

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAELA JURKOVIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAELA JURKOVIČ

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA ELASTAZE V
BLATU IN DIHALNEGA TESTA PRI BOLNIKI S
CELIAKIJO**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE ELASTASE
STOOL TEST AND BREATH TEST IN COELIAC
PATIENTS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo ter na Gastroenterološki kliniki v Kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. ter somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju asist. dr. Radu Janši, dr. med., za vse strokovne nasvete in ostalo pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Kristini Suhadolc za vso pomoč pri izvajanju testov ter za strokovne nasvete. Največja zahvala pa gre mojim domačim in Janu, za vso podporo in potrpežljivost, ki so mi jo izkazali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med.

Mihaela Jurkovič

1 UVOD	1
1.1 TANKO ČREVO	1
1.1.1 ZGRADBA TANKEGA ČREVESA	1
1.2 CELIAKIJA	2
1.2.1 ETIOPATOGENEZA	3
1.2.2 KLINIČNA SLIKA	5
1.2.3 DIAGNOSTIKA	6
1.2.4 ZDRAVLJENJE	7
1.3 TREBUŠNA SLINAVKA	8
1.4 PANKREATIČNA EKSOKRINA INSUFICIENCA PRI BOLNIKI S CELIAKIJO	10
1.5 OCENA DELOVANJA TREBUŠNE SLINAVKE	11
1.5.1. TEST PANKREATIČNE ELASTAZE V BLATU	12
1.6 DIHALNI TESTI	13
1.6.1 DIHALNI TESTI ZA MERJENJE EKSOKRINE FUNKCIJE TREBUŠNE SLINAVKE	13
2 NAMEN DELA	16
3 EKSPERIMENTALNI DEL	18
3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV	18
3.2 OPIS ZBIRANJA VZORCEV	18
3.3 ANALIZA VZORCEV TER IZRAČUN PARAMETROV	19
3.3.1 ANALIZA SESTAVE VZORCEV IZDIHANEGA ZRAKA IN IZRAČUN PARAMETROV PRI DIHALNEM TESTU	19
3.3.2 DOLOČANJE ELASTAZE V BLATU	23
3.3.3 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV	25
4 REZULTATI	26
4.1 MERITVE IN IZRAČUNI	26
4.2 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	28
5 RAZPRAVA	37
6 SKLEP	41
7 SEZNAM VIROV	42

KAZALO TABEL

Tabela I: Atipični simptomi celiakije (1, 2, 20).....	6
Tabela II: Stopnje atrofije sluznice po Marshu (8, 9).....	7
Tabela III: Celice Langerhansovih otočkov in njihove naloge (7).....	8
Tabela IV: Pankreatični encimi in proencimi (1).....	10
Tabela V: Rezultati meritev- kontrolna skupina.....	26
Tabela VI: Rezultati meritev - skupina s celiakijo.....	27
Tabela VII: Prikaz odstopanja parametrov.....	28
Tabela VIII: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk pri dihalnem testu.....	29
Tabela IX: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk elastaze v blatu.....	30
Tabela X: Mann-Whitneyjev U test (dihalni test).....	30
Tabela XI: Homogenost varianc pri dihalnem testu.....	32
Tabela XII: Mann-Whitneyjev U test (pankreatična elastaza v blatu).....	33
Tabela XIII: Homogenost varianc pri testu elastaze v blatu.....	33
Tabela XIV: Korelacija med testoma.....	34
Tabela XV: Število pozitivnih in negativnih vrednosti glede na diagnozo.....	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Tanko črevo (33).....	2
Slika 2: Zdrava in atrofirana sluznica tankega črevesa (34).....	5
Slika 3: Zgradba trebušne slinavke (12).....	9
Slika 4: Metabolizem označenega substrata (32).....	14
Slika 5: Potek dihalnega testa pri oceni pankreatične eksokrine funkcije (25).....	15
Slika 6: ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina).....	23

POVZETEK

Celiakija je ena najpogostejših gensko pogojenih bolezni prebavil. Pri mnogih bolnikih je kronična diareja prisotna kljub upoštevanju brezglutenske diete. Eden izmed možnih vzrokov temu je okrnjena eksokrina funkcija trebušne slinavke, ki se pojavi pri približno tretjini bolnikov s potrjeno boleznijo.

V diplomski nalogi smo pri bolnikih s celiakijo in sumom na okrnjeno eksokrino funkcijo pankreasa izvedli dva testa: test določanja elastaze v blatu, ki se ga v klinični praksi uporablja rutinsko, ter dihalni test mešanih trigliceridov. Dihalni test predstavlja novejšo, v klinični praksi še neuveljavljeno metodo testiranja, pri kateri testiranec zaužije označen substrat, ki ga nato lahko izmerimo v izdihanem zraku.

Rezultati testa določanja elastaze v blatu se med skupino s celiakijo in kontrolno skupino niso značilno razlikovali, medtem ko so bili rezultati dihalnega testa pri bolnikih s celiakijo značilno višji napram kontrolni skupini. Značilne korelacije med testoma ni, zato metodi nista zamenljivi.

Izidi preiskave so bili v nasprotju s pričakovanimi, saj smo pri bolnikih s celiakijo pričakovali nižje rezultate obeh testov. Prisotno okrnjeno eksokrino pankreatično funkcijo smo potrdili pri 7,7 % bolnikov s celiakijo. V prihodnje bi bilo potrebno raziskati vzrok v povprečju višjim rezultatom dihalnega testa pri bolnikih s celiakijo in ugotoviti vzrok kronično prisotne diareje, ki se pojavlja kljub upoštevanju brezglutenske diete.

Smotrno bi bilo izkoristiti prednosti obeh testov tako za diagnosticiranje kot tudi za spremljanje poteka zdravljenja ter izkoristiti številčnost substratov, ki so na voljo za izvajanje dihalnega testa. Optimizacija dihalnega testa ter kombinacija obeh testov tako ponuja korak naprej pri iskanju zanesljivega, enostavnega ter ugodnega testa za določanje eksokrine funkcije trebušne slinavke (pomembno večja občutljivost in specifičnost).

ABSTRACT

Coeliac disease is one of the most common genetically related diseases of digestive organs. The chronic diarrhea is despite the gluten-free diet present in many patients. One of the possible causes is truncated exocrine function of the pancreas, which occurs in approximately one third of patients with confirmed disease.

In the thesis, we performed two tests on patients with coeliac disease with suspected reduced pancreatic exocrine function: test of the determination of elastase in the stool, which is a routine clinical practice, and mixed triglyceride breath test. The breath test is a new testing method, where a patient ingests labeled substrate, which can then be measured in exhaled air. It is still not well established in clinical practice.

The test results of fecal stool elastase between the group of patients with coeliac disease and control group were not significantly different, while the results of the breath test in patients with coeliac disease were significantly higher versus the control group. Correlation between tests was not significant, therefore the methods are not interchangeable.

Results of the investigation were contrary to expectations, as we've expected lower results in both tests. The presence of exocrine pancreatic insufficiency was confirmed in 7,7 % coeliac disease patients. In the future, it would be necessary to investigate the cause on average higher breath test results in patients with coeliac disease and determine the cause of presence of chronic diarrhea, which occurs despite the gluten-free diet.

It would be expedient to take advantage of the tests for both the diagnosis and for monitoring the course of treatment, as well as the advantage of the abundance of substrates, which are available for the implementation of the breath test. Optimization of breath test and combination of both tests provides a step forward in search for a reliable, simple and favorable test for the assessment of exocrine function of the pancreas (significantly higher specificity and sensitivity).

SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbnezotiazolin-6-sulfonska kislina)
AGA	antigliadinska protitelesa
ARA	antiretikulinska protitelesa
CD4+	membranski glikoprotein na celicah pomagalkah (limfocitih T)
CD8+	membranski glikoprotein na citotoksičnih limfocitih T
DQ	vrsta alela, s katerim je zapisan HLA antigen
ELISA	encimskoimunska metoda (ang.: enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	antiendomizijska protitelesa
HLA	humani levkocitni antigen
IFN- γ	interferon gama
IgA, IgG	imunoglobulini A/imunoglobulini G
IL	interlevkin
MHC II	glavni histokompatibilni kompleks
SPINK 1	serinski proteazni inhibitor Kazal tip 1
TCR	T celični receptor
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze
t-TG	tkivna transglutaminaza

1 UVOD

Celiakija je ena najpogostejših gensko pogojenih bolezní. Pogost sopotnik nezdravljenih bolnikov je tudi okrnjena eksokrina funkcija trebušne slinavke. Ocenitev eksokrinega delovanja trebušne slinavke pa je težavna, saj je mesto sekrecije težko dostopno. Na voljo je več metod, ki so sicer zanesljive, a pogosto invazivne, drage ali pacientu neprijetne. (1, 30, 42)

V klinični praksi je eden izmed rutinskih testov za ugotavljanje okrnjene eksokrine pankreatične funkcije test določanja elastaze v blatu. Gre za hiter in relativno enostaven test, kjer lahko pacient sam odvzame vzorec blata, ki se ga nato testira. (42)

Dihalni test mešanih trigliceridov predstavlja preprost postopek ocene eksokrine pankreatične funkcije. Gre za novejšo, v klinični praksi še neuveljavljeno metodo, katere prednost je neinvazivnost, varnost ter enostavna diagnostika. (32, 35)

1.1 TANKO ČREVO

Tanko črevo (*intestinum tenue*) poteka od pilorusa do slepega črevesa in predstavlja približno tri četrtine prebavne poti. Pri odraslem človeku meri v dolžino od šest do sedem metrov, kar omogoča podaljšan stik med hrano in prebavnimi encimi.

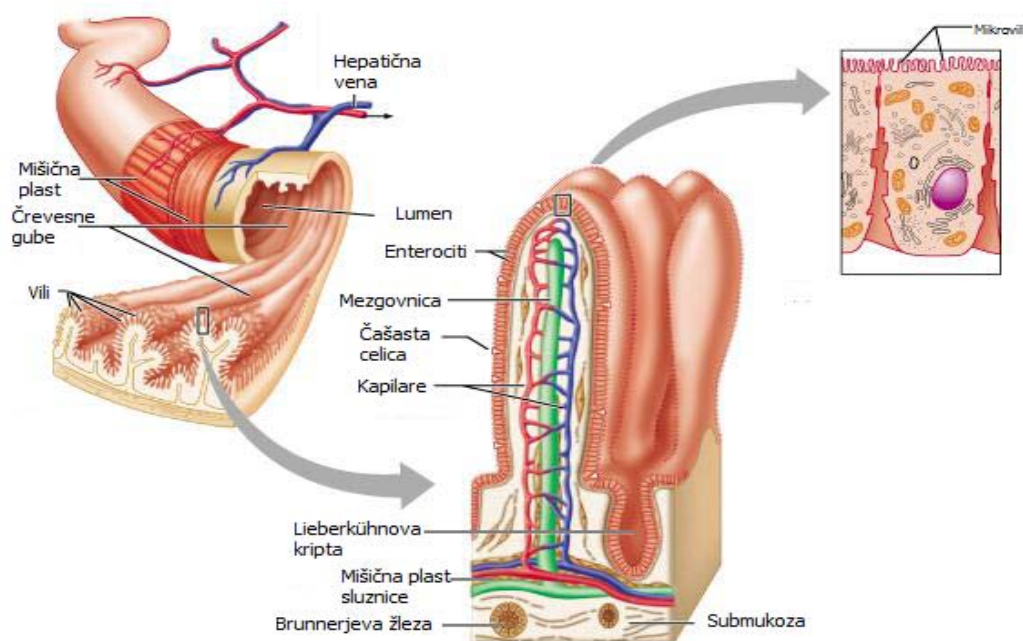
Poglavitna funkcija tankega črevesa je absorpcija hranil. Poleg tega je tanko črevo tudi sekretorni, metabolni, endokrini, živčni in imunski organ.

