
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Aportul ultrasonografiei cu contrast vascular în diagnosticul, caracterizarea și cuantificarea perfuzională a proceselor tumorale și inflamatorii digestive

Doctorand **Mihai Adrian Socaciu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Radu Badea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Agenții de contrast ultrasonografici: microbulele	19
2. Cuantificare perfuzională – Curbe TIC. Modelare matematică. Parametrii TIC. Descriere software	31
3. Aplicații ale studiilor perfuzionale CEUS în formațiuni tumorale hepatice	37
4. Aplicații ale studiilor perfuzionale CEUS în formațiuni tumorale pancreatice	41
5. Aplicații ale studiilor perfuzionale CEUS în bolile inflamatorii intestinale	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	45
1. Obiective generale. Ipoteza de lucru	47
2. Metodologie generală de cercetare	49
3. Studiul I: Aprecierea perfuziei tisulare folosind CEUS pe modele in-vivo de tumori hipervasculare (tumori Walker 256 la șobolani Wistar) tratate cu agenți antiangiogenetici (Sunitinib)	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru	51
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	62
4. Studiul II: Aprecierea eficienței tratamentului cu Sorafenib în forme avansate de carcinom hepatocelular prin cuantificare CEUS în dinamică	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru	68
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate	72
4.5. Discuții	77
5. Studiul III: Diagnosticul și caracterizarea perfuzională a maselor chistice pancreatice prin CEUS	81
5.1. Introducere	81
5.2. Ipoteza de lucru	82
5.3. Material și metodă	82
5.4. Rezultate	84
5.5. Discuții	88
6. Studiul IV: Evaluarea non-invazivă a inflamației și aprecierea răspunsului terapeutic în boala Crohn și rectocolita ulcerativă prin cuantificare dinamică CEUS	91
6.1. Introducere	91
6.2. Ipoteza de lucru	92
6.3. Material și metodă	93
6.4. Rezultate	96

6.5. Discuții	101
7. Discuții generale	107
8. Concluzii generale	111
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115
ABREVIERI	11

Cuvinte-cheie:

Ultrasonografie cu contrast, CEUS, DCE-US, cuantificare, TIC, Walker 256, carcinom hepatocelular, Sorafenib, chiste pancreatice, pseudochist, boli inflamatorii intestinale, RCUH, boala Crohn

INTRODUCERE

Teza de doctorat tratează un subiect foarte vast: aplicațiile ultrasonografiei cu contrast în patologia tumorală și inflamatorie digestivă. Ultrasonografia cu contrast vascular (CEUS) a mărit semnificativ capacitățile, performanțele și gama de aplicații moderne în rândul investigațiilor ultrasonografice.

Cuantificarea captării agenților de contrast reprezintă o rafinare a metodei CEUS, care permite extragerea de date numerice, mai pretabile efectuării de comparații și analizelor statistice. Deși trasarea curbelor TIC a fost posibilă încă de pe primele echipamente ecografice dotate cu software de contrast, metoda nu a luat amploare în practica medicală, existând însă mereu un interes în cercetare. Tehnica foarte laborioasă necesară pentru a obține informații valide a îngreunat adopția clinică a metodei și nu a permis efectuarea unor studii de validare pe loturi mari de pacienți. În ultimii ani s-au dezvoltat aplicații software care să ușureze munca examinatorului prin automatizări ale unor procedee (corecția mișcărilor, interpolarea curbelor) și prin calibrarea imaginilor în vederea standardizării metodei, ducând la un nou val de interes și la o lărgire a paletei de aplicații.

Experiența în literatură în domeniul cuantificării CEUS este încă limitată la studii restrânse pe loturi mici, în general monocentrice (exceptând câteva studii din Franța), de vină fiind probabil nivelul de expertiză necesar, dificultățile de standardizare și, nu în ultimul rând, metodologia laborioasă. Cu toate acestea, rezultatele publicate în literatură sunt majoritar pozitive, lăsând loc de optimism în ceea ce privește viitorul metodei. Se impun însă câteva întrebări, cărora studiile acestei teze vor încerca să le dea răspuns: Care este metoda optimă de examinare în vederea prelucrărilor TIC? Cum se pot standardiza rezultatele, pentru a le face independente de aparatură sau pacient? Care sunt cele mai potrivite aplicații? Care este performanța metodei în diagnostic sau în urmărirea post-terapeutică? Care parametri TIC sunt utili în fiecare caz?

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ca și obiectiv general al tezei de doctorat am ales identificarea și studiul performanței clinice al unor aplicații ale cuantificării perfuzionale prin CEUS, în patologia sistemului digestiv (hepato-pancreatico-intestinală), având ca scop final includerea lor în algoritmul de diagnostic sau de screening terapeutic, cu impact în creșterea performanței diagnostice, în paralel cu îmbunătățirea confortului pacienților și evitarea manoperelor invazive.

Dintre numeroasele aplicații posibile, am ales în cadrul tezei de doctorat să urmăresc trei direcții principale: cuantificarea perfuziei tumorale în vederea urmării efectelor tratamentelor antiangiogenetice, atât pe model animal cât și pe model uman (hepatocarcinom); cuantificarea captării în pereții tumorali în scop diagnostic, în caz de tumori chistice pancreatice și diferențierea lor prin aceste criterii; urmărirea evoluției bolilor inflamatorii cronice, sub tratament antiinflamator și imunomodulator, luând ca model bolile inflamatorii intestinale.

Studiul I:

Obiective:

Obiectivele specifice propuse în primul studiu, constând în analiza dinamică a captării contrastului pe modele tumorale animale aflate sub tratament antiangiogenetic, sunt: aprecierea valorii prognostice a diversilor parametri TIC prin corelare cu măsurători histopatologice

(densitate microvasculară, arie vasculară) și morfologice (greutate tumorală), precum și relațiile dintre evoluția dinamică a acestor parametri și evoluția generală la caz.

