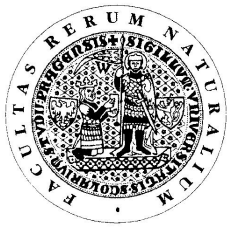
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lenka Šubčíková

POSOUZENÍ EFEKTIVITY LABORATORNÍCH TESTŮ PRO STANOVENÍ EXOKRINNÍ FUNKCE PANKREATU

Assessment of laboratory tests efficiency in case of exocrine pancreas function determination

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Markéta Martínková Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a projektu podpořeného UNIVERSITOU KARLOVOU UNCE: 204025/2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2012.

Abstrakt

Chronická pankreatitida je velmi komplexní onemocnění s obtížnou diagnostikou. V současné době je diagnostika a klasifikace chronické pankreatitidy založena hlavně na zobrazovacích metodách.

V této práci byly porovnávány výsledky dvou nepřímých testů exokrinní pankreatické funkce s rozdílným uspořádáním. Byla stanovována elastáza 1 ve stolici ELISA metodou s monoklonální protilátkou, jako představitel jednoduchého screeningového testu a dynamika a kinetika exokrinní pankreatické sekrece pomocí dechového testu s ^{13}C značeným substrátem. Testy byly prováděny na skupině čtyř dobrovolníků do dobu půl roku s frekvencí jeden měsíc. Byla sledována vzájemná variabilita a korelace prováděných testů. Dále byla statisticky zpracována data z těchto testů u pacientů s podezřením na chronickou pankreatitidu poskytnutá v anonymizované formě pracovištěm Ústavu laboratorní biochemie a laboratorní diagnostiky.

Prokázali jsme, že nepřímé funkční testy a stanovení pankreatických enzymů spolu nekorelují a proto oba tyto laboratorní testy mají svůj specifický význam především v diagnostice exokrinni pankreatické nedostatečnosti.

Klíčová slova: Chronická pankreatitida, pankreatická exokrinní funkce, elastáza 1, dechové testy

Abstract

Chronic pancreatitis is complex disease with complicated diagnosis. Nowadays there are the diagnosis and classification of chronic pancreatitis primarily based on imaging methods.

In this study the results of two indirect tests of pancreatic exocrine function with different arrangement were compared. The pancreatic fecal elastase 1 was determinate by immunoassay with monoclonal antibody, as a simple screening test. The dynamics and kinetics of pancreatic exocrine secretion was observed by a breath test with ^{13}C-labeled substrate. The group of four volunteers was monitored for six months and analyzed each month. The mutual variability of these tests and their correlation was studied. The patients' (suspected suffering by chronic pancreatitis) anonymous data for these tests created by the Institute of laboratory biochemistry and laboratory diagnostics between 1999-2012 were statistical processed.

We found, that the indirect tests of pancreatic exocrine function and determination of pancreatic enzymes does not correlate. Both of these tests have the specific diagnostic value mainly for diagnosis of pancreatic exocrine insufficiency.

Key words: Chronic pancreatitis, pancreatic exocrine function, fecal elastase 1, breath tests

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi, MUDr. Petru Kocnovi, CSc. za odborné rady a cenné připomínky k vypracované práci.

Dále děkuji své garantce RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za pomoc při vypracování této práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat personálu laboratoře ÚLBLD za obětavou pomoc při experimentálním získávání dat, dobrovolníkům za podstoupení testů a svým rodičům za morální a finanční podporu.

Obsah

1 Úvod ….....10
1. 1 Historie.....11
1. 2 Chronická pankreatitida.....12
1. 2. 1 Prevalence a incidence.....12
1. 2. 2 Klinické projevy a komplikace.....13
1. 2. 3 Morfologické projevy a komplikace.....14
1. 2. 4 Etiopatogeneze.....15
1. 2. 5 Klasifikace.....18
1. 2. 6 Jednotlivé formy chronické pankreatitidy.....23
1. 2. 6. 1 Chronická kalcifikující pankreatitida.....23
1. 2. 6. 2 Obstrukční pankreatitida.....24
1. 2. 6. 3 Autoimunitní pankreatitida.....24
1. 2. 7 Diagnostika chronické pankreatitidy.....25
1. 2. 7. 1 Zobrazovací techniky.....26
1. 2. 8 Diagnostika pankreatické insuficience.....28
1. 2. 8. 1 Přímé funkční testy.....28
1. 2. 8. 2 Nepřímé funkční testy testy.....31
1. 2. 9 Enzymatická substituční terapie.....35
2 Cíle.....37
3 Materiál a metody.....38
3. 1 Experimentálně získaná data.....38
3. 2 Metodiky.....39
3. 2. 1 Materiál a přístroje.....39
3. 2. 2 Stanovení elastázy 1 ve stolici.....40
3. 2. 3 Dechový test s ^{13}C značeným substrátem.....43
3. 3 Data pro statistické zpracování.....47
4 Výsledky.....49
4. 1 Experimentálně získaná data.....49
4. 2 Korelace experimentálně získaných dat.....50
4. 3 Korelace dat FELA, PELA a MTG poskytnutých pracovištěm ÚLBLD.....51

5 Diskuse.....55
5. 1 Půlroční sledování čtyř dobrovolníků.....55
5. 2 Korelace dat FELA, PELA a MTG poskytnutých pracovištěm ÚLBLD.....56
6 Závěr.....58
7 Literatura.....59