Sluznica tankega črevesa tvori črevesno bariero in s tem igra pomembno vlogo pri obrambi telesa pred patogenimi bakterijami in antigeni, preprečuje pa tudi translokacijo bakterij iz črevesa. (1, 6, 7)

1.1.1 ZGRADBA TANKEGA ČREVESA

Tanko črevo je sestavljeno iz treh segmentov, ki imajo nekatere skupne histološke značilnosti. Dvanajstnik (*duodenum*) predstavlja prvih 30 cm dolžine tankega črevesa. Zavit je v obliki podkve in objema trebušno slinavko z desne strani, vanj pa vodita dve

veliki žlezni odvodili: skupni žolčevod in odvodilo trebušne slinavke. Tešče črevo (*jejunum*) predstavlja proksimalni del tankega črevesa, v dolžino pa meri približno 2,5 m. Vito črevo (*ileum*) predstavlja zadnji, distalni del tankega črevesa. Konča se v ileo-cekalni zaklopki, v dolžino pa meri 3,5 m. Tako kot v celotni prebavni steni je tudi stena tankega črevesa zgrajena iz sluznice, podsluznice, mišične plasti in seroze. (1, 6, 7)



Slika 1: Tanko črevo (33)

1.2 CELIAKIJA

Celiakija je ena najpogostejših gensko pogojenih kroničnih bolezni. Gre za kronično vnetje tankega črevesa; navadno je prizadet jejunum, redkeje tudi ileum. (1) Je sistemska avtoimunska bolezen in lahko prizadene vse organe. (2)

Pojavlja se pri genetsko dovzetnih ljudeh, človek pa lahko za njo zboli v vseh življenjskih obdobjih. Poglavitni simptom je dolgotrajna diareja. V starosti so v večji meri prisotni tudi izvenčrevesni simptomi, povečana pa je tudi možnost resnejših zapletov. (1)

Vzrok vnetja tankega črevesa je prekomerni imunski odziv v lamini proprijii ozkega črevesa, ki ga sproži uživanje glutena, beljakovine pšenice in sorodnih žit. (1)

Celiakija je ena najpogostejših kroničnih bolezni prebavnega trakta. (1) Prevalenca bolezni pri nas je 1 : 100. (4, 8) Prevalenca bolezni med sorodniki prvega kolena je 8,4 %. (5) Po postavitvi diagnoze je zaenkrat na voljo samo ena učinkovita terapija: brezglutenska prehrana. Brezglutenska dieta mora biti stalna in doživljenjska. (1, 3)

1.2.1 ETIOPATOGENEZA

Dednost

Celiakija je kompleksna bolezen, pri kateri so vključeni okoljski, genetski in imunološki faktorji. Raziskave znotraj družin in med dvojčki so pokazale, da najpomembnejšo vlogo igrajo genetski faktorji – za celiakijo zbolijo namreč 10–20 % ožjih sorodnikov. Pri enojajčnih dvojčkih je možnost, da zbolita oba, 70-odstotna, pri dvojajčnih pa 9-odstotna. (9, 16)

Za razvoj celiakije je potrebna, a ne nujno zadostna, prisotnost alela HLA (humani levkocitni antigen), kodiranega na šestem kromosomu (6p21.3). Prisotnost heterodimera HLA-DQ2 in HLA-DQ8 so dokazali pri skoraj vseh posameznikih, katerim so pravilno diagnosticirali celiakijo. (16) Gre za alela glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHCII). (2)

Molekule HLA razreda II so glikoproteini z regijo, kamor se lahko vežejo antigeni. Vezava antigena na HLA molekulo je sicer močna, a nespecifična. Nahajajo se na površju antigen predstavitvenih celic (makrofagi, limfociti B). Naloga antigen-predstavitvenih celic je predstavitev antigenov T limfocitom, ki te antigene prepoznajo s pomočjo površinskih T-celičnih receptorjev (TCR). Vezava antigena na TCR aktivira T-celice, čemur sledi aktivacija citokinov.

Bolniki, ki ne nosijo nobenega od dveh heterodimerov, so redki in manj predisponirani za nastanek celiakije. (1, 8, 9, 16)

Okrepljen imunski odziv

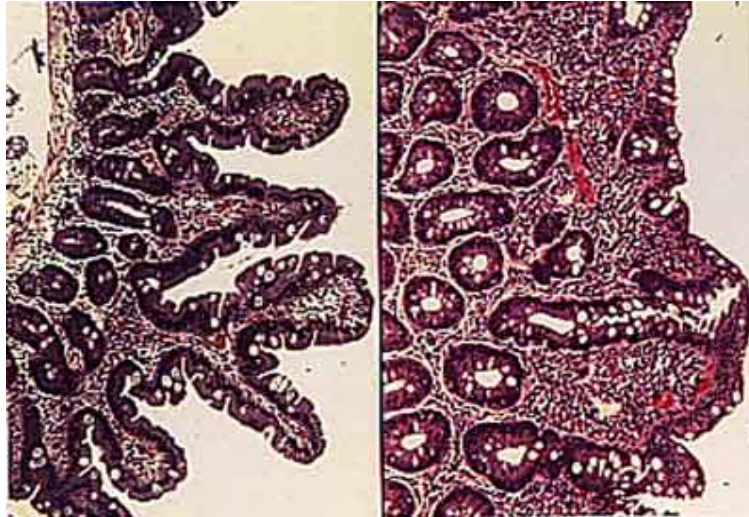
Pri celiakiji sodelujeta tako humoralni kot tudi celični mehanizem imunskega odziva, ki ga povzroči zaužitje glutena. Za to je v največji meri odgovorna alfa frakcija gliadina. (18)

Gluten se v črevesu ne prebavi popolno, saj so peptidi glutena odporni proti encimatski razgradnji, ki so ji podvrženi po vstopu v tanko črevo. (18)

V lamini propriji tankega črevesa pride do deaminacije nepopolno razgrajenih glutenskih ostankov v manjše gliadinske peptide. Vse kaže, da je najpomembnejši 33-merni peptid, ki vsebuje kritične epitope z visoko vsebnostjo glutamina in prolina. Tkivna transglutaminaza 2 (tTG-2) deaminira gliadin do glutaminske kisline, ki je negativno nabita. S tem se poveča afiniteta do vezave na humane levkocitne antigenske receptorje (HLA DQ-2 in HLA DQ-8) na antigen predstavitevni celicih (APC), katerih vezavna mesta so pozitivno nabita. Nastali kompleks (DQ2-peptid oz. DQ8-peptid) aktivira CD4+ T limfocite, ki so prisotni le v lamini propriji tankega črevesa bolnika s celiakijo. Ti limfociti se nato v lamini propriji začnejo pomnoževati. Tako pride do imunskega odgovora in tvorbe vnetnih citokinov (IFN- γ , TNF- α , IL-2). (18)

Mehanizem nastanka protiteles pri humoralnem imunskem odzivu je še neznan. (18) Znano je, da se sproščajo citokini, ki aktivirajo limfocite B, ti pa se nato razrastejo. Ko dozori do plazmatk, začnejo proizvajati IgA in IgG specifična protitelesa proti tkivni transglutaminazi (t-TG), retikulinu (ARA), endomiziju (EMA) in gliadinu (AGA). (1, 11, 17, 18, 19)

Posledica imunskega odziva je značilna sprememba sluznice tankega črevesa, kar pripelje do zmanjšanja oziroma izgube njene funkcionalnosti. Zaradi atrofije črevesnih resic in hipertrofije kript se zmanjša tudi absorpcijska površina sluznice. Manjše število enterocitov pomeni zmanjšano aktivnost različnih encimov. Vse to privede do malabsorbcije pomembnih hranil, v najhujši obliki pa je možna popolna izguba funkcije nagubanega epitelija. (1, 11, 18)



Slika 2: Zdrava in atrofirana sluznica tankega črevesa (34)

1.2.2 KLINIČNA SLIKA

Klinična slika pri celiakiji je zelo raznolika. Pri mnogih odraslih bolnikih je pogosto neznačilna. Nanjo vplivajo starost, obseg sprememb na črevesju in trajanje bolezni. (1)

Poglavitni simptom s strani prebavil je diareja (svetlo, penasto blato), pogosti pa so tudi atipični ali izvenčrevesni simptomi (Tabela I). (1, 2, 20)

Z ozirom na klinično sliko delimo celiakijo na simptomatsko in asimptomatsko.

Znotraj simptomatske oblike bolezni ločimo:

- tipično celiakijo, ki se kaže z značilnimi histološkimi spremembami sluznice tankega črevesa ter prisotnostjo seroloških označevalcev; običajno se razvije pri dojenčkih po tem, ko otrok začne uživati žitarice, in

- atipično celiakijo, kjer so težave s prebavili minimalne, so pa prisotni izvenčrevesni simptomi. (5, 8, 21)

Tabela I: Atipični simptomi celiakije (1, 2, 20)

KOSTNI	zobne anomalije, osteopenija, osteoporoza, rahitis, artritis
HEMATOLOŠKI	sideropenična anemija (malabsorpcija železa), pomanjkanje vitaminov in mineralov (kalcij, vitamin K), trombocitopenija, levkopenija
KOŽNI	dermatitis herpetiformis Duhring, alopecija, aftozni stomatitis
REPRODUKTIVNI	zpoznala puberteta, neredne menstruacije, neplodnost, pogostejši splavi, rojeni otroci z nižjo porodno težo
MIŠIČNI	atrofija mišic, krči
NEVROLOŠKI	epilepsija s perifernimi posteriornimi kalcinacijami, anksioznost, depresija, cerebralna ataksija, miopatija, razvojni zaostanek
MALIGNI	maligni limfom tankega črevesa
OSTALI	okvare jeter (primarna biljarna ciroza, kronični hepatitis), utrujenost, nočna slepota, edemi, sekundarna laktozna intoleranca, krvavitve (hipovitaminoza vitamina K)

Asimptomatska oblika ločuje tiho, latentno, potencialno in refraktno celiakijo. Pogosto se skupaj s celiakijo pojavijo tudi druge avtoimune bolezni. (1, 5, 22)

1.2.3 DIAGNOSTIKA

Celiakijo diagnosticiramo, če nanjo pomislimo. (1) Pri aktivnem iskanju bolnikov s celiakijo uporabljamo sodobna diagnostična merila za celiakijo, ki temeljijo na dokazu reverzibilne okvare sluznice ozkega črevesa, ki nastane kot posledica uživanja glutena. (8, 9)

Ker telo skuša odstraniti vzrok za preobčutljivost na gluten, najdemo v krvi bolnikov s celiakijo več protiteles. (5) Serološki označevalci celiakije so specifična protitelesa, ki jih najdemo v serumu bolnikov s celiakijo. Za dokaz slednjih uporabljamo različne serološke teste. Prednost teh je, da so manj invazivni, visoko občutljivi in specifični. (8, 9) Za diagnosticiranje celiakije dokazujemo antigliadinska protitelesa (AGA) razredov IgG in IgA, antiendomizijska protitelesa (EMA) razreda IgA ter protitelesa proti tkivni transglutaminazi (t-TG) razreda IgA in IgG. (2, 8, 9, 10) Odsotnost protiteles bolezni ne izključuje. (1)

Najenostavnejši so hitri testi za določanje protiteles proti t-TG, katerih podatke so prvič objavili leta 2005. Temeljijo na izkoriščanju tkivne transglutaminaze za odkrivanje

protiteles razreda IgA v kapilarnem vzorcu krvi. (8) Ker so rezultati znani v nekaj minutah, so primerni za presejalne teste v ambulantah družinskih zdravnikov. (2)

Celiakijo potrdimo z duodenalno biopsijo, pri kateri se biopt sluznice iz dvanajstnika histološko pregleda. (1, 2) Pri celiakiji opazimo porast števila intraepitelnih CD8+ T limfocitov nad 40 na 100 epitelnih celic, kriptno hiperplazijo in atrofijo črevesnih resic. (1)

