

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDI MEGLIČ

**VREDNOTENJE DIAGNOSTIČNE UPORABNOSTI  
DIHALNEGA TESTA PRI EKSOKRINI INSUFICIENCI  
TREBUŠNE SLINAVKE**

**A BREATH TEST IN THE ASSESSMENT OF EXOCRINE  
PANCREATIC INSUFFICIENCY: EVALUATION OF  
DIAGNOSTIC VALUE**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višji svetnik in somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med., spec. interne medicine. Odvzemi bioloških vzorcev so bili opravljeni na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Analize bioloških vzorcev so bile opravljene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., višji svetnik in somentorju asist. dr. Radu Janši, dr. med., spec. interne medicine za omogočeno izvedbo diplomskega dela, skrbno vodenje tekom tega in številne dragocene nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem, ki so me v času študija podpirali in mi stali ob strani.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višji svetnik in somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med., spec. interne medicine.

Ljubljana, september 2013

Sandi Meglič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	VI
ABSTRACT .....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 TREBUŠNA SLINAVKA .....	1
1.1.1 Anatomija.....	1
1.1.2 Histologija .....	2
1.1.3 Fiziologija.....	2
1.2 LIPIDI.....	6
1.2.1 Prebava lipidov.....	6
1.2.2 Presnova lipidov .....	7
1.3 EKSOKRINA INSUFICIENCA TREBUŠNE SLINAVKE.....	8
1.4 AKUTNI PANKREATITIS .....	9
1.4.1 Diagnostika akutnega pankreatitisa.....	10
1.4.1.1 $\alpha$ -Amilaza .....	12
1.4.1.2 Lipaza .....	12
1.5 KRONIČNI PANKREATITIS .....	13
1.5.1 Diagnostika kroničnega pankreatitisa .....	15
1.6 CELIAKIJA .....	16
1.6.1 Celiakija in eksokrina insuficienca trebušne slinavke.....	16
1.7 GASTREKTOMIJA .....	17
1.7.1 Gastrektomija in eksokrina insuficienca trebušne slinavke .....	17
1.8 DIAGNOSTIKA EKSOKRINE INSUFICIENCE TREBUŠNE SLINAVKE .....	17
1.8.1 Pankreatična elastaza.....	18
1.8.2 Dihalni testi .....	19
1.8.2.1 Dihalni testi z lipidnimi substrati.....	20
1.8.2.2 Dihalni testi z drugimi substrati.....	22
1.9 ZDRAVLJENJE EKSOKRINE INSUFICIENCE TREBUŠNE SLINAVKE.....	23
2. NAMEN DELA .....	25
3. MATERIALI IN METODE .....	26
3.1 PREDSTAVITEV PREISKOVANCEV .....	26

3.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -AMILAZE V SERUMU.....	28
3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI LIPAZE V SERUMU .....	29
3.4 DOLOČANJE PANKREATIČNE ELASTAZE V BLATU.....	30
3.5 DIHALNI TEST .....	32
3.5.1 Analiza vzorcev izdihanega zraka.....	33
3.5.2 Izračun parametrov dihalnega testa.....	34
3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV .....	36
4. REZULTATI .....	38
4.1 POVPREČNE VREDNOSTI MERITEV .....	38
4.1.1 Serumske aktivnosti $\alpha$ -amilaze .....	38
4.1.2 Serumske aktivnosti lipaze.....	39
4.1.3 Vrednosti pankreatične elastaze v blatu .....	40
4.1.4 Rezultati dihalnega testa.....	41
4.2 PRIKAZ REZULTATOV GLEDE NA REFERENČNE VREDNOSTI .....	42
4.3 REZULTATI STATISTIČNIH TESTOV .....	43
4.3.1 Normalnost porazdelitve spremenljivk .....	43
4.3.2 Parametrični testi za ugotavljanje razlik med skupinami.....	46
4.3.3 Neparametrični testi za ugotavljanje razlik med skupinami .....	47
4.2.4 Analiza korelacije.....	49
5. RAZPRAVA.....	51
5.1 PREISKOVANCI Z AKUTNIM PANKREATITISOM.....	51
5.2 PREISKOVANCI S KRONIČNIM PANKREATITISOM.....	52
5.3 PREISKOVANCI S CELIAKIJO .....	53
5.4 PREISKOVANCI PO OPRAVLJENI GASTREKTOMIJI .....	54
5.5 REZULTATI DIHALNEGA TESTA .....	54
5.6 OMEJITVE RAZISKAVE .....	57
6. SKLEP .....	59
7. LITERATURA .....	61

## KAZALO SLIK

SLIKA 1: Anatomski prikaz trebušne slinavke.....	1
SLIKA 2: Serumske aktivnosti lipaze in $\alpha$ -amilaze v odvisnosti od časa po nastopu akutnega pankreatitisa. ....	13
SLIKA 3: Shematsko predstavljen princip dihalnega testa s $^{13}\text{C}$ označenim trigliceridnim substratom.....	21
SLIKA 4: Algoritem uvajanja nadomestkov pankreatičnih encimov... ..	24
SLIKA 5: Reakcijska shema določanja aktivnosti $\alpha$ -amilaze v serumu.....	28
SLIKA 6: Reakcijska shema določanja aktivnosti lipaze v serumu.....	30
SLIKA 7: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) – ABTS.....	31
SLIKA 8: Princip delovanja masnega spektrometra za analitiko stabilnih izotopov.....	34

## KAZALO GRAFOV

GRAF 1: Prikaz števila preiskovancev v posameznih skupinah. ....	26
GRAF 2: Prikaz povprečnih starosti preiskovancev v posameznih skupinah. ....	27
GRAF 3: Prikaz povprečnih serumskih aktivnosti $\alpha$ -amilaze (izraženih v $\mu\text{kat/L}$ ) v posameznih skupinah.....	38
GRAF 4: Prikaz povprečnih serumskih aktivnosti lipaze (izraženih v $\mu\text{kat/L}$ ) v posameznih skupinah.....	39
GRAF 5: Prikaz povprečnih vrednosti pankreatične elastaze (izraženih v $\mu\text{g/g}$ blata) v posameznih skupinah.....	40
GRAF 6: Prikaz povprečnih rezultatov dihalnega testa v posameznih skupinah.....	41
GRAF 7: Prikaz porazdelitve aktivnosti $\alpha$ -amilaze v vzorcih seruma preiskovancev. ....	44
GRAF 8: Prikaz porazdelitve aktivnosti lipaze v vzorcih seruma preiskovancev. ....	45
GRAF 9: Prikaz porazdelitve vrednosti pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev. ....	45
GRAF 10: Prikaz porazdelitve rezultatov dihalnega testa pri preiskovancih.....	46

## KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: Celice Langerhansovih otočkov in hormoni, ki jih izločajo. ....	2
PREGLEDNICA II: Nekateri proteini v pankreatičnem soku. ....	3
PREGLEDNICA III: Najpomembnejši spodbujevalci in zaviralci sekrecije trebušne slinavke. ....	6
PREGLEDNICA IV: Etiologija akutnega pankreatitisa. ....	9
PREGLEDNICA V: Preiskave pri akutnem pankreatitisu. ....	10
PREGLEDNICA VI: Ransonovi kazalniki. ....	11
PREGLEDNICA VII: M-ANNHEIM klasifikacija stadijev kroničnega pankreatitisa. ....	14
PREGLEDNICA VIII: Preiskave pri kroničnem pankreatitisu. ....	15
PREGLEDNICA IX: Direktni in indirektni testi za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke. ....	18
PREGLEDNICA X: Primeri nekaterih dihalnih testov s <sup>13</sup> C označenimi substrati in njihova uporaba. ....	19
PREGLEDNICA XI: Prikaz starosti (v letih) najstarejših in najmlajših preiskovancev v posameznih skupinah. ....	27
PREGLEDNICA XII: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti serumske aktivnosti $\alpha$ -amilaze ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah. ....	39
PREGLEDNICA XIII: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti serumske aktivnosti lipaze ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah. ....	40
PREGLEDNICA XIV: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti pankreatične elastaze v blatu (izraženih v $\mu\text{g/g}$ blata) ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah. ....	41
PREGLEDNICA XV: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti rezultatov dihalnega testa ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah. ....	42
PREGLEDNICA XVI: Referenčne vrednosti za izvedene preiskave. ....	42
PREGLEDNICA XVII: Število in odstotek preiskovancev v posamezni skupini z odstopi od referenčnih vrednosti izvedenih preiskav. ....	43
PREGLEDNICA XVIII: Prikaz p-vrednosti Shapiro-Wilkovega testa za posamezne spremenljivke. ....	44
PREGLEDNICA XIX: Prikaz p-vrednosti analize varianc (ANOVA) za serumske aktivnosti $\alpha$ -amilaze in rezultate dihalnega testa. ....	47

PREGLEDNICA XX: Prikaz p-vrednosti Tukeyevega testa za rezultate dihalnega testa v posameznih kombinacijah skupin.....	47
PREGLEDNICA XXI: Rezultati Kruskal-Wallisovega testa za serumske aktivnosti lipaze in vrednosti pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev. ....	48
PREGLEDNICA XXII: Prikaz p-vrednosti Mann-Whitneyevega testa za serumske aktivnosti lipaze v posameznih kombinacijah skupin. ....	48
PREGLEDNICA XXIII: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in aktivnostmi $\alpha$ -amilaze v vzorcih seruma preiskovancev. ....	49
PREGLEDNICA XXIV: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in aktivnostmi lipaze v vzorcih seruma preiskovancev. ....	50
PREGLEDNICA XXV: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in vrednostmi pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev. ....	50

## POVZETEK

Dihalni testi predstavljajo novo področje v laboratorijski diagnostiki bolezni prebavil, ki je pritegnilo pozornost številnih raziskovalnih skupin po svetu. Medtem, ko je s strani regulatornih inštitucij trenutno odobrena uporaba dihalnega testa le za diagnostiko okužb z bakterijo *Helicobacter pylori*, so raziskovalci v zadnjih letih posvetili veliko pozornosti razvoju in vrednotenju uporabnosti dihalnih testov tudi za diagnostiko drugih bolezni, med katerimi so pomembne tudi motnje v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Dihalni testi bi lahko s svojimi številnimi prednostmi predstavljali alternativo ali dopolnilo dosedanjim klinično uveljavljenim preiskavam za oceno omenjene funkcije. V diplomski nalogi predstavljamo uporabo dihalnih testov in drugih diagnostičnih strategij za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke, pri čemer smo se še posebej osredotočili na vrednotenje uporabnosti dihalnega testa s trigliceridnim substratom, označenim z izotopom  $^{13}\text{C}$ .

V raziskavo smo vključili 5 skupin preiskovancev, pri čemer smo v 4 skupine razvrstili preiskovance glede na njihovo potrjeno bolezen, v zadnjo skupino pa smo uvrstili zdrave preiskovance. Izbrali smo preiskovance z boleznimi in stanji, pri katerih je možna prisotnost eksokrine insuficience trebušne slinavke. Uporabnost dihalnega testa smo ovrednotili s primerjavo njegovih rezultatov z rezultati uveljavljenih preiskav iz področja laboratorijske diagnostike bolezni trebušne slinavke pri posameznih skupinah preiskovancev. Pridobljene podatke smo statistično ovrednotili, pri čemer smo izvedli primerjavo posameznih parametrov med skupinami preiskovancev in opredelili morebitne korelacije med rezultati dihalnega testa ter ostalimi proučevanimi parametri. Rezultate statistične analize smo v nadaljevanju ustrezno interpretirali glede na značilnosti preiskovancev v posameznih skupinah in primerjali z nam dostopnimi podatki iz literature.

Diagnostična vrednost velike večine dihalnih testov trenutno še ne dosega kriterijev za njihovo vključitev v rutinsko klinično prakso. Kljub temu pa vedno več objavljenih raziskav in predlaganih izboljšav posameznih dihalnih testov vliva upanje za njihovo klinično uveljavitev v bližnji prihodnosti. Pred tem pa bo potrebno največjo mero pozornosti in moči posvetiti odpravi trenutnih ovir, povezanih s pridruženimi fiziološkimi in patološkimi dejavniki, ki vplivajo na rezultate dihalnih testov in onemogočajo njihov prodor v klinično diagnostiko različnih bolezni, hkrati pa odpirajo številne možnosti za raziskovanje na tem področju v prihodnosti. S temi aktivnostmi bodo dihalni testi dobili svoje mesto v klinični praksi.



## **ABSTRACT**

Breath tests represent a new approach in laboratory diagnostics of gastrointestinal diseases, which has attracted attention of many research groups around the world. Although there is only one breath test allowed for routine use, which is the urea breath test for diagnostics of *Helicobacter pylori* infection, researchers have spent a lot of time for development and evaluation of breath tests for other applications, in which the exocrine pancreatic insufficiency has an important role. Breath tests could represent an alternative or supplement for nowadays routine diagnostics approaches because of their important advantages. In this thesis we represent an application of breath tests and other diagnostics strategies for assessment of exocrine pancreatic function. Breath test with isotope  $^{13}\text{C}$  labeled triglyceride substrate has been especially studied.

In our research we included 5 groups of subjects; in 4 groups we distributed patients with different diagnosed diseases and the last group includes healthy subjects. We chose patients with diseases and conditions which may be associated with exocrine pancreatic insufficiency. Evaluation of breath test has been studied with comparison of its results with results of routine established diagnostic tests for different investigated pancreatic diseases. The results of diagnostic tests have been statistically evaluated with comparison of individual variables between groups and determination of potential correlations between results of breath test and other diagnostic tests. The results of statistical analysis have been appropriate interpreted, according to the subject's characteristics in different groups. We have also compared these results with accessible data from literature.

Diagnostic values of the most breath tests have not yet achieved criteria for their establishment in routine clinical practice. Nevertheless there is increasing amount of published results and recommended improvements of several breath tests, which gives hope for their clinical establishment in the near future. Before that, it will be necessary to dedicate the biggest measure of attention and force to avoid nowadays obstacles, which are associated with several consociated physiological and pathological factors. These factors importantly influence the results of breath tests and prevent their routine use in clinical diagnostics of different diseases, but also open several options for research in the near future. With these activities the breath tests will soon be established in clinical practice.

**KLJUČNE BESEDE:** *eksokrina insuficienca trebušne slinavke, dihalni test, izotop <sup>13</sup>C, diagnostična uporabnost.*

**KEY WORDS:** *exocrine pancreatic insufficiency, breath test, isotope <sup>13</sup>C, diagnostic value.*

## **SEZNAM OKRAJŠAV:**

ACA II – avtoprotitelesa proti karboanhidrazi II

AF – alkalna fosfataza

ALA – avtoprotitelesa proti delta-aminolevulinat sintazi

ALT – alanin aminotransferaza

ANA – avtoprotitelesa proti antigenom jedra

ASMA – avtoprotitelesa proti antigenom gladkih mišic

AST – aspartat aminotransferaza

ATP – adenzin trifosfat

CoA – koencim A

CRP – C-reaktivni protein

CT – računalniška tomografija

EITS – eksokrina insuficienca trebušne slinavke

EUZ – endoskopski ultrazvok

ERCP – endoskopska retrogradna holangiopankreatografija

FADH<sub>2</sub> – flavin adenin dinukleotid (reducirana oblika)

FDA – Urad za prehrano in zdravila

γ-GT – gama-glutamil transpeptidaza

IFCC – Mednarodno združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino

LDH – laktat dehidrogenaza

MR – magnetna resonanca

MRCP – magnetnoresonančna holangiopankreatografija

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika)

NBT-PABA – N-benzoil-tirozil-para-aminobenzojska kislina

PCT – prokalcitonin

RTG – rentgenogram

SLE – sistemski lupus eritematosus

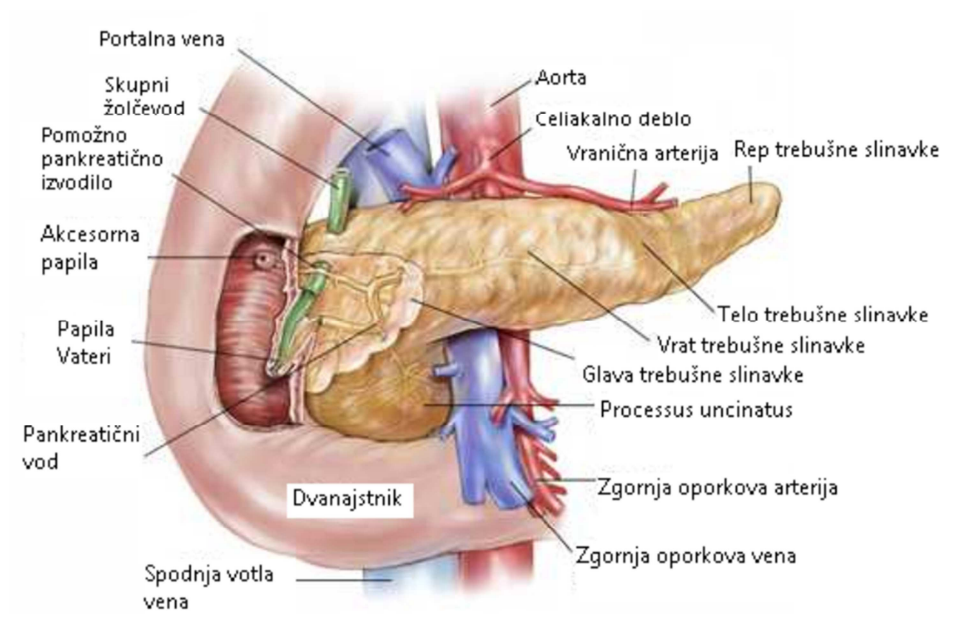
TAP – tripsinogen aktivacijski peptid

# 1. UVOD

## 1.1 TREBUŠNA SLINAVKA

### 1.1.1 Anatomija

Trebušna slinavka (*pancreas*) je prebavna žleza, ki leži retroperitonealno v višini prvega ledvenega vretenca. Opisana je kot ozek in podolgovat organ, dolg 12 do 15 cm, ki tehta 50 do 120 g. Sestavljena je iz naslednjih štirih delov: glava s procesusom uncinatusom, vrat, telo in rep (1,2). Glava (*caput pancreatis*) je najširši del žleze, ki jo obdaja dvanajstnik in leži pod spodnjo votlo veno ter skupnim žolčevodom. Vrat (*collum pancreatis*) leži v ravnini zgornje oporkove arterije in vene. Na njegovi hrbtni strani je žleb portalne vene in zgornje oporkove arterije. Telo (*corpus pancreatis*) je v prečnem prerezu trikotne oblike. Poteka pred aorto in sega na levo stran trebušne votline, kjer se končuje v repu (*cauda pancreatis*). Ta leži nad levo ledvico in sega do vranične line. Glavno izvodilo trebušne slinavke (*ductus pancreaticus*), imenovano tudi Wirsungianov vod, se začne v repu in poteka v notranjosti žleze proti desni strani, kjer se s skupnim žolčevodom združi v ampulo, skozi katero se izliva v dvanajstnik na veliki dvanajstnikovi papili (Vaterjeva papila). Poleg glavnega izvodila ima žleza tudi manjše, pomožno izvodilo, ki je bolj ali manj zakrnelo in vstopa v dvanajstnik nad Vaterjevo papilo preko majhne akcesorne papile. Pomožno izvodilo trebušne slinavke imenujemo Santorinijev vod (1).



Slika 1: Anatomski prikaz trebušne slinavke.

### 1.1.2 Histologija

Trebušna slinavka je žleza, ki je sestavljena iz eksokrinega in endokrinega dela. Eksokrini del obsega 85 % žleze. Osnovna morfološka gradbena enota je acinus, ki ga sestavljata dva funkcionalna tipa celic, in sicer acinarne ter duktularne celice. Okrogle in ovalne acinuse sestavlja 40 do 50 acinarnih celic. Nekaj acinusov tvori višjo morfološko gradbeno enoto, ki jo imenujemo lobus (režnjič). Sistem izvodil delimo na pet delov, ki si po velikosti sledijo po naslednjem vrstnem redu: intraacinarni vstavek, interkalarni vod, intralobularno izvodilo, interlobularno izvodilo in glavno izvodilo trebušne slinavke. Med acinusi se poleg vezivnega tkiva s številnimi kapilarami in živčnimi končiči nahajajo tudi Langerhansovi otočki, ki jih sestavljajo različni tipi celic in predstavljajo endokrini del žleze (preglednica I). Različni tipi celic izločajo posamezne hormone, ki predstavljajo pomembno vlogo v regulaciji metabolizma (3, 4, 5).

Preglednica I: Celice Langerhansovih otočkov in hormoni, ki jih izločajo (3).

VRSTA CELICE	HORMON
A	Glukagon
B	Insulin
D	Somatostatin
PP	Pankreatični polipeptid
VIP	Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)

Acinarne celice vsebujejo številna zimogena zrnca, v katerih so uskladiščeni proencimi, ki so v neaktivni obliki (4). Po sprostitvi proencimov iz celic poteče njihova aktivacija v dvanajstniku. Prav tako te celice sintetizirajo tudi tripsinski inhibitor (SPINK 1), ki prepreči aktivacijo znotrajceličnega tripsina (2, 5). Na bazalni membrani acinarnih celic so receptorji za endokrine, parakrine in živčne prenašalce. Duktularne celice izločajo velike količine tekočine z visoko vsebnostjo natrijevega bikarbonata, ki je po izločanju v dvanajstnik odgovoren za nevtralizacijo želodčne kisline (4).

### 1.1.3 Fiziologija

Trebušna slinavka vsak dan izloči približno 1500 mL pankreatičnega soka s pH vrednostjo med 8,0 in 8,3. Pankreatični sok je sestavljen iz vodne in encimske komponente, pri čemer je vodna komponenta bogata z natrijevim bikarbonatom, ki sodeluje pri nevtralizaciji vsebine dvanajstnika in s tem omogoči aktivacijo encimov v njegovi svetlini. Encimska

komponenta vsebuje encime, odgovorne za prebavo ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov (4, 5). Vodno komponento pankreatičnega soka izločajo duktularne celice in vsebuje raztopljene ione natrija, kalija, bikarbonata ter klorida. Encimska komponenta vsebuje encime, ki razgrajujejo vse tri glavne vrste hranil. Njena sestava je prikazana v preglednici II (4).

Preglednica II: Nekateri proteini v pankreatičnem soku (4).

PROTEIN	MOLEKULSKA MASA	MASNI DELEŽ (%)
$\alpha$ -amilaza	54 800	5,3
Triacilglicerol acilhidrolaza	50 500	0,7
Fosfolipaza A2	17 500	-
Kolipaza	10 000	-
Prokarboksipeptidaza A1	46 000	16,8
Prokarboksipeptidaza A2	47 000	8,1
Prokarboksipeptidaza B1	47 000	4,4
Prokarboksipeptidaza B2	47 000	2,9
Tripsinogen 1	28 000	23,1
Tripsinogen 2	26 000	-
Tripsinogen 3	26 700	16,0
Kimotripsinogen	29 000	1,7
Proelastaza 1	30 500	3,1
Proelastaza 2	30 500	1,2

Encimi, ki razgrajujejo proteine, se razlikujejo glede na način cepitve le teh. Med njimi je najpomembnejši tripsin, ki skupaj s kimotripsinom razgrajuje proteine v peptide, medtem ko cepitev na posamezne aminokislino omogoča karboksipeptidaza. Pri prebavi ogljikovih hidratov ima osrednjo vlogo  $\alpha$ -amilaza, ki razgrajuje škrob, glikogen in večino ostalih ogljikovih hidratov večinoma do ustreznih disaharidov, deloma pa tudi do trisaharidov. Glavni encimi za razgradnjo maščob so pankreatična lipaza (triacilglicerol acilhidrolaza), holesterol esteraza in fosfolipaza A2. Pankreatična lipaza katalizira razgradnjo nevtralnih maščob do maščobnih kislin in monogliceridov. Holesterol esteraza katalizira hidrolizo estrov holesterola, medtem ko fosfolipaza A2 katalizira cepitev maščobnih kislin iz fosfolipidov. Pankreatični sok vsebuje tudi ribonukleazo in deoksiribonukleazo (4, 5).