Material și metodă:

Modelul experimental utilizat a constat în 20 de șobolani masculi rasa Wistar albino (greutate 200 ± 20 g, vârstă 6 luni) împărțiți aleator în două loturi de studiu de câte 10 șobolani, cărora li s-au însămânțat subcutanat fragmente tumorale de carcinosarcom Walker 256. La 4 săptămâni de la inoculare, animalele au fost împărțite aleator în două loturi de câte 10. Lotul 1, desemnat ca martor, a primit hrană normală. Lotul 2 a primit timp de 2 săptămâni, la fiecare 3 zile, Sunitinib per os în doză de 40 mg/kg corp. S-au efectuat examinări ecografice în zilele 1 (z1), 7 (z7) și 15 (z15) șobolanilor tratați cu Sunitinib, respectiv în zilele 1 și 15 șobolanilor martori. În vederea examinării cu contrast, s-a cateterizat una din venele cozii cu o branulă de 26G și s-a injectat SonoVue în bolus în volum de 0,2 ml, urmat de 0,5 ml de soluție NaCl izotonică.

Pentru procesarea numerică s-a folosit software-ul SonoLiver (Bracco®). S-au trasat curbe TIC din tumori, luând ca referință țesutul muscular din jur, s-au obținut hărți parametrice și s-au calculat parametrii: I_{max} , RT, TTP, mTT și, prin integrare de-a lungul primelor 50s de la captare, s-a calculat AUC. Rezultatele au fost comparate cu secțiunile anatomo-patologice obținute, pe care s-a măsurat densitatea microvasculară (MVD) și aria vaselor.

Corelațiile dintre parametrii anatomopatologici și cei ultrasonografici măsurati în ziua 15 s-au efectuat calculând coeficientul Spearman (OriginPro®). Pentru o mai bună descriere a comportamentului dinamic al perfuziei tumorale în cursul tratamentului antiangiogenetic, s-a calculat câte un scor corespunzător fiecărui parametru bazat pe pantele determinate de evoluția în intervalul de timp z1 – z15, cu valori între 1 și 3, mai mare cu creșterea riscului de recidivă. Scorurile obținute au fost, de asemenea, corelate cu parametrii anatomopatologici și cei ultrasonografici (inclusiv TIC) obținuți în z1, folosind coeficientul Spearman și testul Kruskal-Wallis.

Rezultate și discuții:

Studiul a testat fezabilitatea și limitele metodei pe modele de tumori hipervascularare (Walker 256) la șobolani Wistar tratați cu Sunitinib. Studiul experimental ne-a confirmat două ipoteze importante, necesare validării studiilor ulterioare clinice: o bună corelație liniară între parametrii TIC de volum (I_{max} , AUC) și densitatea microvasculară (MVD) măsurată histopatologic; o bună discriminare între starea formațiunilor post-tratament și aspectul tumoral la martori, superioară indicilor morfometrici. În plus, am analizat posibilitatea folosirii în dinamică a parametrilor TIC pentru a încadra cazurile în câteva tipare evolutive pe baza unor scoruri calculate printr-o formulă proprie. Scorurile pentru I_{max} și AUC s-au corelat pozitiv cu MVD la finalul tratamentului, cu alte cuvinte lipsa de răspuns sau o tendință la recădere după prima săptămână a dus la o creștere a vascularizației tumorale.

Studiul II:

Obiective:

Prin cel de-al doilea studiu, realizat pe pacienți cu hepatocarcinom în stadiu avansat, tratați cu un agent antiangiogenetic (*Sorafenib*), ne-am propus să extrapolăm cunoștințele acumulate pe modelul animal și să identificăm parametrii TIC cei mai performanți în vederea stopării evoluției bolii, producerii de necroză tumorală și prelungirii supraviețuirii generale. În

acest scop, ne-am fixat ca obiectiv și obținerea de valori cut-off pentru parametrii studiați, cu calcularea indicilor de performanță corespunzători.

Material și metodă:

Studiul a cuprins 27 pacienți aflați în stadii avansate de HCC (inoperabili) de la IRGH și Institutul Oncologic „I. Chiricuță” din Cluj, tratați cu Sorafenib oral, în doză de 400 mg de 2 ori pe zi. Toți pacienții au fost examinați ultrasonografic nativ și cu contrast (SonoVue 1,6 ml bolus i.v. + 10 ml ser) la începutul tratamentului, pe un aparat GE Logiq 7, cu monitorizare ulterioară la 1 lună după tratament, cu ocazia bilanțului oncologic, cu repetarea examinării CEUS și DCE-US. Rezultate interpretabile în urma monitorizării s-au obținut la 18 pacienți. În funcție de evoluția dimensională a formațiunilor, în conformitate cu criteriile RECIST, pacienții au fost încadrați în grupul cu răspuns (boală staționară, remisie parțială sau completă) sau fără răspuns la tratament (boală evolutivă). Cazurile au fost urmărite pe termen lung, în vederea analizei supraviețuirii generale.

Clipurile cu contrast corespunzătoare secundelor 0-70 au fost exportate de pe ecograf în format DICOM și importate în programul SonoLiver (Bracco ®). Programul a calculat automat parametrii I_{max}, TTP, RT, mTT și aria tumorală, realizând hărți corespunzătoare fiecărui parametru. Curbele exportate au fost importate în programul OriginPro®, unde s-a calculat AUC prin integrarea valorilor instantanee ale intensității de-a lungul axei timpului pe perioada clipului video. S-a calculat și un parametru de debit după formula: $Debit = \frac{AUC}{100 \cdot mTT}$. S-a folosit formula: $Diff \text{ Param} = 100 \frac{Param_2 - Param_1}{Param_1}$ pentru rata de creștere a parametrilor, unde $Param_1$ este parametrul TIC studiat la debutul tratamentului și $Param_2$ la 1 lună de tratament.