Použité zkratky

ABTS	-	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) diamonium
AIP	-	autoimunitní pankreatitida
AP	-	akutní pankreatitida
BMR	-	rychlost bazálního metabolismu
BSA	-	plocha povrchu těla
CCK	-	cholecystokinin
CFTR	-	transmembránový regulátor cistické fibrózy
cPRD	-	kumulativní procentuální výdej oproti dávce
CT	-	počítačová tomografie
E1	-	elastáza 1
ELISA	-	imunometoda s enzymaticky značenou protilátkou
ERCP	-	endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
EUS	-	endoskopická ultrasonografie
FELA	-	stanovení elastázy 1 ve stolici monoklonální protilátkou
HISORt	-	akronym z počátečních písmen pro klasifikaci autoimunitní pankreatitidy
CHCP	-	chronická kalcifikující pankreatitida
CHP	-	chronická pankreatitida
IgG	-	imunoglobuliny třídy G
IR	-	infračervené záření
IRT	-	imunoreaktivní trypsin
JPS	-	Japonská pankreatická společnost (Japan Pancreatic Society)
M-ANNHEIM	-	akronym z počátečních písmen pro jednu z klasifikací chronické pankreatitidy
MRCP	-	cholangiopankreatografie magnetickou rezonancí
MRCPQ	-	kvantitativní cholangiopankreatografie magnetickou rezonancí
MRI	-	zobrazovací magnetická rezonance
MTG	-	smíšené triglyceridy, zkratka pro dechový test s ^{13}C značenými smíšenými triglyceridy
NBT-PABA	-	N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoová kyselina
NDIRS	-	izotop-selektivní nondisperzí infračervená spektrometrie

PABA	-	p-aminobenzoová kyselina
PD	-	pankreas divisium
PEI	-	pankreatická exokrinní insuficience (nedostatečnost)
PELA	-	stanovení elastázy 1 ve stolici polyklonální protilátkou
PES	-	pankreatická exokrinní suficience (dostatečnost)
PRSS1	-	kationický tripsinogen
SPINK1	-	inhibitor sekrece pankreatického trypsinu
TIGAR-O	-	akronym z počátečních písmen jedné z klasifikací chronické pankreatitidy
ÚLBLD	-	Ústav lékařské biochemie a lékařské diagnostiky
US	-	ultrasonografie

Použité jednotky

°C	-	stupně Celsia
cm	-	centimetr
g	-	gram
h	-	hodina
Kč	-	koruna česká
kg	-	kilogram
l	-	litr
mg	-	miligram
ml	-	mililitr
mm	-	milimetr
nm	-	nanometr
µg	-	mikrogram
µl	-	mikrolitr
%	-	procento
‰	-	promile

1 Úvod

Slinivka břišní, nebo-li pankreas je žláza umístěná v horní části břišní dutiny. Vpředu je ohraničena pobřišnicí, duodenem a žaludkem, vzadu slezinou. Pankreas se skládá z hlavy, těla a ocasu. Hlava je nejobjemnější částí a naléhá na duodenum, do něhož z ní do tzv. Vaterovské papily ústí hlavní a vedlejší pankreatický vývod, spolu se žlučovými cestami, se kterými se ještě před papilou spojují v jeden vývod.[1]

Pankreas je žláza s exokrinní i endokrinní funkcí. Endokrinní funkci plní Langerhansovy ostrůvky, které se skládají z alfa, beta a delta buněk, produkujících glukagon (α-buňky), inzulin (β-buňky) a somatostatin (δ-buňky). Exokrinní funkce je spojena s trávením.[2]

Po pozření potravy dochází k roztažení žaludku a produkci žaludečních kyselin, což stimuluje duodenální S buňky k produkci sekretinu do krve. Sekretin vyvolá sekreci velkého objemu vodné, na uhličitanové ionty bohaté pankreatické šťávy.[3] Díky vysoké hladině uhličitanových aniontů slouží k úpravě pH žaludečních šťáv v duodenu.[4] Stejně tak zvýšení koncetrace aminokyselin a mastných kyselin v duodenu stimuluje I buňky k produkci cholecystokinu (CCK). CCK podporuje acinární buňky k produkci sekretu bohatého na trávicí enzymy. Na sekreci pankreatických šťáv se ale podílí i nervová cesta, která zároveň upravuje i množství stimulačních hormonů. [3]

V závislosti na příjmu potravy se tvoří 1-2 L pankreatické šťávy denně. Jejím hlavním úkolem je neutralizace kyselého žaludečního chymu v duonedu, kde také dochází k aktivaci trávicích enzymů.[5] Hlavními zástupci sekretovaných enzymů jsou: amyláza, trypsinogen, chymotrypsinogen, proelastáza, lipázy a nukleázy.[6] Peptidázy jsou sekretovány ve formě proenzymů. Po dosažení duodena se trypsinogen aktivuje na trypsin a ten je schopen aktivovat další pankreatické enzymy.[7] Z duodena dále putují do tenkého a tlustého střeva a vylučují se stolicí. Určitá část jich také prostupuje do krve a je následně vylučována močí.[8]

Mezi nejčastější vývojová onemocnění patří pankreas divisum (PD). Mezi získaná onemocnění pankreatu patří chronická pankreatitida (CHP), akutní pakreatitida (AP) a karcinom pankreatu.[9]