Pri opredelitvi sprememb sluznice tankega črevesa se najpogosteje uporablja klasifikacija po Marshu, ki spremembe sluznice razdeli v štiri stopnje atrofije (Tabela II). (2, 8, 9) Biopsija sluznice ozkega črevesa še vedno velja za zlati standard. (8, 9)

Tabela II: Stopnje atrofije sluznice po Marshu (8, 9)

Tip 0	Normalna sluznica
Tip 1	Infiltrativna faza
Tip 2	Infiltrativno-hiperplastična faza
Tip 3	Ploska destruktivna faza

V zadnjem času se je diagnostika celiakije razširila tudi na genetske preiskave. Te preiskave temeljijo na določanju prisotnosti zapisa za HLA DQ-2 in HLA DQ-8, saj imajo vsi bolniki s celiakijo prisotnega enega od dveh markerjev. Genetski testi imajo visoko negativno napovedno vrednost tj. možnost izključitve bolezni do 100 %, saj so redki tisti bolniki, ki ne nosijo tipičnega zapisa za celiakijo. Markerja sta izredno pomembna za odkrivanje bolezni, a še vedno ne dovolj, da bi napovedala njen razvoj. (9, 10)

Ostali testi, ki so nam v pomoč pri diagnostiki celiakije, so krvne analize, analize blata ter testi črevesne permeabilnosti. (11) Za potrditev diagnoze se smatra tudi dejstvo, da se je pacient odzval na brezglutensko dieto. (1)

1.2.4 ZDRAVLJENJE

Trenutno edina znana metoda zdravljenja celiakije je brezglutenska dieta. Biti mora stalna in doživljenjska. V prehrani so odsvetovani izdelki iz pšenice, rži in ječmena. (1) Kakršnakoli dietna napaka, tudi najmanjša, vnovič izniči uspeh, zlasti če se nenehno ponavlja. (3)

Ob strogem upoštevanju brezglutenske diete se zdravstveno stanje bolnika hitro izboljša – razpoloženje in driska v nekaj dneh, v 6–8 mesecih postanejo serološki testi negativni, po 12 mesecih pa se povsem normalizira tudi sluznica tankega črevesa. Kadar je zraven prisotna sekundarna laktozna intoleranca, se bolniku za nekaj časa odsvetuje uživanje mleka in mlečnih izdelkov. (1, 3)

Cilj zdravljenja je obnova in normalizacija črevesne sluznice ter preprečevanje ostalih možnih zapletov bolezni. (1, 2)

1.3 TREBUŠNA SLINAVKA

Trebušna slinavka je tako endokrini kot eksokrini prebavna žleza, ki poleg jeter sodeluje pri prebavi hrane in pri celični presnovi. (1, 6)

Endokrini del pankreasa

Langerhansovi otočki predstavljajo endokrini del žleze. Sestavljeni so iz šestih tipov celic, vsak tip celice pa opravlja specifično nalogo (Tabela III). (7)

Tabela III: Celice Langerhansovih otočkov in njihove naloge (7)

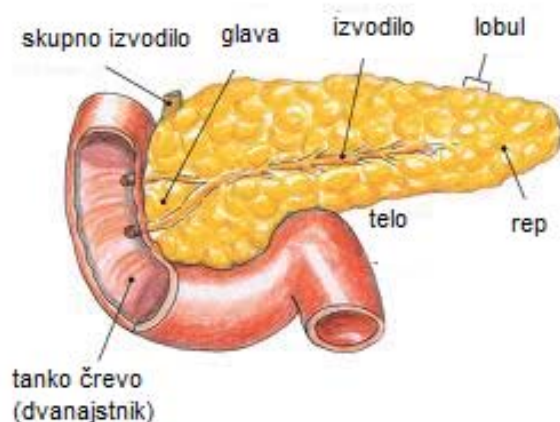
Celice B ali beta (70 %)	secernacija insulina in amilina
Celica A ali alfa (20 %)	izločanje glukagona
Celice D ali delta ali tipa III (5–10 %)	izločanje somatostatina, naključno porazdeljene po pankreasnih otočkih
Celice PP ali F (1–2 %)	izločanje pankreatičnega polipeptida
Celice DI ali tipa IV, minorna skupina celic	izločanje vazoaktivnega-intestinalnega peptida (VIP)
Celice EC ali enterokromafine celice, minorna skupina celic	izločanje serotonina, motilina, substance P

Eksokrini del pankreasa

Eksokrini del organa je albuminozna žleza, zgrajena iz žleznih mešičkov (acinusov), ki obsega 85 % žleze. Acinus, osnovno morfološko gradbeno enoto, sestavljata dva funkcionalna tipa celic – acinarne in duktularne celice. Več acinusov skupaj tvori lobus. Med njimi leži vezivno tkivo s številnimi kapilarami in živčnimi končiči ter Langerhansovi otočki. Glavna naloga eksokrine funkcije trebušne slinavke je nevtralizacija kislega želodčnega soka in prebava hrane v dvanajstniku. (1, 7)

Acinarne celice izločajo prebavne encime v raztopini in vsebujejo zimogena zrnca, kjer so uskladiščeni neaktivni proencimi (Tabela IV). (1, 7) Odgovorne so za sintezo triptinskega inhibitorja (SPINK 1), na bazalni membrani pa najdemo receptorje za različne transitorije (endokrine, parakrine in živčne). (1)

Duktularne celice izločajo z bikarbonatom bogato raztopino, ki nevtralizira kisel želodčni sok. (1, 7)



Slika 3: Zgradba trebušne slinavke (12)

Trebušna slinavka dnevno izloči v dvanajstnik od 1,5 do 3 litre soka, ki je bogat z encimi. V aktivirani obliki najdemo lipazo in amilazo, ostali encimi pa so neaktivni. Aktivirajo se šele v dvanajstniku. (1)

Tabela IV: Pankreatični encimi in proencimi (1)

Proteolitični encimi	tripsinogen, himotripsinogen, proelastaza, prokarboksipeptidaza A in B
Lipolitični encimi	lipaza, prokarboksilna esteraza, profosfolipaza A2
Amiolitični encimi	alfa-amilaza
Nukleaze	ribonukleaza, dezoksiribonukleaza
Drugi	prokolipaza, tripsinski inhibitor (SPINK 1)

Pankreatični sok se izliva v glavni pankreatični vod, ki se skupaj s skupnim žolčnim vodom in skozi papilo Vateri odpira v duodenum. (1, 7)

1.4 PANKREATIČNA EKSOKRINA INSUFICIENCA PRI BOLNIKI S CELIAKIJO

Okrnjena eksokrina pankreatična funkcija je pogost sopotnik bolnikov s celiakijo. (23, 30)
O tem je prvič poročal že Dreiling leta 1957, čigar opazovanja so nato potrdili tudi ostali raziskovalci z uporabo direktnih ali indirektnih testov za določanje pankreatične eksokrine funkcije. (15)

Ocenjujejo, da okrnjena pankreatična funkcija spremlja 15–40 % bolnikov z nezdravljeno boleznijo. Kadar je prisotna v težji obliki, je potrebna terapija s pankreatičnimi encimi. Običajno gre za prehodno in reverzibilno stanje, ki se z uvedbo brezglutenske diete povrne v normalno delovanje trebušne slinavke. (23, 30)

Nizka vrednost pankreatične elastaze 1 je bolj pogosta pri bolnikih s celiakijo, pri katerih je prisotna tudi kronična diareja. Patofiziološki mehanizem pankreatične insuficience je pri teh bolnikih večfaktorski. (15, 16)

Vzroki za okrnjeno eksokrino pankreatično funkcijo so trije:

1. zmanjšana ekskrecija sekretina in holecistokinina – hormonov, ki stimulirata trebušno slinavko zaradi sprememb v črevesnih endokrinih celicah, ki hormona izločajo,

2. zmanjšanja sinteza prekursorjev pankreatičnih encimov kot posledica nezadostne absorpcije aminokislin,
3. spremembe v strukturi trebušne slinavke (atrofija acinarnih celic, pankreatična fibroza) zaradi zmanjšane absorpcije proteinov. (23)

Preden sklepamo, da gre le za zmanjšano eksokrino delovanje trebušne slinavke, je potrebno izključiti še druge vzroke ali zaplete bolezni. (28)

1.5 OCENA DELOVANJA TREBUŠNE SLINAVKE

Ocena eksokrinega delovanja trebušne slinavke je težavna, saj sta tako trebušna slinavka kot mesto sekrecije težko dostopna. Poznamo direktne in indirektne teste, ki nam to omogočajo, pri tem pa je pomembno, da ločimo, kdaj je vzrok maldigestije okvara trebušne slinavke in kdaj se vzrok nahaja drugje.

Direktni testi temeljijo na kvantifikaciji volumna stimulirane pankreatične sekrecije (encimov, bikarbonata). Kljub visoki občutljivosti in specifičnosti je njihova uporaba v klinični praksi omejena, saj gre za invazivne (potrebna je duodenalna intubacija), časovno potratne in drage teste. (25, 26, 27)

Pri indirektnih testih ocenjujemo eksokrino funkcijo trebušne slinavke na podlagi njenih prebavnih zmožnosti ali pa s pomočjo kvantifikacije pankreatičnih encimov v blatu. Razdelimo jih lahko torej na oralne teste in teste blata. Za zlati standard velja test kvantifikacije maščob v blatu, v klinični praksi pa se uporabljata še test aktivnosti kimotripsina v blatu in test elastaze v blatu. (25)

Pri oralnem testu testiranec zaužije predpisan obrok, ki vsebuje označen substrat. V dvanajstniku pride do hidrolize substrata, ki se nato absorbira. Določimo ga lahko v serumu, urinu ali izdihanem zraku. (25)

Prednost indirektnih testov je njihova enostavna in neinvazivna aplikacija, vendar pa so v primerjavi z direktnimi testi manj občutljivi in manj specifični. (25, 27)

1.5.1. TEST PANKREATIČNE ELASTAZE V BLATU

Pankreatična elastaza 1 ali pankreatopeptidaza EC 3.4.21.36 je specifična endoproteaza, ki jo sintetizirajo acinarne celice trebušne slinavke. Gre za proteazo, ki sodi v skupino serinskih proteaz, skupaj z nekaterimi ostalimi prebavnimi encimi (kimotripsin, tripsin). Njena edinstvena sposobnost je kataliza razgradnje elastina. Sestavljena je iz 240 aminokislin, z molekularno težo okoli 26 kDa in specifično afiniteto do karboksilnih skupin alanina, valina in levcina. Med potovanjem skozi črevo je stabilna ter večinoma vezana na soli žolčnih kislin. Njene koncentracije v blatu so pet do šestkrat višje v primerjavi s tistimi v pankreatičnem soku. (36)

Zaradi dobre korelacije z eksokrino pankreatično funkcijo je določanje pankreatične elastaze v blatu pomemben in dober indikator ocene pankreatične funkcije. Za izvedbo testa zadostuje en vzorec blata. Odvzem vzorca je hiter, neboleč ter enostaven, sam test pa je relativno poceni. Poleg tega vzorec lahko shranimo do nekaj dni, saj pravilno hranjen le malo izgubi na imunoaktivnosti. Omejitve metode predstavljajo vzorci s tekočim blatom, kjer lahko pride do napak pri analizi vsebnosti encima zaradi razredčitve vzorca, vendar pa se temu lahko izognemo z liofilizacijo ali centrifugacijo vzorca pred njegovo analizo. (42)

Občutljivost in specifičnost testa za določanje pankreatične elastaze-1 v blatu za diagnosticiranje eksokrine pankreatične insuficience sta večji od 90 %. (41) Test določanja elastaze-1 v blatu kaže večjo specifičnost in občutljivost za dokazovanje eksokrine pankreatične insuficience v primerjavi s testom določanja kimotripsina v blatu, poleg tega pa je primerljiv tudi z oralnimi testi za določanje pankreatične funkcije. (36)