S-a calculat mediana supraviețuirii (metoda Kaplan-Meier, OriginPro®) și, pe baza ei, s-a împărțit lotul în pacienți cu supraviețuire mai mare sau egală cu aceasta, inclusiv supraviețuitorii la momentul încheierii studiului (supraviețuire₅₀₊), respectiv mai mică (supraviețuire₅₀₋). S-au comparat medianele ratelor de creștere ale parametrilor TIC între diferitele grupuri descrise mai sus, folosindu-se testul non-parametric Mann-Whitney. S-au căutat valori *cut-off* pentru ratele de creștere ale parametrilor TIC pentru diferențierea între grupurile supraviețuire₅₀₊/supraviețuire₅₀₋, utilizându-se curbele ROC și s-a calculat performanța diagnostică pentru fiecare parametru în parte. S-a verificat relevanța acestor valori, efectuându-se curbe de supraviețuire pe subgrupurile delimitate de valorile *cut-off* ale fiecărui parametru și comparându-se diferențele cu testul *log rank*.

Rezultate și discuții:

Studiul și-a propus validarea tehnicii pe un lot de pacienți umani. Rezultatele sunt deocamdată parțiale, din cauza lotului redus (N=18), intenția noastră fiind de a continua studiul și în anii care urmează. Chiar dacă limitele statisticii în această situație ne obligă la o reținere în interpretarea rezultatelor, concluziile studiului sunt foarte încurajatoare. Debitul, un parametru derivat din parametrii TIC clasici AUC și mTT, a arătat, alături de I_{max}, o dinamică strâns legată de supraviețuirea generală. Prin raportare la supraviețuirea mai mare decât mediana populațională, am obținut valori cut-off ale parametrilor TIC, pe baza cărora am calculat indicii de performanță prognostică. Astfel, un cut-off al ratei de creștere a I_{max} de -14,82%, respectiv a Debitului de 18,33%, a permis încadrarea în grupul cu supraviețuire mai bună, cu o sensibilitate de 81% și specificitate de 85%, respectiv o sensibilitate de 90% și specificitate de 71%. Scăderea ratelor de creștere sub aceste valori *cut-off* semnifică o supraviețuire mai mare decât mediana populației (736 zile). Alți factori luați în calcul (aparitia necrozelor, criteriul clasic RECIST) s-au

corelat mai puțin cu supraviețuirea. S-a remarcat, de asemenea, corelarea indicilor de debit (RT, mTT) cu apariția necrozelor în tumori.

Studiul III:

Obiective:

Studiul al treilea este axat pe valoarea diagnostică a cuantificării CEUS în pereții formațiunilor lichidiene pancreatice, în vederea diferențierii, pe de o parte, între masele chistice și pseudochiste, pe de altă parte între formațiunile benigne și cele maligne / cu potențial malign. S-a ales această aplicație diagnostică întrucât, de obicei, în aceste cazuri aprecierea subiectivă a captării contrastului din pereți este dificilă și supusă erorilor.

Material și metodă:

41 de pacienți pacienții diagnosticați cu mase chistice pancreatice la IRGH Cluj-Napoca au fost examinați CEUS (aparatură GE Logiq 7) à jeun, după un repaus alimentar de cel puțin 4 ore, folosind SonoVue în doză de 2,4 ml i.v. în bolus + 10 ml ser fiziologic. Regiunile de interes au fost definite în: peretele sau septele îngroșate ale chistului, conținutul chistului și un vas arterial din jur. Încărcarea și spălarea agentului de contrast de la nivelul componentelor chistice au fost comparate cu parenchimul pancreatic normal adiacent leziunii.

Analiza cantitativă CEUS a constatat în trasarea automată a curbelor TIC pe aparat și analiza acestora în programul OriginPro®. S-au corectat mișcările în planul de examinare și au fost excluse secvențele cu mișcări în afara planului. Pe curbele interpolate au fost calculați următorii parametri: Intensitatea maximă (IMAX), Time to Peak (TTP), Maximum ascending GRADient (GRAD), Time to maximum GRADient (TTG) și Area Under the Curve (AUC). Pentru fiecare parametru s-a calculat o valoare normalizată după formula: $nParam. = (Param. perete - Param. conținut) \times (Param. arteră / Param. perete)$.

Analiza statistică s-a realizat cu programul SPSS 13.0 (SPSS Inc, USA). S-au comparat mediile și varianțele parametrilor TIC normalizați obținuți în fiecare subgrup, folosind testele t-Student și Fischer pentru două populații. S-au determinat valori *cut-off* pentru fiecare parametru prin analiza curbelor ROC, pentru performanța diagnosticului folosind fiecare parametru normalizat și s-a calculat aria de sub curbă (AUROC).

Rezultate și discuții:

În acest studiu am apreciat relevanța parametrilor TIC în diferențierea dintre pseudochiste și tumori chistice pancreatice, pe de o parte, și între formațiunile chistice benigne și cele maligne sau cu potențial malign, pe de altă parte. După o prealabilă normalizare a parametrilor, folosind o formulă originală care ține cont atât de captarea din peretele chistelor, cât și de cea din interior și dintr-o arteră înconjurătoare, am obținut o bună delimitare între subgrupurile de mai sus pentru parametrii nTTP, nAUC și nTTG. În diferențierea pseudochist-tumoră chistică, au avut valoare diagnostică nTTP și nAUC (semnificând tumoră la valori sub 7 s, respectiv peste 825 dBs); pentru diferențierea malign-benign au avut performanță bună nTTP și nTTG (semnificând benignitate la peste 9s, respectiv 8,5s). Metoda a fost foarte laborioasă în acest studiu, fiind nevoiți să extragem manual curbele TIC direct din aparat, din cauza necesității unui control strict al mișcărilor structurilor fine analizate față de regiunile de interes. În aceste condiții, postprocesările s-au efectuat semiautomat, folosind un program de analiză matematică (OriginPro®). Pentru o validare a acestor valori, ar fi nevoie de o metodă mai facilă, aplicabilă similar indiferent de aparatura folosită în examinare și de un lot mai numeros. Lucrarea noastră,

însă, își păstrează valoarea de studiu-pilot în acest sens, fiind singura din literatură în acest moment care tratează problematica formațiunilor chistice pancreatice prin prisma cuantificării CEUS.