Onemocnění pankreatu patřila a stále patří mezi nemoci s obtížnou diagnostikou a terapií, což platí zejména pro CHP. V posledních letech lze sice zaznamenat významný pokrok ve znalostech týkajících se diagnostiky i terapie, přesto můžeme bez nadsázky říci, že CHP umíme diagnostikovat až ve stadiu rozvinutějších morfologických změn a léčit ji

umíme až v období rozvinutých charakteristických symptomů, úplně vyléčit ji zatím neumíme.[9]

1. 1 Historie

Pankreas byl poprvé popsán řeckým anatomem a chirurgem Herophilem (335- 280 př. n. l.)[10] První představy o pankreatu byly, že je to kompaktní a stejnorodý masitý orgán bez kostí a chrupavek. Jeho pojmenování vychází z řeckých slov „*pan* - všechen a *creas* - maso“. Toto pojmenování pochází od Rufususe z Ephesu (asi 100 n. l.).[11] O modernější popis pankreatu se ve 2. stol. n. l. pokusil římský lékař Claudius Galén. Ten si již pravděpodobně uvědomoval, že se jedná o žlázu a popsal i okolní žilní systém, který by ji mohl vyživovat. Tato práce byla pro několik dalších století nerozvíjena a Galénovy závěry byly přijímány až dogmaticky.[10]

Vesálius v 16. století jako první oficiálně zpochybnil Galénovy závěry. V této době se předpokládalo, že hlavní funkcí pankreatu je mechanická ochrana žaludku. Opravdový průlom nastal až v roce 1642, kdy Johan Georg Wirsüng objevil a popsal pankreatický vývodný systém u člověka. Jeho funkci objasnit již ale nestihl, neboť byl o rok později zavražděn.[10] V roce 1664 objevil Regnier de Graaf způsob, jak odebírat pankreatický sekret u psů a tím umožnil jeho další studium.[11] Další badatelé zabývající se významem a regulací pankreatické šťávy, mezi něž patřil i český vědec Jan Evangelista Purkyně, prokázali, že sekreční produkty pankreatu mají schopnost emulgovat tuky a trávit škrob.[9]

Dalším důležitým mezníkem byly práce Claude Bernarda, který v roce 1849 publikoval velmi přehledný soubor znalostí o pankreatu, složení pankreatického sekretu a jeho význam pro trávení rozličných složek potravy. Funkce pankreatu byla intenzivně studována například I. P. Pavlovem, W. M. Baylissem a E. H. Starlingem (regulace sekrece)[10], W. Kühnem (izolace trypsinů), A. Marcetem (objev lipázy).[11] Kolem roku 1854 již bylo jisté, že pankreas je žlázou s exokrinní funkcí. V tomto roce vyslovil německý patolog R. Wirchow hypotézu, že by pankreas mohl mít i funkci endokrinní. Tuto hypotézu potvrdil v roce 1869 Paul Langerhans objevem specifických ostrůvků, které po něm byly později pojmenovány.[9]

První, kdo popsal onemocnění slinivky byl Claasen v roce 1842. Zabýval se především

patologickými důsledky nadměrného požívání alkoholu na pankreas. V roce 1889 vyšel v Boston Medical and Surgical Journal rozsáhlý článek Reginalda Fitze, který pojednává o příznacích a klasifikaci onemocnění pankreatu. Identifikace a diagnostika konkrétně CHP, trápila vědce již od počátku výzkumu. Teprve v roce 1788 Cawley vyslovil myšlenku, že je možné hledat souvislosti mezi onemocněními slinivky a životním stylem jedince. Poprvé byla pankreatitida diagnostikována a popsána v roce 1870 Edwinem Klebsem. Brzy se lékařské odborné časopisy doslova hemžily články o nejrozličnějších případech pankreatitidy, ovšem jen málokterý se zaměřoval na diagnostiku před úmrtím pacienta. Dalším krokem k diagnostice CHP byl rok 1946, kdy M. W. Comfort publikoval rozsáhlé dílo zabývající se klinickými aspekty CHP, poukázal na vztah mezi pankreatitidou a konzumací alkoholu a popsal diagnosticky významné symptomy CHP. Definice a klasifikace CHP se změnila teprve s rozvojem biochemických výzkumů během posledních 50 let. Pro diagnostiku byl velmi přínosný rozvoj vizualizačních metod.[11]

Rozvoj studia a diagnostiky onemocnění pankreatu v České republice se pojí se jmény prof. Dr. Karela Herforta, spoluzakladatele Evropského pankreatologického klubu, prof. Dr. Friče a prof. Dr. Bartoše.[9]

1. 2 Chronická pankreatitida

CHP je progresivní zánětlivé onemocnění, které snižuje exokrinní i endokrinní funkci pankreatu.[12] Jedná se o ireverzibilní fibrotickou přestavbu parenchymu žlázy, ke které dochází na podkladě zánětu a reparačních imunitních dějů.[13,14]

CHP se často vyvíjí z AP, která je definována jako krátkodobý akutní zánět pankreatu. Hlavními příznaky AP jsou bolesti v oblasti břicha a zvýšená koncentrace pankreatických enzymů v krvi a/nebo v moči.[15] Hlavními kritérii pro diagnostiku AP zobrazovacími metodami jsou zánětlivá centra a žlučové kameny. Klinická funkce a morfologie většinou bývá bez následků. AP může recidivovat.[16]