Pri diagnosticiranju blage eksokrine pankreatične insuficience je test manj občutljiv in specifičen v primerjavi z direktnimi testi določanja pankreatične funkcije, zato lahko pričakujemo lažjen negativen rezultat testa. (42)

Ker preizkus predstavlja količino izločene pankreatične elastaze, pa testa ni mogoče uporabiti za določitev izboljšanja absorpcije maščob po uvedbi peroralnih encimskih nadomestkov, kot je to mogoče pri drugih testih, npr. pri dihalnemu testu mešanih trigliceridov. (42)

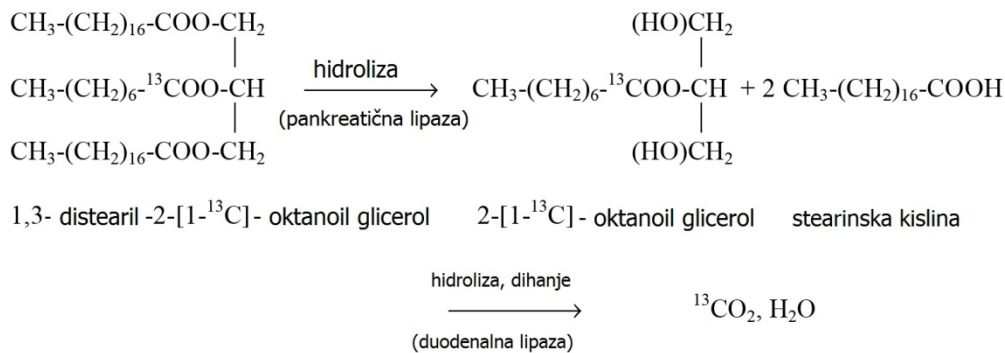
1.6 DIHALNI TESTI

Dihalni testi predstavljajo neinvazivno diagnostično metodo, s katero lahko *in vivo* ocenimo aktivnost encimov, funkcijo organov in transportne procese. V uporabi so vodikovi dihalni testi in pa ^{13}C -dihalni testi, pri katerih ogljikov izotop služi kot indikator, ki ni radioaktiven. Zaradi tega je test varen in primeren tudi za uporabo pri otrocih in nosečnicah. (26)

^{13}C - dihalni testi izkoriščajo lastnosti ogljikovega izotopa 13, ki predstavlja 1,11 % vseh ogljikovih atomov v naravi. Gre za stabilen izotop, ki se ga uporablja za izdelavo substratov, ki so po zaužitju podvrženi različnim metabolnim potem. Opazujemo lahko encimsko aktivnost, transport snovi, absorpcijo, oksidativne procese. Način testiranja torej določa izbiro substrata. (26, 31)

1.6.1 DIHALNI TESTI ZA MERJENJE EKSOKRINE FUNKCIJE TREBUŠNE SLINAVKE

Za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke je na voljo več substratov, označenih z izotopom ^{13}C , ki jih hidrolizira lipaza – mešani trigliceridi, ^{13}C -oktanoat, ^{13}C -triolein, ^{13}C -holein. Izkazalo se je, da je za oceno presnove maščobe najprimernejši substrat z mešanimi trigliceridi. Tako je ^{13}C -dihalni test mešanih trigliceridov do sedaj najbolj optimiziran in služi kot alternativna metoda testu kvantifikacije maščob v blatu. (25, 26)



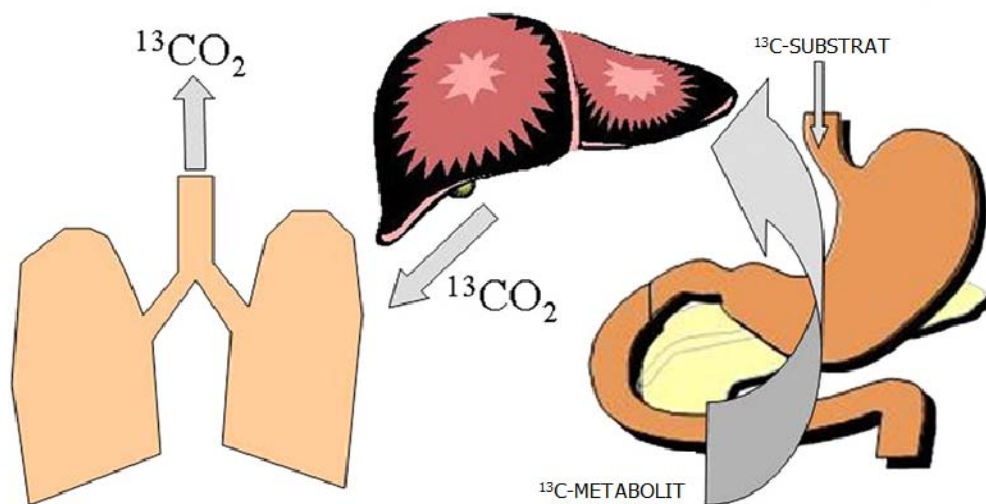
Slika 4: Metabolizem označenega substrata (32)

Dihalni test mešanih trigliceridov se uporablja za oceno stopnje digestije lipidov. Že leta 1981 ga je opisal Ghoose s sodelavci in z njim izmeril aktivnost lipaze v dvanajstniku, posledično pa tudi eksokrino funkcijo trebušne slinavke. (24)

Pri testu pacient zaužije označen substrat, katerega metaboliti se po razgradnji absorbirajo v kri, nato pa izločijo v izdihanem zraku kot CO_2 oziroma kot $^{13}\text{CO}_2$. Razmerje CO_2 in $^{13}\text{CO}_2$ izmerimo pred zaužitvijo substrata (bazalna meritve) in po zaužitju substrata. Rezultate testa interpretiramo na podlagi porasta $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku napram količini $^{13}\text{CO}_2$ bazalne meritve. (26, 31)

Substrat pri dihalnem testu mešanih trigliceridov predstavlja 1,3-distearil, 2-[karboksi- ^{13}C]oktanoil glicerol v obliki praška. Z izotopom je v trigliceridu označena maščobna kislina na mestu 2. Testiranec ga zaužije skupaj z obrokom, ki vsebuje predpisano količino lipidov (navadno 20–30g). Pri tem je pomembno, da je količina lipidov natančno določena, saj močno vpliva na končne rezultate testa. (25, 26, 32)

V tankem črevesu trigliceridi hidrolizirajo do glicerola in prostih maščobnih kislin, sproščeni označeni metaboliti pa so po absorpciji podvrženi še jetrnemu metabolizmu. Posledica tega je nastanek $^{13}\text{CO}_2$, ki ga detektiramo v izdihanem zraku.



Slika 5: Potek dihalnega testa pri oceni pankreatične eksokrine funkcije (25)

Količino izdihanega $^{13}\text{CO}_2$ izmerimo s pomočjo masne spektrometrije, ta pa nam indirektno pokaže eksokrino delovanje trebušne slinavke. (25, 26)

Dihalni test mešanih trigliceridov je preprost, neinvaziven in natančen (specifičnost in občutljivost nad 90 %). Prav zaradi tega ga lahko uporabimo večkrat, saj je primeren tudi za kontrolo pacientov, ki so zaradi zmanjšane eksokrine funkcije trebušne slinavke prejeli oralno nadomestilo pankreatičnih encimov. (25, 26)

Omejitvi uporabe testa v klinični praksi sta visoka cena substrata in čas izvajanja testa (6–8 ur). (26)

2 NAMEN DELA

Namen raziskave je opredelitev kliničnega pomena dihalnega testa mešanih trigliceridov za določanje pankreatične eksokrine insuficience v primerjavi s testom določanja elastaze v blatu. Test določanja pankreatične elastaze v blatu je rutinski test, ki ga na klinikah uporabljajo za določanje eksokrine pankreatične insuficience. Gre za enostaven in hiter test, pri katerem analiziramo vzorec blata.

Dihalni testi so novejša metoda za ugotavljanje okrnjene eksokrine pankreatične funkcije. Prednosti dihalnega testa so predvsem njegova preprosta in pacientu prijazna izvedba ter neinvazivnost. Prav zaradi tega je prišlo do predloga, da bi se dihalni test lahko uveljavil kot rutinski test v klinični praksi.

V diplomski nalogi se bomo osredotočili na bolnike s celiakijo, sama raziskava pa zajema še druge bolnike (akutni pankreatitis, kronični pankreatitis, gastrektemija, diabetes), predvsem pa večje skupine bolnikov znotraj vsake posamezne skupine preiskovancev.

Cilj diplomske naloge je ovrednotiti eksokrino pankreatično funkcijo pri bolnikih s celiakijo s pomočjo dihalnega testa in s testom pankreatične elastaze v blatu ter primerjati njuno uporabnost oziramo morebitno zamenljivost.

V nalogi bomo:

- določili vsebnost pankreatične elastaze v blatu pri skupini zdravih ljudi in skupini bolnikov s celiakijo,
- določili delež izdihanega ^{13}C pri skupini zdravih in skupini bolnikov s celiakijo,
- ovrednotili rezultate ter ugotavljali, ali se dobljene vrednosti testov bolnikov s celiakijo značilno razlikujejo napram kontrolni skupini,
- ugotavljali morebitno korelacijo med testoma .

Rezultate meritev bomo statistično ovrednotili in tako skušali ugotoviti, ali bi dihalni test lahko uvedli v klinično prakso za določanje spremenjene eksokrine funkcije trebušne

slinavke. Rezultati vrednotenja bodo pokazali pomen obeh testov v klinični praksi, opredelili pa bodo tudi možnost dihalnega testa kot zamenljive metode za test pankreatične elastaze v blatu.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV

V skupino smo zajeli dve skupini ljudi. V prvi skupini so bili zdravi prostovoljci (24 oseb), drugo skupino pa so sestavljali bolniki s celiakijo (13 oseb) s še vedno prisotnim meteorizmom, nekateri pa tudi s kronično prisotno diarejo, in posledično s sumom na zgodnjo okrnjeno eksokrino pankreatično funkcijo. Bolniki s celiakijo so se zdravili v Ljubljani na Gastroenterološki kliniki. Udeležence smo poklicali po telefonu, jim na kratko obrazložili potek preiskave in jih povabili k sodelovanju. Vsi so sodelovali prostovoljno ter pisno privolili v izvedbo testa ter uporabo podatkov za namen raziskave.

V raziskavi je sodelovalo 30 žensk in 7 moških. V skupini zdravih je bilo 18 žensk in 6 moških, v skupini s celiakijo pa 12 žensk ter 1 moški. Povprečna starost vseh preiskovancev je bila 42,1 leta. V skupini zdravih je bila povprečna starost 44,9 leta, najmlajši preiskovanec je imel 22 let, najstarejši pa 66 let. V skupini s celiakijo je bila povprečna starost 39,3 leta, najmlajši preiskovanec je imel 18 let, najstarejši pa 76 let.

3.2 OPIS ZBIRANJA VZORCEV

Pacienti in zdravi prostovoljci so na kliniko prišli zjutraj in pred pričetkom testa izpolnili anketo ter oddali kri, kjer so jim z biokemijsko preiskavo preverili krvno sliko. Po oddaji krvi so testiranci prejeli lonček za oddajo urina in lonček za blato. V blatu smo določali vsebnost pankreatične elastaze, ki služi kot parameter za ugotavljanje eksokrine funkcije trebušne slinavke.