Studiul IV:

Obiective:

Studiul final al tezei este axat pe urmărirea sub tratament specific a pacienților cu boli inflamatorii intestinale și își propune ca obiective specifice, pe de o parte, compararea rezultatelor cuantificării CEUS, prin parametri TIC, cu standardul de aur în aprecierea inflamației intestinale, reprezentat de endoscopie. Pe de altă parte, scopul final este de a găsi pentru parametrii relevanți valori cut-off care să realizeze, cu performanță cât mai bună, o predicție precoce a răspunsului la tratament, în vederea evitării examinărilor colonoscopice frecvente.

Material și metodă:

Din totalul de 131 de pacienți cu boli inflamatorii intestinale recrutați prospectiv la IRGH Cluj-Napoca, 67 au fost diagnosticați cu RCUH și 46 cu boală Crohn. S-au determinat scoruri de activitate clinică (Trulove-Witts, respectiv CDAI), hemoleucograma, PCR, scoruri de activitate endoscopică (Mayo, respectiv SES-CD) și s-au efectuat examinări ultrasonografice native și post-contrast, la debutul tratamentului și după 3 luni. Examinarea ultrasonografică, utilizând un ecograf GE Logiq 7, a selectat cel mai afectat segment intestinal accesibil, pe care s-au descris complicațiile, modificările perienterice, structura straturilor, aspectul power Doppler și grosimea peretelui.

După injectarea a 2,4 ml SonoVue i.v. bolus + 10 ml ser fiziologic, s-a calculat un scor al straturilor și s-au exportat clipurile totalizând 60s pentru postprocesare în programul SonoLiver. S-a ales ca și referință o regiune din mușchii anteriori abdominali situați în apropierea ansei. S-a desenat ROI în așa fel încât să includă întreg peretele intestinal și să evite zonele cu artefacte. S-au obținut parametrii TIC: I_{max}, RT, TTP, mTT și s-a calculat AUC în programul OriginPro® prin integrarea intensității.

Am apreciat relația dintre scorurile endoscopice (Mayo în RCUH și SES-CD în BC) și scorurile clinice, PCR, grosimea peretelui, scorul straturilor, I_{max}, RT, TTP, mTT, AUC și ln(AUC), folosind testul Spearman. Pentru predicția ameliorării postterapeutice s-a aplicat testul Wilcoxon parametrilor clinici, biochimici și ultrasonografici, înainte și la 3 luni după tratament, pentru pacienții cu scor endoscopic îmbunătățit. Am calculat de asemenea corelația dintre diferența de scor endoscopic și diferența parametrilor studiați, folosind coeficientul Spearman. Pentru patru parametri relevanți selectați am măsurat performanța în diagnosticul ameliorării endoscopice (scăderea scorului endoscopic cu minim o unitate) folosind curbele ROC.

Rezultate și discuții:

În acest studiu am aplicat metoda DCE-US pentru a testa corelația parametrilor TIC cu modificările inflamatorii apărute în bolile inflamatorii intestinale și a aprecia răspunsul la tratamentul anti-inflamator. În studiul nostru, parametrul cu cea mai bună performanță în discriminarea dintre clasele de activitate măsurate endoscopic și în aprecierea precoce a răspunsului endoscopic post-terapie a fost AUC, sub forma ln(AUC). În RCUH, ln(AUC) a fost capabil să estimeze lipsa progresiei scorurilor endoscopice cu o sensibilitate de 94% și o specificitate de 83%, iar în boala Crohn, cu o sensibilitate de 77% și o specificitate de 100%.

Valorile obținute în boala Crohn trebuie însă privite cu rezervă din cauza lotului scăzut, care ar putea duce la creșterea specificității măsurate.

Atât grosimea peretelui intestinal, cât și scorurile clinice au prezis cu semnificație statistică ameliorarea evidențiată endoscopic, însă performanțele lor au fost mai reduse în comparație cu parametrii de volum (Imax, ln(AUC)). Importanța acestor rezultate este confirmarea valorii CEUS în monitorizarea unor tratamente costisitoare și cu efecte adverse numeroase, cu valoare mai bună decât metodele aplicate de rutină în momentul de față (scorurile clinice) și o poziționare apropiată de rezultatele endoscopice (standardul de aur). Metoda poate reprezenta o alternativă minim invazivă la endoscopiile repetate, în aprecierea activității bolilor inflamatorii intestinale și a evoluției sub tratament antiinflamator, permițând realizarea unui compromis între o supraveghere mai bună și un confort sporit al pacienților. Studiile endoscopice nu pot fi eliminate, dar frecvența lor poate fi redusă în această situație.

CONCLUZII GENERALE:

1. Ultrasonografia cu agenți de contrast (CEUS) poate fi folosită cu succes în cuantificarea perfuziei la nivelul patului tumoral, pe modele animale (șobolani Wistar) de tumori hipervascularare mamare (Walker 256) implantate subcutanat.
2. Dintre parametrii TIC analizați în cazul modelelor animale, o performanță bună în corelație cu densitatea microvasculară (MVD) apreciată histopatologic o au Imax și AUC (parametri de volum). S-a constatat o relație liniară între parametrii CEUS menționați și MVD.
3. Au existat diferențe semnificative statistic între lotul de șobolani cu tratament (Sunitinib) și cel martor pentru: aria tumorală, greutate, diferența Imax și diferența AUC.
4. Pe baza variației parametrilor CEUS în evoluție, sub tratament, s-au constatat tipare diferite, cărora le-am asociat un scor evolutiv cuprins între 1 și 3, cu risc mai mare de recidivă la valoarea mai mare a scorului. Scorul Imax și scorul AUC s-au corelat semnificativ pozitiv cu MVD la sfârșitul studiului. Valorile inițial crescute ale parametrilor de volum (Imax, AUC) au facilitat un răspuns mai bun al acestor parametri (corelație negativă între scor și valorile inițiale).
5. Extrapolând datele pentru un lot uman cu HCC avansat, tratat cu Sorafenib, s-au constatat, de asemenea, performanțe bune ale parametrilor de volum (Imax, Debit), exprimați ca rate de creștere, în diferențierea între pacienții cu supraviețuire mai mare decât mediana și ceilalți. Parametrii de debit (RT, mTT) s-au corelat mai bine cu apariția necrozelor.
6. S-au înregistrat performanțe bune pentru ratele de creștere Imax și Debit în prognosticul de supraviețuire peste mediană, la valori cut-off de -14,82%, respectiv 18,33%, scăderea sub aceste valori semnificând un prognostic mai bun. Performanțele au fost confirmate prin diferențe semnificative între curbele de supraviețuire pe fiecare subplot.
7. Măsurarea parametrilor TIC la nivelul pereților formațiunilor chistice pancreatice ar putea facilita diagnosticul diferențial dintre pseudochiste și tumori chistice, pe de o parte și între formațiuni chistice benigne și formațiuni maligne sau cu risc, pe de altă parte.
8. Performanțele au fost mai bune prin normalizarea parametrilor TIC în funcție de conținutul chistic, perete și un vas arterial din jur.
9. În diferențierea pseudochist-tumoră chistică, au avut valoare diagnostică nTTP și nAUC (semnificând tumoră la valori sub 7 s, respectiv peste 825 dBs); pentru diferențierea malign-benign au avut performanță bună nTTP și nTTG (semnificând benignitate la peste 9s, respectiv 8,5s).

10. Analiza cantitativă pe baza parametrilor TIC poate reprezenta o alternativă minim invazivă la endoscoopiile repetate, în aprecierea activității bolilor inflamatorii intestinale și a evoluției sub tratament antiinflamator.
11. Parametrul cu cea mai bună performanță în discriminarea dintre clasele de activitate măsurate endoscopic și în aprecierea precoce a răspunsului endoscopic post-terapie a fost AUC, sub forma $\ln(\text{AUC})$.
12. Atât grosimea peretelui intestinal, cât și scorurile clinice au prezis cu semnificație statistică ameliorarea probată endoscopic, însă performanțele lor au fost mai reduse în comparație cu parametrii de volum (I_{max} , $\ln(\text{AUC})$).
13. Cuantificarea perfuzională dinamică cu agenți de contrast ultrasonografici oferă multe perspective în aprecierea hemodinamicii de la nivelul patului microcirculator, atât în patologia tumorală cât și în patologia inflamatorie sau ischemică, cu potențiale aplicații clinice valoroase, în special în monitorizarea terapierilor de ultimă generație.
14. Metoda este încă destul de laborioasă, necesitând un control riguros al factorilor de eroare, dar prin dezvoltarea pachetelor software specializate care ușurează mult munca examinatorului, există deja perspectiva unei implementări și în activitatea clinică.

PHD THESIS ABSTRACT

The value of contrast-enhanced
ultrasound in the diagnosis,
characterization and perfusion
quantification of tumoral and
inflammatory digestive diseases

PhD student: **Mihai Adrian Socaciu**

Coordinator: **Prof. Dr. Radu Badea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	17
1. Ultrasonographic contrast agents: microbubbles	19
2. Perfusion quantification – TIC curves. Mathematic modeling. TIC parameters. Software description	31
3. Dynamic CEUS applications in liver tumors	37
4. Dynamic CEUS applications in pancreatic tumors	41
5. Dynamic CEUS applications in inflammatory bowel diseases	43
PERSONAL CONTRIBUTIONS	45
1. General objectives. Work hypothesis	47
2. General research methods	49
3. Study I: Assessment of tissue perfusion using CEUS on in-vivo models of hypervascularized tumors (Walker 256 in Wistar rats) treated with antiangiogenic agents (Sunitinib)	51
3.1. Introduction	51
3.2. Work hypothesis	51
3.3. Material and method	52
3.4. Results	56
3.5. Discussions	62
4. Study II: Assessment of Sorafenib treatment efficiency in advanced stages of hepatocellular carcinoma by dynamic CEUS.	67
4.1. Introduction	67
4.2. Work hypothesis	68
4.3. Material and method	68
4.4. Results	72
4.5. Discussions	77
5. Study III: Diagnosis and perfusion characterization of pancreatic cystic masses by CEUS.	81
5.1. Introduction	81
5.2. Work hypothesis	82
5.3. Material and method	82
5.4. Results	84
5.5. Discussions	88
6. Study IV: Non-invasive assessment of inflammation and of treatment response in Crohn's disease and Ulcerative colitis by dynamic CEUS.	91
6.1. Introduction	91
6.2. Work hypothesis	92
6.3. Material and method	93
6.4. Results	96
6.5. Discussions	101
7. General discussions	107

8. General conclusions	111
9. Thesis originality and innovation	113
REFERENCES	115
ABBREVIATIONS	11

Key-words:

Contrast-enhanced ultrasonography, CEUS, DCE-US, quantification, TIC, Walker 256, hepatocellular carcinoma, Sorafenib, pancreatic cyst, pseudocyst, IBD, Ulcerative colitis, Crohn's disease

INTRODUCTION

The PhD thesis deals with a very broad subject: the contrast enhanced ultrasound applications in the tumoral pathology and inflammatory digestive diseases. Vascular ultrasound contrast-enhanced ultrasound (CEUS) significantly increased the capabilities, performance and range of modern applications among ultrasound investigations.

