

Stenozele căilor biliare extrahepatice

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand **Marius-Horațiu Stanca**

Conducător de doctorat **Liviu Emil Vlad**

Cuprins	
INTRODUCERE	8
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	10
1. Colestaza extrahepatică: cauze și efecte	11
1.1.....Introduce re	11
1.2.....Noțiuni de fiziologia colestazei	11
1.3.....Efectele obstrucției biliare	13
1.4.....Stresul oxidativ în colestază. Sisteme de protecție hepatică	15
1.5.....Anatomo patologia colestazei extrahepatice	18
2. Strategia diagnostică și tactica terapeutică a leziunilor cauzatoare de colestază extrahepatică	19
2.1. Diagnosticul obstrucțiilor biliare	19
2.1.1. Examenul clinic	19
2.1.2 Explorări diagnostice	21
2.1.2.1. Explorări care evidențiază colestaza	21
2.1.2.2 Explorări care stabilesc sediul și etiologia colestazei	23
2.1.3 Tactica terapeutică a leziunilor cauzatoare de colestază extrahepatică	29
2.1.3.1 Tratamentul medical	29
2.1.3.2 Tratamentul invaziv, curativ și paliativ	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	40
1. Ipoteza de lucru/obiective	41
2. Metodologie generală	42
3. Studiu 1 - Studiul experimental al colestazei extrahepatice	44
3.1. Introducere	44
3.2. Scopul studiului	44
3.3. Material și metodă	45
3.4. Rezultate	48
3.5. Discuții	76
3.6. Concluzii	84
4. Studiul 2 – Evaluarea stresului oxidativ în colestaza extrahepatică	85
4.1. Introducere	85
4.2. Scopul studiului	85
4.3. Material și metodă	85
4.4. Rezultate	88
4.5. Discuții	115
4.6. Concluzii	124
5. Studiul 3 – Evaluarea implicațiilor colestazei și a stresului oxidativ hepatic în evoluția postoperatorie a pacienților cu icter obstructiv	125
5.1. Introducere	125
5.2. Scopul studiului	125
5.3. Material și metodă	126

5.4. Rezultate	127
5.5. Discuții	134
5.6. Concluzii	140
6. Concluzii generale (sinteză)	141
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	143
REFERINȚE	145
ANEXE	167

Cuvinte cheie: stenozele căilor biliare extrahepatice, coleastă, stres oxidativ, melatonină, tinospora cordifolia, sintetaza oxid nitrică, radical oxid nitric, radical hidroxil, antioxidanți

1. Introducere

Stenozele căilor biliare extrahepatice sunt procese patologice de cauze diverse ce induc colestaza extrahepatică. Noțiunea de colestază extrahepatică este cuprinsă în cadrul nosologic al afecțiunilor în care producția de secreție și excreție ai hepatocitului sunt împiedicați în curgerea lor liberă spre intestin. Procesul este urmat de acumularea bilirubinei, a acizilor și sărurilor biliare în hepatocit și regurgitarea lor în sânge. Efectele acestei inversări a polarității biliare se manifestă atât la nivel local, hepatocitar, cât și general. Metabolismul celulei hepatice este modificat, caracterizat fiind de reacții de oxidoreducere foarte intense, cu producerea de cantități crescute de radicali liberi de oxigen, a căror activitate nu mai poate fi contracarată de antioxidanții proprii, moment în care este declanșat stresul oxidativ. Acțiunea radicalilor liberi se obiectivează prin alterări ale tuturor structurilor celulare, până la nivel de ADN, rezultatul fiind accelerarea apoptozei hepatice. Acestea li se adaugă declanșarea unui răspuns inflamator, cu expresie la nivelul spațiilor porte, produs și întreținut de fenomenele de stres oxidativ. Cumularea consecințelor distructive ale celor două fenomene, stresul oxidativ și infiltratul inflamator, se manifestă în timp prin alterarea funcției hepatice, apoptoză și necroză celulară, apariția fibrozei celulare.

Dereglarea funcțiilor și a structurii hepatice este însoțită de alterări ale funcționale și structurale și în celelate organe digestive, lipsa bilei din intestin fiind responsabilă pentru fenomene de maldigestie și malabsorbție, dar și de declanșarea unui stres oxidativ al peretelui intestinal, cu consecințe ce pot fi nefaste bolnavului.

În studiul de față am încercat să descriem modificările celulare, biochimice, dar și ultrastructurale ce se petrec la nivel hepatic în cazul colestazei extrahepatice. Am urmărit pe un model experimental animal succesiunea cronologică a evenimentelor celulare și biochimice ce survin ligaturii canalului coledoc, prin evaluări ale funcției hepatice și studii de microscopie optică și electronică. Ulterior am analizat amploarea stresului oxidativ hepatic secundar colestazei și, folosind același model experimental, am studiat acțiunea unor substanțe creditate cu efecte antioxidante, din punctul de vedere al protecției hepatice. După studiul experimental am evaluat influența colestazei asupra evoluției bolnavilor cu icter datorat neoplaziilor periampulare și am apreciat ponderea acestora în cadrul factorilor de risc pentru apariția complicațiilor postoperatorii.

Abordarea temei s-a făcut într-un mod complex și multidisciplinar, înafara autorului fiind implicați anatomopatologi și medici de laborator, specialiști în microscopia electronică și optică, chimiști, specialiști din cadrul biobazei universității. Descrierea fenomenelor, fără să fie exhaustivă, a început de la nivelul ultrastructural celular, a trecut prin descrierea histologică și biochimică și a continuat cu eforturile de găsimă a unor soluții de combatere a stresului oxidativ hepatic și a consecințelor nefaste ale colestazei. În mod firesc, s-a făcut trecerea de la studiul experimental la cel clinic, iar concluzia celor trei studii este că există soluții pentru ameliorarea evoluției pacienților tratați pentru afecțiuni cauzatoare de colestază extrahepatică și stres oxidativ.

Toate studiile experimentale au primit acordul Comisiei de Etică a Universității.

2. Studiu 1. Studiul experimental al colestazei extrahepatice

Scopul studiului: evidențierea evoluției biochimice, morfopatologice și ultrastructurale a hepatocitului în condițiile colestazei extrahepatice prin ligatura completă de coledoc distal la șobolan.

Material și metodă: s-a luat în studiu un lot de șobolani adulți, rasa Wistar, la care, în anestezie generală, s-a practicat ligatura coledocului distal cu fir de mătase 4-0. Preoperator s-a recoltat sânge de la fiecare individ, pentru determinarea valorilor bazale ale transaminazelor și a enzimelor de colestază. Ulterior, la intervale de 7 zile s-au recoltat probele hepatice și s-au sacrificat, în mod aleator, exemplare pentru studiul morfologic și ultrastructural. S-au efectuat preparate de microscopie optică și electronică. Urmărirea lotului s-a făcut pe

durata a 28 de zile. După culegerea datelor s-au realizat curbele de evoluție biochimică și s-au analizat datele oferite de cele două tipuri de microscopie. În urma studiului s-a imaginat o cronologie biochimică și morfopatologică a ficatului aflat în condiții de stenoză completă coledociană.

Rezultate, discuții: la microscopia optică principalele modificări sunt următoarele: La o săptămână de la operație, am observat o proliferare masivă a celulelor epiteliale biliare (colangiocite), acest fenomen ducând la o creștere a numărului de canalicule biliare de la nivelul spațiilor porto-biliare, numărul canaliculelor biliare pe spațiu Kiernan având o medie de 12,76. Pe lângă fenomenele de proliferare celulară epiteliale biliare, s-au constatat fenomene necrotico-inflamatorii, inflamația fiind de gradul 2 după indicele Knodell. La două săptămâni am constatat o creștere semnificativă a numărului de canalicule biliare pe spațiu Kiernan, numărul mediu al acestora fiind de 31,73, astfel încât ductele biliare proliferate depășesc spațiul port și infiltrază parenchimul hepatic. La acest interval, pe lângă ductele biliare cu aspect relativ normal, am constatat prezența unor structuri anormale, respectiv celule epiteliale proliferante care nu sunt dispuse pe membrană bazală și nu au tendința de a forma lumene canaliculare. Gradul activității necrotico-inflamatoare a fost de 1 – inflamație minimă. La acest interval nu au fost constatate leziuni de fibroză hepatică. La trei săptămâni am observat o creștere a numărului de canalicule biliare de la nivelul spațiilor porto-biliare, media acestora fiind de 20,17/ spațiu Kiernan. Infiltratul inflamator a fost foarte abundent, tipul celular predominant fiind cel al limfocitelor. Inflamația a fost de gradul 2 după indicele Knodell. Nu s-au observat leziuni de fibroză hepatică. La 4 săptămâni post-operator am constatat o reducere a numărului de canalicule biliare la nivelul spațiilor porto-biliare, numărul mediu al acestora fiind de 4,9. În schimb crește numărul celulelor cu morfologie caracteristică celulelor mezenchimale. Printre celulele mezenchimale și celulele epiteliale biliare proliferate s-au observat hepatocite atrofiate, care vor suferi necroză de coagulare. Această modificare fenotipică, poate fi pusă pe seama unui fenomen denumit tranziție epitelial – mezenchimală.