Preiskovanci so morali biti pred pričetkom izvedbe testa tešči vsaj 12 ur. Vsak je prejel 11 epruvet, v katere je nato preko slamice vsake pol ure pihnil toliko zraka, da se je epruveta orosila. Epruveto smo takoj po vpihu zamašili. Do konca izvedbe testa so lahko pili izključno navadno, negazirano vodo, saj lahko vsa ostala morebitno zaužita hrana in pijača,

ki vsebuje raztopljen CO₂, vodita do napačne interpretacije rezultatov zaradi sprememb v količini izdihanega ogljikovega dioksida. Med samo izvedbo testa so preiskovanci morali mirovati in niso smeli kaditi. Tako smo se izognili hiperventilaciji, ki bi tudi lahko vodila do napačne interpretacije rezultatov. Da bi dobili čim bolj točne in zanesljive rezultate, je bilo potrebno upoštevati vsa dana navodila. Prvi vzorec smo vzeli pred zaužitjem testnega obroka. Ta služi za določitev bazne linije, ki predstavlja naravno prisoten ¹³CO₂ v izdihanem zraku, vsebnost katerega se od posameznika do posameznika razlikuje. Po odvzemu prvega vzorca so testiranci prejeli testni obrok, ki je vseboval 100 g kruha, 15 g masla ter 10 g čokoladnega namaza (Viki krema), kamor smo vmešali 200 mg substrata (v našem primeru 1,3-distearil-2-(karboksi-¹³C) oktanoil glicerol v obliki praška). Nato je sledil odzem ostalih vzorcev ob času 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 in 300 min po zaužitju. Test je bil zaključen po vpihu v zadnjo epruveto. (37)

3.3 ANALIZA VZORCEV TER IZRAČUN PARAMETROV

3.3.1 ANALIZA SESTAVE VZORCEV IZDIHANEGA ZRAKA IN IZRAČUN PARAMETROV PRI DIHALNEM TESTU

Sestavo vzorcev izdihanega zraka smo merili s pomočjo masnega spektrometra za analizo stabilnih izotopov (IRMS), ki velja za najstarejšo in najbolj pogosto metodo za analizo stabilnih izotopov. (39) Uporabili smo masni spektrometer Analytical precision, ki deluje po principu kontinuiranega pretoka in omogoča sklopitev plinskega kromatografa z masnim spektrometrom. Pred analizo vzorca se v plinskem kromatografu CO₂ loči od ostalih komponent vzorca. Tako v masni spektrometer skozi injektor prehaja izoliran CO₂, skupaj z nosilnim plinom (helijem). Celoten proces poteka avtomatizirano. Na enak način smo opravili tudi analizo standardnega CO₂. (38)

Princip delovanja je sledeč: sprva poteče ionizacija vzorca, pri čemer se ustvari žarek ionov, ki potujejo skozi elektromagnet. Tu poteče ločitev ionov glede na njihovo razmerje med maso in nabojem. Ionski žarek se tako loči na posamezne ione, te pa ločeno zaznajo posamezni detektorji. Na tak način smo dobili podatke o relativni zastopanosti ionov z različnim razmerjem med maso in nabojem v vzorcu. (38)

Rezultate dihalnega testa podamo kot odstotek kumulativno izločenega ^{13}C v merjenem času (odstotki izdihanega ^{13}C). (39)

Izotopsko sestavo izdihanega CO_2 podamo z vrednostjo delta (δ), ki predstavlja relativno izotopsko sestavo preiskovanega vzorca glede na izbrani standard (*Enačba 1*). Izražena je v promilih. (39)

[Enačba 1]

$$\delta = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000$$

R_{vz} – razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v vzorcu

R_{st} – razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v standardu

Standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine, ki so izbrane tako, da so izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi. Delta vrednost vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Za ogljikov standard je bil privzet karbonatni standard fosila *Belemnitelle americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$. Vrednost R, ki podaja razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), je vedno podana kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu. V primeru, ko je delta vrednost pozitivna, je izotopsko razmerje R v vzorcu višje od razmerja v standardu, kar pomeni več težjega izotopa. Kadar vzorec vsebuje manj težjega izotopa, je vrednost delta negativna. (39)

Povečanje razmerja R po zaužitju testnega obroka kaže na prisotnost aktivnega encima. V nasprotnem primeru ostane vrednost delta nespremenjena v primerjavi z bazalno meritvijo (pred zaužitjem testnega obroka). (39)

Delež $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku izračunamo za vsak vzorec ob vseh časih meritve (*Enačba 2*). (39)

[Enačba 2]

$$\%^{13}C_{t_x} = \frac{\frac{\delta^{13}C_{t_x} + 1}{1000}}{\frac{1}{0,0112372} + \frac{\delta^{13}C_{t_x} + 1}{1000}} \cdot 100$$

Pred zaužitjem testnega obroka izvedemo bazalno meritve, ki nam da podatek o običajni količini ^{13}C , vnesenega v telo z zaužito hrano. Rezultate bazalne meritve upoštevamo pri izračunu deleža ^{13}C v vzorcu tako, da vrednost bazalne meritve odštejemo od vsake izračunane vrednosti $\%^{13}C$ ob času t . (Enačba 3) Tako izvzamemo vpliv $^{13}CO_2$, izdihanega v bazalnih pogojih. (39)

[Enačba 3]

$$\%^{13}C_{t_x} = \%^{13}C_{t_x} - \%^{13}C_{t_0}$$

Razmerje $^{13}C/^{12}C$ se pred in po zaužitju testnega obroka spremeni, če je prisoten aktiven encim.

Glede na zaužito količino substrata in čas izračunamo hitrost razgradnje označenega substrata:

[Enačba 4]

$$\%^{13}C/h = \frac{\frac{\%^{13}C_{t_x}}{100} \cdot V_{CO_2}}{\frac{\%^{13}C_{sub} - \%^{13}C_{t_0}}{100} \cdot \frac{m_{sub}}{M_{sub}}} \cdot 100\%$$

$^{13}C_{sub}$ – delež ^{13}C v označenem substratu

V_{CO_2} – volumen izdihanega ogljikovega dioksida v $mmol/h/m^2$

m_{sub} – masa označenega substrata v g

M_{sub} – molska masa označenega substrata v g/mol

Množino izdihanega ogljikovega dioksida v eni uri izračunamo po enačbi 5. Pri tem upoštevamo tudi telesno površino, ki jo izračunamo po enačbi 6. Telesno površino (BSA) izračunamo iz podatkov o telesni masi v kilogramih (kg) in telesni višini v centimetrih (cm). (39)

[Enačba 5]

$$V_{CO_2} = BSA(m^2) \cdot 5 \text{ mmol} / \text{min} / m^2 \cdot 60 \text{ min} / h$$

[Enačba 6]

$$BSA(m^2) = \sqrt{\frac{m(\text{kg}) \cdot h(\text{cm})}{3600}}$$

Kumulativno količino izločenega ^{13}C izračunamo po enačbi 7. Definirana je kot celotna količina izotopa ^{13}C , ki se izloči v izdihanem zraku ob določenem času glede na količino s substratom vnesenega ^{13}C . Kumulativna količina izločenega ^{13}C nikoli ne doseže 100 %, saj se ga nekaj zadržuje v telesu v obliki bikarbonata, določena količina pa se ga vključi v druge metabolne cikle. (39)

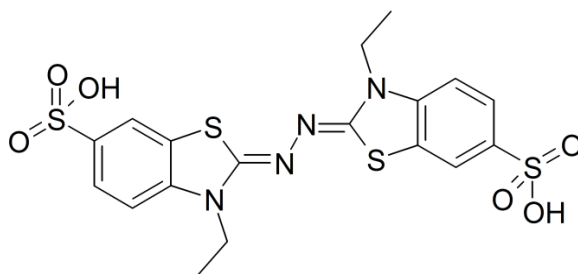
[Enačba 7]

$$\text{kumulativni } ^{13}\text{C} [\%] = \sum_i \frac{\%^{13}\text{C} / h (t_i) + \%^{13}\text{C} / h (t_{i-1})}{2} \cdot \frac{(t_i - t_{i-1})}{60}$$

3.3.2 DOLOČANJE ELASTAZE V BLATU

Za določanje pankreatične elastaze v blatu odda preiskovanec en vzorec blata po spontanem iztrebljanju v posodici za blato. Z žličko, ki je nameščena v pokrovu posodice zajame blato iz globine iztrebka. Zadostuje količina vzorca, velika za lešnik. Nekaj dni pred odvzemom vzorca blata preiskovanec ne sme uživati odvajal ali sredstev proti driski. (43)

Določanje pankreatične elastaze v blatu smo izvedli z imunokemijsko metodo ELISA z dvojnimi monoklonalnimi protitelesi proti različnim epitopom človeške pankreatične elastaze. Reakcija poteče na mikrotitrski plošči, na katero so vezana protitelesa proti humani elastazi E1. Na omenjena protitelesa se veže pankreatična elastaza iz vzorca in standardov. Med inkubacijo se kompleks monoklalnega protitelesa proti pankreatični elastazi, označen z biotinom, veže na imobiliziran encim iz vzorca in standardov. Hkrati poteka tudi vezava s streptavidinom označene peroksidaze. Peroksidaza oksidira ABTS, substrat, ki ga kot naslednjega dodamo. Nastane zeleno obarvan produkt. Intenziteta nastale zelene barve je sorazmerna s koncentracijo elastaze v vzorcu blata. (41)



Slika 6: ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)

Pri določanju pankreatične elastaze v blatu smo uporabili naslednje reagente:

- mikrotitrski ploščica z vezanimi protitelesi proti humani elastazi E1,
- ekstrakcijski pufer (fosfatni pufer, NaCl, detergent, pH 7,2),
- pufer za spiranje (washing),

- monoklonska protitelesa, označena z biotinom, proti pankreatični elastazi in s streptavidinom označena peroksidaza,
- raztopina substrata (ABTS),
- alkalna raztopina STOP reagenta,
- raztopine standardov (15, 50, 150 in 500 $\mu\text{g/g}$ pankreatične elastaze),
- kontrolna raztopina.

Uporabljen material:

- plastične epruvete za ekstrakcijo vzorca (Roche),
- plastične epruvete za razredčitev vzorca,
- pipete,
- 500-mililitrska bučka za pripravo pufrov.

Meritve smo opravili s pomočjo spektrofotometra SLT-Spectra Labinstruments s filtrom 405 nm.

Priprava vzorca poteka tako, da s pomočjo plastične paličice, ki je priložena plastični epruveti za ekstrakcijo, zajamemo vzorec, ga nanese na vdolbino spodnjega pokrovčka epruvete ter zravnamo površino. Vdolbina vsebuje približno 100 mg vzorca. Skozi zgornjo odprtino dodamo 10 ml ekstrakcijskega puфра, tj. do oznake. Nato epruveto zapremo. Vzorce večkrat močno premešamo na mešalcu ter po najmanj petih minutah usedanja odvzamemo alikvot in pričnemno redčenje. Redčitev v razmerju 1 : 250 izvedemo tako, da 10 μl ekstrakta dodamo 2,5 ml spiralnega puфра. (41)

V vdolbinice plošče pipetiramo 50 μl slepe raztopine (puфра za spiranje), standardov, kontrole in vzorcev ter pri sobni temperaturi inkubiramo 30 minut. Nato vsebino vdolbinic zavržemo, vsako vdolbinico pa speremo 3x s po 250 μl puфра za spiranje. Nato v vsako vdolbinico pipetiramo 50 μl z biotinom označenih protiteles proti pankreatični elastazi in s streptavidinom označene peroksidaze. Sledi 15 minut inkubacije pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo. Vsebino vdolbinic ponovno zavržemo ter vsako vdolbinico speremo 3x s po 250 μl puфра za spiranje. Nato pipetiramo 100 μl substrata v vsako vdolbinico, čemur sledi 15 minut inkubacije pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo

ob stresanju. Nato v vsako vdolbinico pipetiramo 100 μ l raztopine STOP reagenta in previdno stresamo. V okviru časa 5–30 minut izmerimo absorbanco nastale zelene obarvane raztopine pri valovni dolžini 450 nm. Močnejša zelena barva pomeni višjo koncentracijo pankreatične elastaze v vzorcu. Rezultate podamo v μ g pankreatične elastaze na g blata, kot normalna pa je določena vrednost pankreatične elastaze nad 200 μ g elastaze /g blata. Meja detekcije znaša 15 μ g/g, ponovljivost v seriji 5,8 % (n=20), med serijami (10 zaporednih dni) pa 7,6 %. (41)

3.3.3 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

Statistično vrednotenje rezultatov bomo opravili s pomočjo programa IBM SPSS statistics 20. V statistično analizo bomo vključili podatke o izmerjenih vrednosti pankreatične elastaze v blatu ter rezultate dihalnih testov, izražene v odstotkih kumulativno izločenega ^{13}C v izdihanem zraku šest ur po zaužitju testnega obroka.