CEUS quantification represents a refinement of the method, which allows the extraction of numerical data, more suitable for making comparisons and statistical analyzes. Although the plotting of TIC curves was possible since the first ultrasound equipment with contrast software, the method has not gained momentum in medical practice, although there was always an interest in the research area. The very laborious technique required to obtain valid information hampered the clinical adoption of the method and detained the validation studies on large groups of patients. In recent years, automation was developed, through software applications that facilitate the examiner's work processes (motion correction, interpolation curves) and by calibrating images for a standardized method, leading to a new wave of interest and a widening range of applications.

The published experience on CEUS quantification is still limited to small studies, generally monocentric (except a few studies in France), probably due to a certain required level of expertise, standardization difficulties and, not least, a laborious methodology. However, the results published in the literature are mainly positive, leaving room for optimism regarding the future of the method. Some issues remain open, on which the studies of this thesis will try to give an answer: What is the optimal examination method for processing TIC? How can the results be normalized, to make them independent of the equipment or of the patient? What are the best applications? What performance has this method in the diagnosis or post-treatment follow-up? Which TIC parameters are useful in each case?

PERSONAL CONTRIBUTIONS

As a general objective of the PhD thesis I chose to identify and study the clinical performance of various TIC quantification applications, in the digestive system pathology (hepato-pancreato-intestinal), having as final aim their inclusion in diagnostic or therapeutic screening algorithms, with an impact in increasing diagnostic performance, while improving patient comfort and avoiding invasive maneuvers.

Of the many possible applications, we chose in this PhD thesis to pursue three main directions: tumor perfusion quantification for the effects of antiangiogenetic treatments, both in animal (Walker 256) and human (HCC) models; TIC quantification in the tumor walls for diagnostic purposes, in the case of cystic pancreatic tumors and their differentiation by these criteria; the follow-up of chronic inflammatory diseases under anti-inflammatory and immunomodulatory therapy, taking as a model inflammatory bowel diseases.

Study I:

Objectives:

The specific objectives proposed in the first study, consisting of the dynamic analysis of contrast enhancement in animal tumor models under antiangiogenetic therapy are: assessing the prognostic value of various TIC parameters by correlation with histopathological

(microvascular density, vascular area) and morphological (tumor weight) measurements as well as the relation between the dynamic development of these parameters and the final outcome, for each case.

Material and method:

The experimental model used consisted of 20 male Wistar albino rats (weight 200 ± 20 g, six months old) randomly divided into two study groups of 10 rats, which were subcutaneously inoculated with carcinosarcoma Walker 256 tumor fragments. At 4 weeks after inoculation, the animals were divided randomly into two groups of 10. Group 1, designated as control, received a normal diet. Group 2 received for 2 weeks, every 3 days, Sunitinib per os at a dose of 40 mg/kg body weight. Ultrasound examinations were conducted on days 1 (D1), 7 (D7) and 15 (D15) on rats treated with Sunitinib, respectively in days 1 and 15 on control rats. In order to examine with contrast, one of the tail veins was catheterized with a 26G cannula and injected with a bolus SonoVue injection of 0.2 ml, followed by 0.5 ml of isotonic NaCl solution.

For the numerical processing we used the SonoLiver software (Bracco®). TIC curves were plotted from tumors, using as reference the muscular tissue nearby, parametric maps were obtained and were calculated the following parameters: I_{max} , RT, TTP, mTT; by integrating the first 50s since the enhancement, AUC was also calculated. The results were compared with the anatomic-pathological sections obtained, with the microvascular density (MVD) and the vessels' area measured inside.

Correlations between the pathology data and the ultrasonographic parameters measured on day 15 were performed by calculating the Spearman coefficient (OriginPro®). For a better description of the dynamic behavior of tumoral perfusion during the antiangiogenic therapy, we calculated a score corresponding to each parameter, based on the slopes of evolution in the D1 – D15 interval, with values between 1 and 3, higher with increased relapse risk. Scores were also correlated with anatomopathological and ultrasonographic (including TIC) parameters obtained in D1 using Spearman coefficient and Kruskal-Wallis test.

Results and discussion:

The study tested the feasibility and the limitations of the method on hypervascular tumor models (Walker 256) in Wistar rats treated with Sunitinib. The experimental study confirmed two important assumptions, required further for clinical validation of the studies: a good linear correlation between TIC volume parameters (I_{max} , AUC) and microvascular density (MVD) measured histopathologically; a good discrimination between the post-treatment parameters and tumor appearance in controls, topping morphometric indices. In addition, we examined the possibility of using dynamic TIC parameters to group the cases according to some evolution patterns based on the calculated scores by a formula that we developed. The scores for the I_{max} and AUC were positively correlated with the MVD at the end of the treatment, in other words, the lack in response or of tendency to relapse after the first week resulted in an increase in tumor vascularization.

Study II:

Objectives:

By the second study, performed on patients with advanced hepatocellular carcinomas treated with an antiangiogenic agent (Sorefenib), we decided to extrapolate the knowledge gained from the animal model study and identify the most relevant TIC parameters concerning

the disease's remission, the production of tumor necrosis and prolongation of general survival. To this end, we also have set as a target to obtain cut-off values for the studied parameters, with the calculation of the corresponding performance indices.

Material and method:

The study comprised 27 patients in advanced (inoperable) stages of HCC from IRGH and the Oncological Institute "I. Chiricuță " in Cluj, treated with Sorafenib orally, with a dose of 400 mg two times a day. All patients were examined by native and contrast enhanced ultrasound (SonoVue 1.6 ml iv bolus + 10 ml saline) at the beginning of treatment, on a GE Logiq 7 unit, with follow-up at 1 month after treatment, with the repetition of CEUS and DCE-US examinations. Interpretable results from monitoring were obtained in 18 patients. Depending on the dimensional evolution of the tumors, according to the RECIST criteria, patients were enrolled in: a group with response (stationary disease, partial or complete remission) or with no treatment response (progressive disease). The cases were followed in the long-term, for the survival analysis.