La nivelul canalului coledoc, după ligatură s-a constatat o creștere a diametrului canalului ductal, o îngroșare a peretelui canicular, o creștere a numărului celulelor conjunctive proliferate de la nivelul țesutului conjunctiv subepitelial și o creștere a cantității de fibre elastice. Unul din aspectele importante relevate la nivel coledocian este prezența infiltratului inflamator din perete, prezent și evident în primele 3 săptămâni și care se ameliorează după a 4-a. Inflamația din peretele ductal apare la nivelul firului de ligatură și este deplin justificată de prezența corpului străin, dar infiltratul neutrofilic este sesizat și la distanță de fir, cu toate că nu se instrumentează calea biliară în timpul operației. Este posibil ca acest lucru să fie datorat iritației date de acumularea de bilă cu presiune crescută în coledoc, ce declanșează un răspuns inflamator nespecific, similar infiltratului periportal din parenchimul hepatic.

Microscopia electronică: După primele 7 zile de la ligatura coledociană, hepatocitul își păstrează structura normală, nu se descriu modificări majore. Membrana celulară este intactă, joncțiunile strânse apar neafectate. Se observă dilatări ale spațiilor biliare. Nucleii și organitele celulare nu suferă alterări notabile. Fibrele colagene vizibile aparțin spațiului perivascular și prezența lor este normală. Acest aspect indică reacția celulară adaptativă la agresiunea indusă de staza sărurilor biliare, fără afectarea structurii hepatocitare, ceea ce conferă reversibilitatea funcției celulare după ridicarea obstacolului. Imaginile obținute la 14 și 21 de zile de la ligatură evidențiază alterarea progresivă a structurii celulare, fără diferențe majore de la o săptămână la alta. Caracteristicile sunt dilatări exprimate ale spațiilor biliare de la polii biliari ai hepatocitelor, cu aplatizarea microvililor sub acțiunea hiperpresiunii biliare. Joncțiunile strânse își păstrează integritatea arhitecturii. La nivelul citoplasmei se remarcă pierderea de matrice celulară, citoplasma prezintă vacuolizări și încărcare grasă. Celulele îto, încărcate cu vitamina A în mod normal, își pierd vacuolele lipidice (probabil vitamina A trece în hepatocit ca reacție antioxidantă). Mitocondriile încep să arate electron-hipodense, balonizate, rotunjite, scad numeric, cristele mitocondriale prezintă dezintegrări. La nivelul unor nuclei s-au detectat nucleoli cu vacuolizări. Aceste vacuole sunt reale și nu sunt artefacte de prelucrare, deoarece prezintă perete propriu, se încadrează în conturul nucleolului, pe care nu-l deformează. S-a exclus aspectul de infecție virală, deoarece în acel caz imaginea virusurilor din nucleu este neagră și nu transparentă. Cu toate că stresul oxidativ din celulă este intens, nu am pus în evidență prezența peroxizomilor pe nici una din secțiunile examinate.

Evoluția biochimică. Transaminazele: curbele obținute demonstrează un vârf al acestora la 7 zile de la ligatură, cu o scădere ușoară la 14 zile, apoi cu o scădere mai accentuată, apropiindu-se de valorile inițiale după 21 de zile de icter colestatic. Normalizarea transaminazelor, în absența unui tratament specific nu poate fi explicată pe baza datelor pe care le-am obținut și poate fi parte a unor procese adaptative specifice șobolanilor. Evoluția FA

este de creștere în prima săptămână, apoi se menține în platou și prezintă o tendință mult mai lentă de descreștere, spre finalul celor 4 săptămâni. În timpul experimentului, după primele 2 săptămâni, am avut dubii asupra eficacității ligaturii coledociene, luând în considerare comportamentul animalelor și evoluția transaminazelor și a bilirubinei, dar temerea ne-a fost infirmată de prezența valorilor crescute ale FA și de aspectul coledocului în momentul sacrificării indivizilor. Măsurarea valorilor bilirubinei totale și directe a relevat o curbă de evoluție asemănătoare celei a FA. Valorile maxime s-au înregistrat după primele 7 zile, apoi au scăzut treptat spre finalul experimentului. Acest lucru nu se suprapune modelului uman, în care nu există o scădere a nivelului bilirubinei în cazul existenței unui obstacol biliar complet și permanent.

Evaluarea datelor obținute din studiul primului lot de șobolani ne-a permis să facem o imagine de ansamblu asupra fenomenelor ce se petrec după inducerea prin ligatură coledociană a icterului colestatic și să tragem unele concluzii. Modelul experimental este valid doar în primele două săptămâni, în vederea comparării cu modul uman de evoluție din punct de vedere a analizelor biochimice, mecanismele de protecție ale șobolanilor fiind mult mai evidente în săptămânile ce urmează. Fenomenele morfopatologice, însă, își urmează propriul curs, în pofida aparentei normalizări enzimatică.

Concluzii: Pe modelul experimental utilizat leziunea cea mai evidentă a fost reacția ductală, numărul canaliculelor biliare crește progresiv până la două săptămâni după ligatură, după care acesta scade. Există o corelație negativă între activitatea de proliferare a celulelor epiteliale biliare și numărul celulelor cu fenotip mezenchimal, care crește progresiv după ligatură. La 4 săptămâni apare fibroza incipientă, aceasta fiind de stadiul 1 după indicele Knodell. La nivelul canalului coledoc se constată o îngroșare a peretelui pe baza proliferării de celule mezenchimale și de fibre elastice. La nivel ultrastructural, primele organite celulare afectate sunt mitocondriile. Enzimele de colestază și transaminazele au o evoluție similară omului în primele 2 săptămâni. La nivelul ficatului de șobolan se declanșează reacții adaptative, de protecție, însă deteriorarea morfopatologică nu este influențată.

3. Studiu 2. Evaluarea stresului oxidativ în colestaza extrahepatică

Scopul studiului: Ne-am propus evaluarea stresului oxidativ hepatic indus de către colestază, din punct de vedere cantitativ, prin măsurarea radicalilor liberi de oxigen formați, dar și din punct de vedere calitativ, prin aprecierea leziunilor produse sub acțiunea reacțiilor de oxidoreducere. De asemenea, am încercat să analizăm efectele antioxidante și hepatoprotectoare ale preparatelor de melatonină și tinospora cordifolia, folosind aceleași criterii enunțate mai sus.

Material și metodă: s-au constituit trei loturi de șobolani adulți din rasa Wistar, la care s-a practicat ligatura coledocului distal. Unui lot i s-a administrat în perioada postoperatorie soluție apoasă de melatonină, lotul M, altuia infuzie din extract de tinospora cordifolia, lotul T, iar ultimul lot a fost considerat martor, lot L. Similar primului studiu, s-au recoltat probe sanguine pre și postoperator, la interval de 7 zile s-au sacrificat subiecți pentru probele de microscopie optică și electronică. Pentru evaluarea stresului oxidativ, s-a determinat producția de NO, prin spectrofotometrie din omogenatul de ficat și s-a evidențiat producerea radicalului hidroxil OH prin rezonanța electronică de spin.

Rezultate, discuții: Din punct de vedere microscopic, la animalele care au primit melatonină și tinospora cordifolia, modificările tisulare nu sunt dramatic diferite de animalele netratate. Se întâlnește infiltratul inflamator, arii de hepatocitoliză, piece-meal necrosis periportal. Nu se observă arii de fibroză, dar și la modelul cu ligatură simplă fibroza a apărut abia după 28 de zile. Efectele sunt explicabile prin acțiunea bruscă, violentă a ligaturii coledociene, cu repercusiuni asupra unui ficat neprotejat în prealabil prin nici un mecanism. În schimb, gradul de inflamație periportală și reacția de proliferare ductală este mai redusă, mai exprimată în primele 7 zile pentru grupa tinospora, apoi în următoarele 7 zile pentru grupa melatonină. Acest lucru ne facem să credem că, sub acțiunea acestor substanțe, se produce o reducere a produșilor de stres oxidativ și o imunomodulare la nivel hepatic, cu scăderea răspunsului inflamator. Reacția de proliferare ductală este un proces adaptativ și protector în colestază, reducerea ei poate să însemne resimțirea mai puțin agresivă, sub acțiunea protectoare a melatoninei și tinosporei, a colestazei.