Za preprečitev razgradnje žleze, ki bi jo povzročili aktivirani pankreatični encimi, so vzpostavljeni štirje fiziološki zaščitni mehanizmi:

- Encimi so v zimogenih zrcih shranjeni v obliki neaktivnih proencimov in se aktivirajo šele v dvanajstniku. Primer takšnega proencima je tripsinogen, ki ga v aktivno obliko pretvori enterokinaza v svetlini dvanajstnika. Aktiven tripsin nato aktivira preostali tripsinogen, kimotripsinogen, proelastazo in prokarboksipeptidazo (2, 4).
- V zimogenih zrcih acinarnih celic je prisoten tripsinski inhibitor (SPINK 1), ki prepreči prezgodnjo, tako znotrajcelično, kot tudi zunajcelično aktivacijo tripsina v acinusih in izvodilih trebušne slinavke (2, 5).
- V tkivu trebušne slinavke, pankreatičnem soku in v plazmi sta prisotna tripsinska inhibitorja  $\alpha$ -1 antitripsin in  $\alpha$ -2 makroglobulin (2).
- Zaščitni mehanizem, ki varuje pred razgradnjo žleze je tudi sposobnost avtokatalize tripsina (2).

Pri aktivaciji tripsina se od molekule tripsinogena odcepi manjši fragment, imenovan tripsinogen aktivacijski peptid (TAP), ki v pogojih fiziološke aktivacije tripsina ostaja v svetlini dvanajstnika. Pri prekomerni aktivaciji tripsina v acinarnih celicah se TAP pojavi v serumu in urinu, kar predstavlja pomemben diagnostični pristop pri akutnem pankreatitisu (2, 6). Za razliko od proteolitičnih encimov se  $\alpha$ -amilaza in lipaza v pankreatičnem soku nahajata v aktivni obliki (2, 4, 5).

Sekrecija eksokrinega dela trebušne slinavke je odvisna od številnih dejavnikov, pri čemer so za njeno aktivacijo pomembni kemični, hormonski, mehanski in nevrogeni dejavniki. Kemični dejavniki predstavljajo prisotnost delno prebavljenih hranil v dvanajstniku in zgornjem delu tankega črevesja. Hormonski dejavniki vključujejo regulacijsko vlogo sekretina, holecistokinina in gastrina pri izločanju pankreatičnega soka. Med mehanske dejavnike uvrščamo posamezne fiziološke refleksne odzive, ki se sprožijo kot posledica raztega stene prebavnega trakta. Pomembna je tudi vloga nevrogenih dejavnikov, pri čemer je ključen živčni prenašalec acetilholin, ki se sprošča iz parasimpatičnih živčnih končičev v enteričnem živčnem sistemu (4, 5).

Sekrecijo eksokrinega dela trebušne slinavke razdelimo na tri faze glede na različne dejavnike in mehanizme, ki so udeleženi pri izločanju pankreatičnega soka:

- **Cefalična faza**, med katero se izloči okrog 25 % pankreatičnega soka. Pri tem predstavljajo organoleptične lastnosti hrane glavni dejavnik, ki preko vagalnih in enteričnih živčnih impulzov stimulira acinarne in duktularne celice (4).
- **Gastrična faza**, pri kateri je pomemben razteg stene želodca, ki refleksno stimulira tako acinarne, kot tudi duktularne celice. Pri tem je ključna tudi vloga gastrina, ki se sprošča kot odziv na mehanično stimulacijo stene želodca in stimulira izločanje pankreatičnega soka z visoko vsebnostjo encimske komponente (4).
- **Intestinalna faza**, pri kateri ima osrednjo vlogo prisotnost hrane v dvanajstniku in zgornjem delu tankega črevesja. Pri tem je v največji meri ključna regulacijska vloga hormonov sekretina in holecistokinina (4).

V regulacijo izločanja pankreatičnega soka so vpleteni številni omenjeni dejavniki, ki s spodbudo ali zavoro uravnavajo tako bazalno, kot tudi spodbujeno sekrecijo žleze. Izločanje pankreatičnega soka je v veliki meri spodbujeno kot odziv na prisotnost delno prebavljenih hranil v zgornjih delih tankega črevesja. Tudi sestava pankreatičnega soka je v določenem obsegu odvisna od vrste hranil v prebavni cevi, pri čemer imajo ključno vlogo hormonski dejavniki. Med slednje uvrščamo hormone holecistokinin, sekretin in gastrin. Holecistokinin se sprošča v krvni obtok iz enteričnih endokrinih celic v sluznici dvanajstnika in zgornjega dela jejunuma kot odziv na prisotnost delno prebavljenih proteinov in maščob v tankem črevesju. Po vezavi na ustrezen receptor povzroči stimulacijo sinteze in sproščanja encimov iz acinarnih celic trebušne slinavke. Posledično je spodbujeno izločanje pankreatičnega soka, ki vsebuje več prebavnih encimov ter manj vode in elektrolitov. Drugače deluje sekretin, ki se v krvni obtok sprošča kot odziv na prisotnost kisle vsebine dvanajstnika in stimulira duktularne celice k izločanju večjih količin vode in bikarbonatnih ionov. Gastrin deluje na podoben način kot holecistokinin, pri čemer se v največji meri sprošča iz G celic želodca kot odziv na mehansko stimulacijo njegove stene. (4, 5).

Vloga nevrogenih dejavnikov je pri stimulaciji izločanja pankreatičnega soka manjša v primerjavi z omenjenimi hormonskimi dejavniki. Pri tem je pomembna vloga acetilholina kot živčnega prenašalca v enteričnem živčnem sistemu, ki po vezavi na ustrezne receptorje podobno kot holecistokinin stimulira sintezo in sproščanje prebavnih encimov iz acinarnih celic (4, 5). Med najpomembnejše zaviralce sekrecije trebušne slinavke sodijo somatostatin, snov P, peptid YY in neuropeptid Y, ki se sproščajo iz različnih celic vzdolž prebavnega trakta (2). V preglednici III so navedeni vsi omenjeni spodbujevalci in zaviralci sekrecije trebušne slinavke.

Preglednica III: Najpomembnejši spodbujevalci in zaviralci sekrecije trebušne slinavke.

<b>SPODBUJEVALCI SEKRECIJE</b>	<b>ZAVIRALCI SEKRECIJE</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• sestavine hrane</li> <li>• holecistokinin</li> <li>• sekretin</li> <li>• gastrin</li> <li>• acetilholin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• somatostatin</li> <li>• snov P</li> <li>• peptid YY</li> <li>• neuropeptid Y</li> </ul>

## **1.2 LIPIDI**

Lipidi so skupina bioloških molekul, ki so zaradi svoje hidrofobne narave bolje topni v nepolarnih topilih kot v vodi. Ker v to skupino biomolekul uvrščamo spojine glede na njihovo topnost in ne kemijsko strukturo, gre za strukturno zelo različne spojine, ki pa so vključene v številne biološke funkcije in tako predstavljajo pomembne molekule v bioloških sistemih. Med lipide tako uvrščamo maščobne kisline, trigliceride, glicerofosfolipide, sfingolipide in steroide. Glede na že omenjeno definicijo lipidov pa lahko med njih uvrstimo tudi različne druge spojine, kot so pigmenti, encimski kofaktorji, hormoni, signalne molekule in prenašalci elektronov (7).

### **1.2.1 Prebava lipidov**

V prehrani živalskih vrst so najbolj zastopane nevtralne maščobe, ki jih imenujemo tudi trigliceridi. Vsaka molekula trigliceridov je sestavljena iz glicerola, ki je zaestren s tremi maščobno-kislinskimi stranskimi verigami. V običajni prehrani so prisotne tudi manjše količine fosfolipidov, holesterola in njegovih estrov (4, 5). Manjši delež trigliceridov se



razgradi že v želodcu pod vplivom encimov, ki jih skupno imenujemo preduodenalne lipaze (4). Naslednja stopnja v prebavi maščob je emulgiranje, kar omogočijo lecitin in žolčne kisline, ki se sprostijo iz žolča. Pri tem se maščobe razpršijo v večje število manjših kapljic, ki so zaradi svoje večje površine bolj dostopne za lipaze. V dvanajstniku poteka encimska razgradnja trigliceridov pod vplivom pankreatične lipaze, ki molekulo triglicerida razgradi v monoglicerid in dve molekuli ustreznih maščobnih kislin (4, 5, 7). Pankreatična lipaza potrebuje za svojo optimalno aktivnost koencim, imenovan kolipaza, ki tvori komplekse s solmi žolčnih kislin in tako omogoči približanje molekule triglicerida k aktivnemu centru encima (8). Pri razgradnji drugih vrst lipidov v dvanajstniku sodelujeta druga dva lipolitična encima, ki sta holesterol esteraza in fosfolipaza A2 (4, 5). Monogliceridi in proste maščobne kisline, ki nastanejo po encimski razgradnji trigliceridov, se pod vplivom soli žolčnih kislin vgradijo v micelle. Ti so definirani kot majhni, okrogli ali cilindrični delci, velikosti 3 do 6 nanometrov in sestavljeni iz 20 do 40 molekul soli žolčnih kislin (4). Jedro micela tvorijo hidrofobni deli steroidnega skeleta žolčnih kislin, kar omogoča vgradnjo lipidnih molekul, medtem ko površino micelov tvorijo polarne skupine z nabojem, ki povečajo njihovo topnost v prebavnih sokovih. V tej obliki monogliceridi in maščobne kisline prehajajo v celice črevesne sluznice, kjer poteče sinteza novih trigliceridov, ki se vgradijo v hilomikrone. Slednji zapustijo celice črevesne sluznice in prehajajo skozi limfni sistem v krvni obtok (4, 5, 7). Manjši delež kratko in srednjeveržnih maščobnih kislin se absorbira neposredno v portalni krvni obtok (4).

### **1.2.2 Presnova lipidov**

Absorbirane maščobe se v obliki hilomikronov prenašajo po krvnem obtoku do perifernih tkiv. Hilomikroni so lipoproteini z najnižjo gostoto, katerih jedro tvorijo trigliceridi in estri holesterola, na svoji površini pa vsebujejo holesterol, fosfolipide in apolipoproteine, ki povečajo njihovo topnost v plazmi. V perifernih tkivih se iz hilomikronov pod vplivom lipoprotein-lipaze sprostijo maščobne kisline. Lipoprotein-lipaza je encim, ki se nahaja v stenah kapilar in s hidrolizo cepi trigliceride, ki so del hilomikronov (9). Maščobne kisline preidejo preko plazemske membrane v citosol, kjer poteče njihova aktivacija z vezavo molekule koencima A (CoA). Ta predstavlja pogoj za prenos maščobnih kislin skozi mitohondrijski membrani v matriks, kjer poteka  $\beta$ -oksidacija. Pri tej reakciji nastajata reducirana produkta NADH in FADH<sub>2</sub>, ki se ponovno oksidirata s pomočjo verige za prenos elektronov, pri čemer v procesu oksidativne fosforilacije nastane ATP. Glede na

število ogljikovih atomov v izhodnih maščobnih kislinah nastajata pri  $\beta$ -oksidaciji še dva različna pomembna produkta, ki vstopata v citratni cikel. Pri  $\beta$ -oksidaciji maščobnih kislin s sodim številom ogljikovih atomov nastanejo molekule acetil-CoA, ki vstopajo neposredno v citratni cikel. Pri  $\beta$ -oksidaciji maščobnih kislin z lihim številom ogljikovih atomov pa poleg acetil-CoA nastane še propionil-CoA, ki se preko treh reakcij pretvori v sukcinil-CoA. Slednji, za razliko od propionil-CoA, vstopa v citratni cikel. Oba omenjena produkta se preko citratnega ciklusa in oksidativne fosforilacije pretvorita do končnih produktov oksidacije maščobnih kislin, ki sta ogljikov dioksid in voda (7).

### **1.3 EKSOKRINA INSUFICIENCA TREBUŠNE SLINAVKE**

Eksokrina insuficienca trebušne slinavke (EITS) je opredeljena kot nezadostna aktivnost pankreatičnih encimov v svetlini dvanajstnika, ki je lahko posledica njihovega zmanjšane izločanja zaradi okvar trebušne slinavke, motene aktivacije ali povečane deaktivacije, prav tako pa tudi motene stimulacije izločanja pankreatičnih encimov. Posledica omenjenega stanja je motena prebava različnih hranil, kar privede do razvoja različnih znakov in simptomov. V zgodnji fazi bolniki navajajo občutke napihovanja, pretakanja tekočine po trebuhu, blage bolečine in minimalne spremembe v konsistenci blata. Z napredovanjem bolezni vstopijo v ospredje pogoste driske, bolečine v trebuhu in steatoreja, ki je klinično opredeljena kot izločanje več kot 10 g maščob v blatu na dan. Motena absorpcija hranil vodi tudi do izgube telesne teže, pomanjkanja v lipidih topnih vitaminov (A, D, E in K), mineralov (Ca in Mg) in esencialnih maščobnih kislin. Z EITS je povezana tudi večja pojavnost osteoporoze in povečano tveganje za kardiovaskularne dogodke (10, 11).

EITS predstavlja poseben klinični problem zaradi pozne prepoznave in posledično poznega začetka zdravljenja. Vzroki za to so različni in obsegajo pojav funkcionalnih sprememb pred strukturnimi spremembami trebušne slinavke, razvoj prvih simptomov pri več kot 60 % znižanju izločanja pankreatičnih encimov in vpletenost številnih patofizioloških mehanizmov pri razvoju EITS. Slednja tako nastopa pri številnih bolezenskih stanjih, ki vključujejo akutni in kronični pankreatitis, celiakijo, Chronovo bolezen, Sjögrenov sindrom, sladkorno bolezen, tumorje trebušne slinavke, stanja po operativnih posegih na zgornji prebavni cevi in trebušni slinavki ter nekatera druga obolenja. V nadaljevanju so opisana stanja, ki smo jih obravnavali v pričujoči diplomski nalogi (10, 11).

## 1.4 AKUTNI PANKREATITIS

Akutni pankreatitis je akutno vnetje trebušne slinavke, ki ga klinično označuje bolečina v trebuhu in dvig serumskih aktivnosti pankreatičnih encimov (2, 12). Bolezen lahko poteka v blagi ali hudi obliki. Blago potekajoči akutni pankreatitis povzroči intersticijski edem žleze brez nekroze tkiva in hitro ter popolno popravo okvar. Težko potekajočo obliko akutnega pankreatitisa spremlja nekroza tkiva žleze in sistemska prizadetost, ki lahko vodi tudi do večorganske odpovedi. V teh primerih je bolezen lahko tudi smrtna. V 80 % primerov je potek bolezni blag, medtem ko je v 20 % primerov prisoten težji potek bolezni s pogostejšimi zapleti. V Sloveniji in tudi v svetovnem merilu je prisoten trend naraščanja incidence akutnega pankreatitisa, zlasti biliarnega, pri čemer se bolezen v večji meri pojavlja pri moških med 40. in 60. letom starosti (2).

Razvoj akutnega pankreatitisa lahko sprožijo različni dejavniki, med katerimi sta najpogostejša žolčni kamni in prekomerno uživanje alkohola (2, 12). Ostali vzroki so redkejši in so navedeni v preglednici IV (2).

Preglednica IV: Etiologija akutnega pankreatitisa (2).

POGOSTI VZROKI	REDKI VZROKI
<ul style="list-style-type: none"><li>• žolčni kamni (tudi mikrolitiza)</li><li>• alkohol</li><li>• hiperlipidemija</li><li>• hiperkalcemija</li><li>• stenoza papile Vateri</li><li>• disfunkcija Oddijevega sfinktra</li><li>• poškodba</li><li>• zaplet po ERCP</li><li>• nekatera zdravila</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• pankreas divizum</li><li>• periampularni karcinom</li><li>• karcinom trebušne slinavke</li><li>• periampularni divertikel</li><li>• vaskulitis</li><li>• virusi: Coxackie virus, mumps, HIV</li><li>• bakterije</li><li>• paraziti: Ascaris lumbricoides</li><li>• avtoimunski vzroki: SLE, Sjögrenov sindrom</li><li>• cistična fibroza</li><li>• hereditarni pankreatitis</li></ul>

Akutni pankreatitis lahko sprožijo tudi številna zdravila, med katerimi so najpomembnejša azatioprin, sulfonamidi, sulindak, tetraciklini, valprojska kislina in didanozin (2, 13). Pri 10 % bolnikov ne ugotovimo vzroka, takrat govorimo o idiopatskem pankreatitisu. Patogeneza akutnega pankreatitisa še ni povsem pojasnjena, vedno več dokazov pa govori

v prid mehanizmu prezgodnje aktivacije tripsinogena v acinarnih celicah in posledičnega vnetnega odziva, pri katerem je ključna vloga nekaterih citokinov, metabolitov arahidonske kisline, kisikovih radikalov in levkocitnih proteaz. V klinični sliki akutnega pankreatitisa je vodilen simptom huda bolečina v žlički ali ob popku, ki običajno nastopi po mastnem obroku ali obdobju intenzivnega pitja alkohola (2).

#### 1.4.1 Diagnostika akutnega pankreatitisa

Cilj diagnostike je potrditi akutni pankreatitis in napovedati potek bolezni. Kljub pogosti prizadetosti bolnika zaradi bolečin in bruhanja ter posledično težavni komunikaciji so pomembni anamnestični podatki, ki nas usmerjajo v hitro in pravilno diagnostiko ter ukrepanje. Začetna diagnostika obsega laboratorijske in slikovne preiskave, ki jim kasneje dodamo še preiskave, s katerimi ocenimo prognozo bolezni. V preglednici V so navedene laboratorijske in slikovne preiskave, ki jih uporabljamo v diagnostiki akutnega pankreatitisa (2, 8, 14).

Preglednica V: Preiskave pri akutnem pankreatitisu.

LABORATORIJSKE PREISKAVE	SLIKOVNE PREISKAVE
<ul style="list-style-type: none"> <li>• hemogram in diferencialna bela krvna slika</li> <li>• <math>\alpha</math>-amilaza</li> <li>• lipaza</li> <li>• CRP</li> <li>• PCT</li> <li>• jetrni testi: AST, ALT, bilirubin, AF, <math>\gamma</math>-GT</li> <li>• elektroliti</li> <li>• sečnina in kreatinin</li> <li>• kalcij</li> <li>• lipidogram</li> <li>• urinski testi: <math>\alpha</math>-amilaza, lipaza, TAP</li> <li>• glukoza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nativni RTG trebuha</li> <li>• UZ trebuha</li> <li>• CT ali MR trebuha</li> <li>• MRCP in EUZ (redkeje)</li> </ul>

Za dokaz diagnoze akutnega pankreatitisa je poleg značilne klinične slike ključna zvišana aktivnost  $\alpha$ -amilaze in lipaze v serumu, kar lahko v prvih dneh bolezni ugotovimo pri kar 90 % bolnikov. Ob značilni klinični sliki in normalni funkciji ledvic zadošča za potrditev diagnoze že trikratno zvišanje aktivnosti encimov (2, 14). V hemogramu opazimo značilno

zvišanje hematokrita in levkocitozo, medtem ko lahko z analizo seruma ugotovimo elektrolitske motnje (najpogosteje hipokaliemijo), zvišano sečnino in hipertrigliceridemijo. Ob prisotnem biliarnem pankreatitisu ugotovimo zvišanje jetrnih encimov, pri čemer so pogosto poleg serumskih aktivnosti ALT in AST sočasno zvišane tudi aktivnosti  $\gamma$ -GT in AF. Ob prisotni zapori žolčevoda ugotovimo tudi zvišano koncentracijo bilirubina v serumu. Hiperkalciemija in dinamika koncentracije C-reaktivnega proteina (CRP) predstavljata pomembna napovedna dejavnika pri bolnikih z akutnim pankreatitisom (2).

Napovedne dejavnike tveganja za razvoj težko potekajočega akutnega pankreatitisa skrbno spremljamo in ocenjujemo pri vsakem bolniku ob sprejemu ter 24 in 48 ur po sprejemu v bolnišnico. Za oceno napovednih dejavnikov tveganja so uporabni Ransonovi kazalniki, ki so navedeni v preglednici VI. Za oceno napovednih dejavnikov tveganja uporabljamo tudi kazalnike APACHE II, katerih bistvena prednost je njihova uporabnost za oceno stanja ves čas bolezni in ne samo prvih 48 ur. Več kot trije Ransonovi kazalniki v prvih 48 urah, več kot 8 točk točkovne lestvice APACHE II in odpoved posameznih organov so zgodnji znanilci hudega pankreatitisa (2). Glavna pomanjkljivost obeh navedenih kazalnikov je nesposobnost napovedi poteka hudega pankreatitisa v prvem dnevu. Iz tega razloga so proučevali številne druge kazalnike, med katerimi je bil najbolj uspešen TAP, ki ga določamo v urinu (2, 6). Pomemben in preprost kazalnik poteka hudega pankreatitisa, ki ga uporabljamo v vsakodnevni klinični praksi, je dinamika koncentracije CRP in sprememba hematokrita (2).

Preglednica VI: Ransonovi kazalniki (2).

PRI SPREJEMU V BOLNIŠNICO ALI OB DIAGNOSTICIRANJU BOLEZNI	PO 48 URAH
<ul style="list-style-type: none"> <li>• starost &gt; 55 let</li> <li>• levkociti &gt; <math>16 \times 10^9/L</math></li> <li>• serumska koncentracija glukoze &gt; 10 mmol/L</li> <li>• AST &gt; 2,0 <math>\mu</math>kat/L</li> <li>• LDH &gt; 5,83 <math>\mu</math>kat/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• padec hematokrita &gt; 10 %</li> <li>• porast sečnine &gt; 1,8 mmol/L kljub rehidraciji</li> <li>• serumska koncentracija Ca &lt; 2 mmol/L</li> <li>• <math>pO_2</math> &lt; 8 kPa</li> <li>• presežek baz &gt; 4 mmol/L</li> <li>• volumski deficit več kot 6 litrov tekočine</li> </ul>

#### **1.4.1.1 $\alpha$ -Amilaza**

$\alpha$ -Amilaza je normalno prisoten encim v plazmi z molekulkso maso 54 000 do 62 000 Da. Spada v razred hidrolaz in katalizira hidrolizo 1,4- $\alpha$ -glukozidne vezi v polisaharidih. Za optimalno aktivnost encima je potrebna prisotnost kalcijevih ionov, ki imajo vlogo kofaktorja. Encim zaradi svoje relativno majhne molekulske mase prehaja skozi glomerulno membrano in tako predstavlja edini plazemski encim, ki je normalno prisoten v urinu.  $\alpha$ -Amilaza je prisotna v številnih tkivih in telesnih tekočinah. Glede na njen izvor ločimo dve vrsti izoencimov, in sicer P izoencime, ki izvirajo iz trebušne slinavke ter S izoencime, katerih izvor so ustne slinavke. Posamezni izoencimi  $\alpha$ -amilaze so produkt številnih post-translacijskih modifikacij, ki vključujejo deamidacijo, glikozilacijo in deglikozilacijo (14).