Clips corresponding to 0-70 seconds of contrast enhancement were exported from the machine in DICOM format and imported into the program SonoLiver (Bracco ®). The program automatically calculated parameters as I_{max}, TTP, RT, MTT and tumor area, making maps for each parameter. Exported curves were imported in the OriginPro® program, where AUC was calculated by integrating the instantaneous values of intensity along the time axis. We also calculated a flow („Debit”) parameter according to the formula: $Debit = \frac{AUC}{100 \cdot mTT}$. We used the formula: $Diff \text{ Param} = 100 \frac{Param_2 - Param_1}{Param_1}$ for the growth rate of parameters, where $Param_1$ is the TIC parameter studied at the start of the treatment and $Param_2$ at 1 month of treatment.

We calculated the median of survival (Kaplan-Meier method, OriginPro®) and, based on it, we split the group in patients with equal or greater survival, including survivors at the end of the study (survival₅₀ +) or less (survival₅₀ -). We compared the median for growth rates of TIC parameters between the different groups described above, using the non-parametric Mann-Whitney test. We searched the cut-off values for growth rates of the TIC parameters for differentiating between survival groups ₅₀ +/₅₀ - using ROC curves and we calculated the diagnostic performance for each parameter. For the relevance of these values, we performed survival curves on the subgroups defined by the cut-off values of each parameter and we compared the differences with the *log rank* test.

Results and discussion:

The study aims the technique validation on a group of human patients. The results are still partial due to a small lot (N = 18), our intention being to continue the study in the following years. Considering the statistics' limits in this situation, we keep a reserved view in the interpretation of the results, but the conclusions of this study are still very encouraging. „Debit”, a parameter derived from the classical TIC parameters, AUC and mTT, revealed, along with I_{max}, a dynamics closely linked to overall survival. In the aim of a survival greater than the median of the population, we obtained cut-off values for TIC parameters, based on which we calculated the prognostic performance indices. Thus, a cut-off of the increase rate in the I_{max} of -14.82% and of 18.33% in „Debit”, allowed the classification in the group with a better survival, with a sensitivity of 81%, specificity of 85% and a sensitivity of 90%, specificity of 71%, respectively. The decreased growth rates below these cut-off values means a survival greater than the median

of the population (736 days). Other factors taken into account (the appearance of necrosis, classic RECIST criteria) were less correlated with survival. The correlation of the flow indices (RT, mTT) with the extension of tumor necrosis was also noted..

Study III:

Objectives:

The third study is focused on the diagnostic value of CEUS quantification in the walls of pancreatic fluid formations, in order to distinguish, on one hand, between cystic masses and pseudocysts, on the other hand between benign and malignant / borderline cystic tumors. We chose this diagnostics application because usually in these cases the subjective assessment of the contrast enhancement in the walls is difficult and subjected to errors.

Material and method:

41 patients diagnosed with pancreatic cystic masses at IRGH Cluj-Napoca were examined by CEUS (GE Logiq 7 machine) after at least 4 hours of fasting, using a dose of 2.4 ml SonoVue iv bolus + 10 ml saline. The regions of interest were defined inside: thickened walls or septa of the cyst, the cyst's contents and a surrounding arterial vessel. Enhancement and wash-out of the contrast agent from the cystic components were compared with the normal pancreatic parenchyma adjacent to the lesion.

CEUS quantitative analysis consisted in automatic plotting of TIC curves on the machine and their analysis with the OriginPro® program. The movements were corrected in the examination plan and the sequences with out of plane motions were excluded. On interpolated curves the following parameters were calculated: maximum intensity (IMAX), Time to Peak (TTP), Maximum ascending GRADient (GRAD), Time to maximum GRADient (TTG) and Area Under the Curve (AUC). For each parameter we calculated a normalized value according to the formula: $nParam. = (Wall Param. - Content Param.) \times (Artery Param. / Wall Param.)$.

The statistical analysis was performed with SPSS 13.0 (SPSS Inc, USA). We compared the means and variances of TIC normalized parameters obtained in each subgroup, using Student's t-test and Fischer's test for two populations. We determined the cut-off values for each normalized parameter by analyzing the ROC curves, for its diagnostic performance, and calculated the AUROC.

Results and discussion:

In this study we assessed the relevance of TIC parameters in differentiating between pseudocysts and pancreatic cystic tumors, on one hand, and between benign and malignant/ borderline cystic tumors, on the other hand. After a preliminary normalization of the parameters using an original formula that takes into account the enhancement of the cyst's wall, of the inside and of the surrounding artery, we obtained a good separation between the above subgroups for the following parameters: nTTP, nAUC and nTTG. In the pseudocyst-cystic tumor differentiation a diagnostic value was obtained for nTTP and nAUC (meaning tumors at values below 7s and over 825 dBs, respectively); for differentiating benign-malignant cystic tumors, nTTP and nTTG had a good performance (signifying benign over 9s and 8.5s, respectively). The method was very laborious in this study, because of the need to strictly control the fine structures' movements in relation with the regions of interest, imposing us to manually extract and correct the TIC curves directly from the machine. Accordingly, postprocessings were carried-out in semiautomatic manner using a mathematical analysis software (OriginPro®). For a validation of these values,

an easier method would be required, applicable on a larger lot, regardless of the ultrasound machines used. Our work, however, retains its value in this pilot study, being the only one in the literature dealing with the issue of the cystic pancreatic masses in terms of CEUS quantification CEUS.

Study IV:

Objectives:

The final study of the thesis is focused on following up patients treated for inflammatory bowel diseases and has, as specific objectives, on one hand to compare the TIC parameters with the gold standard in assessing intestinal inflammation, represented by endoscopy. On the other hand, the ultimate goal is to find for the relevant parameters, with cut-off values in order to achieve, with the best performance, a prediction of early treatment response, to avoid frequent colonoscopy examinations.