1. 2. 1 Prevalence a incidence

Souhrnem se incidence CHP ve vyspělých zemích pohybuje mezi 3,5 až 10/100 000 obyvatel za rok[13] a prevalence okolo 28/100 000 obyvatel za rok.[17] Incidence CHP v Evropě se pohybuje v širokém intervalu od asi 1,6/100 000 obyvatel za rok ve Švýcarsku

(1973-1982) po 13,4/100 000/rok ve Finsku (1989).[18] Střední Evropa vykazuje podobné výsledky pro Českou Republiku (7,9/100 000 za rok), Německo (7,0) a Dánsko (8,7), ale pro Polsko je incidence jen 4,0/100 000 obyvatel za rok.[19] Některé studie vykazují zajímavý nárůst onemocnění ve Velké Británii, kde zaznamenali 100% nárůst onemocnění v období od 1989/90 (incidence 4,3) do 1999/2000 (incidence 8,6).[18] V roce 2002 Lankisch a jeho spolupracovníci publikovali výsledky velmi dobře definované populace ze severního Německa[20] a přibližná incidence mezi lety 1988 - 1995 byla 6,4/100 000 obyvatel za rok. O rok později se ve Francii incidence pohybovala okolo 5,86 -7,74/100 000 obyvatel/rok. Přibližná prevalence byla odhadována na 26,4/100 000 obyvatel.[19]

Čína měla v roce 2003 zjištěnou prevalenci 13,5 a Japonsko o rok dřív prevalenci 35,5 a incidenci 14,4/100 000 obyvatel/rok. Přitom Japonsko ještě v roce 1974 vykazovalo incidenci 2,0 a v roce 1999 incidenci 5,8 a Čína prevalenci 3,1 ještě v roce 1996.[18] Tento nárůst mohl mít dvě příčiny. Za prvé mohl být způsoben zdokonalením stávajících metod a zavedením nových a za druhé mohl být způsoben zvýšenou konzumací alkoholu.[21]

Pro USA je hodnota incidence z roku 2004 8,1/100 000 obyvatel/rok.[18] Zajímavější je ale údaj z roku 1987 pro bílou populaci. Incidence pro muže byla 5,7/100 000/rok a pro ženy 7,6/100 000/rok, ačkoliv je známo, že CHP se vyskytuje u mužů se statisticky významně vyšší frekvencí.[10]

1. 2. 2 Klinické projevy a komplikace

Pacienty nejvíce trápí silná bolest v oblasti epigastria, která může vystřelovat i do zad. Bolest je příčinou nechutenství, které vede k malnutrici a úbytku hmotnosti. Bolesti u pankreatitidy můžeme rozdělit na dva typy: pro typ A jsou charakteristické opakující se ataky bolesti[13] s trvání několika hodin až dní[22] v intervalech několika měsíců až let[23], u typu B je bolest přetrvávající.[13]

Prvním projevem pokročilého onemocnění je maldigesce tuků, jejímž typickým symptomem je steatorea. Objevuje se při poklesu sekrece pankreatické lipázy pod 10 %. Steatorea se vyskytuje většinou až po dlouhé době trvání onemocnění, může to být dokonce až okolo 20 let.[3] Jejím nepříjemným projevem může být i malabsorpce v tuku rozpustných vitamínů A, D, E, K a B12.[24] Sekrece proteázy a amylázy klesá pomaleji.[13]

V pokročilé fázi CHP se rovněž může objevit diabetes mellitus typu IIIc (podle

klasifikace Americké diabetologické asociace), který je typický poruchou sekrece inzulinu i glukagonu[13] v důsledku destrukce Langerhansových ostrůvků působením zánětlivých buněk v pankreatu při postupu CHP.[14]

Výjimečně se může objevit ikterus obstrukčního charakteru. Jeho příčinou je zhoršení odtoku žluči, v souvislosti s CHP nejčastěji kvůli stenóze části žlučovodu v blízkosti pankreatu.[23]

Další vzácnou komplikací je vznik ascitu v peritoneální oblasti[24] při prosakování pseudocysty (80 %) nebo porušeného pankreatického kanálku (20 %). Pankreatický ascites se objevuje asi u 3,5 % pacientů s CHP.[25]

1. 2. 3 Morfologické příznaky a komplikace

Kalcifikace jsou častým markerem CHP při použití zobrazovacích diagnostických metod. Specifičnost pankreatických kalcifikací pro CHP záleží na jejich lokaci v pankreatu. Pro parenchymální kalcifikace je specifičnost 67 % (pro rozptýlené parenchymální 91 %), pro kalcifikace v pankreatickém vývodu je to 88 % a při výskytu kalcifikací ve vývodu i parenchymu současně je to až 100 %.[26] Zatím ale není objasněno, jaký je vztah mezi rozvojem kalcifikací pankreatu, příčinou a trváním onemocnění. Prevalence pankreatických kalcifikací je 0-4 % v čase vypuknutí onemocnění, 37-59 % po 8-25 letech a 80-91 % po 14-36 letech trvání onemocnění. Kalcifikace vznikají v kyselém prostředí z fibrotické tkáně.[22] Průměrný čas pro rozvoj kalcifikací je 13,1 roku u alkoholické CHP, 16,9 roku pro pozdní formu idiopatické CHP a 24,9 let pro brzkou formu idiopatické CHP.[27]

Další morfologickou změnou jsou stenózy, které se vyvíjí z proliferující fibrotické tkáně pankreatického parenchymu, čímž dochází ke zúžení žlučovodu nebo duodena. Dalším možným původem stenózy, na základě utlačení okolních tkání, je růst pseudocysty v parenchymu.[22]