Examenul electronomicroscopic merge cu precizarea mai în detaliu a dereglărilor de la nivel celular și care oferă suportul morfologic al evoluției enzimatică. La 7 zile de colestază extrahepatică alterările celulare nu sunt

dramatice și nici nu sunt diferențe notabile între loturi. Cu excepția faptului că peroxizomii, care sunt un marker al activității antioxidante, sunt prezenți doar la loturile tratate cu melatonină și tinospora și complet absenți la cei neprotejați, nu au fost puse în evidență alte aspecte relevante ale activității hepatoprotectoare a celor doi produși studiați. Mai mult, aspectul mitocondriilor dă rezultate contradictorii, deoarece la lotul T, teoretic protejat, mitocondriile au același aspect normal, ca și la lotul L, neprotejat, în timp ce mitocondriile șobolanilor protejați cu melatonină par a suferi mai mult decât restul. Întregul tablou electronomicroscopic este normal pentru toate cele trei loturi, din prisma evoluției șobolanilor din lotul de urmărire. Deși există o coleastă intensă, relevată de examinările biochimice, mecanismele protectoare proprii celulei hepatice de șobolan își fac datoria, astfel că nu se produc alterări structurale. Diferențele între imaginile mitocondriilor celor trei loturi nu sunt majore și, din prisma evoluției ulterioare, probabil că nu au nici o semnificație. Compararea imaginilor obținute la 14 zile de coleastă relevă diferențe importante și cu semnificație între cele trei loturi. În timp ce la lotul martor deprecierea ultrastructurii celulare sub efectul stresului oxidativ este evidentă, manifestată atât la nivelul citoplasmei, care apare vacuolizată, cât și la nivelul mitocondriilor, care-și pierd și ele din integritate, la celelalte două loturi se poate obiectiva efectul protectiv al melatoninei și al *tinospora cordifolia*. La o privire de ansamblu, ceea ce surprinde este imaginea de celule normale pe secțiunile lotului M și T, comparativ cu lotul L. Mitocondriile celulelor din lotul L sunt depreciate, cu matricea rarefiată, cu distrugerii de criste mitocondriale, în timp ce la loturile M și T acestea apar similar celulelor normale. Peroxizomii sunt evidențiabili, din nou, doar la loturile M și T. Foarte interesantă este apariția vacuolelor din nucleolii hepatocitelor neprotejate, din lotul L, vacuole care, în mod normal se descriu la celule aflate în perioadă intensă de diviziune mitotică. Emitem ipoteza că acest aspect pledează pentru declanșarea unor procese de regenerare hepatică ca răspuns la agresiunea colestazei și la necrozele celulare. Deoarece în ficatul loturilor M și T nu s-au descoperit nucleoli vacuolizați pe nici una dintre secțiuni, ar putea să însemne că agresiunea resimțită de hepatocit nu este așa de mare și, din această cauză nici activitatea mitotică și de regenerare ca răspuns la agresiune nu este intensă.

Din punct de vedere al prezentării a sindromelor de hepatocitoliză și coleastă am remarcat o asemănare a curbelor de evoluție cu animalele netratate în prima săptămână, când nu există diferențe semnificative între valorile ASAT, ALAT, Bbt, FA la cele trei grupe. După prima săptămână se remarcă „normalizarea” aproape a tuturor probelor biochimice la grupele melatonină și tinospora, comparativ cu lotul martor. Având în vedere modul de comportament al enzimelor și bilirubinei la primul lot studiat, se poate afirma că administrarea de melatonină și tinospora la animalele cu icter colestatic induce „normalizarea” probelor biochimice ale subiecților cu o săptămână mai repede decât în modelul natural de evoluție. Cu toate că explicația acestui tip de comportament la șobolan nu poate fi explicat decât prin declanșarea unor mecanisme protectoare, rezultatele experimentului nostru promovează ideea că administrarea de substanțe antioxidante au și un rol modulator al sistemelor adaptative hepatice, prin stimularea activității lor. Efectele melatoninei și tinosporei cordifolia sunt mai evidente asupra enzimelor de coleastă și bilirubinei, ceea ce se traduce prin rolul de stabilizare a membranei, lucru ce va fi obiectivat prin studiile de microscopie electronică.

Măsurarea compușilor de stres oxidativ a fost în corelație cu datele obținute din analiza biochimiei și a morfopatologiei. Comparativ cu lotul martor, la exemplarele tratate cu melatonină și tinospora cordifolia cantitatea de NO₂/gram de țesut a fost semnificativ mai mică. După primele 7 zile cantitatea de NO₂/gr țesut este, în medie, egală la grupele M și T, la 14 zile se observă variații între indivizii M, cei din grupa T rămân la valori sensibili egale, dar din cauza loturilor mici nu se pot trage concluzii de semnificație statistică în grupele respective. Rezultatele obținute la rezonanța electronică de spin pentru detectarea OH au oferit date aparent paradoxale. Din analiza tipurilor de spectre reiese că semnalul cel mai puternic îl are ficatul de șobolan sănătos. Apropiat, dar cu o amplitudine mult mai mică e spectrul celor tratați cu melatonină. Acesta este maxim în primele 7 zile de la inducerea stresului oxidativ, ca ulterior să scadă în intensitate. Ficatul celor din grupa tratată cu tinospora prezintă un spectru sugestiv pentru radicalii OH, dar de amplitudine mică în prima săptămână, dar care crește la două săptămâni, apropiindu-se de cel al indivizilor sănătoși. Semnalul ficatului animalelor cu ligatură de coledoc, dar fără nici un tratament adițional nu prezintă un semnal clar pentru OH. În experimentul nostru am încercat să determinăm în dinamică activitatea radicalului OH, simulând măsurătorile *in vivo*. Astfel, probele de ficat au fost puse în contact cu capcana de spin, pentru a bloca radicalii formați, dar au fost lăsate la temperatura camerei, de 21°C. Măsurătorile s-au făcut la o oră, la 2 ore de la recoltare și apoi a doua zi. Spectrele specifice OH generate de către probe au indicat o activitate oxidativă intensă la șobolanii sănătoși și tratați cu melatonină, dar mult mai slabă la cei din grupa ligatură simplă. Modul de prezentare s-a menținut în aceeași manieră și la a doua determinare, la 2 săptămâni, ceea ce înseamnă că este un model valid. Acest lucru poate fi

explicat prin evoluția țesutului hepatic rămas în condiții de anaerobioză. Celulele provenite de la exemplarele sănătoase posedă un aparat enzimatic, metabolic și energetic intact, așa că, în condiții de privare de oxigen procesele de degenerare apoptotică și necroză se vor produce în datorită unui stres oxidativ intens. La șobolanii din grupa melatonină semnalul pentru OH se apropie de cel al indivizilor sănătoși, este stabil și puternic, de amplitudine. Parenchimul șobolanilor cu ligatură de coledoc, dar tratați cu melatonină se comportă asemănător unuia îndemn atunci când este pus în condiții de anaerobioză, lucru care ne facem să credem că administrarea de melatonină prezervă în celula hepatică mecanismele enzimatice și resursele energetice, fiind un factor de protecție. Proba de țesut prelevat de la șobolanii cu ligatură, dar netratați în niciun fel, ținută în condiții anaerobe, se comportă aproape inert din punct de vedere al producției de OH, deci al stresului oxidativ. Explicația ar putea consta în faptul că aceste celule sunt epuizate structural, funcțional și energetic de către stresul oxidativ intens la care sunt supuse datorită colestazei induse experimental. Indivizii tratați u tinospora se comportă asemănător celor cu melatonină, dar prezintă un semnal mai slab, ceea ce ne face să credem că activitatea antioxidantă a tinosporei cordifolia este prezentă, dar mai puțin eficientă, comparativ cu melatonina.

Concluzii: Icterul obstructiv și colestaza extrahepatică declanșează la nivel hepatic procese de stres oxidativ, responsabile de alterările morfofuncționale și imunologice celulare. Administrarea de melatonină și infuzie de tinospora cordifolia la șobolanii cu ligatură de coladoc s-a dovedit a avea efect hepatoprotector. Administrarea per os a melatoninei și tinosporei s-a dovedit eficientă din punctul de vedere a biodisponibilității. Acțiunea melatoninei și a tinosporei cordifolia se obiectivează prin prezervarea structurală și funcțională a mitocondriilor. Melatonina și tinospora cordifolia manifestă acțiuni antioxidante de intensități variabile, în mod direct sau prin susținerea mecanismelor adaptative celulare

4. Studiu 3. Evaluarea implicațiilor colestazei și a stresului oxidativ hepatic în evoluția postoperatorie a pacienților cu icter obstructiv

Scopul studiului: Prin prezentul studiu încercăm o evaluare a efectelor stressului oxidativ consecutiv colestazei extrahepatice asupra evoluției pacienților cu tumori periampulare, din punctul de vedere al apariției complicațiilor postoperatorii nehemoragice. Cu toate că intervențiile chirurgicale pentru tumorile periampulare sunt complexe, cu multiple riscuri chirurgicale asociate metodei în sine, la pacienți cu un status general posibil alterat, considerăm că stresul oxidativ hepatic datorat icterului, cu toate că este rezolvat prin restabilirea drenajului biliar, poate să influențeze evoluția postoperatorie a bolnavilor, prin efectele celulare și funcționale deja instalate.

Material și metodă: S-au luat în studiu o serie de pacienți consecutivi operați în Clinica Chirurgie III operați pentru tumori periampulare în perioada ianuarie 2009 – aprilie 2011. Pacienții au fost împărțiți în două loturi inițiale, primul la care s-a practicat operația cu intenție radicală, duodenopancreatectomia cefalică (lot DPC - LDPC) și al doilea, la care s-au practicat intervenții paliative (lot paliativ LP). Pentru fiecare dintre loturi s-a evaluat statusul biochimic al colestazei și al hepatocitolizei la internare (Bb, FA, γ GT, ASAT, ALAT), nivelul hemoglobinei Hb și al leucocitelor L, apoi s-a divizat fiecare lot în mai multe subloturi, după cum urmează: a) câte unul cu bilirubina și enzimele de hepatocitoliză crescute (indice al unui stress oxidativ hepatic intens), b) altul cu bilirubina crescută, dar enzimele normale (stress oxidativ hepatic moderat), c) bilirubină normală și transaminaze normale, d) bilirubină normală și transaminaze crescute. S-au analizat complicațiile postoperatorii și s-au comparat din acest punct de vedere loturile între ele. S-au elaborat tabele de contingență și s-a evaluat statistic importanța stressului oxidativ hepatic ca factor de risc pentru apariția complicațiilor postoperatorii în chirurgia tumorilor periampulare, folosind testul Fisher exact, two tailed.