Na začetku statistične analize bomo izvedli osnovno statistično analizo in ugotavljali normalnost porazdelitve rezultatov. Glede na rezultat testa normalnosti porazdelitve se bomo odločili za nadaljnje korake statističnega vrednotenja.

V primeru normalne porazdelitve rezultatov bomo uporabili t-test dveh neodvisnih spremenljivk, skupaj z njim pa izvedli tudi F-test homogenosti varianc, ki je eden od pogojev za izvedbo t-testa dveh neodvisnih vzorcev.

V primeru, da se dobljeni rezultati ne porazdeljujejo normalno, bomo uporabili alternativni parametrični test, tj. Mann-Whitneyjev U test. Ker le-ta predpostavlja tudi homogenost varianc bomo v tem primeru izvedli tudi Levenov test.

Morebitno korelacijo med rezultati dihalnega testa in testa elastaze v blatu bomo določili s pomočjo Pearsonovega koeficienta.

Na koncu bomo izračunali občutljivost in specifičnost obeh testov.

4 REZULTATI

4.1 MERITVE IN IZRAČUNI

V spodnji tabeli so predstavljeni rezultati dihalnega testa ter testa pankreatične elastaze v blatu. Rezultati dihalnega testa so podani kot sprememba razmerja med $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, ki se spremeni po tem, ko bolnik zaužije substrat označen s ^{13}C . Mejna vrednost dihalnega testa znaša 22 % (vrednosti pod 22 % kažejo na zmanjšano aktivnost lipaze). (35) Referenčne vrednosti pankreatične elastaze v blatu so nad 200 $\mu\text{g/g}$ blata, kar pomeni, da so patološke vrednosti do 200 $\mu\text{g/g}$ blata. Če znaša rezultat testa 200 $\mu\text{g/g}$ blata, test ponovimo (Tabela V, Tabela VI).

Tabela V: Rezultati meritev- kontrolna skupina

Št. vzorca	Dihalni test (%)	Elastaza v blatu ($\mu\text{g/g}$)
1(K)	44,2	519
2 (K)	41	497
3 (K)	42,5	605
4 (K)	19	566
5 (K)	38	498
6 (K)	69	610
7 (K)	55	406
8 (K)	17,5	315
9 (K)	31,5	235
10 (K)	27,3	500
11 (K)	50,6	557
12 (K)	56	438
13 (K)	47,9	575
14 (K)	56,6	499
15 (K)	33,6	360
16 (K)	33,3	512
17 (K)	68	415
18 (K)	67	445
19 (K)	38	363
20 (K)	24	408
21 (K)	35,17	619
22 (K)	23	490

23 (K)	38,8	475
24 (K)	40,7	472

Povprečne vrednosti meritev pri zdravih preiskovancih:

- dihalni test: 47,57 %
- elastaza v blatu: 474,13 µg/g blata

V kontrolni skupini imata vrednost dihalnega testa pod referenčno mejo 22 % dva bolnika, kar predstavlja 8,3 %.

Tabela VI: Rezultati meritev - skupina s celiakijo

Št. vzorca	Dihalni test (%)	Elastaza v blatu (µg/g)
1 (C)	50,6	439
2(C)	42	541
3(C)	63,2	547
4(C)	12,3	349
5(C)	69,9	470
6(C)	88,3	468
7(C)	53,3	440
8(C)	70,3	504
9(C)	47,5	530
10(C)	52	392
11(C)	48,4	523
12(C)	31,3	408
13(C)	58	670

Povprečne vrednosti pri bolnikih s celiakijo:

- dihalni test: 52,85 %
- elastaza v blatu: 483,15 µg/g blata

V skupini s celiakijo ima vrednost dihalnega testa pod referenčno mejo 22 % en bolnik, kar predstavlja 7,7 %.

4.2 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Iz dobljenih podatkov smo najprej na podlagi intervala zaupanja izračunali delež testirancev v obeh skupinah, kjer pride do odstopanja od referenčnih vrednosti. Rezultati so prikazani v Tabeli VII.

Tabela VII: Prikaz odstopanja parametrov

DIHALNI TEST	Znotraj ref. vr.	Izven ref. vr.
kontrolna skupina	7 (29,2 %)	17 (70,8 %)
celiakija	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)
ELASTAZA V BLATU	Znotraj ref. vr.	Izven ref. vr.
kontrolna skupina	10 (41,7 %)	14 (58,3 %)
celiakija	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)

V skupini zdravih je imelo odstotek izdihanega ^{13}C znotraj intervala zaupanja 29,2 % oziroma 7 preiskovancev, izven vrednosti intervala zaupanja pa 70,8 % (17 preiskovancev). Koncentracija pankreatične elastaze v blatu je bila znotraj vrednosti intervala zaupanja pri 41,7 % (10 preiskovancev), izven vrednosti intervala zaupanja pa pri 58,3 % (14 preiskovancev).

V skupini s celiakijo je imelo delež izdihanega ^{13}C znotraj intervala zaupanja 61,5 % (8 preiskovancev), izven vrednosti intervala zaupanja pa 38,5 % (5 preiskovancev). Koncentracija pankreatične elastaze v blatu je bila znotraj vrednosti intervala zaupanja pri 53,8 % (7 preiskovancev), izven vrednosti intervala zaupanja pa pri 46,2 % (6 preiskovancev).

Rezultate smo nato obdelali z računalniškim programom IBM SPSS Statistics 20. Postavljene hipoteze smo opredelili glede na dobljene in izračunane rezultate. Kot statistično značilne razlike smo opredelili tiste na ravni $P < 0,05$.

Na začetku smo opravili osnovno statistično analizo tako za rezultate dihalnega testa kot tudi za rezultate pankreatične elastaze v blatu. Dobili smo vrednosti aritmetične sredine,

mediane, variance, standardne variacije za skupino s celiakijo (C) ter za kontrolno skupino (K) (Tabela VIII, Tabela IX).

Tabela VIII: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk pri dihalnem testu

Spremenljivka	Rezultati dihalnega testa_C
Število preiskovancev	13
Najnižja vrednost	12,3
Najvišja vrednost	88,3
Aritmetična sredina	52,85
Mediana	52
95 % interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	41,46–64,25
Varianca	355,53
Standardna deviacija	18,85
Koeficient asimetrije	-0,326
Spremenljivka	Rezultati dihalnega testa_K
Število preiskovancev	24
Najnižja vrednost	17,5
Najvišja vrednost	69
Aritmetična sredina	41,57
Mediana	39,75
95 % interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	32,28–47,86
Varianca	221,56
Standardna deviacija	14,89
Koeficient asimetrije	0,327

Kadar razpolagamo z majhnim vzorcem, normalne porazdelitve rezultatov ne moremo predpostaviti. Zato smo v nadaljevanju izvedli neparametrični Mann-Whitneyjev U test, ki predpostavlja neodvisnost vzorcev, enakost (homogenost) varianc in enako porazdelitev (torej parametrično oziroma neparametrično) za obe skupini.

Pred samo izvedbo testa smo postavili ničelno in alternativno hipotezo.

Tabela IX: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk elastaze v blatu

Spremenljivka	Elastaza v blatu_C
Število preiskovancev	13
Najnižja vrednost	349
Najvišja vrednost	670
Aritmetična sredina	483,15
Mediana	470
95 % interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	432,98–533,33
Varianca	6893
Standardna deviacija	83,03
Koeficient asimetrije	0,582
Spremenljivka	Elastaza v blatu_K
Število preiskovancev	24
Najnižja vrednost	235
Najvišja vrednost	619
Aritmetična sredina	474,13
Mediana	493,5
95 % interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	433,71–514,54
Varianca	9160,38
Standardna deviacija	95,71
Koeficient asimetrije	-0,599

Ničelna hipoteza (H₀): Med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo ni statistično značilnih razlik v vrednostih dihalnega testa.

Alternativna hipoteza (H_a): Med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo so statistično značilne razlike v vrednostih dihalnega testa.

Tabela X: Mann-Whitneyjev U test (dihalni test)

DIHALNI TEST	Število preiskovancev	Mean Rank
kontrolna skupina	24	16,31
celiakija	13	23,96
Mann-Whitneyjev U test	91,50	P = 0,04

Vrednost $P = 0,04$, kar je manjše od $P = 0,05$ (Tabela X). Ničelno hipotezo zavrnamo.

Pri dihalnem testu mešanih trigliceridov obstaja statistično značilna razlika med skupinama.

Ker Mann-Whitneyjev U test predpostavlja homogenost varianc, izvedemo Levenov test, katerega rezultati so predstavljeni v Tabeli XI.

Tabela XI: Homogenost varianc pri dihalnem testu

Levenov test homogenosti varianc	
F	0,161
P	0,691

Ničelna hipoteza (H₀): Standardni odkloni varianc pri dihalnem testu so znotraj kontrolne skupine in skupine preiskovancev s celiakijo enaki.

Alternativna hipoteza (H_a): Standardni odkloni varianc pri dihalnem testu znotraj kontrolne skupine in skupine preiskovancev s celiakijo niso enaki.

Vrednost P pri testiranju homogenosti varianc pri dihalnem testu zavzame vrednost 0,691, kar je $> 0,05$. Ničelno hipotezo sprejmemo. Standardni odkloni varianc med skupinama so homogeni.

Enako smo postopali pri statistični analizi rezultatov testa elastaze v blatu. Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo ter izvedli Mann-Whitneyjev U test. Rezultati so predstavljeni v Tabeli XII.

Ničelna hipoteza (H₀): Med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo ni statistično značilnih razlik v vrednostih testa pankreatične elastaze v blatu.

Alternativna hipoteza (H_a): Med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo so statistično značilne razlike v vrednostih testa pankreatične elastaze v blatu.

Tabela XII: Mann-Whitneyjev U test (pankreatična elastaza v blatu)

TEST FE-1	Število preiskovancev	Mean Rank
kontrolna skupina	24	18,94
celiakija	13	19,12
Mann-Whitneyjev U test	154,5	P = 0,968

Vrednost Mann-Whitneyjevega U testa znaša pri testu elastaze v blatu 154,5, vrednost P pa je 0,968, kar je $> 0,05$. Sprejmemo ničelno hipotezo. Med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo ni statistično značilnih razlik v vrednostih testa pankreatične elastaze v blatu.

Tudi tu izvedemo Levenov test. Rezultati so predstavljeni v Tabeli XIII.

Tabela XIII: Homogenost varianc pri testu elastaze v blatu

Levenov test homogenosti varianc	
F	0,252
P	0,619

Ničelna hipoteza (H₀): Standardni odkloni varianc pri testu pankreatične elastaze v blatu so znotraj kontrolne skupine in skupine preiskovancev s celiakijo enaki.

Alternativna hipoteza (H_a): Standardni odkloni varianc znotraj kontrolne skupine in skupine preiskovancev s celiakijo niso enaki.

Tudi v tem primeru zavzame P vrednost $> 0,05$, zato sprejmemo ničelno hipotezo in potrdimo homogenost varianc.

Analizirali smo tudi korelacijo med obema testoma, za kar smo izračunali Pearsonov koeficient, ki lahko zavzame vrednosti med -1 in 1, pri čemer -1 pomeni popolno negativno povezanost spremenljivk, vrednost 1 pa popolno pozitivno povezanost spremenljivk. Pearsonov koeficient (r) med dihalnim testom in testom pankreatične

elastaze v blatu znaša $r = 0,269$, kar pomeni, da je korelacija med testoma šibka. Vrednost P znaša $0,107$, kar je večje od $0,05$ – korelacija med testoma torej ni statistično značilna (Tabela XIV).