Pankreatické pseudocysty jsou uzavřené útvary bohaté na amylázu a další pankreatické enzymy obklopené fibrotickou tkání. Často se vyskytují u AP, hlavně v souvislosti s tkáňovými nekrózami po AP a obstrukcí pankreatického vývodu, kde zvyšující se vnitřní tlak vede k hromadění pankreatických šťáv uvnitř pankreatu. U CHP je jejich výskyt vzácnější (30 - 40 % pacientů) a vyskytují se hlavně u alkoholické formy CHP.[28]

Velmi vzácnou komplikací CHP je pankreatický absces.[9] Nejčastějším původcem je *Escherichia coli*.[29]

Mezi ojedinělé komplikace CHP patří i pankreatické píštěle. Podstatou vzniku píštěle je rozrušení stěny pankreatického vývodu nebo pseudocyst, vedoucí ke vzniku kanálu, který v jednom směru může vést k vytvoření tubulózního propojení s vnitřkem pankreatu, nebo břišní dutinou v závislosti na lokalizaci poškození.[30] Výjimečně se může stát, že se vytvoří píštěl ústící až nad pohrudnici. Pak jsou přítomné symptomy respiračního charakteru, neboť pankreatický výpotek utlačuje plíce.[31]

1. 2. 4 Etiopatogeneze

Pokroky v genetice a technice umožňují lepší a efektivnější výzkum rizikových faktorů a etiologie CHP. Přesná etiologie onemocnění je dosud neznámá, ale jsou známy rizikové faktory, které mají svůj význam ve vývoji CHP. Tyto poznatky jsou důležité k plánování strategie prevence a léčby.[32]

Po genetické stránce jsou pro rozvoj CHP důležité mutace na genech regulujících aktivaci (kationický trypsinogen, PRSS1) a inaktivaci (inhibitor sekrece pankreatického trypsinu, SPINK1) trypsinu a dále na transmembránovém regulátoru cystické fibrózy (CFTR). PRSS1 mutace jsou autosomálně dominantní, ostatní mutace spjaté s CHP jsou autosomálně recesivního charakteru. Hlavní úlohou PRSS1 je hydrolýza proteinů ze stravy na lysin a arginin a aktivace ostatních trávicích pro-enzymů. Předčasná aktivace trypsinogenu uvnitř pankreatu s následnou aktivací ostatních trávicích enzymů má za následek samotrávení pankreatické tkáně. Mutace na kodonech 29 a 122 jsou spjaty hlavně s autosomálně dominantní hereditární CHP. Prevalence těchto mutací je mezi 0 - 19 %.[32] V poslední době se ukazuje, že hrají významnou roli i v idiopatické formě CHP.[13] Hlavním úkolem SPINK1 je zabránit předčasné aktivaci trypsinogenu v acinárních buňkách. Díky stechiometrické nerovnováze mezi trypsinogenem a SPINK1 je SPINK1 schopno inhibovat aktivaci pouze asi 20 % trypsinogenu.[32] Pro hereditární CHP jsou tedy charakteristické homozygotní mutace PRSS1, kdežto 15 - 40 % pacientů s idiopatickou formou onemocnění má mutaci SPINK1 genu na jedné, nebo obou alelách.[33] Cystická fibróza je běžné autosomálně recesivní onemocnění.[32] Frekvence CFTR mutací je u idiopatické CHP pravděpodobně mnohem vyšší, než se očekávalo, současné studie

dokazují, že 20 - 30 % pacientů s idiopatickou formou onemocnění má alespoň jednu CFTR mutaci.[33]

Na rozvoji a průběhu CHP mají podíl i autoimunitní mechanismy. Typické je zvýšení hladiny imunoglobulinu G (IgG), a to hlavně IgG4 a dalších specifických protilátek.[21] Přesná patogeneze onemocnění není zatím známa, ale předpokládá se, že abnormality v hlavním histokompatibilním komplexu třídy II vedou k výskytu autoantigenů proti lymfocytům, které ústí v autoimunitní odpověď.[13]

Všeobecný výzkum týkající se všech forem CHP, bez ohledu na pohlaví, typ CHP a další související faktory, udává jako průměrný věk pacientů 44,6 ± 12,6 roku.[34] Tento údaj je tak široký z toho důvodu, že některé typy CHP se objevují již u adolescentů, jiné naopak až u seniorů.[33] Údaje z francouzského výzkumu uvádějí jako průměrný věk 51 let (medián z 1748 údajů).[35]

Ve většině výzkumů se ukázalo, že až 75 % nemocných s CHP jsou muži. Příčinou však může být vyšší podíl pravidelných konzumentů alkoholu u mužů, než u žen.[36] Francouzské výzkumy uvádějí, že zatímco incidence CHP u mužů je 12,9/100 000 a prevalence 43,8/100 000 u žen je incidence CHP jen 2,6/100 000 a prevalence 9,0/100 000.[35]

Americká studie poukazuje na to, že existovala rozdílná incidence CHP pro bílé přistěhovalce a původní obyvatelstvo. Zatímco kouření u indiánských konzumentů alkoholu zvyšovalo náchylnost k alkoholem indukované CHP, bělošské obyvatelstva bylo náchylnější k jaterní cirhóze. Tento jev zatím není uspokojivě vysvětlen.[32]