Rezultate, discuții: Lotul pacienților cu duodenopancreatectomie cefalică a reprezentat aproximativ o treime din totalitatea cazurilor operate. În momentul intervenției radicale, jumătate din pacienți prezentau icter sclerotegumentar, iar jumătate erau cu icterul remis în urma unui drenaj endoscopic sau chirurgical. Dintre cei icterici, există un procent de 32% la care s-a efectuat o manevră de diversie a bilei în tractul digestiv, fără succes. Analiza univariată a complicațiilor duodenopancreatectomiilor cefalice, în funcție de prezența stressului oxidativ hepatic, nu a oferit diferențe semnificativ statistice între ratele complicațiilor la cei ce prezintă sau nu acest status (25,92% vs 35,13%, $p = 0,4755$), diferență nesemnificativă ce se păstrează și atunci când se compară subloturile între ele. Am încercat studiul pe asocieri de factori ce țin de statusul biologic al bolnavilor și am comparat subloturi de pacienți cu stress oxidativ hepatic, având leucocitoză și respectiv anemie preoperatorie, cu subloturi

fără stress oxidativ, dar prezentând aceleași caracteristici. Am ales leucocitoza ca marker al unei posibile angiocolite, secundară unui drenaj biliar, endoscopic sau chirurgical. În cazul asocierii leucocitozei și a stresului oxidativ nu am găsit diferențe semnificativ statistice între complicațiile apărute în cadrul subploturilor ($p > 0,05$) și nici nu am remarcat o incidență mai mare a fistulelor biliare. Asocierea anemiei preoperatorii a schimbat, însă, situația. Pacienții cu stress oxidativ hepatic și anemie preoperatorie au avut semnificativ statistic mai multe complicații decât cei care nu prezentau anemie, indiferent dacă aveau sau nu stress oxidativ ($p < 0,05$). Pentru a verifica dacă nu cumva anemia în sine este un factor care ar putea afecta singular evoluția postoperatorie, am aplicat testul Fisher pe lotul celor cu anemie și cei fără, iar diferența nu a fost semnificativ statistică, fiind la limită ($p = 0,0835$), deși există lucrări în care anemia este un factor important de risc, la fel ca și diabetul, pentru supurația de plagă. Spre deosebire de lotul DPC, la lotul intervențiilor paliative LP lucrurile stau cu totul altfel. În cazul acestor pacienți stressul oxidativ hepatic constituie el însuși un factor de risc pentru evoluția postoperatorie complicată atunci când comparăm cu subplotul de icterici, dar fără stress oxidativ exprimat ($p < 0,05$). Comparat cu neictericii, subplotul de stress oxidativ nu prezintă diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$). Calculele pe cele două subploturi (cu stress și fără stress oxidativ) au indicat diferențe mari, semnificative statistic (28,33% vs 6,81%, $p = 0,0059$), ceea ce stratifică mai mult pacienții la risc și oferă și aici ipoteza de lucru că stressul oxidativ ar trebui combătut înaintea intervenției. Studiul comparativ al subploturilor stress oxidativ cu celelalte subploturi, fără icter nu indică diferențe între rata complicațiilor, dar nici nu are semnificație, deoarece compară pacienți aflați în situații diferite. Pacienții din subploturile fără icter sunt în stadii de boală avansată, cu stare generală precară, la care s-a practicat derivația digestivă sau alte paliatii și la care, din aceste considerente, este normal ca rata complicațiilor să fie destul de mare. În cazul în care se optează pentru o derivație biliară, fie chirurgical, fie prin stentări, este de preferat ca bila să fie condusă în intestin și nu la exterior, pentru a-și putea exercita funcțiile digestive, dar mai ales, cele protective asupra intestinului.

Concluzii: Icterul *per se* nu constituie factor de risc pentru complicațiile postoperatorii în cazul duodenopancreatectomiei cefalice. Icterul asociat stresului oxidativ hepatic nu constituie factor de risc pentru complicațiile post DPC. Anemia preoperatorie asociată stresului oxidativ reprezintă un factor de risc important pentru complicațiile post DPC, în timp ce anemia singură nu poate fi categorisită ca un factor de risc. Icterul asociat stresului oxidativ hepatic reprezintă un factor de risc pentru complicațiile postoperatorii după intervențiile paliative pentru tumorile periampulare. Ameliorarea preoperatorie a funcției hepatice și a stresului oxidativ la pacientul icteric poate reduce rata complicațiilor postoperatorii, în condițiile unei tehnici corecte.

Europass Curriculum Vitae

Informații personale

Nume și prenume **STANCA MARIUS HORAȚIU**
Adresa 47D Mikszath Kalman, 400503, Cluj-Napoca, Romania
telefon Mobile: 0040745587905
E-mail mariustanca@yahoo.com, horatiu.stanca@umfcluj.ro
Naționalitate român
Data nașterii 19.11.1973

Experiența profesională

Data Iunie 2007 - prezent
Ocupația și poziția deținută Medic specialist, chirurgie generală
Activități și responsabilități Chirurgie generală, urgențe chirurgicale gastrointestinale
Numele și adresa angajatorului Clinica chirurgie 3, Institutul regional de Gastroenterologie și Hepatologie „O. Fodor” Cluj-Napoca, 19-21 Croitorilor
Data Octombrie 2006 - prezent
Ocupația și poziția deținută Asistent universitar
Activități și responsabilități Educația chirurgicală a studenților și rezidenților
Numele și adresa angajatorului Departamentul Chirurgie, UMF „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca,

Studii și competențe

Data Sept 1998
Titlul obținut Licențiat
Domeniul Medicină generală
Universitatea UMF „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, Facultatea de Medicină
Data Martie 2007
Titlul obținut Medic Specialist in chirurgie generală
domeniul Chirurgie generală
Numele și tipul instituției Ministerul Sănătății
Data 05.10.2010
Titlul obținut Competență în chirurgie hepatică și transplant
Domeniul Chirurgia hepatică și de transplant
Numele și tipul instituției Institutul Clinic de Boli Digestive și Transplant Hepatic Fundeni, București, România

Data Iunie 2008
 Titlul obținut Competență în chirurgie laparoscopică
 domeniul chirurgie laparoscopică
 Numele și tipul instituției Clinica Chirurgie nr 3 Cluj-Napoca, UMF „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca,

Limbi străine
 autoevaluare
 European level (*)

engleză
franceză

Understanding		Speaking		Writing
Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
C1	C1	B2	B2	B2
B1	B1	B1	B1	A2

(*) Common European Framework of Reference for Languages

Prezentări la congrese și
 conferințe internaționale
 Prim autor

1. M.H. Stanca, A. Nagy, Monica Toșa, V. Miclăuș, L. Barbu-Tudoran, L. Vlad, “Ameliorarea stresului oxidativ în colestaza extrahepatică”. IASGO București 13-16.04.2011, oral presentation
2. Marius H. Stanca, A. Nagy, Monica Tosa, V. Miclăuș, L. Barbu-Tudoran, L. Vlad, “Antioxidant Protective Effect Of Melatonin And Tinospora Cordifolia In Bile Duct Ligation”, World Congress for Advancement in Surgery, in Israel, 9-12.11.2010, oral presentation
3. Marius H. Stanca et al, “Complications of laparoscopic colecistectomy. A single center experience”, 109th Congress of French Surgical Society, 3-5.10.2007, Paris, poster presentation