Tabela XIV: Korelacija med testoma

Pearsonov koeficient	$r = 0,269$
	$P = 0,107$

Na koncu smo preverili še občutljivost in specifičnost uporabljenih metod. Na osnovi referenčnih vrednosti intervala zaupanja smo rezultate razvrstili na resnično pozitivne (RP), resnično negativne (RN), lažno pozitivne (LP) in lažno negativne (LN). Pri tem smo upoštevali referenčne vrednosti, ki smo jih postavili s pomočjo 95-odstotnega intervala zaupanja. Referenčne vrednosti dihalnega testa pri kontrolni skupini so se gibale med $32,28\%$ in $47,68\%$, pri skupini preiskovancev s celiakijo pa med $41,46\%$ in $64,25\%$. Pri testu pankreatične elastaze v blatu so bile pri kontrolni skupini referenčne vrednosti med $433,71$ in $514,54 \mu\text{g/g}$ blata, pri skupini preiskovancev s celiakijo pa med $432,98$ in $533,33 \mu\text{g/g}$ blata (Tabela XV).

Tabela XV: Število pozitivnih in negativnih vrednosti glede na diagnozo

DIHALNI TEST	RP = 5	RN = 17
	LP = 7	LN = 8
ELASTAZA V BLATU	RP = 6	RN = 10
	LP = 14	LN = 7

RP = pravilno razporejene vrednosti znotraj skupine preiskovancev s celiakijo

RN = pravilno razporejene vrednosti znotraj referenčnih vrednosti pri kontrolni skupini

LP = lažno pozitivne vrednosti pri kontrolni skupini

LN = lažno razvrščene vrednosti znotraj referenčnih vrednosti pri bolnikih s celiakijo.

Diagnostična občutljivost (sensitivity) predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven, torej izven referenčnih vrednosti. V našem primeru so to bolniki s celiakijo, pri katerih je bil rezultat dihalnega testa nižji od 41,46 % ali višji od 64,25 %, vsebnost elastaze v blatu pa manjša od 432,98 µg/g blata ali višja od 533,33 µg/g blata. Diagnostično občutljivost podajamo v odstotkih, predstavlja pa verjetnost pozitivnega izida pri osebah s postavljeno diagnozo bolezni. Večja občutljivost pomeni manjše število lažno negativnih rezultatov.

Občutljivost izračunamo po naslednji formuli:

[Enačba 8]

$$Se = RP / (RP + LN)$$

Se = sensitivity, diagnostična občutljivost

RP = resnično pozitivni; bolniki, ki jih test zazna kot bolne

LN = lažno negativni; bolniki, ki jih test lažno zazna kot zdrave

Izračuni občutljivosti za:

- dihalni test: $5 / (5+8) = 0,385 \times 100 = 38,5 \%$
- test pankreatične elastaze v blatu: $6 / (6 + 10) = 0,375 \times 100 = 37,5 \%$

Diagnostična specifičnost (specifity) predstavlja delež oseb, ki bolezni nimajo. Pri njih je rezultat testa negativen oz. znotraj referenčnih vrednosti. Predstavlja torej delež resnično negativnih dogodkov. Večja diagnostična specifičnost pomeni torej manj lažno pozitivnih rezultatov. Diagnostična specifičnost zavzame vrednost 1 (100 %) v primeru, ko ni nobenega lažno pozitivnega vzorca.

Specifičnost izračunamo po naslednji formuli:

[Enačba 9]

$$Sp = RN / (RN + LP)$$

Sp = specifity, diagnostična specifičnost

RN = resnično negativni; zdravi, ki jih test pravilno prepozna kot zdrave

LP = lažno pozitivni; zdravi, ki jih test lažno zazna kot bolne

Izračuni specifičnosti za:

- dihalni test: $17 / (17 + 7) = 0,708 \times 100 = 70,8 \%$
- test pankreatične elastaze v blatu: $10 / (10 + 14) = 0,417 \times 100 = 41,7 \%$

5 RAZPRAVA

Dihalni test je relativno nova metoda določanja eksokrinega delovanja trebušne slinavke, ki še ni uveljavljena v klinični praksi. Temelji na določanju količine izdihanega označenega izotopa. Pri tem preiskovanec zaužije označen substrat skupaj s predpisanim obrokom, ki vsebuje določeno količino maščob. Metaboliti substrata se po razgradnji absorbirajo v kri, nato pa izločijo v izdihanem zraku kot CO₂ oziroma kot ¹³CO₂. V naši raziskavi smo se odločili dihalni test mešanih trigliceridov preizkusiti na bolnikih s celiakijo, s še vedno prisotnim meteorizmom, pri nekaterih pa tudi s kronično prisotno diarejo, in posledično s sumom na zgodnjo okrnjeno eksokrino pankreatično funkcijo. Bolnike smo testirali na Gastroenterološki kliniki v Ljubljani, kjer se tudi sicer zdravijo.

Paciente in zdrave prostovoljce smo testirali od avgusta 2012 do januarja 2013. Pridobivanje zdravih prostovoljcev je bilo precej lažje, kar se odraža tudi v večji skupini testirancev. Bolniki s celiakijo so bili manj pripravljeni sodelovati, poleg tega pa je bil tudi nabor le-teh omejen, saj je delež bolnikov s celiakijo, ki imajo sočasno prisotno tudi okrnjeno pankreatično eksokrino funkcijo oziroma sum nanjo (stalno prisotne simptome), relativno majhen (približno ena tretjina bolnikov s celiakijo).

V skupino bolnikov s celiakijo smo zajeli 13 bolnikov, od tega je bilo 12 žensk in 1 moški. Povprečna starost preiskovancev v skupini je bila 39,3 leta. V kontrolni skupini je bilo 24 prostovoljcev, 18 žensk in 6 moških. Povprečna starost je bila 44,9 leta.

Iz podatkov smo najprej izračunali povprečno vrednost meritev. Pri skupini s celiakijo je bila povprečna vrednost dihalnega testa 52,85 %, koncentracija elastaze v blatu pa 483,15 µg/g blata, medtem ko je bila povprečna vrednost dihalnega testa pri kontrolni skupini 41,57 %, povprečna koncentracija elastaze v blatu pa 474,13 µg/g blata.

Dobljeni rezultati niso izpolnili naših pričakovanj, saj smo pri skupini s celiakijo in sumom na prisotnost okrnjene eksokrine pankreatične funkcije pričakovali nižje vrednosti tako elastaze v blatu kot tudi rezultatov dihalnega testa, ki bi sum na okrnjeno eksokrino funkcijo potrdile. Meja, ki jo navaja literatura, je 22 % za dihalni test (35) in < 200 µg/g blata za elastazo v blatu. (41)

Rezultate smo nato statistično obdelali. Ker smo razpolagali z majhnim vzorcem testirancev, normalnosti porazdelitve ni bilo mogoče predvideti. Odločili smo se torej za uporabo neparametričnih statističnih testov. Tako smo sprva izvedli Mann-Whitneyjev U test, s katerim smo primerjali rezultate istega testa med skupinama in ugotavljali morebitno prisotno statistično značilno razliko. Pri tem je bila upoštevana stopnja tveganja 0,05 (5 %).

Rezultat Mann-Whitneyjevega U testa za dihalni test je z vrednostjo $P = 0,04$ pokazal, da se rezultati med skupinama statistično značilno razlikujejo, saj je bila vrednost $P < 0,05$. Ničelno hipotezo smo zato ovrgli. Rezultati dihalnega testa pri skupini preiskovancev s celiakijo so torej statistično značilno višji od rezultatov dihalnega testa pri kontrolni skupini.

Enako smo postopali pri analizi rezultatov testa pankreatične elastaze v blatu. Mann-Whitneyjev test v tem primeru z vrednostjo $P = 0,968$ ni pokazal statistično značilnih razlik med obema skupinama. Zato smo sprejeli ničelno hipotezo (H_0), ki pravi, da med kontrolno skupino in skupino preiskovancev s celiakijo ni statistično značilnih razlik v vrednostih testa pankreatične elastaze v blatu.

V okviru analize smo izračunali tudi korelacijo med obema testoma. Izračunali smo Pearsonov koeficient, ki nam poda moč korelacije ter ali je ta pozitivna oziroma negativna. Dobili smo vrednost $r = 0,269$. Med testoma sicer obstaja šibka, pozitivna korelacija, vendar pa ta ni statistično značilna, saj vrednost P zavzame vrednost 0,107, kar je večje od 0,05 in je torej statistično neznačilno.

Pri bolnikih s celiakijo smo v splošnem pričakovali nižje rezultate testov kot pri kontrolni skupini, vendar so bili ti v povprečju višji za 11,28 % za dihalni test in 9,02 $\mu\text{g/g}$ za test pankreatične elastaze v blatu. Klasična okrnjena eksokrina funkcija trebušne slinavke je bila dokazana pri 7,7 % bolnikov. Ena od morebitnih razlag je ta, da na vrednost rezultatov dihalnega testa vpliva več dejavnikov izločanja označenega izotopa. Pri dihalnih testih z lipidnimi substrati je izločanje namreč odvisno od hitrosti praznjenja želodca, absorpcije maščob, enterohepatičnega kroženja žolčnih kislin in samih presnovnih procesov. Ker pa so hkrati visoki tudi rezultati testa elastaze v blatu, bi lahko predpostavili, da so razlogi za prisotnost gastrointestinalnih težav pri bolnikih s celiakijo drugi. V tem primeru bi sum na eksokrino pankreatično insuficienco ovrgli.

Vpliv na rezultate ima tudi sama občutljivost metode, kar pomeni, da metoda poda pozitiven rezultat pri obolelih, tj. resnično pozitivnih. V literaturi smo zasledili visoko občutljivost za oba testa (nad 90 %), kadar določamo močno okrnjeno pankreatično eksokrino funkcijo. Pri zmerno okrnjeni funkciji je občutljivost manjša. V našem primeru znaša občutljivost za dihalni test 38,5 %, za test elastaze v blatu pa 37,5 %.

Na slabšo občutljivost metode bi v našem primeru lahko vplivalo to, da so imeli testiranci morebiti prisotno le blago pankreatično insuficienco, pri kateri je občutljivost testov manjša, oziroma to, da je vzrok kronično prisotnih simptomov morda drug. K slabšemu izračunu občutljivosti metode pa prispeva tudi majhna skupina testirancev in pa glede na klinične simptome nehomogena skupina bolnikov.

Ugotavljali smo tudi specifičnost obeh testov. Specifičnost metode pomeni, da ta ne pokaže pozitivnih rezultatov pri tistih, ki jih v resnici nimajo – torej da ni lažno pozitivnih rezultatov. Specifičnost dihalnega testa znaša 70,8 %, specifičnost testa pankreatične elastaze v blatu pa 41,7 %. Tudi v tem primeru pride do precejšnih odstopanj od podatkov iz literature, kjer je navedena specifičnost nad 90 % za oba testa, razlog za to pa bi tudi v tem primeru lahko bila prisotnost blažje oblike pankreatične insuficience, oziroma celotna potencialna odsotnost, ter majhna skupina testirancev.

Razlogi za trenutno neuveljavljenost dihalnih testov v klinični praksi za določanje eksokrine pankreatične insuficience verjetno izhajajo iz že prej omenjenih dejavnikov (praznenje želodca, presnovni procesi ipd.), ki vplivajo na končne rezultate. Poleg tega je samo testiranje dolgotrajno, kar marsikateremu testirancu predstavlja oviro, saj mora v tem času mirovati, poleg tega pa je prepovedano zaužiti vse, razen negazirane vode. Dodaten razlog je verjetno tudi ta, da sta občutljivost in specifičnost testa manjši pri bolnikih s prisotno blago do zmerno pankreatično insuficienco, pri katerih je test posledično tudi manj natančen.