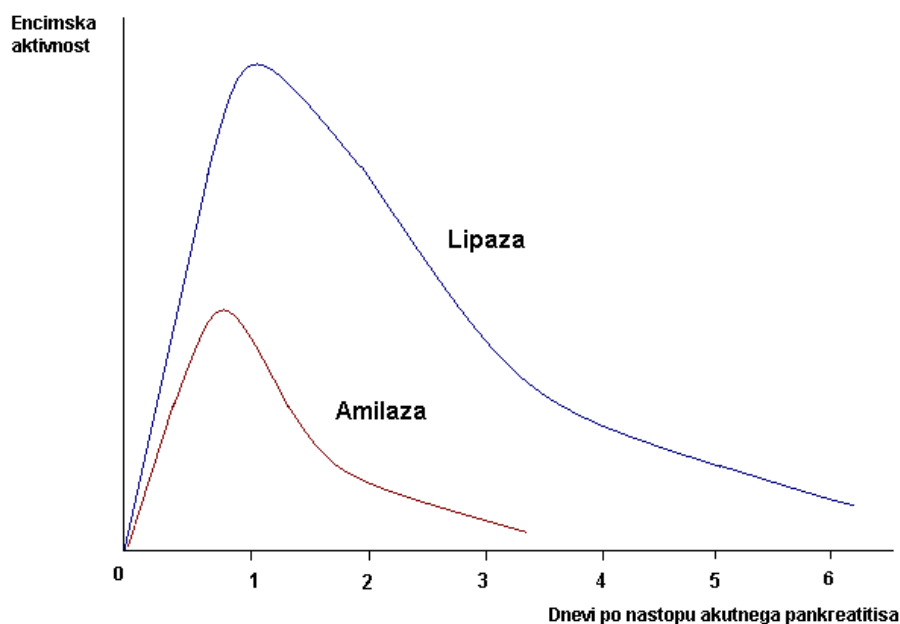
Določanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze predstavlja klasičen pristop v diagnostiki akutnega pankreatitisa. Po nastopu akutnega pankreatitisa se pojavi dvig aktivnosti  $\alpha$ -amilaze v 5 do 8 urah po nastopu prvih simptomov, povišane vrednosti pa se običajno vrnejo v referenčno območje tretji ali četrti dan. Zaradi prisotnosti različnih izoencimov lahko povišane aktivnosti  $\alpha$ -amilaze spremljajo številna obolenja v trebušni votlini in izven nje. Za pravilno interpretacijo rezultatov preiskave je pomembna tudi morebitna prisotnost makroamilazemije, ki se pojavlja pri 1 % populacije in označuje prisotnost kompleksov  $\alpha$ -amilaze z molekulami imunoglobulinov razreda IgG ali IgA v serumu. Selektivno določanje aktivnosti P izoencimov lahko izboljša specifičnost testa za diagnozo akutnega pankreatitisa, vendar pa predstavlja težavo v pozni diagnostiki bolezni zaradi zgodnje normalizacije serumskih aktivnosti. Rešitev za to predstavlja določanje  $\alpha$ -amilaze v urinu, kjer ostane encim zvišan dalj časa po nastopu akutnega pankreatitisa (14).

#### **1.4.1.2 Lipaza**

Pankreatična lipaza je enoverižni glikoprotein z molekulkso maso 48 000 Da, ki katalizira hidrolizo estrov glicerola z dolgoverižnimi maščobnimi kislinami. Velika večina lipaze v serumu izvira iz trebušne slinavke, saj je tam koncentracija encima 5000-krat večja kot v drugih tkivih. Poleg trebušne slinavke lipazo izločajo tudi sluznice želodca, črevesja in dihal. Molekula lipaze je dovolj majhna, da se prosto filtrira skozi glomerulno membrano, vendar pa se v ledvičnih tubulih popolnoma resorbira, kar v fizioloških pogojih onemogoča

njeno prisotnost v urinu. Raziskave kažejo, da se pankreatična lipaza nahaja v vsaj dveh izoformnih oblikah, vendar njune značilnosti še niso povsem znane (14).

Določanje aktivnosti lipaze v serumu je uporabno v diagnostiki akutnega pankreatitisa. Diagnostična občutljivost in specifičnost navedene preiskave znašata med 80 in 100 %. Po nastopu akutnega pankreatitisa se aktivnost serumske lipaze zviša v 4 do 8 urah, nato ostane zvišana še okrog 24 ur, medtem ko se v 7 do 14 dneh vrne na vrednost znotraj referenčnega območja. Prednost zvišane aktivnosti serumske lipaze v primerjavi z  $\alpha$ -amilazo kot biokemijskim označevalcem akutnega pankreatitisa je v daljšem diagnostičnem oknu, saj ostane zvišana dalj časa in tako omogoča tudi pozno diagnostiko bolezni. Zvišanje aktivnosti lipaze v serumu je tudi bolj specifično za diagnozo akutnega pankreatitisa v primerjavi z zvišano serumsko aktivnostjo  $\alpha$ -amilaze, kar je pomembno v diferencialni diagnostiki bolezni trebušnih organov s podobno klinično sliko (14).



Slika 2: Serumske aktivnosti lipaze in  $\alpha$ -amilaze v odvisnosti od časa po nastopu akutnega pankreatitisa.

## 1.5 KRONIČNI PANKREATITIS

Kronični pankreatitis je kronično vnetje trebušne slinavke, ki ga spremlja napredujoč in nepopravljiv propad žleznega tkiva s fibrozo, kronična bolečina ter izguba eksokrine in

endokrine funkcije žleze (2, 8). Prevalenca bolezni je ocenjena na 10 do 45 primerov na 100 000 prebivalcev in močno sovпада s stopnjo alkoholizma v posamezni državi, kar potrjuje dejstvo, da je prav alkoholizem najpogostejši vzrok kroničnega pankreatitisa v Evropi in ZDA. Najpogosteje zbole vajo moški v starosti od 35 do 55 let. Pri otrocih in mlajših odraslih je najpogostejši vzrok kroničnega pankreatitisa cistična fibroza (2, 8, 12).

Klasifikacija kroničnega pankreatitisa temelji na povezavi med etiologijo, stopnjo napredovanja bolezni in prognozo, kar so temeljne postavke klasifikacije M-ANNHEIM, ki je v veljavi od leta 2007. Ime klasifikacije izhaja iz začetnic posameznih dejavnikov, ki vplivajo na razvoj kroničnega pankreatitisa, pri čemer temelji na spoznanju, da je pri večini bolnikov kronični pankreatitis posledica medsebojnega delovanja več dejavnikov, kar predstavlja prva začetnica (*M-multiple*). Dejavniki so nato razdeljeni v skupine z začetnicami A (*alcohol*), N (*nicotine*), N (*nutrition*), H (*hereditary*), E (*effluent duct factors*), I (*immunological factors*) in M (*metabolic and miscellaneous factors*). Glede na klinično sliko in prisotno bolečino ter njeno jakost klasifikacija opredeljuje asimptomatski stadij 0 in štiri simptomatske stadije, kar je prikazano v preglednici VII (2).

Preglednica VII: M-ANNHEIM klasifikacija stadijev kroničnega pankreatitisa (2).

STADIJ	PODTIP STADIJA
0 – Asimptomatski kronični pankreatitis (subklinična slika)	a) naključna najdba (pri obdukciji) b) po enkratni epizodi akutnega pankreatitisa c) akutni pankreatitis z zapleti
I – Odsotna pankreatična insuficienca	a) rekurentni akutni pankreatitis b) rekurentna kronična bolečina v trebuhu c) Ia/Ib z zapleti
II – Delna pankreatična insuficienca	a) izolirana endokrina (ali eksokrina) insuficienca brez bolečine b) izolirana endokrina (ali eksokrina) insuficienca z bolečino c) IIa/b z zapleti
III – Popolna pankreatična insuficienca	a) eksokrina in endokrina insuficienca z bolečino, ki potrebuje analgetično terapijo b) IIIa z zapleti
IV – Končni stadij (izgorelost trebušne slinavke)	a) pankreatična insuficienca brez bolečine b) pankreatična insuficienca brez bolečine z zapleti



Poleg zgoraj navedenih stadijev klasifikacija M-ANNHEIM ob značilni klinični sliki opredeljuje tudi dokazan, verjeten in možen kronični pankreatitis (2).

### 1.5.1 Diagnostika kroničnega pankreatitisa

Diagnostika kroničnega pankreatitisa temelji na klinični sliki, laboratorijskih izvidih, slikovnih metodah in funkcionalnih testih. Na kronični pankreatitis je potrebno pomisliti pri vsakem bolniku, ki ima nepojasnjeno ponavljajočo se ali kronično bolečino v trebuhu. Pri telesnem pregledu bolnika običajno ne najdemo posebnosti. Zelo malo bolnikov ima klasičen trias bolečine, steatoreje in sladkorne bolezni, kar precej oteži diagnostični postopek (2).

Preglednica VIII: Preiskave pri kroničnem pankreatitisu.

LABORATORIJSKE PREISKAVE	SLIKOVNE PREISKAVE	FUNKCIONALNE PREISKAVE
<ul style="list-style-type: none"> <li>• hemogram</li> <li>• <math>\alpha</math>-amilaza</li> <li>• lipaza</li> <li>• jetrni testi: ALT, AST, bilirubin, AF, <math>\gamma</math>-GT</li> <li>• glukoza</li> <li>• elektroliti</li> <li>• avtoprotitelesa: ANA, ASMA, ACA II, ALA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RTG trebuha</li> <li>• UZ</li> <li>• CT</li> <li>• MR z MRCP</li> <li>• ERCP</li> <li>• EUZ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• direktni testi</li> <li>• indirektni testi</li> </ul>

Laboratorijske preiskave krvi so v večini primerov brez posebnosti. Tudi serumski aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze sta v večini primerov normalni. Pri 20 % bolnikov, ki imajo še dovolj žleznega tkiva, lahko ugotovimo rahlo zvišani aktivnosti encimov ob akutnem zagonu bolezni. Ob pritisku povečane glave trebušne slinavke na intrapankreatični del žolčnega izvodila lahko ugotovimo zvišanje celotnega bilirubina na račun direktnega bilirubina, zvišanje AF in jetrnih transaminaz. Zvišana serumska koncentracija glukoze na tešče napoveduje razvoj sladkorne bolezni zaradi propada endokrinega dela trebušne slinavke. Pri bolnikih, ki močno bruhamo in neustrezno nadomeščajo izgubljeno tekočino, se lahko pojavijo elektrolitske motnje in znaki dehidracije. V primeru avtoimunskega

kroničnega pankreatitisa ugotovimo povečano koncentracijo protiteles (predvsem IgG<sub>4</sub>) in prisotnost organsko nespecifičnih protiteles ANA in ASMA ter specifičnih protiteles ACA II in ALA (2).

V slikovni diagnostiki kroničnega pankreatitisa uporabljamo številne preiskave, ki vključujejo ultrazvočni pregled trebuha, pregledno rentgensko sliko trebuha, računalniško tomografijo, klasično magnetno resonanco in njeno različico MRCP, endoskopski ultrazvok in ERCP. Omenjene preiskave omogočajo prikaz značilnih morfoloških sprememb trebušne slinavke in okolnih struktur, prav tako pa omogočajo tudi sočasno izvedbo posegov (2, 15).

## **1.6 CELIAKIJA**

Celiakija je imunsko pogojeno vnetje tankega črevesja, ki prizadene predvsem jejunum, redkeje tudi ileum. Pojavlja se pri genetsko dovzetnih ljudeh kot posledica neustreznega T-celičnega imunskega odziva na gluten iz pšenice in glutenu podobne proteine, prisotne v ječmenu in rži. Danes jo prištevamo med avtoimunske bolezni s poznanim avtoantigenom, ki se imenuje tkivna transglutaminaza 2. Bolezen je poznana tudi pod drugimi imeni, kot sta netropska sprue in glutenska enteropatija (2, 8). Klinična slika pri celiakiji je precej raznolika in je odraz starosti bolnika, trajanja bolezni in obsega sprememb na črevesju. Simptomi so pri odraslih pogosto neznačilni, minimalni ali celo odsotni. Poglavitni simptom, vezan na prebavila, je diareja. Pogostejši so različni zunajčrevesni atipični simptomi in znaki celiakije, ki so posledica malabsorpcije hranil (2).

### **1.6.1 Celiakija in eksokrina insuficienca trebušne slinavke**

Povezava med celiakijo in EITS je bila v preteklosti predmet številnih raziskav. Rezultati so pokazali, da je pri 30 % bolnikov s celiakijo in prisotno diarejo vzrok za slednjo v EITS (16). Temeljni mehanizem, ki pojasnjuje navedeno povezavo, temelji na moteni stimulaciji trebušne slinavke, za kar so odgovorne okvare sluznice tankega črevesja. Za celiakijo značilne okvare sluznice tankega črevesja povzročijo zmanjšano sproščanje holecistokinina, kar posledično vodi v zmanjšano izločanje encimov trebušne slinavke. Posledica navedenega stanja je razvoj EITS s posledično diarejo. Omenjen mehanizem je pomemben pri bolnikih, ki imajo kljub upoštevanju brezglutenske diete prisotno diarejo (17, 18).

## **1.7 GASTREKTOMIJA**

Gastrektomija je operativna odstranitev celotnega želodca ali njegovega dela. Najpogostejše indikacije za gastrektomijo vključujejo rak želodca, krvavečo razjedo na želodcu, perforacijo stene želodca in prisotnost benignih novotvorb na želodcu. Pred izvedbo gastrektomije je potreben obsežen diagnostični postopek, s katerim potrdimo prisotnost in lokacijo patološke spremembe na želodcu. Glede na obseg odstranjenega tkiva želodca delimo gastrektomijo na delno ali subtotalno, pri čemer odstranimo le del želodca in totalno gastrektomijo, pri kateri odstranimo celoten želodec, pogosto tudi z okolnimi bezgavkami (19, 20).

### **1.7.1 Gastrektomija in eksokrina insuficienca trebušne slinavke**

EITS predstavlja pogost zaplet pri bolnikih po opravljeni delni ali totalni gastrektomiji. Pri teh bolnikih lahko ugotovimo zmanjšan volumen izločenega pankreatičnega soka ter zmanjšano količino izločenih encimov in bikarbonata po stimulaciji trebušne slinavke. Sočasno ugotovimo tudi znižane serumske koncentracije gastrina in pankreatičnega polipeptida ter zvišane koncentracije holecistokinina. Omenjene ugotovitve so posledica zmanjšane površine želodca po opravljeni gastrektomiji, kar privede do motene stimulacije eksokrinega dela trebušne slinavke po zaužitju hrane. Drug možen mehanizem EITS pri bolnikih po opravljeni gastrektomiji predstavlja povečana deaktivacija encimov trebušne slinavke, ki nastopi zaradi razrasti bakterij v prebavnem traktu. Navedeno stanje se pri bolnikih kaže z moteno prebavo posameznih hranil in izgubo telesne teže v obdobju po operaciji (11, 21).

## **1.8 DIAGNOSTIKA EKSOKRINE INSUFICIENCE TREBUŠNE SLINAVKE**

Funkcionalne preiskave za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke razdelimo na dve skupini, in sicer so to direktni in indirektni testi. Direktni testi sodijo med invazivne preiskave, pri katerih določamo funkcijo trebušne slinavke neposredno preko izločenega pankreatičnega soka oziroma njegovih komponent. Pri indirektnih testih določamo funkcijo trebušne slinavke na podlagi parametrov, ki so odvisni od te funkcije. Med takšne preiskave spada določanje vsebnosti maščob v 24 ali 72-urnem blatu, testi določanja vsebnosti kimotripsina in pankreatične elastaze v blatu, testi z določanjem produktov

encimsko kataliziranih reakcij v urinu po peroralni aplikaciji sinteznih substratov za pankreatične encime, s sekretinom spodbujena MRCP in različne izvedbe dihalnih testov (2, 8, 11, 22).

Preglednica IX: Direktni in indirektni testi za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke.

DIREKTNI TESTI	INDIREKTNI TESTI
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lundh-ov test</li> <li>• sekretinski test</li> <li>• sekretin-holecistokininski test</li> <li>• sekretin-ceruletidni test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• določanje maščob v blatu</li> <li>• kimotripsin v blatu</li> <li>• pankreatična elastaza v blatu</li> <li>• NBT-PABA</li> <li>• pankreolaurilni test</li> <li>• s sekretinom spodbujena MRCP</li> <li>• dihalni testi</li> </ul>

### 1.8.1 Pankreatična elastaza

Pankreatična elastaza, imenovana tudi elastaza-1, je specifična proteaza, ki je prisotna v pankreatičnem soku. Encim katalizira razgradnjo različnih proteinov, med katerimi je tudi elastin, po katerem je dobil svoje ime. V proteinih je primarno mesto cepitve peptidna vez med alaninom in poljubno aminokislino, pri čemer ima encim endopeptidazno aktivnost. Pankreatična elastaza nastaja iz proencima trebušne slinavke, imenovanega proelastaza-1, s pomočjo aktivacije pod vplivom tripsina. Njene koncentracije v blatu so pet do šestkrat večje v primerjavi s pankreatičnim sokom, kar je posledica njene odpornosti na razgradnjo v prebavnem traktu (8, 22).

Določanje pankreatične elastaze v blatu predstavlja pomemben pristop v diagnostiki motenj eksokrine funkcije trebušne slinavke. V primerjavi z drugimi diagnostičnimi testi dosega boljšo diagnostično občutljivost pri blažji obliki kroničnega pankreatitisa in visoko občutljivost ter negativno napovedno vrednost za razlikovanje med diarejo pankreatičnega izvora od ostalih vzrokov. V številnih raziskavah so dokazali visoko specifičnost in občutljivost za diagnostiko EITS, saj obe presegata 90 %. Negativen rezultat testa določanja pankreatične elastaze v blatu ne izključuje blagih oblik bolezni, medtem ko so lažno pozitivni rezultati lahko povezani s prisotnostjo nekaterih drugih bolezni, ki niso povezane s trebušno slinavko ali pa z določanjem vsebnosti encima v vzorcih tekočega blata. Navedeni interferenci se lahko izognemo z določitvijo pankreatične elastaze v

sušenih vzorcih blata. Lažno pozitivne rezultate testa so ugotovili pri bolnikih z laboratorijsko dokazanimi oblikami podhranjenosti, vnetnimi črevesnimi boleznimi in pri bolnikih s kronično diarejo nepankreatičnega vzroka. Prav tako so dokazali prisotnost lažno pozitivnih rezultatov pri bolnikih s prekomerno razrastjo bakterij v črevesju, za kar naj bi bila odgovorna povečana bakterijska proteolitična razgradnja encima (8, 11, 22).

### 1.8.2 Dihalni testi

Različne izvedbe dihalnih testov so pritegnile veliko pozornosti v diagnostiki bolezni prebavil. Pri tem predstavlja pomemben segment uporaba dihalnih testov za oceno intestinalne absorpcije maščob, ki predstavljajo neinvaziven diagnostični pristop z veliko stopnjo sprejemljivosti s strani bolnikov. Prva generacija dihalnih testov je temeljila na uporabi substratov, označenih z radioaktivnim izotopom  $^{14}\text{C}$ , ki ima zelo dolgo razpolovno dobo. Danes je v ospredju uporaba substratov, označenih s stabilnim in neradioaktivnim izotopom  $^{13}\text{C}$ , ki predstavlja okoli 1,11 % celotnega naravno prisotnega ogljika. V preglednici X so prikazani primeri nekaterih do sedaj razvitih dihalnih testov s  $^{13}\text{C}$  označenimi substrati in njihova uporaba (23).

Preglednica X: Primeri nekaterih dihalnih testov s  $^{13}\text{C}$  označenimi substrati in njihova uporaba (23).

$^{13}\text{C}$ OZNAČEN SUBSTRAT	UPORABA
$[^{13}\text{C}]$ glukoza, $[\delta^{13}\text{C}]$ glukoza	Proučevanje absorpcije in presnove glukoze
$[^{13}\text{C}]$ galaktoza, $[\delta^{13}\text{C}]$ galaktoza	Diagnostika jetrnih bolezni
$[^{13}\text{C}]$ ksiloza	Diagnostika prekomerne razrasti bakterij v črevesju
$[^{13}\text{C}]$ saharoza, $[\delta^{13}\text{C}]$ saharoza	Diagnostika pomanjkanja saharaze
$[^{13}\text{C}]$ laktoza, $[\delta^{13}\text{C}]$ laktoza	Diagnostika pomanjkanja laktaze
$[^{13}\text{C}]$ sečnina	Diagnostika okužb s <i>Helicobacter pylori</i>
$[^{13}\text{C}]$ acetati, $[^{13}\text{C}]$ oktanojska kislina	Ocena hitrosti praznjenja želodca
$[^{13}\text{C}]$ glikozil ureidi	Ocena časa prehoda skozi črevesje
$^{13}\text{C}$ označeni različni lipidi	Diagnostika malabsorpcije maščob

*Opomba:  $\delta$  pred  $^{13}\text{C}$  označuje substrat, ki je naravno bogat z izotopom  $^{13}\text{C}$ .*

$^{13}\text{C}$  dihalni testi temeljijo na določanju razmerja med  $^{13}\text{CO}_2$  in  $^{12}\text{CO}_2$  v izdihanem zraku po zaužitju obroka, hranila ali drugega z izotopom  $^{13}\text{C}$  označenega substrata. Izotop  $^{13}\text{C}$  je

prisoten v vseh živilih, pri čemer se njegovi deleži v posameznih živilih razlikujejo, zato je količina  $^{13}\text{CO}_2$  v izdihanem zraku odvisna od vrste zaužite hrane. Povprečen dnevni vnos  $^{13}\text{C}$  znaša 2 do 3 g, kar je bistveno več, kot preiskovanec zaužije pri preiskavi, saj ta odmerek znaša okrog 200 mg. Uporaba dihalnih testov s  $^{13}\text{C}$  označenimi substrati je možna tudi pri otrocih, nosečnicah in doječih materah, kar predstavlja veliko prednost pred dihalnimi testi prve generacije. Izmed vseh dihalnih testov je s strani ameriškega Urada za prehrano in zdravila (FDA) trenutno odobrena le uporaba dihalnega testa s  $^{13}\text{C}$  označeno sečnino za diagnostiko okužbe s *Helicobacter pylori* v prebavnem traktu (8, 22, 23, 24).

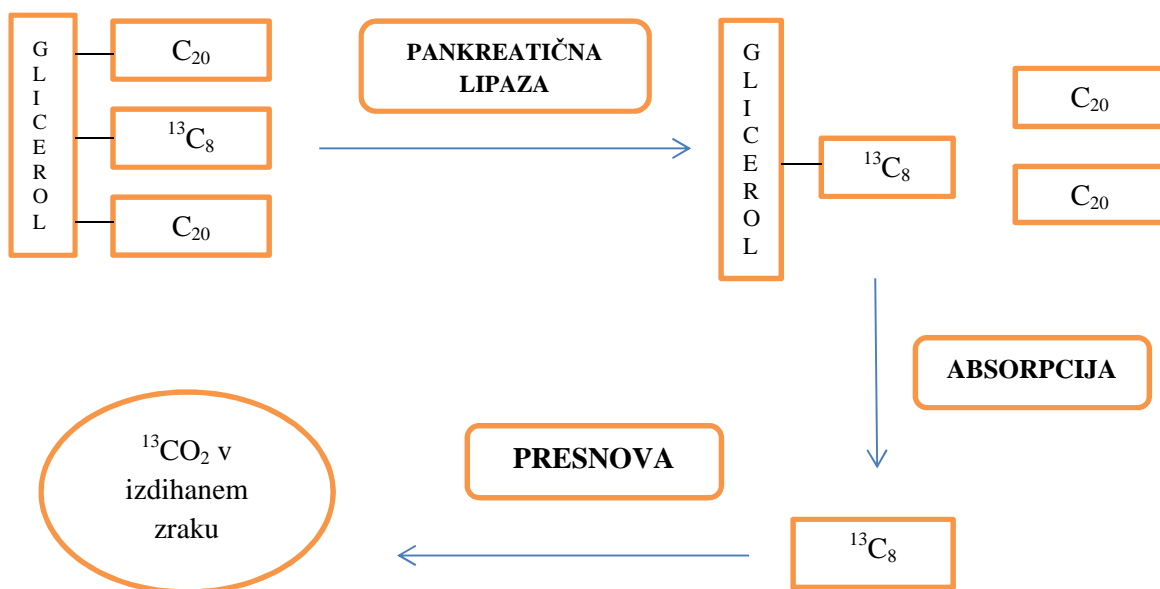
Izvedba dihalnih testov temelji na zaužitju označenega substrata s tekočim ali trdnim obrokom hrane. Sestavine testnega obroka upočasnijo praznjenje želodca in tako podaljšajo kontaktni čas označene snovi s preiskovanim encimom. Pri moteni eksokrini funkciji trebušne slinavke vodi pomanjkljivo izločanje encimov v zmanjšano absorpcijo posameznih hranil in posledično zmanjšan obseg njihove presnove. Z uporabo  $^{13}\text{C}$  označenih substratov za pankreatične encime tako lahko ugotavljamo zmanjšano aktivnost teh encimov preko zmanjšane deleža  $^{13}\text{CO}_2$  v izdihanem zraku glede na vsebnost  $^{13}\text{C}$  v zaužitem substratu. Specifičnost in občutljivost dihalnih testov za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke sta močno vezani na kompleksnost procesov absorpcije in presnove. Na rezultate dihalnih testov tako vplivajo številni fiziološki in patološki dejavniki, ki lahko precej otežijo interpretacijo rezultatov testa. Širšo klinično uporabo navedenih testov preprečuje tudi cena substratov, dolgotrajnost izvedbe in pomanjkljiva standardizacija dihalnih testov (8, 23, 24, 25). Izbira posameznega substrata je odvisna od encima trebušne slinavke, ki mu določamo aktivnost, pri čemer največjo občutljivost dosežemo pri lipidnih substratih (8, 23, 24, 26).