Coautor

1. "Complications of the pancreatic pseudocyst. Diagnosis and treatment", I.Părăian, O.Bălă, **M.H.Stanca**, XXIst European Congress of the International College of Surgeons and the 4th Congress of the Czech Medical Association J.E.Purkine, Praga, 2-5 iunie 1999, Abstract Book
2. "Diagnostic difficulties and therapeutical options in the pancreatic abscesses", I.Părăian, **M.H.Stanca**, O.Andreica, First Meeting of the Mediterranean societies of Pancreatology and XXIIIrd Meeting of the Italian Pancreatic Association, Bologna, 23-25 septembrie 2000, Abstract Book
3. "Complicațiile biliare ale chistului hidatic hepatic", I. Părăian, C.Iancu, Ligia Achimaș, **M.H.Stanca**, Ali Samir, A III-a Conferință Internațională de Chirurgie, Iași, 13-15 Iunie 2001, vol. Rezumate
4. "Surgical treatment of the recurrent hepatic hydatid disease", I. Părăian, **M.H.Stanca**, Ali Samir, World Congress of Gastroenterology, Bangkok, 24.02.-01.03.2002, poster session
5. "Pyogenic Liver Abscesses. Experience of the 3rd Surgical Clinic Cluj-Napoca", I. Părăian, **M.H.Stanca**, EuroSurgery 2002, Lisabona 2-5 iunie 2002, oral presentation
6. „Tratamentul chirurgical al cancerului gastric. Analiza a 472 cazuri”, L.Vlad, Al. Necula, **M.H.Stanca**, Anca Mureșan, A. Mirică, T. Găvan, Al XXII- lea Congres Național de Chirurgie, Tg. Mureș-Sovata, 5-8 mai, vol rez. Pag. 477
7. „Colecistectomia laparoscopică în colecistita acută – strategie și aspecte tehnice”, L. Vlad, O. Bălă, L. Furcea, C. Iancu, I.C. Puia, Fl. Pop, H.Radu, G. Osian, N. Al Hajjar, F. Graur, Al. Necula, **M.H. Stanca**, Al II-lea congres Național al ARCE, Cluj Napoca, 15-17.09.2004, vol rez.
8. „Paliația chirurgicală în cancerul pancreatic”, L. Vlad, L. Furcea, C. Iancu, D. Munteanu, C. Puia, D. Miclăuș, O. Finta, **M.H. Stanca**, H. Neagoș, Conferința Națională de Chirurgie, Chirurgia Pancreasului, 25-29.05.2005, Iași, vol. rez. pag. 296
9. „Incidentele intraoperatorii și complicațiile postcolecistectomie laparoscopică. A scăzut incidența acestora?”, O. Bălă, L. Vlad, C. Iancu, N. Al Hajjar, C. Puia, D. Munteanu, M. Geza, F. Pop, R. Horea, F. Graur, G. Osian, A. Necula, Luminița Furcea, **M.H. Stanca**, V. Vermeșan, B. Negru, F. Mihăileanu, Conferința Națională de Chirurgie. Al II-lea Simpozion al Asociației Române de Chirurgie Hepato-bilio-pancreatice și Transplant Hepatic. Al IX-lea Simpozion și Curs Postuniversitar al Secțiunii române IASGO, București, 18-21.04.2007
10. „Evaluarea stadiului în cancerul gastric după introducerea clasificării TNM-UICC 1998”, A. Necula, L. Vlad, C. Iancu, D. Munteanu, C. Puia, O. Bălă, F. Pop, R. Horea, N. Al Hajjar, G. Osian, F. Graur, Luminița Furcea, **M.H. Stanca**, M. Geza, Conferința Națională de Chirurgie. Al II-lea Simpozion al Asociației Române de Chirurgie Hepato-bilio-pancreatice și Transplant Hepatic. Al IX-lea Simpozion și Curs Postuniversitar al Secțiunii române IASGO, București, 18-21.04.2007

Cursuri postuniversitare

"The role of radiofrequency in the treatment of malignant liver tumors", pre-congress course at the 17th World Congress of IASGO, Bucharest, 05.09.2007

"Surgical anatomy of the caudate lobe", post-congress course, at the 11th National Symposium of Romanian Section of IASGO, Bucharest, 04.04.2009

"Modern concepts in pancreatic and liver surgery", CME, Cluj-Napoca, 22-23.10.2009

"Journées de Chirurgie du Centre Hepato-Biliaire Hopital Paul Brusse", 19-20.06.2009, Hotel Marriott Paris Rive Gauche

Lucrări publicate
Prim autor

1. **M.H. Stanca**, A. Nagy, M. Toşa, L. Vlad, Efectele hepatoprotectoare ale Melatoninei și Tinospora cordifolia administrate per os în icterul colestatic indus experimental, Chirurgia vol 106, nr. 2, martie-aprilie 2011

Coautor

1. Necula A, Vlad L, Iancu C, Munteanu D, Puia C, Bălă O, Pop F, Radu H, Al-Hajaar N, Osian G, Graur F, Furcea L, **Stanca MH**, Molnar G, Mocan T, [Clinical aspects with prognostic value in gastric cancer--analysis of 468 cases with gastric adenocarcinoma].Chirurgia (Bucur). 2008 Mar-Apr;103(2):181-8
2. Necula A, Vlad L, Iancu C, Munteanu D, Puia C, Bălă O, AlHajaar N, Pop F, Radu H, Osian G, Graur F, Furcea L, **Stanca MH**, Molnar G, Mocanu L.[Morbidity and mortality in gastric cancer surgery--analysis of 468 cases with gastric adenocarcinoma]. Chirurgia (Bucur). 2008 Sep-Oct;103(5):529-37.
3. Părăian, **M. H. Stanca**, "Diverticulul Meckel. Analiza a 60 de cazuri", Clujul Medical 2001, vol LXXV, nr. 4, pag 441-445

The extrahepatic bile ducts stenoses

Abstract

Phd **Marius-Horațiu Stanca**

Scientific coordinator **Liviu Emil Vlad**

Cuprins	
INTRODUCTION	8
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	10
1. Extrahepatic cholestasis: causes and effects	11
1.6. Introduction	11
1.7. Notions of cholestasis	11
1.8. Effects of biliary ducts obstruction	13
1.9. Oxidative stress in cholestasis. Hepatoprotective systems	15
1.10. Histopathology of extrahepatic cholestasis	18
2. Diagnostic strategy and therapeutic tactics of bile duct injury causing extrahepatic cholestasis	19
2.1. Diagnose of biliar obstruction	19
2.1.1. Physical examination	19
2.1.2 Diagnostic explorations	21
2.1.2.1. Explorations that highlight cholestasis	21
2.1.2.2 Explorations that highlight the ethiology of cholestasis	23
2.1.3 therapeutic tactics of bile duct injury causing extrahepatic cholestasis	29
2.1.3.1 Medical treatment	29
2.1.3.2 Invasive, curative and paliative treatment	34
PERSONAL CONTRIBUTION	40
1. Working hypothesis/objectives	41
2. General methodology	42
3. Study nr 1. – The experimental study of extrahepatic cholestasis	44
3.1. Introduction	44
3.2. Aim	44
3.3. Method and materials	45
3.4. Results	48
3.5. Discussions	76
3.6. Conclusions	84
4. Study nr 2 – Assesment of oxidative stress in extrahepatic cholestasis	85
4.1. Introduction	85
4.2. Aim	85
4.3. Method and materials	85
4.4. Results	88
4.5. Discutions	115
4.6. Conclusions	124
5. Study nr 3 – Assessment of the implications of cholestasis and liver oxidative stress in postoperative evolution of patients with obstructive jaundice	125
5.1. Introduction	125
5.2. Aims	125
5.3. Method and materials	126
5.4. Results	127

5.5. Discussions	134
5.6. Conclusions	140
6. General conclusions (synthesis)	141
7. Thesis originality	143
8. References	145
9. Addendum	167

Key words: extrahepatic bile ducts stenoses, cholestasis, oxidative stress, melatonine, tinospora cordifolia, nitroxid sinthetaze, nitric oxide radical, hidroxyyl radical, antioxidants

1. Introduction

Extrahepatic bile ducts stenoses are pathological proceses of multiple causes, that induce the extrahepatic cholestasis.. Extrahepatic cholestasis notion is included in the nosological frame in wich the products of secretion and excretion of the hepatocyte are prevented in their free flow to the intestine. The

process is followed by accumulation of bilirubin, bile acids and salts in hepatocytes and their regurgitation in the bloodstream. The effects of this reversal of hepatocytes polarity bile occurs at both levels, local and general. Liver cell metabolism is altered, characterized by very intense redox reactions, followed by production of increased quantities of oxygen free radicals, whose activity can not be counteracted by liver's own antioxidants, moment in which oxidative stress is triggered. Free radicals act by alterations of all cellular structures, to the level of DNA, resulting in acceleration of liver apoptosis. They trigger an inflammatory response, produced and maintained by oxidative stress phenomena and manifested in the portal space. Aggregation of the destructive consequences of the two phenomena, oxidative stress and inflammatory infiltrate, will manifest by impaired liver function, cell apoptosis and necrosis, cellular development of fibrosis.

Impaired liver function and structure is accompanied by functional and structural alterations in the other digestive organs, the lack of bile in the intestine is responsible for maldigestion and malabsorption, but also for the onset of oxidative stress in the intestinal wall, with consequences that can be harmful patient.

In this study we tried to describe the cellular, biochemical and ultrastructural hepatic changes that occur in extrahepatic cholestasis case. We followed on animal experimental model the chronological sequence of cellular and biochemical events occurring bile duct ligation by assessing liver function, optical and electronic microscopy studies. Subsequently we analyzed the extent of the cholestatic oxidative stress, using the same experimental model and we studied the action of antioxidant substances, in terms of liver protection. After the experimental study we evaluated the influence of the oxidative stress on the evolution of patients with cholestatic jaundice due to periampular malignancies and we appreciated its share of the risk factors for postoperative complications.

Topic was approached in a complex and multidisciplinary manner, in which were involved pathologists and laboratory physicians, specialists in electronic and optical microscopy, chemists, specialists from the university animal experimental center. Description of facts, without being exhaustive, begins at the ultrastructural level, passes through description of the histological and biochemical changes and continued with efforts to find solutions to combat oxidative stress and hepatic adverse consequences of cholestasis. Naturally, it made the transition from experimental to the clinical study and the conclusion of the three studies is that there are solutions to improve patient outcomes treated for disease-causing extrahepatic cholestasis and oxidative stress.