V nasprotju z dihalnim testom je test določanja pankreatične elastaze v blatu hitrejši, saj je potreben le majhen vzorec blata, ki ga pacient lahko odda takoj oziroma pošlje po pošti, v kolikor to ni bilo mogoče v času, ko je bil na kliniki. Sam odvzem vzorca naj ne bi bil problematičen, vendar pa je to toliko težje pri bolnikih s kronično prisotno diarejo, saj je blato tekoče. Tudi pri tej metodi pa se kaže njena šibkost pri tistih pacientih, ki imajo blago pankreatično insuficienco, saj je občutljivost in specifičnost metode v tem primeru manjša.

Smiselno bi bilo torej dihalne teste optimizirati na ta način, da bi iskali substrat, ki bi zagotavljal večjo občutljivost in specifičnost tudi pri blažjih oblikah eksokrine pankreatične insuficience ali pa umestili ostale specifične substrate, ki jih tudi lahko uporabimo za vrednotenje eksokrine pankreatične insuficience. Tekom določenega časovnega obdobja bi lahko ugotovili, v kateri časovni točki oziroma točkah krivulja doseže maksimum. S tem bi namreč lahko skrajšali test, saj bi bilo potrebno opraviti le bazalno meritev na začetku in na primer zadnjih nekaj meritev.

Razmisliti bi bilo potrebno tudi o izkoriščanju prednosti dihalnega testa za spremljanje poteka zdravljenja eksokrine pankreatične insuficience, saj je z njim možna določitev izboljšanja absorpcije maščob po uvedbi peroralnih encimskih nadomestkov, česar pa nam test določanja pankreatične elastaze v blatu ne omogoča.

Glavni namen naše raziskave je bilo opredeliti klinični pomen določanja pankreatične elastaze v blatu in dihalnega testa mešanih trigliceridov pri bolnikih s celiakijo in sumom na okrnjeno pankreatično eksokrino funkcijo. Rezultati niso pokazali značilne korelacije med obema testoma, tako da zamenljivosti metod ne moremo potrditi. Dokončnih odgovorov na podlagi tako majhne in nehomogene skupine ne moremo podati. Smotrno bi bilo izkoristili prednosti obeh testov za diagnosticiranje eksokrine pankreatične insuficience in spremljanje poteka zdravljenja po začetku jemanja peroralnih encimskih nadomestkov. Za razliko od testa določanja pankreatične elastaze v blatu, ki se ga na klinikah opravlja rutinsko, dihalni test mešanih trigliceridov zaenkrat še ni uveljavljen v klinični praksi, vendar pa njegova enostavna in pacientu prijazna izvedba ponuja dobro izhodišče za optimizacijo metode.

6 SKLEP

Dihalni test mešanih trigliceridov je še neuveljavljena metoda, s katero lahko določimo eksokrino delovanje trebušne slinavke. S pomočjo raziskave pri bolnikih s celiakijo, pri katerih je obstajal sum na prisotnost eksokrine pankreatične insuficience, smo želeli opredeliti klinični pomen dihalnega testa mešanih trigliceridov napram testu določanja pankreatične elastaze v blatu, ki je v klinični praksi že uveljavljen.

Rezultati so pokazali, da

- metodi nista zamenljivi, saj med njima ni statistično značilne korelacije; dihalni testi tako ne predstavljajo alternativne metode testu določanja elastaze v blatu, ki je trenutno uveljavljen v klinični praksi,
- so imeli bolniki s celiakijo v povprečju višjo vrednost elastaze v blatu, vendar med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik,
- so imeli bolniki s celiakijo pri dihalnem testu višje rezultate, ki se statistično značilno razlikujejo od rezultatov kontrolne skupine; slednjemu bi bilo potrebno v prihodnje nameniti več pozornosti in raziskati vzroke za to,
- bi bilo smiselno razmisliti o izkoriščanju prednosti dihalnega testa za spremljanje poteka zdravljenja po prejemu peroralnih pankreatičnih encimskih nadomestkov, saj je z njim možna določitev izboljšanja absorpcije maščob, česar pa nam test določanja pankreatične elastaze v blatu ne omogoča.

Trenutno še ni na voljo preprostega, ugodnega in zanesljivega testa za določanje eksokrine funkcije trebušne slinavke, vendar pa kombinacija testa elastaze v blatu in dihalnega testa mešanih trigliceridov predstavlja celovitejši način testiranja zgodnjih oblik okrnjene eksokrine pankreatične funkcije in ponuja dobro izhodišče za optimizacijo tako posamezne metode kot tudi njune kombinacije.

7 SEZNAM VIROV

[1] Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. Izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-496, 510-512, 550-551

[2] Brencelj J, Sedmak M: Celiakija; Medicinski razgledi 2010, 49(4): 471- 477

[3] Hiller A: Raznolika dieta pri celiakiji, In obs medicus, d.o.o., Ptuj, 2003: 22-23

[4] Slovensko društvo za celiakijo, <http://www.drustvo-celiakija.si/>

Datum dostopa: 07. 01. 2013

[5] Babič M, Colarič D, Eder K, Elbl T, Kompolšek T, Murko A, Špilak M: Izzivi družinske medicine; učno gradivo – zbornik seminarjev študentov Medicinske fakultete Univerze v Mariboru, 4. Letnik, 2007/2008; Maribor 2007; 53-61

[6] Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija za medicinske šole, DZS Ljubljana, 1996: 97-98, 104-106

[7] Petrovič D, Zorc M: Histologija – učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, 1. ponatis, Littera Picta, Ljubljana, 2010: 137-138, 173-180

[8] Dolinšek J, Urlep-Žižej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije, Zdravniški vestnik 2006, 75 (2): 89-97

[9] Dolinšek J: Vpliv brezglutenske diete in genetskih dejavnikov na apoptotsko aktivnost sluznice ozkega črevesa pri otrocih s celiakijo, Ljubljana, 2006

[10] Kagnoff MF: Diagnosis and Management of Celiac Disease. Gastroenterology 2006; 131 (6): 1977-1980

[11] Helms SND: Coeliac disease and gluten-associated diseases. Alternative Medicine Review 2005; 10 (3): 172-186

[12] Anatomy: Endocrine Pancreas

<http://www.jltacademystudents.com/courses/JLCPCONLINE2012/end14/07end14.htm>

Datum dostopa: 10. 06. 2013

[13] Leeds SJ, Hopeer AD, Hurlstone DP, Edwards SJ, Mcalindon ME, Lobo AJ, Donnelly MT, Morley S, Sanders DS: Is exocrine pancreatic insufficiency in adult coeliac disease a cause of persisting symptoms?, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 25, 265-271, 2007

[14] Dahmane R: Ilustrirana anatomija, druga dopolnjena izdaja, Tehniška založba Slovenije, d.d., Ljubljana, 2005: 104-105

[15] Leeds SJ: Coeliac disease and pancreatic exocrine insufficiency, SheBo Biotech, 2007

[16] Kagnoff MF: Overview and pathogenesis of celiac disease, *Gastroenterology* 2005; 128: 10-18

[17] Sollid LM: Immunology of celiac disease, International Coeliac Disease Meeting, Maribor, 2007: 55-58

[18] Autodore J, Bierly PA, Hlywiak KH, Jatla M, Verma R: Overview of celiac disease: Differences between children and adult, *Practical gastroenterology*, 2008: 23-27

[19] Rodrigo L: Celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12 (41): 6585-6593

[20] Turk-Mičetić D: Epidemiology of coeliac disease, International coeliac disease meeting, Maribor, 2007: 37-38

[21] Borelli M, Troncone R: The clinical spectrum of celiac disease, International coeliac disease meeting, Maribor, 2007: 89-94

[22] Horvath K, Fasano A: Management of refractory celiac disease, *Medscape general medicine*, 2001;3(4)

- [23] Freeman HJ: Pancreatic endocrine and exocrine changes in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(47): 6344-6346
- [24] Amarri S, Swart GR, Weaver LT: ^{13}C mixed triglyceride breath test, *Gut* 1998;43(3): 13-19
- [25] Muñoz Domingues EJ: Diagnosis of chronic pancreatitis: Functional testing, *Best practice & research clinical gastroenterology* 24, 2010: 233-241
- [26] Braden B: Methods and functions: Breath tests, *Best practice & research clinical gastroenterology* 23, 2009: 337-352
- [27] Biankin AV, Oliver MR, Pearce CB, Toouli J, Wilson JS, Wray NH: Management of pancreatic exocrine insufficiency: Australasian pancreatic club recommendations, *The Medical Journal of Australia*, 2010, 193(8): 461-467
- [28] Janša R: Spremenjeno delovanje trebušne slinavke in celiakija, *Naša lekarna*, 2008, 28: 66-69
- [29] Klein PD: ^{13}C breath tests: visions and realities, *The journal of nutrition*, 2001, 131(5): 1637-1642
- [30] Aghdassi AA, Keller J, Layer P, Lerch MM, Mayerle JV: Tests of pancreatic exocrine function – Clinical significance in pancreatic and non-pancreatic disorders, *Best practice & research clinical gastroenterology* 23 (3), 2009: 425-439
- [31] Osredkar J: Dihalni test s sečnino – njegovo mesto v diagnostiki, *Zdravniški vestnik* 2004, 73: 13-17
- [32] Fischer H, Wetzel K: ^{13}C -Breath tests in medical research and clinical diagnosis, 4th Edition, Fischer Analysen Instrumente GmbH, Leipzig, 2005: 25
- [33] The encyclopedia of science
http://www.daviddarling.info/encyclopedia/S/small_intestine.html

Datum dostopa: 22. 01 .2013

[34] Celiac disease

<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2006/mohr/celiac.html>

Datum dostopa: 22. 01. 2013

[35] Protocols - 13C Breath Tests – PANCREAS

<http://www.campro.eu/PDF/Brochures/Flyer-Breath-Test-Protocol/web-protocols-13C-breath-tests-pancreas-okt2011-en.pdf>

Datum dostopa: 05. 02. 2013

[36] Dominici R, Franzini C: Fecal Elastase-1 as a test for pancreatic function: a Review, Clin Chem Lab Med, 40(4):325-332; 2002

[37] INFAL UK, the breath test company. Pancreo-Lip®, ¹³C-mixed triglyceride breath test for the diagnosis of pancreatic function.

<http://www.infal.co.uk/innovations/pancreolip.php>

Datum dostopa: 24. 02. 2013

[38] Dunn S: Gas source mass spectrometry: Stable isotope geochemistry. Geochemical instrumentation and analysis.

http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/gassourcemaspec.html

Datum dostopa: 24. 02. 2013

[39] Fischer H, Wetzel K: Recent results of the development and application of ¹³C-breath tests. Fischer analysen instrumente GmbH (FAN), 1st edition, Leipzig, 1999.

http://www.fan-gmbh.de/docs/13c_recent_results.pdf

Datum dostopa: 27. 02. 2013

[40] Rossmann A: Practical and instrumental side of measuring stable isotopes in food for geographical origin assignment. RAFA Workshop Determining Geographical Origin of Food, Prague, Czech Republic, 2009

http://www.trace.eu.org/ws/rafa/L5_AndreasRossmann.pdf

Datum dostopa: 27. 02. 2013

[41] ScheBo® Biotech AG: ScheBo® pancreatic elastase 1 stool test.

http://www.schebo.com/english/ScheBo_Pancreatic_Elastase_1_Stool_Test_3.php.

Datum dostopa: 01. 04. 2013

[42] Leeds JS, Oppong K, Sanders DS: The role of fecal elastase-1 in detecting exocrine pancreatic disease, Nat. Rev.Gastroenterol.Hepatol 8,405-415, 2011

[43] Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo: Navodilo za odvzem blata za določanje pankreatične elastaze v blatu.

http://www.kikkb.si/Navodilo%20za_dolocanje_pankreaticne_elastaze_v_blatu.pdf

Datum dostopa: 01. 04. 2013