h</b>	107,4±100,7 (84,5)	71,1±82,5 (32)	194,9±87,2 (189)	0,3	19,5	84,5	172	407,4	0,3	10,6	32	105	320,7	51,3	120,1	189	248,4	407,4
<b>MMP9 0</b>	21,0±9,1 (19,8)	16,2±7,7 (14,3)	27,6±6,3 (28,5)	8,2	13,5	19,8	28,9	35,0	8,2	10,2	14,3	19,8	31,2	15,5	25,0	28,5	32,4	35,0
<b>MMP 48h</b>	21,0±7,0 (23,4)	19,1±10,5 (17,8)	21,9±5,1 (23,6)	9,0	15,5	23,4	26,1	32,0	9,0	11,4	17,8	25,5	32,0	13,5	18,0	23,6	26,1	27,4