All experimental studies were approved by the University's Ethics Committee .

2. Study 1. Experimental study of extrahepatic cholestasis

Aims: Highlighting developments in biochemical and ultrastructural pathological conditions of hepatocyte in extrahepatic cholestasis by complete ligation of the distal common bile duct in rats.

Materials and methods: a group of adult Wistar rats was used, in which, in general anesthesia, distal complete choledocal ligation was performed, using silk 4-0 thread. Preoperative blood samples were collected from each individual, to determine basal values for transaminases and cholestatic enzymes. Subsequently, at intervals of 7 days, blood samples were collected from each individual, and couple of rats were slaughtered at random, for morphological and ultrastructural study copies. Preparations were made for optical and electronic microscopy. Follow of the lot was made over 28 days. Afterwords data collection were made and biochemical evolution curves were analyzed, along with the data from the two types of microscopy. The study envisioned a timeline to biochemical and pathological changes of the liver in common bile duct obstruction.

Results, discussion: the optical microscope main changes are as follows: One week after surgery, we noticed a massive proliferation of biliary epithelial cells (colangiocyte), this phenomenon leads to an increase in the number of bile ducts from the porto-biliary areas, with a 12.76 bile ductes in average on space of Kiernan. In addition to biliary epithelial cell proliferation, were found necrotic inflammatory phenomena, inflammation was grade 2 after Knodell score. In two weeks we found a significant increase in the number of bile ducts in the space Kiernan, their average number being 31.73, so that the bile ducts proliferate beyond the port space and infiltrating liver parenchyma. At this time, in addition to relatively normal-looking bile ducts, we found the presence of abnormal structures, namely proliferating epithelial cells who are not arranged on basement membrane and do not tend to form lumens canaliculare. Necrotic-inflammatory activity grade was 1 - minimal inflammation. At this time no injuries have been reported hepatic fibrosis. Three weeks we have seen an increase of bile ducts from the porto-biliary spaces, their average being 20.17 / Kiernan space. Inflammatory infiltrate was very abundant, predominant lymphocytes. Inflammation was grade 2 after Knodell score. No lesions were observed in liver fibrosis. At 4 weeks after surgery we found a reduction in the number of bile ducts in the porto-

biliary spaces, their average number is 4.9. Instead increase the number cells with characteristic morphology of mesenchymal cells. Among the mesenchymal cells and biliary epithelial cells proliferate atrophied hepatocytes were observed, which will undergo coagulation necrosis. This phenotypic change can be attributed to a phenomenon called epithelial - mesenchymal transition.

In the bile duct after ligation there was an increase in ductal diameter channel, a canalicular wall thickening, an increase in cells from the connective tissue, subepithelial proliferation and an increasing amount of elastic fibers. One important aspect is the presence of choledocal inflammatory infiltrate in the wall, present and evident in the first 3 weeks and ameliorated after the 4th. Inflammation of the wall occurs in the ductal ligation wire and is fully justified by the presence of foreign body, but the neutrophilic infiltrate is notified at a distance from the ligation site, although not handle bile duct during the operation. It is possible that this is due to irritation of bile accumulation and increased pressure into the common bile duct that triggers a nonspecific inflammatory response, similar to periportal infiltrate the liver parenchyma.

Electron microscopy: After the first 7 days after ligation, hepatocyte retains its normal structure and no major changes are described. The cell membrane is intact, tight junctions appear unaffected. Dilatation of the biliary space is observed. Nucleus and cellular organelles are not suffering notable alterations. Perivascular collagen fibers is visible belongs to the space, but their presence is normal. This indicates the cellular adaptive response to stasis bile salt-induced aggression without affecting the structure of hepatocytes, which confers cell function reversibility after lifting obstruction. Images obtained at 14 and 21 days after ligation shows progressive alteration of cellular structure, without major differences from week to week. Biliary spaces dilatation is characteristic, expressed at the poles of the hepatocyte bile, with biliary hyperpresion flattening microvillus. Tight junctions retain their architectural integrity. In the cytoplasm is remarkable loss of matrix cell cytoplasm shows vacuolation and fat loading. ITO cells loaded with vitamin A normally lose vacuoles lipid (probably vitamin A pass in hepatocytes in antioxidant response). Mitochondria are beginning to show electron-hypo dense, bloated, rounded, lower in number, with mitochondrial cristae disintegration. At the level of the nuclei were detected vacuolisation of nucleoli. These vacuoles are real and not artifacts of processing, it presents their own wall, falls within the contours of nucleoli, which do not distort. Virus infection was excluded, because in that case the image is black and not transparent. Although the cell oxidative stress is intense, we've not revealed the presence of peroxisome on any of the sections examined.

Biochemical evolution. Transaminases: curves obtained show their peak at 7 days after ligation, with a slight decrease to 14 days, then a more pronounced decline, approaching baseline after 21 days of cholestatic jaundice. Normalization of transaminases in the absence of specific treatment cannot be explained based on the data we obtained and can be part of specific adaptive processes in rats. The evolution of AF is figured by increased levels in the first week, then maintain the plateau and has a much slower decreasing trend towards the end of 4 weeks.. Total bilirubin and conjugated bilirubin measurement showed a similar trend curve of AF. Maximum values were recorded after 7 days, then declined gradually towards the end of the experiment. This model does not match human, in wich one cannot find a decrease in bilirubin levels in the event of a complete and permanent biliary obstruction. Evaluation of pooled first group of rats allowed us to make an overview of the phenomena that occur after induction of cholestatic jaundice by common bile duct ligation and draw some conclusions. The experimental model is valid only in the first two weeks for comparison with human mode of evolution in terms of chemistry, mechanisms of rat protection is much more obvious in the coming weeks. Pathological phenomena follow their own course, despite apparent enzyme normalization.

Conclusions: in this experimental model, most obvious damage was the ductal reaction, their number increasing progressively to two weeks after ligation, after which it decreases. There is a negative correlation between the activity of proliferation of biliary epithelial cells and mesenchymal phenotype number of cells, which increases progressively after ligation. 4 weeks fibrosis occurs early, which is the stage one after the Knodell score. In the bile duct wall thickening there is a proliferation of mesenchymal cells on and elastic fibers. At ultrastructural level, mitochondria are the first cellular organelle that is affected. Cholestatic enzymes and transaminases have a similar evolution of man in the first two weeks. The rat liver triggers adaptive protection responses, but the pathologically course of damage is not affected.

3. Study 2. Evaluation of oxidative stress in extrahepatic cholestasis

Aims: We set the evaluation of oxidative stress induced by the cholestatic liver in quantitative terms by measuring the oxygen free radicals formed, but also qualitatively by considering the lesions caused by

redox reactions. We also tried to analyze the effects of antioxidant and hepatoprotective preparations of melatonin and *Tinospora cordifolia*, using the same criteria mentioned above.

Materials and methods: there were three groups of adult Wistar rats, who underwent distal common bile duct ligation. First lot was given aqueous melatonin during postoperative period (group M), another infusion of *Tinospora cordifolia* extract (group T), and the last batch was considered a witness, lot L. As the first study, blood samples were collected before and postoperative interval of 7 days and were sacrificed subjects for evidence of optical and electronic microscopy. To assess oxidative stress, NO production was determined by spectrophotometry in liver homogenate and hydroxyl OH radical production was evidenced electronic spin resonance ESR.

Results, Discussion: In terms of optic microscopy, in animals that received melatonin and *Tinospora cordifolia*, tissue changes are not dramatically different from untreated animals. Inflammatory infiltrate is encountered, hepatocytolise areas, periportal piece-meal necrosis also. Areas of fibrosis were not observed, but also in simple ligation model fibrosis occurred only after 28 days. The effects are explained by the action of sudden, violent choledocol ligation, with repercussions on a liver previously unprotected by any mechanism. Instead, the degree of periportal inflammation and ductal proliferation response is lower than in witness, a little more expressed in the first 7 days in *Tinospora* group, then the next 7 days for melatonin group. This make us believe that , there is a reduction of oxidative stress products and immunomodulation in the liver with decreased inflammatory response under the action of these substances. Ductal proliferation response is adaptive and protective process in cholestasis, its reducing it can mean resentment less aggressive of cholestasis under the protective action of melatonin and *Tinospora cordifolia*.