Bylo prokázáno, že riziko vývinu CHP je závislé na množství konzumovaného alkoholu. Zatím není věděcky určené množství alkoholu, které se dá jednoznačně označit za hranici zvýšeného rizika vývinu CHP a její vývoj je pozorován jen asi u 5 - 15 % chronických alkoholiků. Rovněž bylo prokázáno, že alkohol i v malých dávkách může způsobit propuknutí choroby, nebo její zhoršení, u jedinců náchylných k CHP například z genetických důvodů.[33] Alkohol pravděpodobně zvyšuje riziko vzniku CHP hned pěti mechanismy:[13]

a) efekty alkoholu na různé části pankreatu: Alkohol působí převážně na hlavní a vedlejší pankreatický vývod a acinární buňky a ovlivňuje motilitu Oddiho svěrače. Chronická konzumace alkoholu usnadňuje vznik proteinových zátek v pankreatických vývodech.[13] Alkohol spolu s nedostatkem bílkovin jsou příčinou stoupající koncentrace proteinů v pankreatické šťávě[37] a zvyšující se kapacity acinárních buněk pro syntézu lithostatinu

(hlavní složka bílkovinné zátky).[38] Alkoholem je indukované i zvýšení hladiny acinárního glykoproteinu[39], který je rovněž významnou součástí bílkovinné zátky.[13]

b) efekt alkoholu na pankreatické enzymy: Některé studie na krysách dokazují, že chronická konzumace alkoholu může vyvolat změny v acinárních buňkách, které vedou k předčasné aktivaci trávicích enzymů.[13] Tento jev má za následek rozrušování struktury lysozomů, ve kterých jsou trávicí enzymy skladovány.[40] Předpokládá se, že za rozrušování struktury lysozomů jsou zodpovědné i cholesteryl-estery a ethyl-estery mastných kyselin[41], které se akumulují v pankreatu při chronické konzumaci alkoholu. Svou roli v rozrušování lysozomální membrány hraje i alkoholem indukovaný oxidativní stres.[13]

c) metabolismus alkoholu v pankreatických acinárních buňkách: Vědci při zkoumání alkoholem indukované toxicity v játrech zjistili, že ethanol je metabolizován i v pankreatu, a to oběma cestami: oxidativní i neoxidativní. Produkovanými metabolity jsou acetaldehyd a ethyl-estery mastných kyselin.[13] Jako ostatní xenobiotika je i alkohol metabolizován cytochromem P450 za vzniku volných kyslíkových radikálů, které jsou důvodem oxidativního stresu poškozujícího pankreatickou tkáň.[42]

d) efekt toxických metabolitů ethanolu: Acetaldehyd způsobuje morfologické poškození pankreatu u krys a psů a inhibuje sekretinovou stimulaci izolovaného ascinu. U krys infuze ethyl-esterů mastných kyselin udržuje zvýšenou hladinu Ca^{2+} uvnitř acinárních buněk, což může vést k mitochondriální depolarizaci a následné smrti buňky.[43]

e) efekt alkoholu na pankreatickou mikrocirkulaci: Dvě studie dokazují, že pravidelná konzumace alkoholu významně snižuje pankreatické prokrvení u pokusných krys. Tento jev byl doprovázen zvýšením leukocytární adheze a zvýšeným výskytem adhezivních molekul a cytokinů v pankreatu.[13]

S konzumací alkoholu většinou souvisí i abúzus cigaret. Nízké procento kuřáků nekonzumujících alkohol znesnadňuje posouzení vlivu samotného kouření na rozvoj a průběh CHP. Přesto bylo prokázáno, že abúzus cigaret je rizikovým faktorem brzkého vzniku a zhoršování alkoholické a pozdní idiopatické CHP.[26] Riziko stoupá v závislosti na množství vykouřených cigaret.[44] V japonské studii z let 1997-98 se abúzus cigaret ukazuje jako důležitý faktor pro rozvoj kalcifikací.[45] Předpokládá se, že kouření inhibuje sekreci pankreatického uhličitanu a redukuje sérovou kapacitu inhibitoru trypsinu a hladinu α_1-antitrypsinu.[32] Nepříznivý vliv abúzu cigaret může být rovněž ovlivňován polymorfismem v genu pro uridin 5'-difosfát glukuronosyltransferázu. Tato rodina enzymů

je zodpovědná za detoxikaci od produktů kouření.[21]

Dalším rizikovým faktorem je PD, což je vrozená vývojová vada, u které nedojde ke správnému rozdělení a napojení hlavního vývodu. Většina pankreatických šťáv je odváděna pouze vedlejším vývodem, který není uzpůsoben k tak velkému průtoku, což může vyvolat komplikace.[46]

Byla vyřčena hypotéza, že relativní obstrukce odtoku na straně vedlejšího vývodu vlivem relativních stenóz v kombinaci se zvýšeným tokem pankreatické šťávy, způsobeným alkoholem nebo výživou, může zvýšit tlak v dorzálním pankreatickém kanálku. To může u pacientů s PD zapříčinit rozvoj pankreatitidy. Není ale jisté, jestli má PD vliv na rozvoj CHP, nebo pouze AP.[33] Přesto, že je tato vada poměrně rozšířená, pouze malé množství nemocných vykazuje příznaky CHP. Na druhou stranu se objevují studie, které dokazují vyšší prevalenci nealkoholické CHP pro jedince s PD v porovnání s kontrolní skupinou.[47]