### **1.8.2.1 Dihalni testi z lipidnimi substrati**

Doslej so razvili številne vrste dihalnih testov za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke s pomočjo lipidnih substratov, označenih z izotopom  $^{13}\text{C}$ . Tovrstni testi temeljijo na zmanjšani aktivnosti lipaze v svetlini dvanajstnika, kar je posledica motenj v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Ključna prednost uporabe lipidnih substratov v dihalnih testih pred drugimi substrati je v zgodnejšem upadu aktivnosti lipaze v primerjavi z drugimi pankreatičnimi encimi ob prisotnosti bolezni trebušne slinavke, kar prinaša boljšo

diagnostično občutljivost metode. Dihalni testi s  $^{13}\text{C}$  označenimi lipidnimi substrati so uporabni tudi pri spremljanju zdravljenja z nadomestki encimov trebušne slinavke (23, 26).

Dihalni test s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom predstavlja najpomembnejši pristop za oceno aktivnosti lipaze v svetlini dvanajstnika. Njegov princip je prikazan na sliki 2. Sintezni substrat za ta test je 1,3-distearil-2-(karboksi- $^{13}\text{C}$ )oktanoil glicerol, ki vsebuje dolgoverižni stearoilni skupini na mestih 1 in 3, medtem ko je na mestu 2 prisotna s  $^{13}\text{C}$  označena srednjeverižna oktanoilna skupina. Označen substrat apliciramo bolniku peroralno na tešče skupaj s standardnim obrokom. Vzorce izdihanega zraka nato zbiramo 6 ur in v njih določamo količino  $^{13}\text{CO}_2$  s pomočjo masne spektrometrije. Kot pri vseh dihalnih testih, je tudi v tem primeru potrebna določitev bazne linije, ki jo izvedemo z meritvijo  $^{13}\text{CO}_2$  v izdihanem zraku pred aplikacijo označenega substrata. Rezultat dihalnega testa podamo kot odstotek izločenega  $^{13}\text{C}$  v izdihanem zraku ob določenem času vzorčenja ali kot odstotek kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v merjenem času. Po aplikaciji substrata poteče encimska hidroliza stearoilnih skupin na mestih 1 in 3 v molekuli pred absorpcijo in metabolizmom  $^{13}\text{C}$ -oktanoata ali  $^{13}\text{C}$ -oktanoil monoglicerida. Zmanjšana aktivnost pankreatične lipaze tako vodi v zmanjšan obseg absorpcije  $^{13}\text{C}$  označenega substrata in posledično manjši nastanek  $^{13}\text{CO}_2$  (8, 22, 23, 27).



Slika 3: Shematsko predstavljen princip dihalnega testa s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom.

Ostale izvedbe dihalnih testov z označenimi lipidnimi substrati vključujejo uporabo trioktanoina, trioleina, tripalmitina, holesteril oktanoata in hioleina. Omenjene substrate so uporabili v posameznih raziskavah z namenom zmanjšanja prisotnih interferenc v procesu absorpcije lipidov in posledično izboljšanja diagnostične uporabnosti, ki je bila ugotovljena pri testih s trigliceridnimi substrati (22).

Ključno težavo pri vseh dihalnih testih za diagnostiko EITS predstavlja vpletenost številnih dejavnikov v izločanje izotopa  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom. Slednje je pri dihalnih testih z lipidnimi substrati v veliki meri odvisno tudi od hitrosti praznjenja želodca, absorpcije maščob v črevesju, enterohepatičnega kroženja žolčnih kislin, presnovnih procesov, nastajanja endogenega  $^{13}\text{CO}_2$  ter pljučne funkcije. Upočasnjena hitrost praznjenja želodca vodi v posledično upočasnjeno prebavo in absorpcijo substrata ter izločanje  $^{13}\text{C}$ . Različne motnje v absorpciji maščob, enterohepatičnem kroženju žolčnih kislin in presnovnih procesih prav tako lahko vplivajo na upočasnjeno izločanje izotopa. Vključevanje  $^{13}\text{C}$  v alternativne presnovne poti lahko vodi do zmanjšane izločanja  $^{13}\text{CO}_2$  z izdihanim zrakom. Nastajanje endogenega  $^{13}\text{CO}_2$  je v veliki meri odvisno od prehrane posameznika, kar zahteva skrbno interpretacijo rezultatov dihalnega testa. Različne motnje v pljučni funkciji lahko privedejo do upočasnjenega ali pospešenega izločanja  $^{13}\text{CO}_2$ . Pri interpretaciji rezultatov dihalnih testov je potrebno upoštevati vplive vseh navedenih dejavnikov na izločanje  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom, s čimer se izognemo napačnemu vrednotenju rezultatov testa (8, 22, 27).

#### **1.8.2.2 Dihalni testi z drugimi substrati**

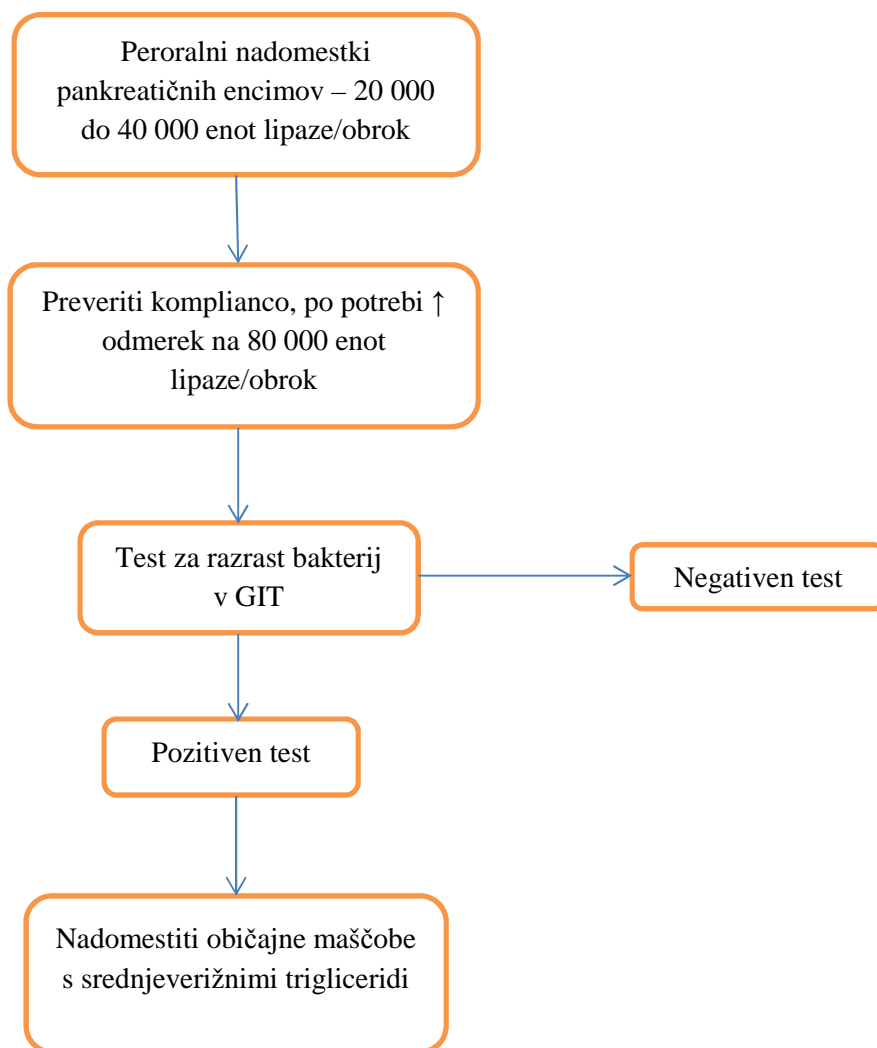
V literaturi je opisana tudi uporaba dihalnih testov z drugimi substrati, vendar ti dosegajo slabo občutljivost in specifičnost. Primer takšnega testa predstavlja dihalni test s škrobnim substratom, ki dosega slabo specifičnost zaradi začetka prebave škroba že v ustni votlini in prav tako slabo občutljivost, saj je zmanjšanje izločanja pankreatične  $\alpha$ -amilaze izraženo šele pri napredovalih stopnjah okvar eksokrine funkcije trebušne slinavke (28). Slabo specifičnost dosegajo tudi izvedbe dihalnih testov s peptidnimi substrati, vendar pa na tem področju veliko obeta uporaba dipeptida benzoil-L-tirozil[1- $^{13}\text{C}$ ]alanin, ki ga specifično cepi le pankreatična karboksipeptidaza (29).



## 1.9 ZDRAVLJENJE EKSOKRINE INSUFICIENCE TREBUŠNE SLINAVKE

Osnovno vodilo pri obravnavi bolnika z motnjo v eksokrini funkciji trebušne slinavke predstavlja stopnja izraženosti omenjene motnje in osnovna bolezen, ki je do te motnje privedla. Iz tega razloga je zdravljenje bolnikov z navedenimi motnjami zelo individualno ter tako usmerjeno k vsakemu bolniku posamezno in njegovim težavam. Možnosti zdravljenja EITS obsegajo tako prehranske ukrepe, kakor tudi zdravljenje z nadomestki encimov trebušne slinavke, kar je odvisno od stopnje okvare. Prehranska priporočila vključujejo prehrano z visoko vsebnostjo energentov, proteinov in ogljikovih hidratov ter manjšo vsebnostjo maščob pretežno rastlinskega izvora. Priporočeno je tudi postopno uvajanje srednjeverzičnih trigliceridov v obliki prehranskih dodatkov oziroma živil za posebne medicinske namene, ki jih bolniki zaužijejo v 5 do 7 manjših obrokih dnevno. Omenjeni trigliceridi so lažje in hitreje prebavljivi ter se bolj učinkovito absorbirajo (11, 30, 31).

Pri zdravljenju težjih oblik EITS so poleg zgoraj omenjenih začetnih ukrepov pomembni tudi nadomestki encimov trebušne slinavke. Omenjena zdravila vsebujejo uprašeno trebušno slinavko prašičjega izvora, v kateri so prisotni encimi  $\alpha$ -amilaza, lipaza in proteolitični encimi. V Sloveniji je registrirano zdravilo z odmerki lipaze 10 000, 25 000 in 40 000 enot lipaze po Evropski farmakopeji (32). Algoritem uvajanja nadomestkov pankreatičnih encimov je prikazan na sliki 3. Odmerki zdravila so prilagojeni vsebnosti maščob v posameznem obroku in po priporočilih naj ne bi bili nižji od 20 000 do 40 000 enot lipaze na obrok. Pri zdravljenju EITS z nadomestki encimov je prednostna uporaba farmacevtskih oblik z gastrozistentno oblogo, saj želodčna kislina povzroči deaktivacijo lipaze. V primeru uporabe farmacevtskih oblik brez gastrozistentne obloge je potrebno kombiniranje zdravila z inhibitorjem protonske črpalke, ki zmanjša nastajanje želodčne kisline in s tem omogoči stabilnost lipaze v želodcu. Kombinacija z inhibitorjem protonske črpalke je upravičena tudi v primerih, kadar kljub uporabi nadomestkov encimov trebušne slinavke z gastrozistentno oblogo ne dosežemo želenih učinkov. Glede na klinično sliko ali ob dokazanem pomanjkanju je potrebno tudi nadomeščanje vitaminov A, D, E, K in B<sub>12</sub>. Pri kroničnem pankreatitisu je ključno tudi zdravljenje bolečine (11, 30, 31).



Slika 4: Algoritem uvajanja nadomestkov pankreatičnih encimov (31).

## **2. NAMEN DELA**

Dihalni testi s  $^{13}\text{C}$  označenimi trigliceridnimi substrati predstavljajo nov potencialen diagnostični pristop pri obravnavi bolnikov z motnjami v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Pri diagnostiki in spremljanju zdravljenja bolnikov s tovrstnimi motnjami je imelo v dosedanji klinični praksi ključno vlogo določanje vsebnosti pankreatične elastaze v blatu. Omenjena preiskava ostaja v ospredju obravnave teh bolnikov tudi danes, saj jo odlikujeta preprosta izvedba in visoka diagnostična občutljivost, vendar ima ključne pomanjkljivosti povezane s težavnim odvzemom vzorca in posledično slabšo sprejemljivostjo s strani bolnikov ter možnostjo prisotnosti lažno pozitivnih ali negativnih rezultatov testa v določenih kliničnih situacijah. Dihalni testi pri tem predstavljajo konkurenčen pristop, saj bi z njimi lahko odpravili številne pomanjkljivosti trenutno uveljavljenih diagnostičnih metod. S tem namenom bomo v diplomski nalogi ovrednotili rezultate dihalnega testa pri petih skupinah preiskovancev in jih primerjali z rezultati uveljavljenih preiskav na področju motenj v eksokrini funkciji trebušne slinavke ter patoloških stanj, ki so s tovrstnimi motnjami povezana. Pri tem želimo odgovoriti na ključno vprašanje, ki se pojavlja v zvezi z uporabnostjo dihalnega testa kot potencialne metode za diagnostiko EITS in na podlagi katerega smo oblikovali delovno hipotezo.

### **Hipoteza**

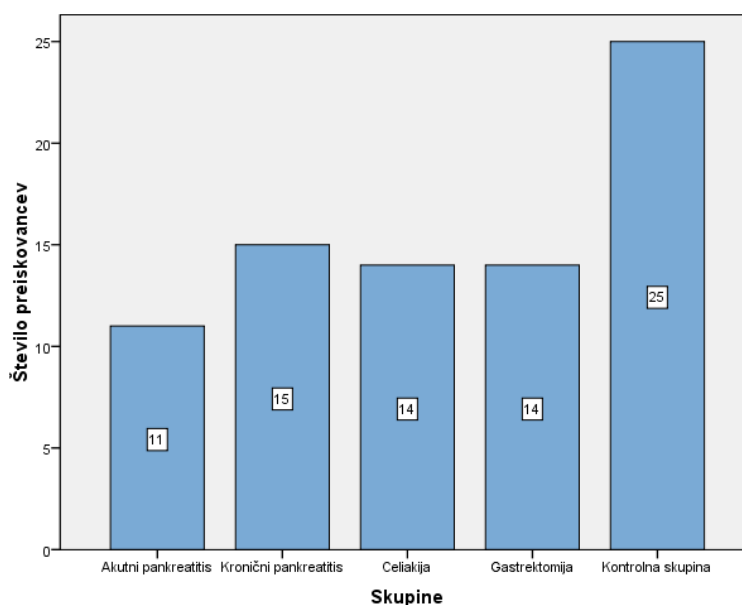
Dihalni test s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom predstavlja uporaben pristop v diagnostiki EITS in posledično ponuja alternativo trenutno uveljavljenim diagnostičnim testom na tem področju.

### 3. MATERIALI IN METODE

V okviru raziskave smo pri preiskovancih določili serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze, vsebnosti pankreatične elastaze v vzorcih blata ter odstotke kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v šestih urah po zaužitju testnega obroka. Vse meritve smo opravili v laboratorijih Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pridobljene podatke smo v nadaljevanju tudi statistično ovrednotili.

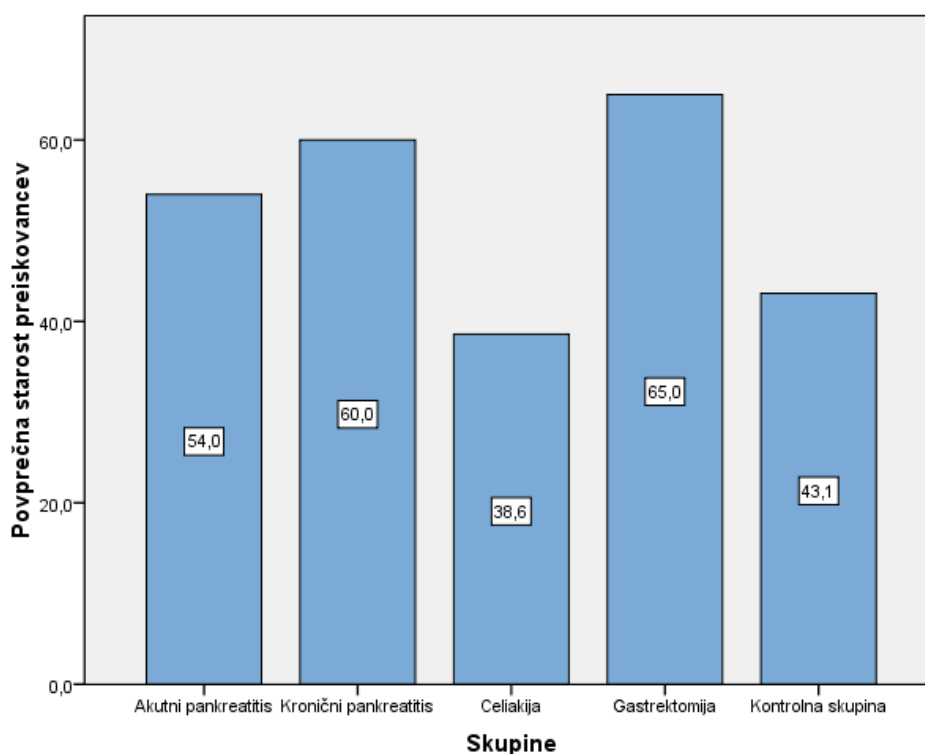
#### 3.1 PREDSTAVITEV PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 79 preiskovancev, med katerimi je bilo 54 v obdobju med januarjem in julijem 2012 obravnavanih v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana zaradi suma na prisotnost EITS. Preiskovance smo razvrstili v 5 skupin glede na prisotnost ali odsotnost posameznih bolezenskih stanj, ki jih spremljajo motnje v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Največjo skupino predstavljajo preiskovanci v kontrolni skupini, ki jih je 25. Pogoji za vključitev preiskovancev v kontrolno skupino so bili odsotnost EITS, potrjena z rezultati določanja vsebnosti pankreatične elastaze v blatu, ki so znotraj referenčnega intervala in odsotnost bolezni ter stanj, ki so lahko povezane z razvojem EITS. V skupino bolnikov z akutnim pankreatitisom smo uvrstili 11 bolnikov, 15 v skupino bolnikov s kroničnim pankreatitisom ter 14 v skupini bolnikov s celiakijo in po opravljeni gastrektomiji. Število preiskovancev v posameznih skupinah prikazuje graf 2.



Graf 1: Prikaz števila preiskovancev v posameznih skupinah.

Najvišjo povprečno starost preiskovancev ugotovimo v skupini bolnikov po opravljeni gastrektomiji (65,0 let), medtem ko je glede na epidemiološke značilnosti bolezni pričakovano najnižja povprečna starost preiskovancev v skupini bolnikov s celiakijo (38,6 let). V skupini bolnikov z akutnim pankreatitisom znaša povprečna starost 54,0 let, v skupini bolnikov s kroničnim pankreatitisom 60,0 let in v kontrolni skupini 43,1 leto. Povprečne starosti preiskovancev v posameznih skupinah prikazuje graf 3, medtem ko so v preglednici XI prikazane starosti najmlajših in najstarejših preiskovancev v posameznih skupinah.



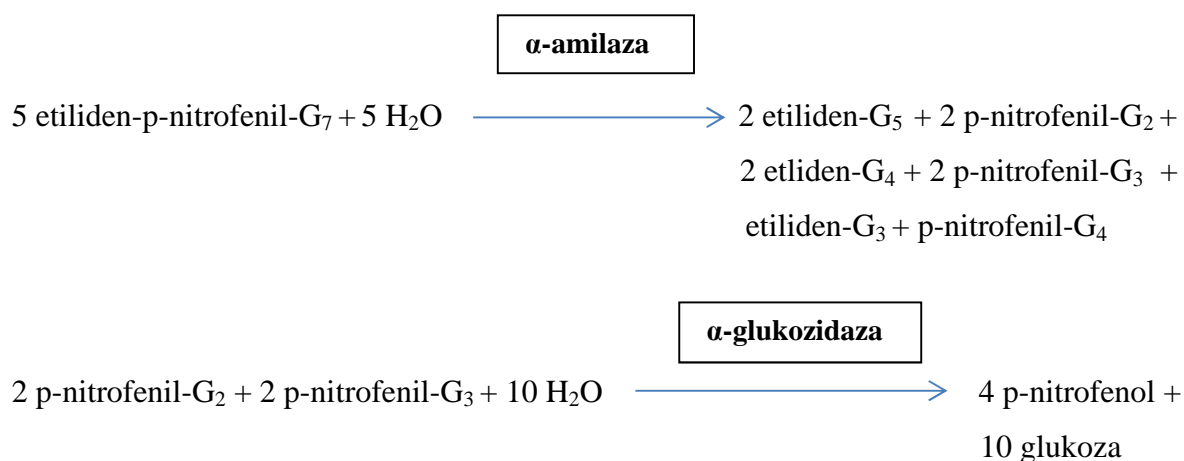
Graf 2: Prikaz povprečnih starosti preiskovancev v posameznih skupinah.

Preglednica XI: Prikaz starosti (v letih) najstarejših in najmlajših preiskovancev v posameznih skupinah.

	Akutni pankreatitis	Kronični pankreatitis	Celiakija	Gastrektomija	Kontrolna skupina
Najstarejši preiskovanec	87	76	65	84	68
Najmlajši preiskovanec	21	49	17	41	22

### 3.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -AMILAZE V SERUMU

Za določanje serumskih aktivnosti  $\alpha$ -amilaze smo preiskovancem odvzeli 5 mL venske krvi v standardno epruveto brez dodatkov (rdeč zamašek). Iz pridobljenih vzorcev venske krvi smo nato pripravili vzorce seruma, pri čemer je najmanjša potrebna količina seruma za analizo 250  $\mu$ L. Pri določanju aktivnosti  $\alpha$ -amilaze v serumu smo predhodno izvedli popolno inhibicijo S izoencimov s pomočjo dveh vrst monoklonskih protiteles. Nato smo izvedli določitev aktivnosti P izoencimov s pomočjo dveh reakcij, ki ju katalizirata različna encima. Princip omenjene metode temelji na encimsko-barvnem testu s p-nitrofenolom, ki je shematsko prikazan na sliki 4. Pri tem kot substrat  $\alpha$ -amilaze uporabimo maltoheptaozo, ki je dodatno označena s p-nitrofenilno skupino. Po hidrolizi substrata, ki jo katalizira  $\alpha$ -amilaza, nastanejo krajši glukozni polimeri, označeni s p-nitrofenilno skupino, ki nato vstopijo v indikatorsko reakcijo. V indikatorski reakciji encim  $\alpha$ -glukozidaza katalizira hidrolizo označenih produktov primarne reakcije, pri čemer nastanejo molekule p-nitrofenola in glukoze. Aktivnost  $\alpha$ -amilaze v vzorcu je premosorazmerna količini nastalega p-nitrofenola v indikatorski reakciji, katerega absorbanco merimo pri 405 nm. Na molekulo substrata je poleg p-nitrofenilne skupine vezana tudi etilidenska skupina, ki substrat zaščiti pred hidrolizo z  $\alpha$ -glukozidazo. S tem je v prvi stopnji zagotovljena selektivna hidroliza uporabljenega substrata z  $\alpha$ -amilazo iz vzorca. Opisana metoda določanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze z maltoheptaoznim substratom je standardizirana pri 37 °C in predstavlja priporočeno referenčno metodo s strani IFCC (14).