Electron examination go to specify in more detail disturbances in cellular and morphological, supporting the evolution of enzymes. In the first 7 days of extrahepatic cholestasis, the cellular alterations are not dramatic, nor are notable differences between the groups. Except that peroxisomes, which are a marker of antioxidant activity, are present only in groups treated with melatonin and *Tinospora* and completely absent in the unprotected, were not highlighted other issues of hepatoprotective activity of the two products studied. Moreover, the appearance of mitochondria gives conflicting results, because the T group, theoretically protected, mitochondria have the same look normal, as in group L, unprotected, while protected rats with melatonin mitochondria appear to suffer more than the rest. The entire electron microscopy picture is normal for all three groups of rats in group terms of tracking progress. Although there is intense cholestasis, revealed by biochemical examinations, their protective mechanisms in rat liver cells do their duty, so that there is no structural alterations. Differences between images of mitochondria of the three batches are not major and, in light of subsequent developments, probably have no significance. Comparison of images obtained at 14 days of cholestasis reveals significant differences between the three groups. While the control group depreciation of cell ultrastructure under the effect of oxidative stress is obvious, manifested both in the cytoplasm, which appears vacuolated and in the mitochondria, which also lose the integrity, the other two groups might object protective effect of melatonin and *Tinospora cordifolia*. In an overview, it looks surprising the image of normal cells in lot M and T, compared with group L. Mitochondria are impaired in L group cells, with rarefied matrix, destruction of mitochondrial cristae, while the groups M and T cells they appear like normal. Peroxisomes are highlighted, again, only to groups M and T. Very interesting is the appearance of nuclear vacuoles in unprotected hepatocytes in group L, vacuoles which normally describe the cells in mitotic division intense period. We are issuing this call for the hypothesis that the onset of liver regeneration processes is a response to aggression cholestasis and cellular necrosis. Because in the lots M and T vacuolated nucleoli were not found on any of the sections could mean that the aggression felt by hepatocytes is not so great and because of that mitotic activity and regeneration in response to aggression is not intense. In terms of the hepatocytolise and cholestasis syndroms, we have noted a similarity of the curves of evolution with untreated animals during the first week, when there is no significant difference between the values of AST, ALT, BBT, AF. After the first week, we noted "normalization" of almost all biochemical tests in melatonin and *Tinospora* group compared with controls. Given the behavior of enzymes and bilirubin in the previous group studied, one can say that the administration of melatonin and *Tinospora* in induced cholestatic jaundice animals, leads to "normalization" of enzymes in at least one week faster than the natural model of evolution. Although the explanation of this behavior in rats can be explained only by triggering protective mechanisms, our experimental results promote the idea that the administration of antioxidants also have a modulator role of hepatic adaptive systems, by promoting their work. Effects of melatonin and *Tinospora cordifolia* are more obvious on the cholestatic enzymes and bilirubin, which translates into the role of stabilizing the membrane, which will be objectified by electron microscopy studies.

Measurement of oxidative stress compounds was correlated with data obtained from analysis of biochemistry and morphopathology. Compared with controls, the specimens treated with melatonin and *Tinospora cordifolia*, production of NO₂/g amount of tissue was significantly lower. After 7 days the amount of NO₂/g tissue is, on average, equal to M and T groups and, at 14 days are observed variations between individuals M, while in the group T values remain fairly similar, but because of small lots, there is no conclusions of statistical significance in these groups. The results obtained in electronic spin resonance to detect OH gave apparently contradictory data. The analysis of types of spectra show that the strongest signal it is healthy rat liver. Similar, but with a much smaller amplitude, appears the spectrum of subjects treated with melatonin. It is within the first 7 days after induction of oxidative stress, and subsequently to decrease in intensity. The liver of the group treated with *Tinospora* presents a spectrum suggestive of OH radicals, but the small amplitude in the first week, but that increases to two weeks, approaching that of healthy individuals. Liver signal of choledoc ligation animals, but no additional treatment does not show a clear signal for OH. In our experiment we tried to determine the dynamic activity of OH radical, simulating in vivo measurements. Thus, liver samples were put in contact with the spin trap to block the radicals formed, but were left at room temperature 21 ° C. Measurements were made at a time, 2 hours after harvest and then the next day. OH spectrum generated by specific evidence indicated a strong oxidative activity in healthy and treated with melatonin rats, but much weaker in the simple ligation group. Presentation was maintained in the same manner and to the second determination 2 weeks, which means that it is a valid model. This can be explained by the evolution of liver tissue remained in anaerobic conditions. Cells from healthy specimens have a enzymatic, metabolic and energy device intact, so that in the oxygen deprivation apoptotic degeneration and necrosis processes will occur due to intense oxidative stress. In melatonin treated rats signal for OH group is close to that of healthy individuals, is stable and strong amplitude. Parenchyma of rats with choledoc ligation, but treated with melatonin behaves like a free when it is placed in anaerobic conditions, which make us believe that the administration of melatonin preserves the hepatic cell enzymatic mechanisms and energy, as a protective factor. Tissue samples taken from rats with ligation, but untreated in any way, kept under anaerobic conditions, behaves almost inert in terms of production of OH, so the oxidative stress. The explanation could be that these cells are heavy depleted structural, functional and energy by oxidative stress faced by experimentally induced cholestasis. Individuals receiving *Tinospora* behave like those with melatonin, but has a weaker signal, which makes us believe that the antioxidant activity of *Tinospora cordifolia* is present, but less effective than melatonin.

Conclusions: Extrahepatic obstructive jaundice and cholestasis in the liver triggers oxidative stress processes responsible for morpho-functional and immune alterations. Administration of melatonin and infusion of *Tinospora cordifolia* in rats with ligation of choledoc have been shown to have hepatoprotective effects. Administration of melatonin and *Tinospora* per os has been effective in terms of bioavailability. Melatonin and *Tinospora cordifolia* action is specified by structural and functional preservation of mitochondria. Melatonin and *Tinospora cordifolia* exhibit antioxidant actions in varying intensities, directly or by supporting adaptive cellular mechanisms

4. Study 3. Assessment of the implications of cholestasis and liver oxidative stress in postoperative evolution of patients with obstructive jaundice

Aims: In this study attempt an assessment of extrahepatic cholestasis consecutive oxidative stress on the evolution of patients with periampular tumors, in terms of nonhaemorrhagic postoperative complications occurrence. Although surgery for tumors periampulare are complex, with multiple risks associated by the surgical method itself, on patients with general status possibly altered, we consider that oxidative stress due to liver jaundice, although it is resolved by restoring bile drainage, can influence postoperative evolution of patients through the cellular and functional alterations already installed.

Material and Methods: In this study we considered a series of consecutive patients operated on in the Surgical Clinic III surgery for tumors periampulare between January 2009 - April 2011. Patients were divided into two groups, one who underwent surgery with radical intent, cephalic duodenopancreatectomy (lot DPC - LDPC) and the second, which were practiced palliative intervention (palliative group LP). For each batch was evaluated biochemical status of cholestasis at admission (BB, FA, γ GT, AST, ALT), Hb hemoglobin level and leukocyte L, then each lot was divided into several sublots, as follows: a) by one with elevated bilirubin and transaminase (index of hepatic oxidative stress heavily), b) one with high bilirubin but normal enzymes (moderate hepatic oxidative stress), c) normal bilirubin and transaminases normal, d) normal bilirubin and elevated transaminases. Postoperative complications were

analyzed and lots were compared from this point of view. We have developed contingency tables and evaluated statistically to stress the importance of oxidative metabolism as a risk factor for postoperative complications in surgery perampulare tumors using Fisher exact test, two tailed.

Results, Discussion: The lot of cephalic duodenopancreatectomy patients represented approximately one third of all cases operated. When radical surgery, half the patients had jaundice and half were jaundice resolved after an endoscopic or surgical drainage. Of the jaundiced patients, there is a 32% undergoing a maneuver of diversion of bile in the digestive tract, without success. Univariate analysis of DPC complications, according to the presence of hepatic oxidative stress, did not provide statistically significant differences between the rates of complications in those who have status or not (25.92% vs 35.13%, $p = 0.4755$), insignificant difference that is maintained when comparing each subplot. We tried study of a combination of factors related to biological status of patients and compared sublots patients with hepatic oxidative stress, preoperative anemia or leukocytosis, respectively, with sublots with no oxidative stress, but presenting the same characteristics. We chose leukocytosis as a possible marker of angiocolitis, secondary to biliary drainage, endoscopic or surgical. In the combination of leukocytosis and oxidative stress we didn't found statistically significant differences between the sublots complications ($p > 0.05$) nor we observed a higher incidence of biliary fistulas. Association of preoperative anemia changed the situation. Hepatic oxidative stress in patients with preoperative anemia were statistically significantly more complications than those with no anemia, whether they were or not in oxidative stress ($p < 0.05$). To check whether anemia itself is a singular factor that could affect the postoperative evolution, we applied the Fisher's exact test plot on patients with anemia and those without, and the difference was not statistically significant ($p = 0.0835$), although there are works in which anemia is a significant risk factor, like diabetes, for suppuration of the wound. Unlike DPC group, in the group of palliative interventions LP things are different. In these patients liver oxidative stress is in itself a risk factor for postoperative evolution when compared with subplot complicated by jaundice, but without oxidative stress expressed ($p < 0.05$). Calculations on the two sublots (with stress and without oxidative stress) indicated significant differences, (28.33% vs. 6.81%, $p = 0.0059$), which stratify patients at risk and more, offers here working hypothesis that oxidative stress would be fought before the intervention. Comparative study of oxidative stress with other sublots without jaundice indicates no difference between the rate of complications, but neither is significant because it compared patients in different situations. In the palliative group, patients without jaundice sublots are in advanced stages of disease with a poor general condition, who underwent gastrointestinal bypass or other paliatii and which, for those reasons, it is normal that the rate of complications is quite high. If an biliary diversion is needed, , either by stenting or surgically, it is preferable that the bile is headed in the intestine and not outside, to enable it to carry digestive functions, but especially the protection of bowel wall .