Vzácně je s CHP spojováno i selhání ledvin. Důvodem je pravděpodobně zvýšená hladina uremických toxinů, které můžou poškozovat parenchym pankreatu, a změna v regulaci sekrece pankreatických enzymů a uhličitanu.[32]

Další vzácnou příčinou CHP může být i hyperkalcemie. CHP trpí asi 3 z 9 jedinců s familiární hyperparathyreózou (jednou z komplikací je zvýšení hladiny vápníku v krvi). Vápník napomáhá aktivaci trypsinogenu a stabilizaci trypsinu.[32] CHP u pacientů s hyperparathyreózou má odlišné klinické příznaky než u pacientů bez této komplikace. Pacienti, kteří podstoupili parathyreodektomii nemají recidivu pankreatické bolesti po nezanedbatelně dlouhou dobu (14,3 ± 13,8 měsíce).[48]

1. 2. 5 Klasifikace

Jednoznačně uznávaná a všeobecně používaná klasifikace je nezbytná pro usnadnění komunikace mezi odbornou veřejností. Během let se uskutečnila řada symposií, s cílem takovouto klasifikaci vytvořit.[15] Situaci příliš neusnadňuje, že se o CHP zajímá více lékařských oborů a každý z nich má snahu klasifikovat CHP ze svého úhlu pohledu.[49]

Historicky první klasifikace byla zavedena v roce 1963 na symposiu v Marseille. Tato klasifikace dělila pankreatitidu na akutní, recidivující akutní, chronicky recidivující a chronickou s anatomickými a/nebo funkčními poškozeními žlázy.[50]

V roce 1984, na druhém Marseillském symposiu, byla CHP považována za onemocnění,

pro které je charakteristická trvalá bolest, nebo opakující se ataky bolesti v oblasti břicha, případně zad. Nebolestivé formy nebyly do klasifikace zahrnuty. Dále byl brán v potaz výskyt pankreatické nedostatečnosti. Morfologickým znakem byla uznána permanentní ztráta exokrinního parenchymu a různé stupně dilatace vývodného systému pankreatu.[50] Rovněž byl zahrnut výskyt proteinových zátek, pseudocyst a malých center nekrózy. Poprvé byla charakterizována obstrukční forma CHP.[15]

Nejnovější znění této klasifikace pochází z roku 1988 a je známo jako Marseillsko-římská klasifikace. Tato verze již zahrnuje více faktorů. Byly charakterizovány tyto formy CHP: chronická obstrukční pankreatitida, chronická kalcifikující pankreatitida (CHCP) a chronická zánětlivá pankreatitida.[50] CHCP byla dále dělena na podskupiny: hereditární, nutriční a hyperkalcemická.[15]

Další klasifikace byla definována na mezinárodním setkání v Cambridge v roce 1983. Podnětem pro její vznik byly rozmáhající se funkční testy a nové zobrazovací techniky, jako je endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie (ECRP), magnetická rezonance (MRI), ultrasonografie (US) nebo počítačová tomografie (CT). Byla snaha o vytvoření klasifikace založené na zobrazovacích metodách vypovídající o vážnosti onemocnění, která by se dala porovnávat mezi různými diagnostickými centry.[15] Nevýhodou bylo, že morfologické abnormality ne vždy korelují se závažností onemocnění, jak je tomu například u funkčních testů. Normální ECRP (US, CT) nález může mít i pacient s histopatologicky rozvinutou CHP.[50] Na této klasifikaci spolupracovali odborníci z pěti oborů, kteří shrnuli poznatky o CHP týkající se jejich zaměření.[49]

Mezi aktuální klasifikace patří roztřídění CHP, které bylo poprvé definováno v roce 1995 Japonským pankreatickým sdružením (Japan Pancreas Society, JPS). Tato klasifikace dělí CHP na: jednoznačnou, pravděpodobnou a možnou. Zvláštními skupinami pak jsou ještě obstrukční, zánětlivá (autoimunitní) a tumor-formující pankreatitida. Základem klasifikace byly zobrazovací metody (ECRP, US, CT), funkční testy a histologické nálezy. Na základě rozvoje cholangiopankreatografie magnetickou rezonancí (MRCP) byla v roce 2001 provedena malá revize JPS kritérií a byly nově zahrnuty i výsledky MRCP. Z morfologického hlediska se nálezy US, CT, MRCP a ERP u JPS kritérií 1995 i 2001 v některých bodech liší od Cambridgeovské klasifikace.[50]

Další klasifikace byla vytvořena na základě výsledků endoskopické ultrasonografie (EUS) na sjezdu v Rosemontu (2007). Hlavním cílem bylo nahradit dnes již málo

dostačující Cambridgeovskou klasifikaci. Hlavním problémem na EUS založené diagnostiky byla rozličná terminologie a kritéria pro diagnostiku CHP v publikované literatuře, která velmi ztěžovala reprodukci a vzájemné porovnání výzkumů. Obrázky z EUS vyšetření byly poprvé v diagnostice použity již v roce 1986. Jejich nevýhodou je, že hodnocení je do značné míry subjektivní a záleží tedy na daném vyhodnocovateli.[51] Znaky jsou rozděleny do skupin, podle své významnosti: hlavní A kritéria (např.: kaménky v hlavním pankreatickém vývodu), hlavní B kritéria (např.: lobularity) a 8 vedlejších znaků (např.: pseudocysty). Na základě této klasifikace byla CHP rozdělena na tři skupiny (Tab. 1)[26]