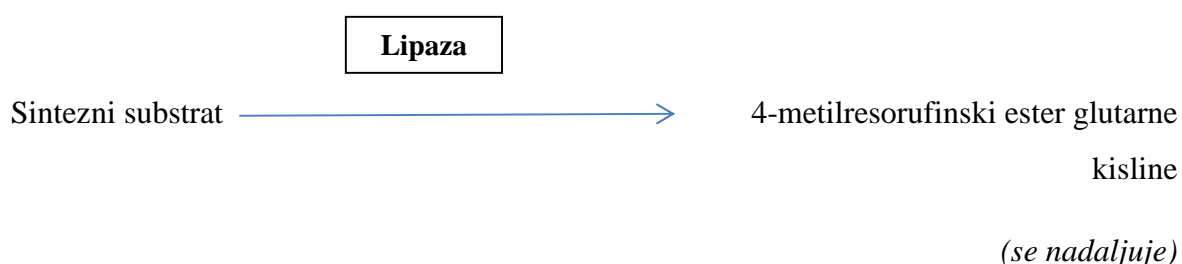
Slika 5: Reakcijska shema določanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze v serumu.

Določitev serumskih aktivnosti  $\alpha$ -amilaze moti prisotnost antikoagulantov, ki kelirajo kalcijeve ione (oksalati, citrati, EDTA). Poznane so tudi interference v primeru ikteričnih vzorcev ( $> 60$  mg/dL bilirubina), hemolize ( $> 500$  mg/dL hemoglobina), lipemije ( $> 30$  g/L trigliceridov), koncentracij glukoze nad 2 g/L in askorbinske kisline nad 1 g/dL. Vzorci seruma so stabilni dva dni pri 20 do 25 °C in 10 dni pri 2 do 8 °C (14, 33).

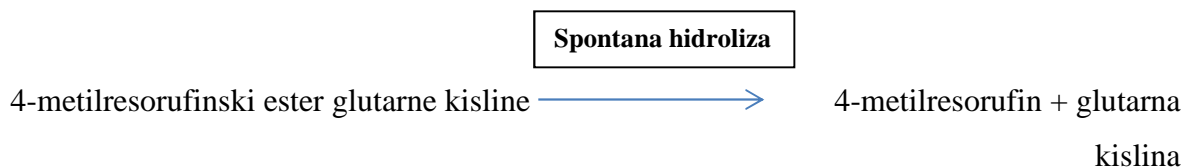
Pri določanju serumskih aktivnosti  $\alpha$ -amilaze smo uporabili regent AMYL IFCC liquid, raztopino kalibratorja C.f.a.s. in kontrolni raztopini PreciNorm U (QCS) ter PreciPath U (QCS) proizvajalca Roche diagnostics. Meritve smo opravili na analizatorjih Roche/Hitachi 917 in Roche/Hitachi Modular. Rezultate meritev podamo v  $\mu$ kat/L seruma. Linearno območje metode obsega interval od 0 do 87,5  $\mu$ kat/L. Merilna negotovost metode znaša 0,00581  $\mu$ kat/L. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle preiskovance in vzorce seruma znašajo od 0,47 do 1,67  $\mu$ kat/L (14, 34).

### 3.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI LIPAZE V SERUMU

Za določanje serumskih aktivnosti lipaze smo preiskovancem odvzeli 5 mL venske krvi v standardno epruveto brez dodatkov (rdeč zamašek). Iz pridobljenih vzorcev venske krvi smo nato pripravili vzorce seruma, pri čemer je najmanjša potrebna količina seruma za analizo 250  $\mu$ L. Določanje aktivnosti lipaze v serumih preiskovancev smo izvedli s pomočjo encimsko-kolorimetrične metode, ki temelji na uporabi sinteznega substrata 4-metilresorufinskega estera 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-glutarne kisline. Po encimski hidrolizi omenjenega substrata v alkalnem mediju, ki jo katalizira lipaza iz vzorca seruma, nastane nestabilen 4-metilresorufinski ester glutarne kisline, ki dalje spontano hidrolizira do glutarne kisline in 4-metilresorufina. Slednji vsebuje modro obarvan kromofor z absorpcijskim maksimumom pri 580 nm. Izmerjena absorbanca obarvanega produkta je premosorazmerna aktivnosti lipaze v vzorcu. Omenjena metoda je standardizirana pri 37 °C (14). Njen princip je shematsko prikazan na sliki 5.



(nadaljevanje)



Slika 6: Reakcijska shema določanja aktivnosti lipaze v serumu.

Pri določanju serumskih aktivnosti lipaze so poznane interference v primeru ikteričnih vzorcev ( $> 60$  mg/dL bilirubina), hemolize ( $> 500$  mg/dL hemoglobina), lipemije ( $> 22,8$  mmol/L trigliceridov) in uporabe nekaterih antikoagulantov, ki inhibirajo lipazo (oksalati, citrati, EDTA, fluoridi). Vzorci seruma so stabilni 7 dni pri 15 do 25 °C in 2 do 8 °C ter 1 leto pri -15 do -6 °C (14, 33).

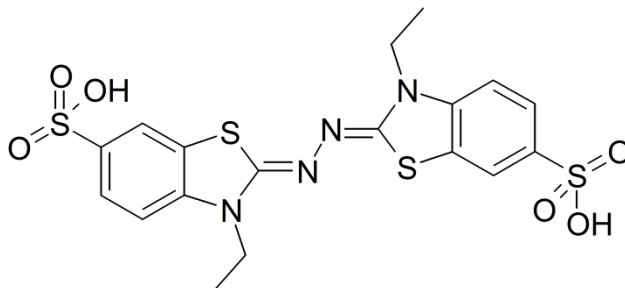
Za določanje aktivnosti lipaze v serumu smo uporabili reagent Lipase colorimetric assay, raztopino kalibratorja C.f.a.s. in kontrolni raztopini PreciNorm U (QCS) ter PreciPath U (QCS) proizvajalca Roche diagnostics. Meritve smo opravili na analizatorjih Roche/Hitachi 917 in Roche/Hitachi Modular. Rezultate meritev podamo v  $\mu$ kat/L seruma. Linearno območje metode obsega interval od 0,05 do 5,00  $\mu$ kat/L. Merilna negotovost metode znaša 0,0237  $\mu$ kat/L. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle in vzorce seruma znašajo od 0,22 do 1,00  $\mu$ kat/L (14, 34).

### **3.4 DOLOČANJE PANKREATIČNE ELASTAZE V BLATU**

Za določanje pankreatične elastaze odda preiskovanec 1 vzorec blata po spontanem iztrebljanju. Nekaj dni pred odvzemom vzorca blata ne sme uživati odvajal ali sredstev proti diareji. Vzorec odvzame z žličko, ki je nameščena v pokrovu posodice za blato tako, da zajame blato iz globine iztrebka (35). Določanje pankreatične elastaze v blatu smo izvedli s pomočjo imunokemijske metode ELISA z dvojnimi monoklonskimi protitelesi proti različnim epitopoma človeške pankreatične elastaze. Reakcija poteka na mikrotitrski plošči z vezanimi protitelesi proti pankreatični elastazi. V naslednji stopnji poteče vezava pankreatične elastaze iz vzorca in standardov na omenjena protitelesa. Med inkubacijo nato poteče vezava z biotinom označenega protitelesa proti pankreatični elastazi na imobiliziran encim iz vzorca in standardov ter vezava s streptavidinom označene peroksidaze na omenjeno sekundarno protitelo. Sledi dodatek substrata ABTS (slika 6), iz katerega



nastane zeleno obarvan produkt po oksidaciji s peroksidazo. Izmerjena absorbanca zeleno obarvanega produkta je premosorazmerna koncentraciji pankreatične elastaze v ekstraktu blata (8, 36).



Slika 7: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) – ABTS.

Pri določanju pankreatične elastaze v blatu smo uporabili naslednje reagente:

- mikrotitrna ploščica z vezanimi monoklonskimi protitelesi proti pankreatični elastazi,
- ekstrakcijski pufer (fosfatni pufer + NaCl + detergent; pH = 7,2),
- pufer za spiranje,
- z biotinom označena monoklonska protitelesa proti pankreatični elastazi + s streptavidinom označena peroksidaza,
- raztopina substrata (ABTS),
- alkalna raztopina STOP reagenta,
- vrečka s sušilnim sredstvom.

Poleg navedenih reagentov smo uporabili tudi raztopine standardov s 15, 50, 150 in 500  $\mu\text{g/g}$  pankreatične elastaze ter kontrolno raztopino. Prav tako smo uporabili naslednji material:

- plastične epruvete za ekstrakcijo vzorca,
- plastične epruvete za razredčitev vzorca,
- pipete,
- 500 mL bučka za pripravo pufrov.

Meritve smo opravili na spektrofotometru SLT-spectra (Lab. Instruments) s filtrom 405 nm.

Vzorec pripravimo tako, da ga zajamemo s pomočjo plastične paličice, ki je priložena epruveti za ekstrakcijo, ga naneseemo v vdolbino spodnjega pokrovčka epruvete in zravnamo površino. Skozi zgornjo odprtino dodamo 10 mL ekstrakcijskega pufru in epruveto zapremo. Vzorce večkrat močno premešamo na mešalcu in po najmanj 5 min usedanja odvzamemo alikvot in pričnemo z redčenjem. Slednje izvedemo tako, da 10  $\mu$ L ekstrakta vzorca dodamo 2,5 mL pufru za spiranje.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice pipetiramo 50  $\mu$ L pufru za spiranje (slepa raztopina), standardov, kontrole in vzorcev. Sledi 30 min inkubacije pri sobni temperaturi, nato vsebino vdolbinic zavržemo in vsako speremo s 3-krat po 250  $\mu$ L pufru za spiranje. Nato v vsako vdolbinico pipetiramo 50  $\mu$ L reagenta, ki vsebuje z biotinom označena monoklonska protitelesa proti pankreatični elastazi in s streptavidinom označeno peroksidazo. Sledi 15 min inkubacije pri sobni temperaturi in zaščiteno pred svetlobo, nato vsebino vdolbinic zavržemo in ponovno vsako speremo po zgoraj opisanem postopku. V nadaljevanju pipetiramo 100  $\mu$ L substrata v vsako vdolbinico in nato mikrotitrsko ploščico inkubiramo 15 min pri sobni temperaturi ob stresanju in zaščiteno pred svetlobo. Nato v vsako vdolbinico pipetiramo 100  $\mu$ L raztopine STOP reagenta, previdno stresamo in po 5 do 30 min izmerimo absorbanco pri 405 nm. Rezultate podamo v  $\mu$ g pankreatične elastaze na g blata. Meja detekcije znaša 15  $\mu$ g/g, ponovljivost v seriji 5,8 % ( $n = 20$ ) in med serijami (10 zaporednih dni) 7,6 %. Referenčno območje predstavljajo vrednosti nad 200  $\mu$ g/g blata (36).

### **3.5 DIHALNI TEST**

Za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke smo v raziskavi uporabili dihalni test s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom, ki temelji na odvisnosti količine izdihanega  $^{13}\text{CO}_2$  od aktivnosti pankreatične lipaze v dvanajstniku. Pri tem smo uporabili sintezni substrat 1,3-distearil-2-(karboksi- $^{13}\text{C}$ )oktanoil glicerol v obliki praška, ki smo ga primešali čokoladni kremi in dodali testnemu obroku. Po zaužitju substrata pankreatična lipaza v dvanajstniku cepi estrsko vez med glicerolom in verigama stearinske kisline na mestih 1 in 3. Ob tem se sprostijo monogliceridi z označeno oktanoilno verigo na mestu 2, ki se absorbirajo v tankem črevesju in nato v obliki na novo sintetiziranih trigliceridov, vključenih v hilomikrone, vstopajo v krvni obtok. Po delovanju lipoprotein-lipaze molekule  $^{13}\text{C}$ -označene oktanojske kisline vstopajo v celične mitohondrije, kjer poteče njihov metabolizem. Produkt slednjega je  $^{13}\text{CO}_2$ , ki se v različnih oblikah prenaša do pljuč, kjer

prestopa alveolo-kapilarne membrane in se tako izloči v izdihan zrak (37). Princip uporabljenega dihalnega testa je prikazan na sliki 2 v uvodnem poglavju. Referenčna meja kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v 6 urah po aplikaciji testnega obroka znaša 22 %. Vrednosti pod to mejo nakazujejo na prisotnost EITS (38). Löser je s sodelavci ugotovil, da uporabljen dihalni test izkazuje 85 % specifičnost in 62 % občutljivost v primeru blage EITS, do 100 % občutljivost v primeru hude EITS in celokupno 81 % občutljivost za diagnostiko EITS (27).

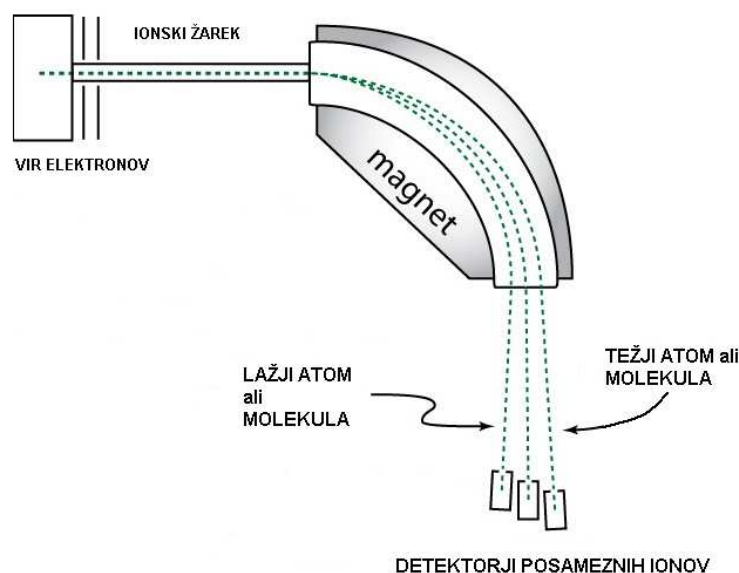
Pred izvedbo dihalnega testa mora biti preiskovanec tešč 12 ur. Najbolj optimalno je, da dihalni test opravimo zjutraj po tem, ko je bil preiskovanec čez noč tešč. Med izvedbo dihalnega testa mora preiskovanec mirovati in ne sme kaditi, s čimer se izognemo hiperventilaciji, ki bi lahko vodila do napačne interpretacije rezultatov testa. Med izvedbo testa prav tako ne sme zaužiti hrane, pije pa lahko le negazirano vodo. Vsaka zaužita hrana ali pijača, ki vsebuje raztopljen  $\text{CO}_2$ , lahko vodi do sprememb v količini izdihanega ogljikovega dioksida in s tem do napačnih interpretacij rezultatov testa. Najmanj teden dni pred izvedbo dihalnega testa mora preiskovanec prenehati z jemanjem zdravil, ki bi lahko vplivala na rezultate testov. Ob potrebi ponovitvi testa lahko tega izvedemo šele naslednji dan. Vsa navedena navodila je potrebno natančno upoštevati, saj lahko vsaka nedoslednost pri izvedbi testa vodi do lažno pozitivnih ali negativnih rezultatov (37, 38).

Prvi odvzem vzorca izdihanega zraka smo opravili pred zaužitjem testnega obroka in je bil namenjen določitvi bazne linije, ki predstavlja naravno prisoten  $^{13}\text{CO}_2$  v izdihanem zraku. Po odvzemu prvega vzorca je sledilo zaužitje standardiziranega testnega obroka, ki ga sestavlja 10 g čokoladne kreme z 200 mg primešanega substrata, 100 g kruha in 15 g masla. Preiskovanci so lahko skupaj s testnim obrokom zaužili 150 mL kave, čaja ali vode. Po zaužitju testnega obroka je sledil odvzem 10 vzorcev izdihanega zraka ob času 30, 60, 90, 120, 210, 240, 270, 300, 330 in 360 min po zaužitju testnega obroka. Pri odvzemu vzorcev so preiskovanci pihnilo skozi slamico v epruvete toliko zraka, da so se te orosile. Epruvete smo nato takoj zamašili.

### **3.5.1 Analiza vzorcev izdihanega zraka**

Izotopsko sestavo vzorcev izdihanega zraka smo določali s pomočjo masnega spektrometra za analitiko stabilnih izotopov (IRMS). Pri tem smo uporabili masni spektrometer AP 2003, Analytical precision, ki deluje po principu kontinuiranega pretoka, kar omogoča

neposredno sklopitev masnega spektrometra s plinskim kromatografom. Pred analizo vzorca poteče v plinskem kromatografu ločitev CO<sub>2</sub> od ostalih komponent v vzorcu. Po omenjeni pripravi vzorca prehaja izoliran CO<sub>2</sub> skozi injektor v masni spektrometer skupaj z nosilnim plinom (helijem), kar poteka avtomatizirano pod nadzorom računalniškega sistema. Princip delovanja masnega spektrometra temelji na začetni ionizaciji vzorca, pri čemer se ustvari žarek ionov, ki v nadaljevanju potujejo skozi elektromagnet, v katerem poteka njihova ločitev glede na razmerje med maso in nabojem. Pri tem se začetni skupni ionski žarek loči na posamezne ione, ki jih ločeno zaznajo posamezni detektorji. Princip delovanja IRMS je prikazan na sliki 7. Po istem postopku smo opravili tudi analizo standardnega CO<sub>2</sub>. Z metodo masne spektrometrije pridobimo podatke o prisotnosti ionov z različnim razmerjem med maso in nabojem ter njihovi relativni zastopanosti v vzorcu. Natančnost navedene analizne metode znaša 0,2 ‰ (39).



Slika 8: Princip delovanja masnega spektrometra za analitiko stabilnih izotopov (IRMS) (39).

### 3.5.2 Izračun parametrov dihalnega testa

Rezultate <sup>13</sup>C dihalnega testa podamo kot odstotek kumulativno izločenega <sup>13</sup>C z izdihanim zrakom v merjenem času. Z IRMS izmerjeno izotopsko sestavo izdihanega CO<sub>2</sub> izrazimo z vrednostjo delta ( $\delta$ ), ki predstavlja relativno izotopsko sestavo preiskovanega vzorca glede na izbrani standard. Izračunamo jo po spodnji enačbi in je izražena v promilih (23).

$$\delta = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000 \quad \text{enačba 1}$$

Pri tem vrednost  $R_{vz}$  predstavlja razmerje med izotopoma  $^{13}\text{C}$  in  $^{12}\text{C}$  v preiskovanem vzorcu,  $R_{st}$  pa isto razmerje v izbranem standardu. Standard je izbran glede na njegovo izotopsko sestavo, ki je skladna z razširjenostjo določenega izotopa v naravi. Za ogljik je bil izbran karbonatni standard fosila *Belemnitelle americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini z vrednostjo R, ki znaša 0,0112372. Delta vrednost ( $\delta$ ) vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti  $\delta$  pomenijo višje izotopsko razmerje R v vzorcu in s tem večjo vsebnost izotopa  $^{13}\text{C}$  v preiskovanem vzorcu v primerjavi s standardom. Negativne vrednosti posledično pomenijo nižje izotopsko razmerje v vzorcu in s tem manjšo vsebnost težjega izotopa v vzorcu. Izmerjeno razmerje R med obema izotopoma se ob prisotnosti aktivnega encima po zaužitju testnega obroka poveča, medtem ko v primeru neaktivnega ali odsotnega encima ostane nespremenjeno v primerjavi z izmerjenim istim razmerjem pred zaužitjem obroka. Delež  $^{13}\text{C}$  v izdihanem zraku se za vsak čas vzorčenja izračuna po enačbi:

$$\%^{13}\text{C}_{t'} = \frac{\frac{\delta(^{13}\text{C}_t) + 1}{1000}}{\frac{1}{0,0112372} + \frac{\delta(^{13}\text{C}_t) + 1}{1000}} \cdot 100 \quad \text{enačba 2}$$

Pri izračunu deleža  $^{13}\text{C}$  v izdihanem zraku moramo upoštevati tudi meritev bazne linije pred zaužitjem testnega obroka, ki odstrani vpliv  $^{13}\text{CO}_2$  izdihanega ob bazalnih pogojih. Izračunan delež  $^{13}\text{C}$  v vzorcu pred zaužitjem testnega obroka odštejemo od vsake posamezne izračunane vrednosti  $\%^{13}\text{C}$  ob času t, kar ponazarja spodnja enačba:

$$\%^{13}\text{C}_t = \%^{13}\text{C}_{t'} - \%^{13}\text{C}_{t_0} \quad \text{enačba 3}$$

Hitrost razgradnje označenega substrata glede na zaužito količino in čas izračunamo po naslednji enačbi:

$$\frac{\%^{13}\text{C}}{h} = \frac{\frac{\%^{13}\text{C}_t}{100} \cdot n_{\text{CO}_2}}{\frac{(\%^{13}\text{C}_{\text{sub}} - \%^{13}\text{C}_{t_0}) \cdot m_{\text{sub}}}{100 \cdot M_{\text{sub}}}} \cdot 100 \% \quad \text{enačba 4}$$

pri čemer %  $^{13}\text{C}_t$  predstavlja delež izotopa v izdihanem zraku, %  $^{13}\text{C}_{\text{sub}}$  delež izotopa v zaužitem substratu, %  $^{13}\text{C}_{t_0}$  pa delež  $^{13}\text{C}$  v izdihanem zraku ob meritvi bazne linije pred zaužitim testnim obrokom.  $M_{\text{sub}}$  in  $m_{\text{sub}}$  predstavljata molsko maso in maso zaužitega substrata,  $n_{\text{CO}_2}$  pa množino izdihanega ogljikovega dioksida v eni uri, ki se lahko izračuna po enačbi 5. Pri izračunu množine izdihanega ogljikovega dioksida v eni uri je potrebno upoštevati telesno površino, ki jo izračunamo s pomočjo podatkov o telesni masi in višini, kar ponazarja enačba 6.

$$n_{\text{CO}_2} = \text{telesna površina (m}^2\text{)} \cdot 5 \frac{\text{mmol}}{\text{min}\cdot\text{m}^2} \cdot 60 \text{ min} \quad \text{enačba 5}$$

$$\text{telesna površina (m}^2\text{)} = \sqrt{\frac{m \text{ (kg)} \cdot h \text{ (cm)}}{3600}} \quad \text{enačba 6}$$

Kumulativna količina izločenega  $^{13}\text{C}$  je definirana kot celotna količina izotopa, ki se izloči v izdihanem zraku ob določenem času glede na količino vnesenega  $^{13}\text{C}$  s substratom in se izračuna po naslednji enačbi:

$$\text{kumulativni } ^{13}\text{C} [\%] = \sum_i \frac{\frac{\%^{13}\text{C}}{h}(t_i) + \frac{\%^{13}\text{C}}{h}(t_{i-1})}{2} \cdot \frac{(t_i - t_{i-1})}{60} \quad \text{enačba 7}$$

Izločen kumulativni  $^{13}\text{C}$  nikoli ne doseže 100 %, saj se določen delež  $^{13}\text{C}$  zadrži znotraj organizma v obliki bikarbonata ali pa se vključi v druge presnovne cikle (23).

### 3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Statistično analizo pridobljenih podatkov smo opravili s pomočjo računalniškega programa SPSS Statistics 17.0 za programsko okolje Windows. V statistično analizo smo vključili podatke o izmerjenih aktivnostih  $\alpha$ -amilaze in lipaze v serumu, vrednostih pankreatične elastaze v blatu ter rezultatih dihalnega testa pri preiskovancih, ki so izraženi v odstotkih kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v šestih urah po zaužitju testnega obroka.

V prvi stopnji statistične analize podatkov smo izvedli test normalnosti porazdelitve posameznih spremenljivk, kar predstavlja temeljno vodilo pri izbiri statističnih metod v nadaljevanju raziskave. Normalnost porazdelitve obravnavanih spremenljivk smo preverili

s pomočjo Shapiro-Wilkovega testa pri stopnji tveganja 0,05. V primeru p vrednosti, večjih od stopnje tveganja, lahko potrdimo normalnost porazdelitve, medtem ko se v nasprotnem primeru spremenljivke ne porazdeljujejo normalno.

Pri spremenljivkah, za kateri smo predhodno ugotovili, da njuna porazdelitev ni v skladu z normalno porazdelitvijo, smo izvedli neparametrični Kruskal-Wallisov test za potrditev razlik med posameznimi skupinami. V primeru ugotovljenih razlik v povprečnih vrednostih obravnavanih spremenljivk med posameznimi skupinami smo v nadaljevanju izvedli Mann-Whitneyev test, s katerim smo opredelili statistično značilne razlike v vsaki posamezni kombinaciji proučevanih skupin. Neparametrične teste smo izvedli pri stopnji tveganja 0,05.