Material and method:

Of the 131 patients with inflammatory bowel diseases prospectively recruited at IRGH Cluj-Napoca, 67 were diagnosed with UC and 46 with Crohn's disease. We determined the clinical activity scores (Trulove-Witts and CDAI, respectively), CBC, CRP, endoscopic activity scores (Mayo and SES-CD, respectively). Native and post-contrast ultrasound examinations were performed at the start of the treatment and after 3 months. The ultrasound examination, using a GE Logiq 7 machine, selected the most affected, accessible bowel loop, on which we described complications, perienteric changes, the layer structure, power Doppler appearance and wall thickness.

After the injection of 2.4 ml SonoVue i.v. bolus + 10 ml saline we calculated a score of layers and clips totaling 60s were exported for post-processing in the SonoLiver program. As reference, we chose the anterior abdominal muscles, located near the loop. ROI was drawn so as to include the entire intestinal wall and to avoid areas with artifacts. TIC parameters were obtained: I_{max}, RT, TTP, mTT, while AUC was calculated in the OriginPro® program by integrating the intensity.

We determined the relationship between endoscopic scores (Mayo in UC and SES-CD in CD) and clinical scores, CRP, wall thickness, layers' score, I_{max}, RT, TTP, mTT, AUC and ln (AUC), using the Spearman coefficient. For the prediction of post-therapeutic endoscopic score improvement, we applied the Wilcoxon test for clinical, biochemical and ultrasonographic parameters, before and 3 months after treatment. We also calculated the correlation between the endoscopic score difference and differences in the studied parameters, using the Spearman coefficient. For four selected parameters, we measured the performance in diagnosing endoscopic improvements (decreased endoscopic score by at least one unit) using the ROC curves.

Results and discussion:

In this study, we applied the DCE-US method to test the correlation of TIC parameters with the inflammatory changes occurring in inflammatory bowel diseases and to assess the response to anti-inflammatory treatment. In our study, the parameter with the best performance in discriminating between classes of activity measured by endoscopy and in the assessment of early post-therapy endoscopic response was ln (AUC). In UC, ln (AUC) was able to estimate the lack of progression of endoscopic scores with a sensitivity of 94% and a specificity of 83%, and

in Crohn's disease with a sensitivity of 77% and a specificity of 100%. The values obtained in Crohn's disease should be treated with caution, however, because of the small lot, which could lead to a false increase the measured specificity.

Both the intestinal wall thickness and clinical scores predicted, with statistic signification, the endoscopic improvement, however, their performance was lower compared to the volume parameters (Imax, ln (AUC)). The importance of these results is the confirmation of the CEUS value in the monitoring of expensive, risky treatments, having a better value than routine methods applied at present (clinical scores) and a performance close to endoscopic findings (gold standard). The method may be a minimally invasive alternative to repeated endoscopies in assessing inflammatory bowel disease activity and its progression under antiinflammatory therapy, allowing a compromise between a better supervision and an increased comfort for patients. Endoscopic studies can not be eliminated, but their frequency may be reduced in this situation.

GENERAL CONCLUSIONS:

1. Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) can be successfully used to quantify tumor perfusion, in animal models (Wistar rats) of hypervascular mammary tumors (Walker 256) implanted subcutaneously.
2. Of the TIC parameters analyzed in the animal models, a good performance in correlation with microvascular density (MVD) was found for Imax and AUC (volume parameters). There was a linear relationship between the mentioned CEUS parameters and the MVD.
3. There were statistically significant differences between the treated group of rats (Sunitinib) and the controls for: tumor area, weight, Imax difference and AUC difference.
4. Based on the variation of the CEUS parameters during treatment, we found different patterns, with an associated evolution score between 1 and 3, with greater risk of relapse at a higher score value. The Imax score and the AUC score were significantly correlated positively with MVD at the end of the study. High initial values of the volume parameters (Imax, AUC) have facilitated a better response of these parameters (negative correlation between the score and the initial values).
5. Extrapolating the data for a human lot with advanced HCC, treated with sorafenib, we also obtained good performances for the volume parameters (Imax, Flow), expressed as growth rates, in differentiating between patients with and without a survival higher than the median. The flow parameters (RT, mTT) were correlated better with the occurrence of necrosis.
6. We have achieved good performance for Imax and "Debit" growth rates in the survival prognosis over the median values, at cut-off values of -14.82% and 18.33%, respectively, the decrease below these values signifying a better prognosis. The performance was confirmed by significant differences between survival curves for each subset.
7. Measuring TIC parameters in the walls of pancreatic cystic masses could facilitate the differential diagnosis between pseudocysts and cystic tumors, on one hand and between benign cystic tumors and malignant/borderline tumors, on the other hand.
8. The performance was better by normalizing the TIC parameters, according to the cyst's content, its wall and a surrounding arterial vessel.
9. In the differentiation of pseudocyst-cystic tumors, nTTP and nAUC had a diagnostic value (meaning tumors at values below 7s and over 825 dBs, respectively); for the difference benign-

malignant, a good performance was found for nTTP and nTTG (signifying benign at over 9s and 8.5s, respectively).

10. The quantitative analysis based on the TIC parameters can be a minimally invasive alternative to repeated endoscopies, in assessing the activity of inflammatory bowel diseases and of the outcome under antiinflammatory therapy.

11. The parameter with the best performance in discriminating between activity classes determined by endoscopy and the assessment of early endoscopic post-therapy response was $\ln(\text{AUC})$.

12. The thickness of the intestinal wall and also the clinical scores, predicted with statistical significance the improvement proven by endoscopy, but their performances were lower compared to the volume parameters (I_{\max} , $\ln(\text{AUC})$).

13. DCE-US provides many perspectives in the assesement of hemodynamics at the microcirculatory level, in tumor, inflammatory or ischemic pathologies, with potential valuable clinical applications, especially in therapy monitoring.

14. The method is still quite laborious, requiring a strict control of the factors of error, but the development of specialized software packages, which greatly facilitate the work of the examiner, could lead to a future implementation of the method in clinical areas.