Conclusions: jaundice *per se* is not a risk factor for postoperative complications in cephalic duodenopancreatectomy. Jaundice associated with hepatic oxidative stress is not a risk factor for complications after DPC. Preoperative anemia associated with oxidative stress is an important risk factor for complications after DPC, while anemia alone can not be categorized as a major risk factor. Jaundice associated with hepatic oxidative stress is a risk factor for postoperative complications after palliative interventions perampulare tumors. Improvement of preoperative liver function and oxidative stress in icteric patient can reduce postoperative complications, in terms of a correct techniques.

Personal information

Surname(s) / First name(s) **STANCA MARIUS HORAȚIU**
Address(es) 47D Mikszath Kalman, 400503, Cluj-Napoca, Romania
Telephone(s) Mobile: 0040745587905
Fax(es)
E-mail mariustanca@yahoo.com, horatiu.stanca@umfcluj.ro
Nationality romanian
Date of birth 19.11.1973

Work experience

Dates June 2007 - present
Occupation or position held Consultant, General surgeon
Main activities and responsibilities General surgery, surgical emergencies of gastrointestinal diseases
Name and address of employer Surgical Clinic no 3, Emergency Hospital „O. Fodor” Cluj-Napoca, 19-21 Croitorilor street
Dates October 2006 - present
Occupation or position held Assistant professor
Main activities and responsibilities Teaching the medical students and nurses by the bed side, teaching the residents, research activities
Name and address of employer Chair of General Surgery, University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca,

Education and training

Dates Sept 1998
Title of qualification awarded graduated
Principal subjects/occupational skills covered General medicine
Name and type of organisation providing education and training University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, Faculty of Medicine
March 2007
Title of qualification awarded Specialist in general surgery
Principal subjects/occupational skills covered General surgery
Name and type of organisation providing education and training Ministry of Public Health
Dates 05.10.2010

Title of qualification awarded Competence in liver surgery and transplant
Principal subjects/occupational skills covered Liver surgery and transplant
Name and type of organisation providing education and training Clinical Institute of Digestive Diseases an Liver Transplant Fundeni, Bucharest, Romania
June 2008
Title of qualification awarded Competence in laparoscopy
Principal subjects/occupational skills covered Laparoscopic surgery
Name and type of organisation providing education and training Surgical Clinic nr 3 Cluj-Napoca, University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca,

Other language(s)

Self-assessment

European level (*)

english

french

Understanding		Speaking		Writing
Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
C1	C1	B2	B2	B2
B1	B1	B1	B1	A2

(*) Common European Framework of Reference for Languages

Presentations at international congresses
First author

4. M.H. Stanca, A. Nagy, Monica Toşa, V. Miclăuş, L. Barbu-Tudoran, L. Vlad, “Ameliorarea stresului oxidativ în colestaza extrahepatică”. IASGO Bucureşti 13-16.04.2011, oral presentation
5. Marius H. Stanca, A. Nagy, Monica Tosa, V. Miclăuş, L. Barbu-Tudoran, L. Vlad, “Antioxidant Protective Effect Of Melatonin And Tinospora Cordifolia In Bile Duct Ligation”, World Congress for Advancement in Surgery, in Israel, 9-12.11.2010, oral presentation
6. Marius H. Stanca et al, “Complications of laparoscopic colecistectomy. A single center experience”, 109th Congress of French Surgical Society, 3-5.10.2007, Paris, poster presentation

Coauthor

11. "Complications of the pancreatic pseudocyst. Diagnosis and treatment", I.Părăian, O.Bălă, **M.H.Stanca**, XXIst European Congress of the International College of Surgeons and the 4th Congress of the Czech Medical Association J.E.Purkine, Praga, 2-5 iunie 1999, Abstract Book
12. "Diagnostic difficulties and therapeutical options in the pancreatic abscesses", I.Părăian, **M.H.Stanca**, O.Andreica, First Meeting of the Mediterranean societies of Pancreatology and XXIIIrd Meeting of the Italian Pancreatic Association, Bologna, 23-25 septembrie 2000, Abstract Book
13. "Complicațiile biliare ale chistului hidatic hepatic", I. Părăian, C.Iancu, Ligia Achimaș, **M.H.Stanca**, Ali Samir, A III-a Conferință Internațională de Chirurgie, Iași, 13-15 Iunie 2001, vol. Rezumate
14. "Surgical treatment of the recurrent hepatic hydatid disease", I. Părăian, **M.H.Stanca**, Ali Samir, World Congress of Gastroenterology, Bangkok, 24.02.-01.03.2002, poster session
15. "Pyogenic Liver Abscesses. Experience of the 3rd Surgical Clinic Cluj-Napoca", I. Părăian, **M.H.Stanca**, EuroSurgery 2002, Lisabona 2-5 iunie 2002, oral presentation
16. „Tratamentul chirurgical al cancerului gastric. Analiza a 472 cazuri”, L.Vlad, Al. Necula, **M.H.Stanca**, Anca Mureșan, A. Mirică, T. Găvan, Al XXII- lea Congres Național de Chirurgie, Tg. Mureș-Sovata, 5-8 mai, vol rez. Pag. 477
17. „Colecistectomia laparoscopică în colecistita acută – strategie și aspecte tehnice”, L. Vlad, O. Bălă, L. Furcea, C. Iancu, I.C. Puia, Fl. Pop, H.Radu, G. Osian, N. Al Hajjar, F. Graur, Al. Necula, **M.H. Stanca**, Al II-lea congres Național al ARCE, Cluj Napoca, 15-17.09.2004, vol rez.
18. „Paliția chirurgicală în cancerul pancreatic”, L. Vlad, L. Furcea, C. Iancu, D. Munteanu, C. Puia, D. Miclăuș, O. Finta, **M.H. Stanca**, H. Neagoș, Conferința Națională de Chirurgie, Chirurgia Pancreasului, 25-29.05.2005, Iași, vol. rez. pag. 296
19. „Incidentele intraoperatorii și complicațiile postcolecistectomie laparoscopică. A scăzut incidența acestora?”, O. Bălă, L. Vlad, C. Iancu, N. Al Hajjar, C. Puia, D. Munteanu, M. Geza, F. Pop, R. Horea, F. Graur, G. Osian, A. Necula, Luminița Furcea, **M.H. Stanca**, V. Vermeșan, B. Negru, F. Mihăileanu, Conferința Națională de Chirurgie. Al II-lea Simpozion al Asociației Române de Chirurgie Hepato-bilio-pancreatice și Transplant Hepatic. Al IX-lea Simpozion și Curs Postuniversitar al Secțiunii române IASGO, București, 18-21.04.2007
20. „Evaluarea stadiului în cancerul gastric după introducerea clasificării TNM-UICC 1998”, A. Necula, , L. Vlad, C. Iancu, D. Munteanu, C. Puia, O. Bălă, F. Pop, R. Horea, N. Al Hajjar, G. Osian, F. Graur, Luminița Furcea, **M.H. Stanca**, M. Geza, Conferința Națională de Chirurgie. Al II-lea Simpozion al Asociației Române de Chirurgie Hepato-bilio-pancreatice și Transplant Hepatic. Al IX-lea Simpozion și Curs Postuniversitar al Secțiunii române IASGO, București, 18-21.04.2007

Courses attended

“The role of radiofrequency in the treatment of malignant liver tumors”, pre-congress course at the 17th World Congress of IASGO, Bucharest, 05.09.2007

“ Surgical anatomy of the caudate lobe”, post-congress course, at the 11th National Symposium of Romanian Section of IASGO, Bucharest, 04.04.2009

“ Modern concepts in pancreatic and liver surgery”, CME, Cluj-Napoca, 22-23.10.2009

“Journées de Chirurgie du Centre Hepato-Biliaire Hopital Paul Brusse”, 19-20.06.2009, Hotel Marriott Paris Rive Gauche

Paperworks
First author

2. **M.H. Stanca**, A. Nagy, M. Toşa, L. Vlad, Efectele hepatoprotectoare ale Melatoninei și Tinospora cordifolia administrate per os în icterul colestatic indus experimental, Chirurgia vol 106, nr. 2, martie-aprilie 2011

Coauthor

4. Necula A, Vlad L, Iancu C, Munteanu D, Puia C, Bălă O, Pop F, Radu H, Al-Hajaar N, Osian G, Graur F, Furcea L, **Stanca MH**, Molnar G, Mocan T.[Clinical aspects with prognostic value in gastric cancer--analysis of 468 cases with gastric adenocarcinoma]. Chirurgia (Bucur). 2008 Mar-Apr;103(2):181-8
5. Necula A, Vlad L, Iancu C, Munteanu D, Puia C, Bălă O, AlHajaar N, Pop F, Radu H, Osian G, Graur F, Furcea L, **Stanca MH**, Molnar G, Mocanu L.[Morbidity and mortality in gastric cancer surgery--analysis of 468 cases with gastric adenocarcinoma]. Chirurgia (Bucur). 2008 Sep-Oct;103(5):529-37.
6. Părăian, **M. H. Stanca**, “Diverticulul Meckel. Analiza a 60 de cazuri”, Clujul Medical 2001, vol LXXV, nr. 4, pag 441-445