Pri spremenljivkah, za kateri smo potrdili normalnost porazdelitve, smo opravili analizo variance (ANOVA). Z omenjenim testom preverjamo enakost variance med posameznimi skupinami preiskovancev. S pomočjo analize varianc smo tako v prvi stopnji ugotavljali prisotnost statistično značilnih razlik med skupinami. Po potrditvi omenjenih razlik smo v drugi stopnji s pomočjo Tukeyevega testa opredelili statistično značilne razlike v posameznih kombinacijah skupin. Parametrične teste smo izvedli pri stopnji tveganja 0,05.

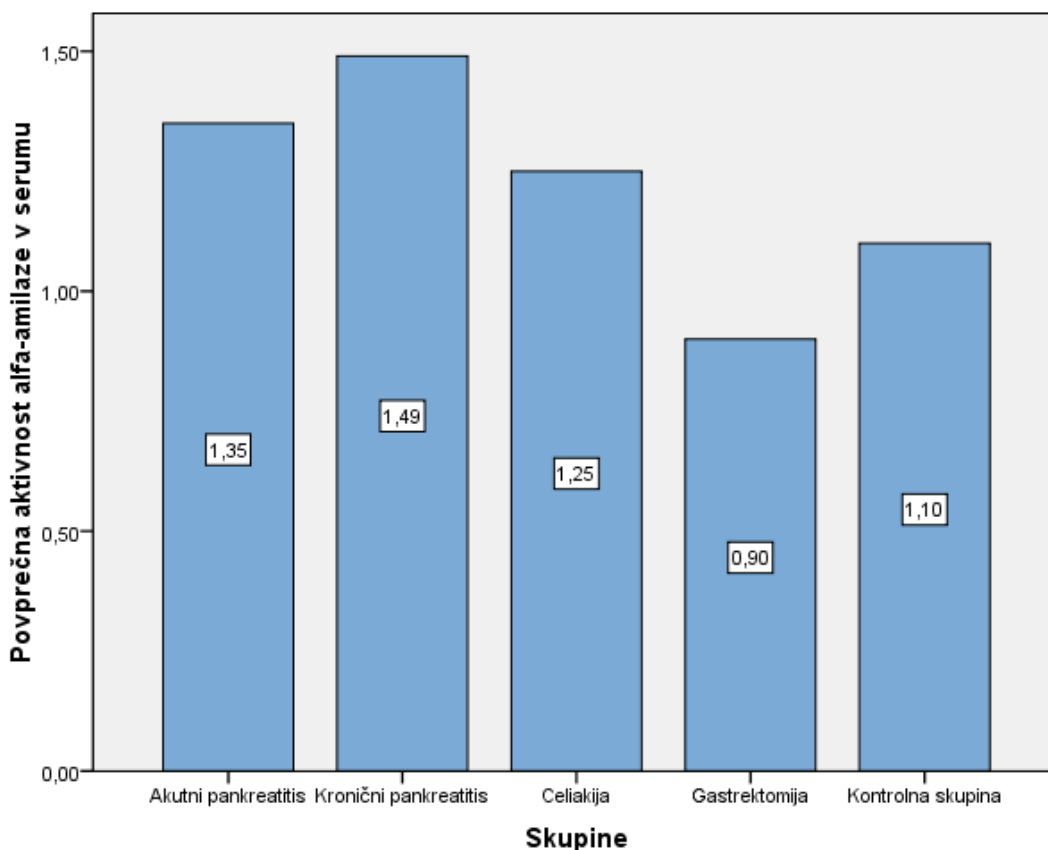
S pomočjo statističnega programa SPSS smo izvedli tudi analizo korelacije med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze, lipaze ter vrednostmi pankreatične elastaze v vzorcih blata pri preiskovancih v posameznih skupinah. Kot merilo korelacije smo upoštevali Spearmanov korelacijski koeficient, ki lahko obsega vrednosti med -1 in 1. Njegove pozitivne vrednosti nakazujejo na pozitivno povezanost spremenljivk, medtem ko negativne vrednosti odražajo negativno povezanost spremenljivk. Ničelna vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta nakazuje ničelni vpliv ene proučevane spremenljivke na drugo. Statistično testiranje korelacij smo izvedli pri stopnji tveganja 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1 POVPREČNE VREDNOSTI MERITEV

#### 4.1.1 Serumske aktivnosti $\alpha$ -amilaze

Najvišjo povprečno aktivnost  $\alpha$ -amilaze v serumu ugotovimo pri skupini bolnikov s kroničnim pankreatitisom. Drugo največjo povprečno aktivnost  $\alpha$ -amilaze najdemo pri bolnikih z diagnozo akutnega pankreatitisa (graf 4). Vse povprečne serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze so znotraj referenčnih vrednosti (do 1,67  $\mu$ kat/L), vendar znotraj skupin bolnikov z akutnim in kroničnim pankreatitisom, celiakijo ter v kontrolni skupini ugotovimo tudi posamezne vrednosti, ki presegajo zgornjo referenčno mejo (preglednica XII). Najmanjšo povprečno serumsko aktivnost encima ugotovimo pri bolnikih po opravljeni gastrektomiji.



Graf 3: Prikaz povprečnih serumskih aktivnosti  $\alpha$ -amilaze (izraženih v  $\mu$ kat/L) v posameznih skupinah.

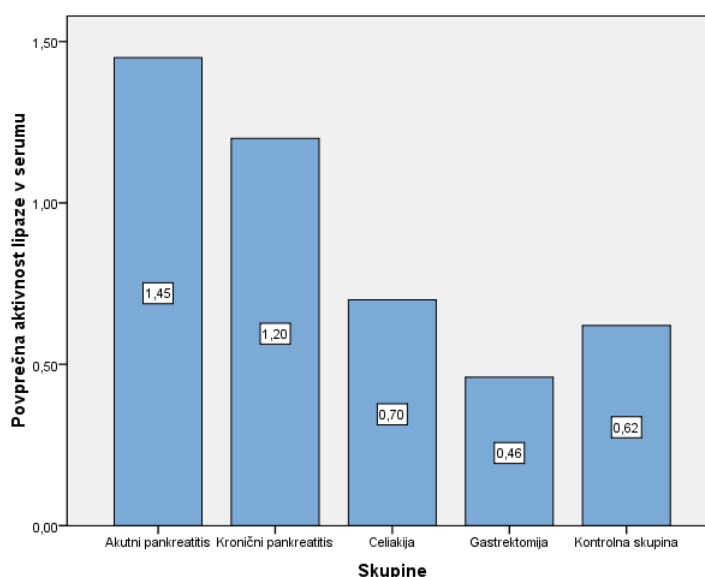


Preglednica XII: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah.

	Akutni pankreatitis	Kronični pankreatitis	Celiakija	Gastrektomija	Kontrolna skupina
Najvišja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	2,95	3,52	2,48	1,63	1,72
Najnižja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	0,50	0,57	0,74	0,31	0,38
Srednja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	1,35	1,49	1,25	0,90	1,10
KV (%)	57,1	63,4	37,4	42,5	32,9

#### 4.1.2 Serumske aktivnosti lipaze

Najvišjo povprečno aktivnost lipaze v serumu ugotovimo pri bolnikih z akutnim pankreatitisom. Pri skupinah bolnikov z akutnim in kroničnim pankreatitisom povprečni serumski aktivnosti lipaze presegata zgornjo referenčno mejo (1,00  $\mu\text{kat/L}$ ), medtem ko so pri ostalih štirih skupinah te vrednosti znotraj referenčnega območja. Najmanjšo povprečno serumsko aktivnost lipaze ugotovimo v skupini bolnikov po gastrektomiji. Omenjene ugotovitve so razvidne iz grafa 5 in preglednice XIII.



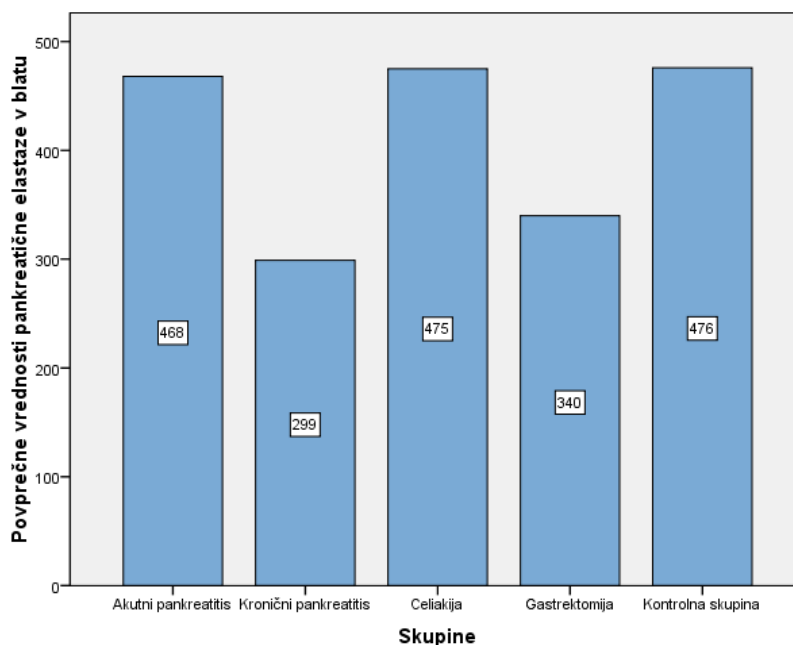
Graf 4: Prikaz povprečnih serumskih aktivnosti lipaze (izraženih v  $\mu\text{kat/L}$ ) v posameznih skupinah.

Preglednica XIII: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti serumske aktivnosti lipaze ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah.

	Akutni pankreatitis	Kronični pankreatitis	Celiakija	Gastrektomija	Kontrolna skupina
Najvišja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	4,18	1,49	1,59	0,92	1,42
Najnižja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	0,35	0,25	0,37	0,20	0,39
Srednja vrednost ( $\mu\text{kat/L}$ )	1,45	1,20	0,70	0,46	0,62
KV (%)	80,1	96,0	45,2	49,6	41,3

#### 4.1.3 Vrednosti pankreatične elastaze v blatu

Povprečne vrednosti pankreatične elastaze v blatu so pri vseh skupinah preiskovancev sicer znotraj referenčnih vrednosti ( $> 200 \mu\text{g/g}$  blata), vendar rezultati znotraj skupin bolnikov s kroničnim pankreatitisom in opravljeno gastrektomijo kažejo precejšnjo variabilnost. Najvišja povprečna vrednost je v kontrolni skupini, najnižja pa v skupini bolnikov s kroničnim pankreatitisom. Navedene ugotovitve so razvidne iz grafa 6 in preglednice XIV.



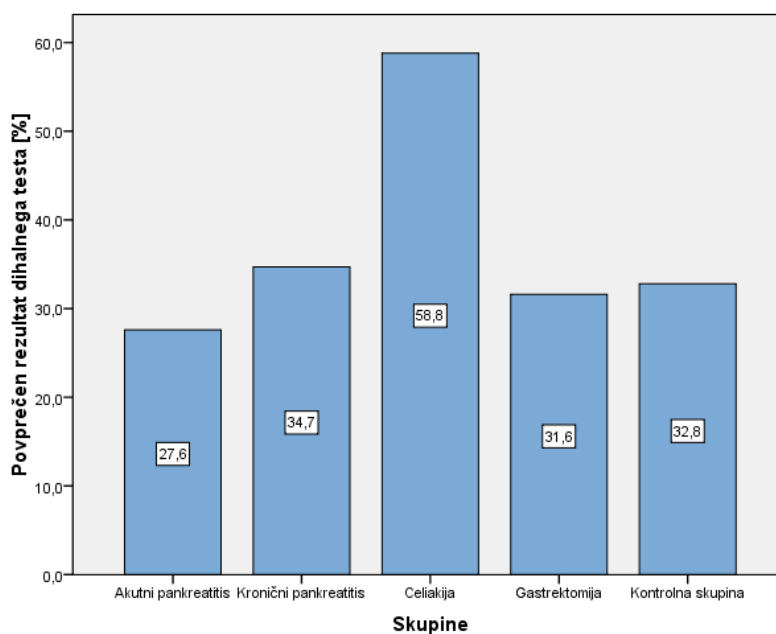
Graf 5: Prikaz povprečnih vrednosti pankreatične elastaze (izraženih v  $\mu\text{g/g}$  blata) v posameznih skupinah.

Preglednica XIV: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti pankreatične elastaze v blatu (izraženih v  $\mu\text{g/g}$  blata) ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah.

	Akutni pankreatitis	Kronični pankreatitis	Celiakija	Gastrektomija	Kontrolna skupina
Najvišja vrednost ( $\mu\text{g/g}$ )	522	484	610	539	619
Najnižja vrednost ( $\mu\text{g/g}$ )	374	6	363	18	315
Srednja vrednost ( $\mu\text{g/g}$ )	468	299	475	340	476
KV (%)	12,6	65,0	15,0	55,4	17,2

#### 4.1.4 Rezultati dihalnega testa

Najnižji povprečni odstotek kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v šestih urah po zaužitju testnega obroka ugotovimo pri skupini bolnikov z akutnim pankreatitisom. Najvišjo vrednost ugotovimo pri skupini bolnikov s celiakijo (58,8 %), kjer je najmanjša tudi variabilnost med rezultati v skupini, medtem ko v kontrolni skupini ta vrednost znaša 32,8 %. Rezultati dihalnega testa kažejo največjo stopnjo variabilnosti v skupini bolnikov po gastrektomiji (graf 7 in preglednica XV).



Graf 6: Prikaz povprečnih rezultatov dihalnega testa v posameznih skupinah.

Preglednica XV: Prikaz najvišjih, najnižjih in srednjih vrednosti rezultatov dihalnega testa ter koeficientov variacije (KV) v posameznih skupinah.

	Akutni pankreatitis	Kronični pankreatitis	Celiakija	Gastrektomija	Kontrolna skupina
Najvišja vrednost (%)	36,0	67,0	88,3	69,0	56,6
Najnižja vrednost (%)	15,3	3,1	38,0	4,0	15,2
Srednja vrednost (%)	27,6	34,7	58,8	31,6	32,8
KV (%)	35,0	54,4	22,3	58,0	39,3

## 4.2 PRIKAZ REZULTATOV GLEDE NA REFERENČNE VREDNOSTI

V nadaljevanju smo izračunali tudi delež preiskovancev z vrednostmi obravnavanih parametrov, ki odstopajo od referenčnih vrednosti. Pri tem smo za serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze ter vrednosti pankreatične elastaze v blatu upoštevali referenčne vrednosti Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ki so navedene v preglednici XVI (40). Pri rezultatih dihalnega testa smo upoštevali literaturno mejno vrednost kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v 6 urah po zaužitju testnega obroka, ki je prav tako navedena v spodnji preglednici (38).

Preglednica XVI: Referenčne vrednosti za izvedene preiskave.

	Referenčne vrednosti
<b><math>\alpha</math>-Amilaza v serumu</b>	do 1,67 $\mu\text{kat/L}$
<b>Lipaza v serumu</b>	do 1,00 $\mu\text{kat/L}$
<b>Pankreatična elastaza v blatu</b>	> 200 $\mu\text{g/g}$
<b>Dihalni test*</b>	$\geq 22 \%$

\*Odstotek kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v 6 urah po zaužitju testnega obroka.

Največji delež odstopov od referenčnih vrednosti serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze ugotovimo pri preiskovancih z akutnim pankreatitisom, medtem ko v skupini preiskovancev po opravljeni gastrektomiji teh ne najdemo. Prav tako ugotovimo pri

preiskovancih z akutnim pankreatitisom tudi največji delež odstopov od referenčnih vrednosti serumske aktivnosti lipaze, medtem ko te ponovno niso prisotne v skupini preiskovancev po opravljeni gastrektomiji. Največji delež odstopov od referenčnih vrednosti pankreatične elastaze v blatu ugotovimo pri preiskovancih po opravljeni gastrektomiji, nekoliko nižji delež ugotovimo pri preiskovancih s kroničnim pankreatitisom, medtem ko v skupinah preiskovancev z akutnim pankreatitisom, celiakijo in v kontrolni skupini teh odstopanj ne najdemo. Največji delež odstopov od referenčnih vrednosti dihalnega testa najdemo v skupini preiskovancev z akutnim pankreatitisom, medtem ko so v skupini preiskovancev s celiakijo vse vrednosti nad upoštevano mejno vrednostjo. Navedene ugotovitve so prikazane v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Število in odstotek preiskovancev v posamezni skupini z odstopi od referenčnih vrednosti izvedenih preiskav.

	<b><math>\alpha</math>-Amilaza</b>		<b>Lipaza</b>		<b>Pankreatična elastaza</b>		<b>Dihalni test</b>	
	<b>Št.</b>	<b>%</b>	<b>Št.</b>	<b>%</b>	<b>Št.</b>	<b>%</b>	<b>Št.</b>	<b>%</b>
<b>Akutni pankreatitis</b>	3	27,3	6	54,5	0	0	3	27,3
<b>Kronični pankreatitis</b>	2	13,3	2	13,3	3	20,0	4	26,7
<b>Celiakija</b>	1	7,1	1	7,1	0	0	0	0
<b>Gastrektomija</b>	0	0	0	0	3	21,4	3	21,4
<b>Kontrolna skupina</b>	1	4,0	2	8,0	0	0	6	24,0

## 4.3 REZULTATI STATISTIČNIH TESTOV

### 4.3.1 Normalnost porazdelitve spremenljivk

Pri testiranju normalnosti porazdelitve posameznih spremenljivk smo postavili naslednji hipotezi:

$H_0$ : Statistična spremenljivka se porazdeljuje normalno.

$H_1$ : Statistična spremenljivka se ne porazdeljuje normalno.

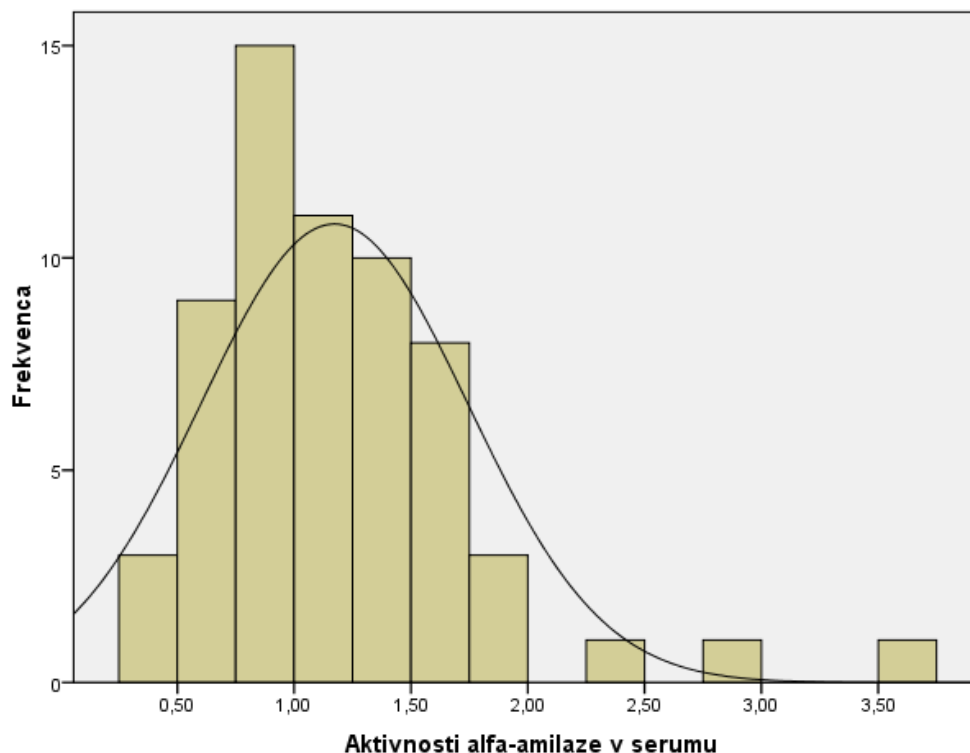
Na podlagi rezultatov Shapiro-Wilkovega testa normalnosti porazdelitve obravnavanih spremenljivk, ki so prikazani v preglednici XVIII, lahko za serumske aktivnosti lipaze in

vrednosti pankreatične elastaze v vzorcih blata zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno, spremenljivki se torej ne porazdelujeta normalno ( $p < 0,05$ ). Za serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in rezultate dihalnega testa lahko ugotovimo, da se porazdeljujejo skladno z normalno porazdelitvijo ( $p > 0,05$ ). Omenjene ugotovitve podpirajo tudi histogrami porazdelitve posameznih spremenljivk (grafi 8, 9, 10 in 11).

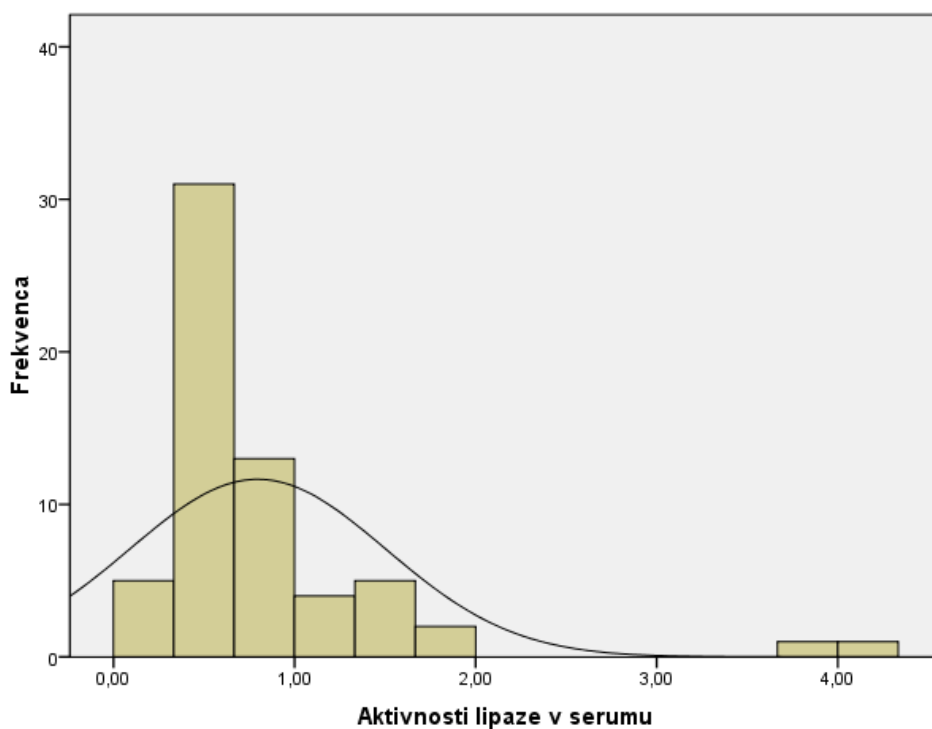
Preglednica XVIII: Prikaz p-vrednosti Shapiro-Wilkovega testa za posamezne spremenljivke.

	<b>p-vrednost</b>
<b><math>\alpha</math>-amilaza</b>	0,089*
<b>Lipaza</b>	0,000
<b>Pankreatična elastaza</b>	0,000
<b>Dihalni test</b>	0,094*

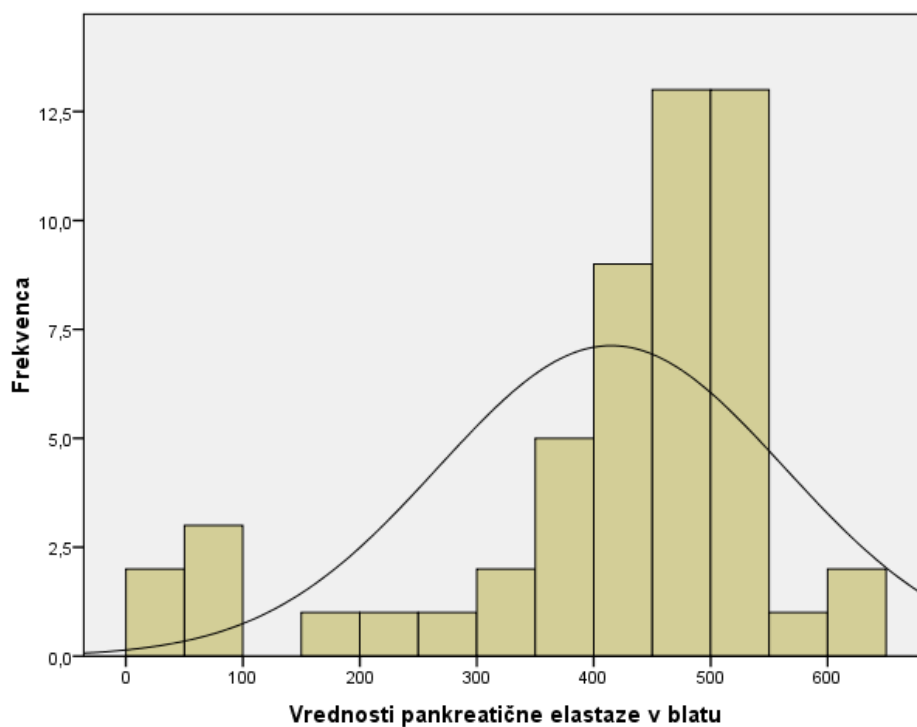
\* Normalnost porazdelitve ( $p > 0,05$ ).



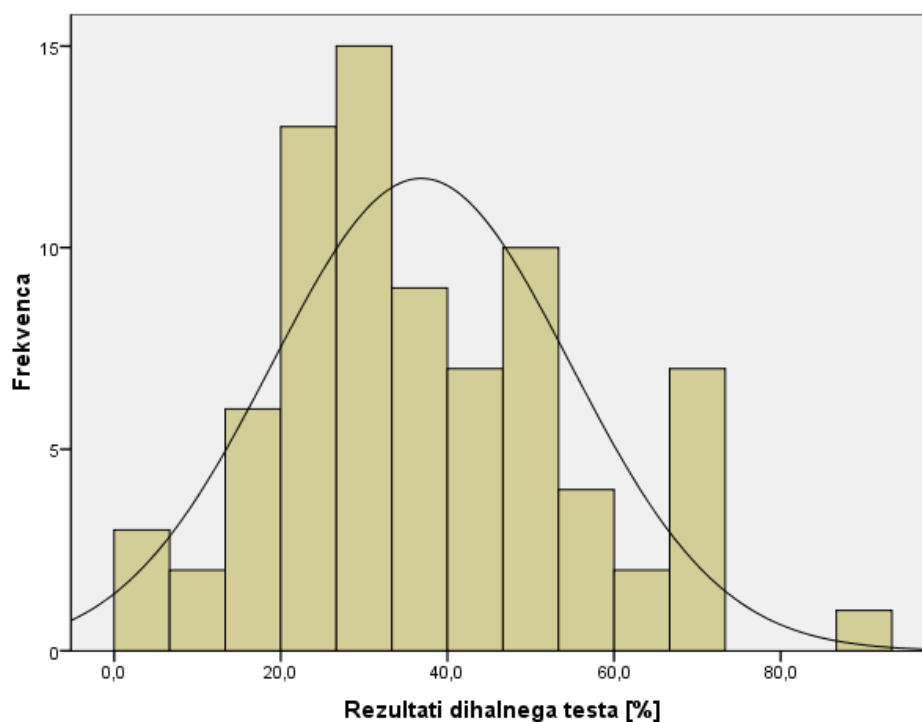
Graf 7: Prikaz porazdelitve aktivnosti  $\alpha$ -amilaze v vzorcih seruma preiskovancev.



Graf 8: Prikaz porazdelitve aktivnosti lipaze v vzorcih seruma preiskovancev.



Graf 9: Prikaz porazdelitve vrednosti pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev.



Graf 10: Prikaz porazdelitve rezultatov dihalnega testa pri preiskovancih.

#### 4.3.2 Parametrični testi za ugotavljanje razlik med skupinami

Pri ugotavljanju razlik med skupinami v vrednostih spremenljivk, ki se porazdeljujejo normalno, smo uporabili analizo varianc (ANOVA). Pri tem smo postavili naslednji hipotezi:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$  (predpostavljena je enakost varianc vseh skupin preiskovancev)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$  (predpostavljena je neenakost varianc med skupinami preiskovancev)

Iz rezultatov analize varianc (ANOVA) je razvidno, da med skupinami preiskovancev ni statistično značilnih razlik v serumskih aktivnostih  $\alpha$ -amilaze, medtem ko te razlike obstajajo pri rezultatih dihalnega testa (preglednica XIX).



Preglednica XIX: Prikaz p-vrednosti analize varianc (ANOVA) za serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in rezultate dihalnega testa.

	$\alpha$ -amilaza	Dihalni test
<b>p-vrednost</b>	0,189	0,000*

\* Statistično značilne razlike med skupinami preiskovancev ( $p < 0,05$ ).

Za opredelitev statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami preiskovancev smo v nadaljevanju izvedli post hoc Tukeyev test. Rezultati omenjenega testa kažejo na statistično značilne razlike v rezultatih dihalnega testa med skupino preiskovancev s celiakijo in vsemi ostalimi skupinami preiskovancev (preglednica XX).

Preglednica XX: Prikaz p-vrednosti Tukeyevega testa za rezultate dihalnega testa v posameznih kombinacijah skupin.

Skupine	1	2	3	4	5
1		0,840	0,000*	0,985	0,928
2	0,840		0,001*	0,994	0,999
3	0,000*	0,001*		0,000*	0,000*
4	0,985	0,994	0,000*		1,000
5	0,928	0,999	0,000*	1,000	

\*Statistično značilna razlika med skupinama preiskovancev ( $p < 0,05$ ).

Oznake posameznih skupin: 1 - akutni pankreatitis, 2 - kronični pankreatitis, 3 - celiakija, 4 – gastrektomija in 5 – kontrolna skupina.

#### 4.3.3 Neparometrični testi za ugotavljanje razlik med skupinami

Za ugotavljanje razlik v povprečnih vrednostih nenormalno porazdeljenih spremenljivk med skupinami preiskovancev smo uporabili Kruskal-Wallisov test pri stopnji tveganja 0,05. Pri testiranju smo postavili naslednji hipotezi:

$H_0$ : Med skupinami ni statistično značilnih razlik v vrednostih posameznih spremenljivk.

$H_1$ : Med skupinami obstajajo statistično značilne razlike v vrednostih posameznih spremenljivk.

Glede na rezultate Kruskal-Wallisovega testa, ki so podani v preglednici XXI, sklepamo, da med skupinami preiskovancev obstajajo statistično značilne razlike v serumskih aktivnostih lipaze ( $p < 0,05$ ). Pri vrednostih pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev ne ugotovimo statistično značilnih razlik med skupinami ( $p > 0,05$ ).

Preglednica XXI: Rezultati Kruskal-Wallisovega testa za serumske aktivnosti lipaze in vrednosti pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev.

	Lipaza	Pankreatična elastaza
<b>p-vrednost</b>	0,006*	0,077

\* Statistično značilne razlike med skupinami preiskovancev ( $p < 0,05$ ).

Za opredelitev razlik v povprečnih serumskih aktivnostih lipaze v vsaki posamezni kombinaciji skupin smo v nadaljevanju uporabili Mann-Whitneyev test pri stopnji tveganja 0,05. Postavili smo naslednji hipotezi:

$H_0$ : V posamezni kombinaciji skupin ni statistično značilne razlike v serumskih aktivnostih lipaze.

$H_1$ : V posamezni kombinaciji skupin obstaja statistično značilna razlika v serumskih aktivnostih lipaze.

Na podlagi rezultatov Mann-Whitneyevega testa lahko ugotovimo statistično značilne razlike v serumskih aktivnostih lipaze med skupinami preiskovancev z akutnim pankreatitisom in kontrolno skupino ter preiskovanci po opravljeni gastrektomiji. Prav tako ugotovimo razlike tudi med skupinama preiskovancev s kroničnim pankreatitisom in preiskovanci po gastrektomiji, med skupinama preiskovancev s celiakijo in po gastrektomiji ter med skupino preiskovancev po opravljeni gastrektomiji in preiskovanci kontrolne skupine (preglednica XXII).

Preglednica XXII: Prikaz p-vrednosti Mann-Whitneyevega testa za serumske aktivnosti lipaze v posameznih kombinacijah skupin.

Skupine	1	2	3	4	5
<b>1</b>		0,441	0,135	0,005*	0,041*
<b>2</b>	0,441		0,217	0,017*	0,089
<b>3</b>	0,135	0,217		0,019*	0,429
<b>4</b>	0,005*	0,017*	0,019*		0,034*
<b>5</b>	0,041*	0,089	0,429	0,034*	

\*Statistično značilna razlika med skupinama preiskovancev ( $p < 0,05$ ).

Oznake posameznih skupin: 1 - akutni pankreatitis, 2 - kronični pankreatitis, 3 - celiakija, 4 - gastrektomija in 5 - kontrolna skupina.

#### 4.2.4 Analiza korelacije

V sklopu statistične analize smo izvedli tudi analizo korelacije med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze, lipaze ter vrednostmi pankreatične elastaze v vzorcih blata pri preiskovancih v posameznih skupinah. Kot merilo korelacije smo upoštevali vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficienta.

Statistično testiranje korelacij med rezultati dihalnega testa in ostalimi proučevanimi spremenljivkami v posameznih skupinah preiskovancev smo izvedli pri stopnji tveganja 0,05 in ob naslednjih postavljenih hipotezah:

$H_0$ : Med spremenljivkama ni statistično značilne korelacije.

$H_1$ : Med spremenljivkama obstaja statistično značilna korelacija.

V preglednici XXIII so prikazani rezultati korelacijske analize med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze v posameznih skupinah preiskovancev. Statistično značilnih korelacij med omenjenima spremenljivkama ne najdemo pri nobeni skupini preiskovancev ( $p > 0,05$ ). Najmočnejša negativna korelacija je nakazana v skupini preiskovancev s kroničnim pankreatitisom.

Preglednica XXIII: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze v vzorcih seruma preiskovancev.

Skupine preiskovancev	Spearmanov koeficient	p-vrednost
<i>Akutni pankreatitis</i>	- 0,017	0,966
<i>Kronični pankreatitis</i>	- 0,119	0,779
<i>Celiakija</i>	0,112	0,729
<i>Gastrektomija</i>	0,029	0,923
<i>Kontrolna skupina</i>	0,077	0,753

V preglednici XXIV so prikazani rezultati korelacijske analize med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi lipaze v posameznih skupinah preiskovancev. Pri nobeni skupini preiskovancev ne najdemo statistično značilnih korelacij ( $p > 0,05$ ). Najmočnejša negativna korelacija je nakazana v skupini preiskovancev s celiakijo.

Preglednica XXIV: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in aktivnostmi lipaze v vzorcih seruma preiskovancev.

Skupine preiskovancev	Spearmanov koeficient	p-vrednost
<i>Akutni pankreatitis</i>	0,133	0,732
<i>Kronični pankreatitis</i>	- 0,095	0,823
<i>Celiakija</i>	- 0,319	0,313
<i>Gastrektomija</i>	- 0,154	0,598
<i>Kontrolna skupina</i>	0,293	0,224

V preglednici XXV so prikazani rezultati korelacijske analize med rezultati dihalnega testa in vrednostmi pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev. Pri nobeni skupini preiskovancev ne najdemo statistično značilnih korelacij ( $p > 0,05$ ). Najmočnejša pozitivna korelacija je nakazana v skupini preiskovancev s kroničnim pankreatitisom.

Preglednica XXV: Prikaz Spearmanovih korelacijskih koeficientov in p-vrednosti za korelacije med rezultati dihalnega testa in vrednostmi pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev.

Skupine preiskovancev	Spearmanov koeficient	p-vrednost
<i>Akutni pankreatitis</i>	- 0,086	0,872
<i>Kronični pankreatitis</i>	0,381	0,352
<i>Celiakija</i>	0,378	0,226
<i>Gastrektomija</i>	0,129	0,674
<i>Kontrolna skupina</i>	- 0,499	0,069

## **5. RAZPRAVA**

Raziskovalno delo v okviru pričujoče diplomske naloge je temeljilo na vrednotenju uporabnosti dihalnega testa kot alternativnega pristopa pri diagnostiki EITS. Preiskovance smo glede na potrjeno bolezen razdelili v štiri skupine, pri čemer je vsako patološko stanje v posamezni skupini povezano z razvojem motenj v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Izbor preiskav, s katerimi smo primerjali rezultate dihalnega testa, smo opravili na podlagi laboratorijskih značilnosti posameznih obravnavanih boleznin in stanj. Serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze tako predstavljajo pomemben diagnostični pristop pri akutnem pankreatitisu in akutnem zagonu kroničnega pankreatitisa, medtem ko je vrednost pankreatične elastaze v blatu splošno uveljavljen diagnostični kazalec EITS pri različnih boleznih, ki do nje privedejo. Tudi prisotnost in izraženost pankreatične insuficience je pri obravnavanih patoloških stanjih različna, zato smo skladno s tem tudi ovrednotili rezultate opravljenih preiskav in njihovo primerjavo z rezultati dihalnega testa.

### **5.1 PREISKOVANCI Z AKUTNIM PANKREATITISOM**

Pri preiskovancih z akutnim pankreatitisom ugotovimo višjo povprečno serumsko aktivnost  $\alpha$ -amilaze v primerjavi z večino ostalih skupin. Podobno velja za serumske aktivnosti lipaze, pri čemer so te v povprečju najbolj zvišane pri preiskovancih z akutnim pankreatitisom. Prav tako ugotovimo v tej skupini najvišja deleža preiskovancev z aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze in lipaze, ki presegajo zgornjo referenčno mejo. Omenjene ugotovitve so v skladu s pričakovanji, saj so za akutni pankreatitis značilne zvišane serumske aktivnosti obeh encimov. Nekoliko drugačne ugotovitve lahko povzamemo na podlagi rezultatov določanja vsebnosti pankreatične elastaze v vzorcih blata preiskovancev z akutnim pankreatitisom, saj je iz podatkov razvidno, da so te znotraj referenčnih vrednosti pri vseh preiskovancih v skupini. Na omenjen rezultat močno vpliva dejstvo, da je stopnja EITS pri bolnikih z akutnim pankreatitisom precej odvisna od samega poteka bolezni. Stopnja EITS je tako sorazmerna z jakostjo akutnega pankreatitisa, razvojem nekrozantnega pankreatitisa in morebitnim kirurškim zdravljenjem (41). Za natančnejšo razjasnitev navedenih dejstev bi bilo potrebno opredeliti stopnjo jakosti akutnega pankreatitisa pri posameznih preiskovancih, pri čemer bi lahko uporabili Ransonove kazalnike ali katero drugo veljavno ocenjevalno lestvico. Pri interpretaciji vrednosti označevalcev EITS je prav tako potrebno upoštevati dejstvo, da so preiskovanci z akutnim pankreatitisom opravili te preiskave šele, ko so bili sposobni peroralnega hranjenja. V

vmesnem obdobju med pojavom akutnega pankreatitisa in izvedbo preiskav je predvsem pri blažjih oblikah bolezni možna normalizacija eksokrine funkcije trebušne slinavke. Nasprotno od ugotovitve glede vrednosti pankreatične elastaze v blatu pa je iz rezultatov dihalnega testa razviden najnižji odstotek kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v primerjavi z ostalimi skupinami, vendar kljub temu ne ugotovimo statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolno skupino. Vrednosti dihalnega testa pod mejno vrednostjo 22 % ugotovimo pri treh preiskovancih (27,7 %), kar predstavlja največji delež patoloških vrednosti dihalnega testa izmed vseh preiskovanih skupin. Slednja ugotovitev bi lahko nakazovala na prisotnost EITS pri posameznih preiskovancih.

## **5.2 PREISKOVANCI S KRONIČNIM PANKREATITISOM**

Pri preiskovancih s kroničnim pankreatitisom ugotovimo najvišje povprečne serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, prav tako pa tudi drugo največjo povprečno serumsko aktivnost lipaze. Serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze so zvišane pri dveh preiskovancih (13,3 %). Zvišane serumske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze so le redko prisotne pri bolnikih s kroničnim pankreatitisom, lahko pa nakazujejo na določene značilnosti patološkega procesa pri bolnikih. Zvišane aktivnosti obeh encimov so lahko povezane s prisotnostjo akutnega zagona bolezni ob delno ohranjenem žlezem tkivu. Za natančnejšo opredelitev povišanih aktivnosti omenjenih encimov bi bilo smiselno podrobneje opredeliti kronični pankreatitis pri posameznih preiskovancih s pomočjo M-ANNHEIM klasifikacije. Podobno kot pri preiskovancih z akutnim pankreatitisom je potrebno poudariti veliko stopnjo variabilnosti v serumskih aktivnostih obeh encimov, kar kaže na dejstvo, da sta obe skupini preiskovancev precej heterogeni v smislu značilnosti bolezni pri posameznikih. Pri preiskovancih s kroničnim pankreatitisom izkazujejo veliko variabilnost tudi vrednosti pankreatične elastaze v blatu, pri čemer je povprečna vrednost parametra najnižja v primerjavi z ostalimi skupinami. Pri treh preiskovancih (20,0 %) so prisotne patološke vrednosti pankreatične elastaze. Prav tako visoko variabilnost izkazujejo tudi rezultati dihalnega testa, iz katerih je razviden drugi največji odstotek kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom, vendar se ta nahaja pod referenčno mejo pri štirih preiskovancih, kar predstavlja 26,7 % in s tem drugi največji delež patoloških vrednosti dihalnega testa. Omenjene ugotovitve podpirajo dejstvo, da je EITS v največji meri prisotna pri bolnikih s kroničnim pankreatitisom, kar je pričakovano glede na patogenezo bolezni, za katero je značilno razraščanje veziva in postopen propad tkiva trebušne slinavke (2, 12). Hkrati pa je

iz teh ugotovitev razvidno, da je stopnja EITS pri naših preiskovancih s kroničnim pankreatitisom zelo različna. Pri večini preiskovancev tako še ni izražene EITS ali pa gre za blažje oblike insuficience, pri katerih je občutljivost dihalnega testa prenizka, da bi bila možna detekcija zmanjšane aktivnosti lipaze, prav tako pa je prenizka tudi občutljivost določanja pankreatične elastaze v blatu.

### **5.3 PREISKOVANCI S CELIAKIJO**

Rezultati preiskovancev s celiakijo prikazujejo tretji največji povprečni serumski aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze, pri čemer sta obe povprečni vrednosti znotraj referenčnega intervala. Patološki aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze sta prisotni pri enem preiskovancu (7,1 %). Na podlagi slednje ugotovitve bi bilo smiselno opredeliti vzrok za zvišanje aktivnosti obeh encimov pri preiskovancu, saj lahko gre pri njem za pridruženo patološko stanje trebušne slinavke, kar lahko vpliva tudi na rezultate drugih dveh parametrov. Iz podatkov o vsebnosti pankreatične elastaze v blatu ugotovimo drugo največjo izmerjeno vrednost (475  $\mu\text{g/g}$ ), vrednosti pri vseh preiskovancih s celiakijo pa se nahajajo znotraj referenčnega intervala. Rezultati dihalnega testa kažejo najvišjo vrednost (58,8 %), ki se značilno razlikuje od vrednosti pri vseh ostalih skupinah preiskovancev. Tovrstni rezultati so v neskladju s podatki iz literature, ki nakazujejo na prisotnost EITS pri približno 30 % odraslih preiskovancev s celiakijo (14). Vzrok za to je lahko v majhnem številu preiskovancev s celiakijo v naši raziskavi, prav tako pa tudi v skupini pretežno mlajših preiskovancev s povprečno starostjo 38,6 let. Značilno višjih vrednosti rezultatov dihalnega testa pri bolnikih s celiakijo nismo zasledili pri pregledu nam dostopne literature. Perri je v svoji raziskavi s sodelavci ugotovil patološke vrednosti kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v šestih urah po zaužitju testnega obroka pri treh od skupno 17 nezdravljenih preiskovancih s celiakijo. Pri enem preiskovancu je bila izmerjena vrednost dihalnega testa na spodnji referenčni meji, medtem ko so bile pri ostalih te vrednosti znotraj referenčnega območja (42). Za natančnejšo razjasnitev naših rezultatov bi tako bilo smiselno opredeliti časovno obdobje od postavljene diagnoze pri posameznih preiskovancih, prav tako pa tudi obliko celiakije, stopnjo prizadetosti tankega črevesja in doslednost pri uživanju živil brez glutena. Vsi navedeni dejavniki vplivajo na razvoj in stopnjo EITS pri celiakiji (16). Značilno višje rezultate dihalnega testa pri preiskovancih s celiakijo bi bilo vsekakor smiselno natančneje opredeliti z nadaljnjimi raziskavami in z njihovo pomočjo morebiti pojasniti opažene ugotovitve.

## **5.4 PREISKOVANCI PO OPRAVLJENI GASTREKTOMIJI**

V skupini preiskovancev po opravljeni gastrektomiji ne ugotovimo odstopanj serumskih aktivnosti  $\alpha$ -amilaze in lipaze nad zgornjo referenčno mejo. Zanimiva je ugotovitev statistično značilno nižjih serumskih aktivnosti lipaze v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami preiskovancev, kar bi lahko pojasnili z vplivom gastrektomije na zmanjšan obseg sinteze lipaze v sluznici želodca. Vrednosti pankreatične elastaze v blatu izkazujejo visoko stopnjo variabilnosti, pri čemer najdemo pri treh preiskovancih (21,4 %) vrednosti pod referenčno mejo 200  $\mu\text{g/g}$ . Pri istih treh preiskovancih ugotovimo tudi vrednosti dihalnega testa pod referenčno mejo. Na podlagi tega ugotovimo, da je stopnja EITS različna pri posameznikih in je glede na podatke iz literature odvisna od vrste in obsega gastrektomije oziroma resekcije želodca. EITS je pogosta spremljevalka bolnikov po opravljeni totalni gastrektomiji, za katero je značilna izguba fizioloških refleksov, ki so udeleženi pri regulaciji izločanja pankreatičnega soka. Navedeno stanje se tako kaže z moteno mehansko stimulacijo izločanja pankreatičnega soka, ki je posledica raztega stene želodca po vnosu hrane. Po delnih resekcijah želodca z ohranitvijo dela njegove stene je stimulacija eksokrinega dela trebušne slinavke manj motena, kar prispeva k blažji obliki ali celo odsotnosti EITS (11, 21). Glede na podatke pri naših preiskovancih lahko sklepamo na razlike v vrsti izvedene operacije pri posameznikih, kar bi lahko podrobneje opredelili s pomočjo dodatnih podatkov o opravljenih operativnih posegih.

## **5.5 REZULTATI DIHALNEGA TESTA**

V okviru raziskave smo ugotavljali tudi statistično značilne razlike v rezultatih dihalnega testa med posameznimi skupinami preiskovancev in opravili korelacijsko analizo med rezultati dihalnega testa ter ostalimi proučevanimi parametri. Pri slednji smo posebno pozornost namenili korelaciji z vrednostmi pankreatične elastaze v blatu, kot trenutno najbolj uveljavljenim diagnostičnim kazalcem EITS. Morebitno korelacijo med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze in lipaze smo proučevali z namenom ugotovitve povezave med patofiziološkimi procesi pri akutnem pankreatitisu in akutnem zagonu kroničnega pankreatitisa ter EITS. Pri tem nismo ugotovili statistično značilnih korelacij med rezultati dihalnega testa in omenjenimi parametri pri nobeni skupini preiskovancev. Omenjene ugotovitve so v neskladju z rezultati objavljenih raziskav, ki kažejo na prisotnost korelacije med rezultati dihalnega testa in vrednostmi pankreatične elastaze v blatu. V novejši japonski raziskavi so Nakamura in sodelavci ugotovili



korelacijo med odstotkom kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v sedmih urah po zaužitju testnega obroka in vrednostmi pankreatične elastaze v blatu pri preiskovancih s kroničnim pankreatitisom in po opravljeni resekciji trebušne slinavke. V omenjeni raziskavi so ugotovili tudi značilno nižje vrednosti obeh parametrov pri obeh navedenih skupinah preiskovancev v primerjavi z zdravimi prostovoljci (43). S primerjavo rezultatov dihalnega testa med posameznimi preiskovanimi skupinami ugotovimo, da obstaja samo statistično značilna razlika med skupino preiskovancev s celiakijo in vsemi ostalimi skupinami, pri čemer rezultati dihalnega testa pri preiskovancih s celiakijo izrazito presegajo povprečne vrednosti ostalih skupin. Med ostalimi skupinami ne obstajajo značilne razlike. Tudi tovrstne ugotovitve so v neskladju z našimi pričakovanji in rezultati drugih raziskav, ki kažejo na značilno nižje vrednosti dihalnega testa pri pacientih z obravnavanimi boleznimi in stanji (11, 42, 43).

Pri interpretaciji rezultatov dihalnega testa je ključna primerjava z vrednostmi pankreatične elastaze, ki trenutno predstavlja najpomembnejši kriterij za diagnostiko EITS. Patološke vrednosti pankreatične elastaze v blatu so tako prisotne le pri 6 od 54 preiskovancih, ki imajo opredeljene bolezni z možno sočasno prisotnostjo EITS (11,1 %), kar potrjuje prisotnost EITS le pri teh preiskovancih. Pri vseh ostalih preiskovancih so vrednosti pankreatične elastaze v blatu znotraj referenčnega območja, vendar je ob tem potrebno poudariti, da negativni rezultati omenjenega testa ne izključujejo blagih oblik EITS. Patološke vrednosti dihalnega testa so prisotne pri večjem številu preiskovancev, in sicer pri 16 od skupno 79 preiskovancev (20,3 %), od tega celo pri 6 preiskovancih iz kontrolne skupine. Slednje kaže na slabo specifičnost (76 %) uporabljenega dihalnega testa za diagnostiko EITS pri upoštevanju mejni vrednosti 22 % kumulativno izločenega  $^{13}\text{C}$  z izdihanim zrakom v 6 urah po zaužitju testnega obroka. Občutljivosti dihalnega testa za diagnostiko EITS v skupinah preiskovancev s posameznimi boleznimi in stanji nismo določali zaradi visokega deleža diagnostično nepotrjene EITS pri preiskovancih.

Slaba specifičnost dihalnega testa za diagnostiko EITS ter odsotnost korelacije med vrednostmi dihalnega testa in pankreatične elastaze v blatu sta ključni ugotovitvi naše raziskave, ki zavračata možnost uporabe dihalnega testa kot alternativnega diagnostičnega pristopa trenutno uveljavljenim preiskavam za diagnostiko motenj v eksokrini funkciji trebušne slinavke. Rezultati raziskave, v kateri je Löser s sodelavci vrednotil uporabnost istega dihalnega testa v diagnostiki EITS, kažejo na potencialno uporabnost tega testa,

vendar z manjšo občutljivostjo za diagnostiko blažje stopnje EITS in specifičnostjo, kot jo dosega določanje pankreatične elastaze v blatu (27). Zanimiva je primerjava z rezultati raziskav, v katerih so vrednotili diagnostično uporabnost dihalnih testov za diagnostiko okužbe s *Helicobacter pylori*. Slednji so trenutno edini dihalni testi, katerih uporaba je uveljavljena v klinični praksi. Diagnostično uporabnost tovrstnih dihalnih testov so določali s primerjavo z rezultati histološke preiskave, ki velja za zlati standard na področju diagnostike omenjene okužbe (44). Njihov razvoj je potekal podobno, kot je to sedaj razvidno pri ostalih dihalnih testih, pri čemer so raziskovalci uspeli izboljšati njihovo diagnostično uporabnost s pomočjo številnih izboljšav v njihovi izvedbi. Prvi standardni <sup>13</sup>C dihalni test s sečnino za diagnostiko okužbe s *Helicobacter pylori* je temeljil na analizi 8 do 15 vzorcev izdihanega zraka, pri čemer so dosegli 94 % specifičnost in 93 % občutljivost za diagnostiko omenjene okužbe (44). Z uvedbo dihalnih testov, ki omogočajo analizo enega vzorca izdihanega zraka ob določenem času vzorčenja in s tem krajši čas preiskave, je raziskovalcem uspelo pomembno izboljšati njihovo klinično uporabnost (45, 46). Sodobni dihalni testi s sečnino dosegajo invazivnim metodam primerljivo diagnostično specifičnost in občutljivost (47, 48).

Najpomembnejši razlog za slabo specifičnost dihalnih testov in s tem trenutno neuveljavljenost tovrstnega pristopa v diagnostiki EITS predstavlja sočasna prisotnost fizioloških in patoloških dejavnikov, ki lahko vplivajo na rezultate dihalnega testa. Med te dejavnike sodijo hitrost praznjenja želodca, motnje v intestinalni absorpciji maščob in enterohepatičnem kroženju žolčnih kislin, vključevanje izotopa v alternativne presnovne poti, nastajanje endogenega <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> ter spremembe v pljučni funkciji (22, 27). Navedeni dejavniki bi lahko v naši raziskavi vplivali na prisotnost patoloških vrednosti pri posameznikih iz kontrolne skupine in tudi večjo pojavnost patoloških vrednosti v skupini preiskovancev z akutnim pankreatitisom. Vpliv večine izmed omenjenih fizioloških dejavnikov lahko omejimo s standardizacijo izvedbe dihalnega testa. Preiskovanci iz naše raziskave so bili seznanjeni s podrobnimi navodili pred izvedbo dihalnega testa, vendar povsem zanesljivo ne poznamo njihove doslednosti pri upoštevanju teh. Posebno velik vpliv na nizko ponovljivost rezultatov dihalnega testa predstavlja različna stopnja telesne aktivnosti, kar je v svoji raziskavi dokazal Kalivianakis s sodelavci (44).

Vse navedene ugotovitve nakazujejo, da bi bilo v prihodnosti smiselno posvetiti večjo pozornost iskanju pristopov za zmanjšanje ali odpravo vpliva omenjenih dejavnikov. Pri

tem bi bilo potrebno natančneje preučiti uporabnost nekaterih drugih specifičnih substratov (npr. peptidnih substratov) in sprememb v sami izvedbi dihalnega testa. Velik del aktivnosti bi bilo smiselno usmeriti k poenostavitvi izvedbe dihalnega testa, ki bi omogočal ustrezno diagnostično uporabnost pri analizi enega odvzetega vzorca izdihanega zraka ob določenem času vzorčenja, kar je raziskovalcem uspelo doseči pri razvoju sodobnih testov za diagnostiko okužbe s *Helicobacter pylori*. Glede na glavne ovire pri umestitvi dihalnih testov v rutinsko klinično prakso bi bilo smiselno v prihodnosti posvetiti večjo pozornost vrednotenju uporabe dihalnih testov za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke z namenom spremljanja vpliva osnovne bolezni na omenjeno funkcijo ter predvsem spremljanja uspešnosti zdravljenja z nadomestki encimov trebušne slinavke pri posameznih bolnikih. Dihalni testi bi tako lahko pridobili svoje mesto kot dopolnilna diagnostična metoda pri spremljanju uspešnosti zdravljenja EITS, pri čemer je določanje pankreatične elastaze v blatu neuporabno.

## **5.6 OMEJITVE RAZISKAVE**

Pri interpretaciji rezultatov naše raziskave je potrebno upoštevati tudi njene omejitve. Ključna omejitev raziskave je v njeni izvedbi, saj smo jo izvedli na preiskovancih s potrjenimi obravnavanimi boleznimi, ki so bili vključeni v diagnostično obravnavo zaradi suma na prisotnost EITS. Pred vključitvijo v raziskavo tako nismo diagnostično potrdili prisotnost EITS pri nobenem od omenjenih preiskovancev. Iz tega razloga je potrebna previdnost pri primerjavi vrednosti pankreatične elastaze in dihalnega testa med posameznimi skupinami, prav tako pa tudi pri vrednotenju korelacije med vrednostmi pankreatične elastaze in dihalnega testa znotraj posameznih skupin preiskovancev. Glede na patološke vrednosti pankreatične elastaze lahko sklepamo na prisotnost EITS le pri 6 od skupno 54 preiskovancev s posameznimi boleznimi. Pri vseh ostalih preiskovancih so vrednosti pankreatične elastaze v blatu znotraj referenčnega območja. V našo raziskavo bi bilo tako smiselno vključiti samo bolnike znotraj posameznih skupin z diagnostično opredeljeno EITS različnih stopenj in tako ovrednotiti uporabnost dihalnega testa v diagnostiki EITS. Pomembno omejitev naše raziskave predstavlja tudi splošno določena referenčna meja za vrednosti dihalnega testa, ki znaša 22 % in temelji na rezultatih večjega števila raziskav, vendar ta ne upošteva variabilnosti med posameznimi laboratoriji. Skladno s tem bi bilo smiselno definirati referenčne vrednosti dihalnega testa glede na

njegove rezultate pri preiskovancih iz naše raziskave. Tvrsten pristop priporočajo tudi proizvajalci dihalnih testov (38).

## 6. SKLEP

Dihalni testi predstavljajo inovativen diagnostični pristop pri obravnavi bolnikov z različnimi boleznimi prebavil. Medtem, ko je uporaba nekaterih dihalnih testov že utečena v rutinski klinični praksi (diagnostika okužb s *Helicobacter pylori*), pa predstavlja uporaba dihalnega testa za oceno eksokrine funkcije trebušne slinavke relativno nov in še neuveljavljen pristop. S pomočjo pričujoče raziskave smo želeli opredeliti morebitno uporabnost dihalnega testa s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom v diagnostiki EITS pri posameznih boleznih, ki lahko privedejo do teh motenj. Pri tem smo ovrednotili korelacije rezultatov dihalnega testa z rezultati ostalih, trenutno uveljavljenih preiskav v diagnostiki omenjenih bolezni. Uvedba dihalnega testa v klinično prakso z namenom diagnostike motenj v eksokrini funkciji trebušne slinavke bi prinesla številne prednosti pred že uveljavljenimi preiskavami na tem področju, med katerimi je najpomembnejše določanje vsebnosti pankreatične elastaze v blatu. Vendar pa pri tem še vedno obstajajo številne ovire, ki to preprečujejo in s katerimi smo se srečali tudi v tej diplomski nalogi.

Rezultati raziskave so pokazali:

- Dihalni test s  $^{13}\text{C}$  označenim trigliceridnim substratom ni primeren za diagnostiko EITS in tako ne predstavlja alternativo trenutno uveljavljenim diagnostičnim metodam na tem področju.
- Med rezultati dihalnega testa in serumskimi aktivnostmi  $\alpha$ -amilaze, lipaze ter vrednostmi pankreatične elastaze v blatu ne obstajajo statistično značilne korelacije.
- Pri preiskovancih s celiakijo ugotovimo statistično značilno višje rezultate dihalnega testa v primerjavi z rezultati pri preiskovancih ostalih skupin.

Kljub številnim že znanim oviram bi bilo smiselno v prihodnosti posvetiti veliko mero pozornosti optimizaciji izvedbe dihalnih testov z namenom zmanjšanja ali celo poskusa odprave vpliva različnih omenjenih dejavnikov na rezultate testov. Večja pozornost je potrebna tudi pri vrednotenju uporabnosti dihalnih testov za spremljanje eksokrine funkcije trebušne slinavke pri posameznih preiskovancih in njihovi uvedbi v klinično prakso. Smiselno bi bilo nadaljevanje raziskav z namenom vrednotenja uporabnosti dihalnega testa za oceno omenjene funkcije pri različnih skupinah bolnikov, pri čemer bi bile potrebne izvedbe raziskav na večjem številu preiskovancev. Poseben poudarek bi bilo smiselno

nameniti vrednotenju rezultatov dihalnega testa pri bolnikih s celiakijo, pri čemer bi bilo potrebno podrobneje proučiti tudi značilnosti bolezenskega procesa pri posameznikih. Vse navedeno odpira številne možnosti za raziskovalno delo na tem področju tudi v prihodnosti, kar bi lahko pomembno prispevalo k številnim izboljšavam obstoječih dihalnih testov ali pa bi s tem odprli vrata povsem novi generaciji dihalnih testov, s katerimi bi bila pot do trenutka uveljavitve rutinske uporabe v klinično prakso precej krajša. Vsekakor ponujajo dihalni testi številne prednosti tako za bolnike, kot tudi zdravstveno osebje, zato zaslužijo temu primerno pozornost tudi v prihodnosti.

Verjamem, da je prihodnost dihalnih testov svetla in da bodo ti prodrli na številna, trenutno morda še neslutena področja laboratorijske diagnostike, vsekakor pa je naša naloga danes, da jim to pot utremo s pravilnimi in učinkovitimi pristopi v okviru znanstveno-raziskovalnega in razvojnega dela.

## 7. LITERATURA

1. Dahmane R: Ilustrirana anatomija, druga izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2005: 104-5.
2. Markovič S: Bolezni prebavil. V: Interna medicina, četrta izdaja, Košnik M et al., Littera picta, Ljubljana, 2011: 576-7, 616-28.
3. Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 82-3.
4. Berne RM, Levy MN, Koeppen BN, Stanton BA: Physiology, 5th editon, Elsevier, 2003: 580-4, 614-9.
5. Guyton AC, Hall JE: Guyton and Hall textbook of Medical physiology, 12th edition, Elsevier Saunders, 2011: 780-3, 791-8.
6. Kylänpää-Bäck ML, Kemppainen E, Puolakkainen P: Trypsin-based laboratory methods and carboxypeptidase activation peptid in acute pancreatitis. Journal of pancreas (online), 2002; 3(2): 34-48.
7. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 488-518.
8. Hill GP: Gastric, pancreatic and intestinal function. V: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5th edition, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Elsevier Saunders, 2011: 1704-8, 1713-8, 1723-5.
9. Ribarič S: Hiperlipoproteinemije. V: Seminarji iz patološke fiziologije, prva izdaja, urednik: Samo Ribarič, Univeza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2008: 140-2.
10. Domínguez-Muñoz JE: Pancreatic exocrine insufficiency: diagnosis and treatment. Journal of gastroenterology and hepatology, 2011; 26(2): 12-6.

11. Friess H, Michalski CW: Diagnosing exocrine pancreatic insufficiency after surgery: when and which patients to treat. The official journal of the international hepatopancreato-biliary association, 2009; 11(3): 7-10.
12. Burroughs AK, Westaby D. Liver, biliary tract disease and pancreatic disease. V: Kumar P, Clark M, eds. Clinical medicine, 7th edition, Elsevier Saunders, 2009: 319-85.
13. Gardner TB, Berk BS: Acute pancreatitis. Medscape reference, Dec. 2011. Dostopno na: <http://emedicine.medscape.com/article/181364-overview#aw2aab6b2b3>. Datum dostopa: 24. 3. 2012.
14. Panteghini M, Bais R: Serum enzymes. V: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5th edition, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Elsevier Saunders, 2011: 583-9.
15. Albashir S, Stevens T: Endoscopic ultrasonography to evaluate pancreatitis. Cleveland clinic journal of medicine, 2012; 79(3): 202-6.
16. Evans KE, Leeds JS, Morley S, Sanders DS: Pancreatic insufficiency in adult celiac disease: do patients require long-term enzyme supplementation? Digestive diseases and sciences, 2010; 55(10): 2999-3004.
17. Malterre T: Digestive and nutritional considerations in celiac disease: Could supplementation help? Alternative medicine review 2009; 14(3): 247-57.
18. Leeds JS, Hopper 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 or persisting symptoms? Alimentary pharmacology and therapeutics, 2006; 25(3): 265-71.



19. Encyclopedia of surgery: A guide for patients and caregivers. Gastrectomy. Dostopno na: <http://www.surgeryencyclopedia.com/Fi-La/Gastrectomy.html>. Datum dostopa: 31. 3. 2012.
20. Repše S, Omejc M, Juvan R, Jelenc F: Napredovali rak želodca – standardna resekcija danes. V: Kirurgija želodca, zbornik simpozija, urednika: Omejc M, Repše S, Kirurška šola, Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, 2005: 154-60.
21. Fries H, Böhm J, Müller MW, Glasbrenner B, Riepl RL, Malfertheiner P, Büchler MW: Maldigestion after total gastrectomy is associated with pancreatic insufficiency. American journal of gastroenterology, 1996; 91(2): 341-7.
22. Chowdhury RS, Forsmark CE: Pancreatic function testing. Alimentary pharmacology and therapeutics, Marec 2003; 17(6): 733-50.
23. Wetzel K, Fischer H: Recent results of the development and application of  $^{13}\text{C}$ -breath tests. Fischer analysen instrumente GmbH (FAN), 1<sup>st</sup> edition, Leipzig, 1999. Dostopno na: [http://www.fan-gmbh.de/docs/13c\\_recent\\_results.pdf](http://www.fan-gmbh.de/docs/13c_recent_results.pdf). Datum dostopa: 2. 4. 2012.
24. Braden B, Lembcke B, Kuker W, Caspary WF:  $^{13}\text{C}$ -breath tests: current state of the art and future directions. Digestive and liver disease: official journal of the Italian society of gastroenterology and the Italian association for the study of the liver, 2007; 39(9): 795-805.
25. Keller J, Franke A, Storr M, Wiedbrauck F, Schirra J: Clinical relevant breath tests in gastroenterological diagnostics – recommendations of the German society for neurogastroenterology and motility as well as the German society for digestive and metabolic diseases. Zeitschrift für gastroenterologie, 2005; 43(9): 1071-90.
26. Braden B:  $^{13}\text{C}$  breath tests for the assessment of exocrine pancreatic function. Pancreas, 2010; 39(7): 955-9.

27. Löser C, Brauer C, Aygen S, Hennemann O, Fölsch UR: Comparative clinical evaluation of the <sup>13</sup>C-mixed triglyceride breath test as an indirect pancreatic function test. Scandinavian journal of gastroenterology, 1998; 33: 327-34.
28. Löser C, Möllgaard A, Aygen S, Hennemann O, Fölsch UR: <sup>13</sup>C-starch breath test – comparative clinical evaluation of an indirect pancreatic function test. Zeitschrift für gastroenterologie, 1997; 35(3): 187-94.
29. BreathID® test: A non–invasive modality to detect pancreatic exocrine insufficiency. Dostopno na: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01259544>. Datum dostopa: 24. 3. 2012.
30. Domínquez-Muñoz JE: Pancreatic enzyme replacement therapy: exocrine pancreatic insufficiency after gastrointestinal surgery. The officinal journal of the international hepato-pancreato-biliary association, 2009; 11 (Suppl. 3): 3-6.
31. Mrevlje Ž: Prehranski ukrepi pri specifičnih boleznih. Slovensko združenje za klinično prehrano. Dostopno na: <http://kliniknaprehrana.si/rokdownloads/Predavanja/LLL/Zdravniki/Ukrepi1.pdf>. Datum dostopa: 3. 9. 2012.
32. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke: Baza podatkov o zdravilih. Dostopno na: <http://www.zdravila.net/>. Datum dostopa: 3. 9. 2012.
33. Reagents on Roche/Hitachi systems. List of interferences based on serum indices for serum and plasma (not applicable for urine). Dostopno na: [https://www.roche-diagnostics.ch/SiteCollectionDocuments/Spital\\_Labor\\_Serum%20Indices/Interferences\\_Hitachi.pdf](https://www.roche-diagnostics.ch/SiteCollectionDocuments/Spital_Labor_Serum%20Indices/Interferences_Hitachi.pdf). Datum dostopa: 6. 9. 2012.
34. Traceability and uncertainty, cobas c 501 – Precinorm® U. Roche diagnostics GmbH. Dostopno na: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/10171735sc.pdf>. Datum dostopa: 6. 9. 2012.

35. Univerzitetni klinični center Ljubljana. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Navodila za odvzem blata za določanje pankreatične elastaze v blatu. Dostopno na: [http://www.kikkb.si/Navodilo%20za\\_dolocanje\\_pankreaticne\\_elastaze\\_v\\_blatu.pdf](http://www.kikkb.si/Navodilo%20za_dolocanje_pankreaticne_elastaze_v_blatu.pdf). Datum dostopa: 6. 9. 2012.
36. ScheBo® Biotech AG: ScheBo® pancreatic elastase 1 stool test. Dostopno na: [http://www.schebo.com/english/ScheBo\\_Pancreatic\\_Elastase\\_1\\_Stool\\_Test\\_3.php](http://www.schebo.com/english/ScheBo_Pancreatic_Elastase_1_Stool_Test_3.php). Datum dostopa: 6. 9. 2012.
37. INFAI UK, the breath test company. Pancreo-Lip®, <sup>13</sup>C-mixed triglyceride breath test for the diagnosis of pancreatic function. Dostopno na: <http://www.infai.co.uk/innovations/pancreolip.php>. Datum dostopa: 7. 9. 2012.
38. Campro Scientific GmbH: Protocols – <sup>13</sup>C breath tests – Pancreas. Lipase activity. <sup>13</sup>C-mixed triglycerid breath test. Dostopno na: <http://www.campro.eu/PDF/Brochures/Flyer-Breath-Test-Protocol/web-protocols-13C-breath-tests-pancreas-okt2011-en.pdf>. Datum dostopa: 7. 9. 2012.
39. Dunn S: Gas source mass spectrometry: Stable isotope geochemistry. Geochemical instrumentation and analysis. Dostopno na: [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/gassourcemasspec.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/gassourcemasspec.html). Datum dostopa: 7. 9. 2012.
40. Univerzitetni klinični center Ljubljana. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Vodnik po preiskavah KIKKB. Dostopno na: <http://www.kclj.si/kikkb/preiskave.htm>. Datum dostopa: 6. 10. 2012.
41. Xu Y, Wu D, Zeng Y, Wang X: Pancreatic exocrine function and morphology following an episode of acute pancreatitis. *Pancreas*, 2012; 41(6): 922-7.
42. Perri F, Pastore M, Festa V, Clemente R, Quitadamo M, D'Altilia MR, Niro G, Paolucci P, Andriulli A: Intraduodenal lipase activity in coeliac disease assessed by means

of  $^{13}\text{C}$  mixed-triglyceride breath test. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 1998; 27(4): 407-10.

43. Nakamura H, Morifuji M, Murakami Y, Uemura K, Ohge H, Hayashidani Y, Sudo T, Sueda T: Usefulness of a  $^{13}\text{C}$ -labeled mixed triglyceride breath test for assessing pancreatic exocrine function after pancreatic surgery. *Surgery*, 2009; 145(2): 168-75.

44. Logan RP, Polson RJ, Misiewicz JJ, Rao G, Karim NQ, Newell D, Johnson P, Wadsworth J, Walker MM, Baron JH: Simplified single sample  $^{13}\text{C}$  urea breath test for *Helicobacter pylori*: comparison with histology, culture and ELISA serology. *Gut*, 1991; 32(12): 1461-4.

45. Lotterer E, Ramaker J, Lüdtker FE, Tegeler R, Geletneký JV, Bauer FE: The simplified  $^{13}\text{C}$ -urea breath test – one point analysis for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Zeitschrift für gastroenterologie*, 1991; 29(11): 590-4.

46. Braden B, Duan LP, Caspary WF, Lembcke B: More convenient  $^{13}\text{C}$ -urea breath test modifications still meet the criteria for valid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Zeitschrift für gastroenterologie*, 1994; 32(4): 198-202.

47. Thijs JC, van Zwet AA, Thijs WJ, Oey HB, Karrenbeld A, Stellaard F, Luijt DS, Meyer BC, Kleibeuker JH: Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. *The American journal of gastroenterology*, 1996; 91(10): 2125-9.

48. Epple HJ, Kirstein FW, Bojarski C, Frege J, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD:  $^{13}\text{C}$ -urea breath test in *Helicobacter pylori* diagnosis and eradication. Correlation to histology, origin of »false« results, and influence of food intake. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1997; 32(4): 308-14.

49. Kalivianakis M, Verkade HJ, Stellaard F, van der Werf M, Elzinga H, Vonk RJ: The  $^{13}\text{C}$ -mixed triglyceride breath test in healthy adults: determinants of the  $^{13}\text{CO}_2$  response. *European journal of clinical investigation*, 1997; 27(5): 434-42.