Tabulka 1: EUS diagnostika CHP na základě Rosemontské klasifikace, zdroj:[26]

Odpovídající CHP	A) 1 hlavní A znak (+) ≥ 3 vedlejší znaky B) 1 hlavní A znak (+) hlavní B znak C) 2 hlavní A znaky
Připomínající CHP	A) 1 hlavní A znak (+) < 3 vedlejší znaky B) 1 hlavní B znak (+) ≥ 3 vedlejší znaky C) minimálně 5 vedlejších znaků
Neurčitý pro CHP	A) 3 - 4 vedlejší znaky, žádný hlavní znak B) hlavní B znak samotný, nebo s < 3 vedlejšími znaky
Normální	A) 2 a méně vedlejších znaků, žádný hlavní znak

V roce 2010 proběhla studie, která měla za úkol určit, zda je Rosemontská klasifikace přínosná pro diagnostiku založenou na EUS. Výsledky výzkumu sice vykazovaly lepší skóre pro diagnostiku dle Rosemontské klasifikace, avšak díky malému souboru pozorovaných statisticky málo významně.[51]

TIGAR-O (Tab. 2) klasifikace publikovaná v roce 2001 je první klasifikace založená na etiologických faktorech.[32] Znalost etiologie je nezbytná k pochopení přirozených a klinických mechanismů vzniku jednotlivých forem CHP a k rozvoji preventivních a terapeutických opatření.[50]

Další klasifikace vznikaly na základě stále větší potřeby korelovat klinické příznaky funkční nedostatečnosti s dosavadními používaným klasifikacemi.[53]

V roce 1996 bylo zorganizováno mezinárodní setkání v Zurichu. Jeho hlavním úkolem bylo zlepšit diagnostiku alkoholické CHP. Zde navržená klasifikace zahrnovala morfologické, histopatologické a etiologické charakteristiky.[54] Byly poprvé diskutovány

i klinické příznaky. Bohužel byly brány v potaz pouze z pohledu alkoholické CHP, pro niž byla zavedena klasifikace na tři stupně A, B a C, dle výskytu charakteristik. Ostatní formy CHP nebyly zohledněny.[53]

Tabulka 2: Klasifikace CHP podle etiologických faktorů (TIGAR-O klasifikace), zdroj:[23]

T - toxicko metabolická forma	• alkohol, nikotin, hyperlipidémie, urémie, xenobiotika, toxiny, hyperkalcémie (hyperparathyreóza[52])
I - idiopatická forma	• idiopatická forma s časným začátkem nemoci • idiopatická forma s pozdním začátkem nemoci • tropická forma • ostatní [19]
G - genetická forma	• hereditární chronická pankreatitida • autosomálně recesivní forma • deficit α_1-antitrypsinu
A - autoimunitní forma	• izolovaná autoimunitní pankreatitida (AIP) • syndromová AIP (např. Sjögrenův syndrom[19])
R - rekurentní AP spojená s morfologickými změnami CHP	• ischemická pankreatitida • postradiační • postnekrotická
O - obstruktivní forma	• obstrukce vývodu • stenóza Vaterovy papily • cystoid utlačující pankreatický vývod • PD • jizva po traumatickém postižení žlázy

Manchesterská klasifikace prezentovaná v roce 2006 dělila CHP také do tří stupňů A, B a C. Stupeň A, tj. lehká forma, byl charakterizován zachováním exokrinní a endokrinní funkce pankreatu. Stupeň B, nebo-li střední forma, byl charakterizován narušením exokrinní/endokrinní funkce a stupeň C, tzv. koncové stádium, byl charakterizován výskytem morfologických i klinických komplikací zároveň.[55]

O rok později byla publikována klasifikace nazvaná M-ANNHEIM. Její pojmenování vzniklo z počátečních písmen jednotlivých kritérií: M (multiple)- rozličné rizikové faktory vzniku CHP roztříděné do skupin: A - alkohol, N - nikotin, N - nutriční faktory, H - hereditární faktory, E - faktory týkající se vývodového systému, I - imunologické faktory a M - metabolické faktory.[56] Velmi detailní rozdělení ji znevýhodňovalo pro praktické využití.[53]

Další návrh ABC klasifikace (Tab. 3) byl prezentován Büchlerem a Malfertheinerem na sjezdu v Bernu v roce 2000[57] a publikována v roce 2009.[53] Tato klasifikace se jako první, a zatím jediná, snažila hodnotit pacienty i z hlediska poškození endokrinní a exokrinní sekretorické funkce pankreatu. To bylo ale posuzováno pouze klinicky, nikoliv laboratorními testy. Jednotlivé stupně poškození pankreatu korelovaly s množstvím elastázy 1 (E1) ve stolici zjištěném pomocí monoklonální protilátky.[58]

Tabulka 3: Návrh bernské klasifikace (2000), upraveno podle:[57]

stupeň	podskupina	klinická charakteristika
A		Bolest nebo ataky AP, bez ztráty funkcí
B		Klinické a morfologické komplikace CHP (pseudocysta, absces, stenóza, ascites,....) bez manifestace ztráty funkcí
C		Manifestace ztráty funkce pankreatu s nebo bez přítomnosti klinických komplikací CHP
	C1	Diabetes mellitus nebo steatorea
	C2	Diabetes mellitus a statorea
	C3	Diabetes mellitus a/nebo stetorea + klinické komplikace CHP

V současnosti je tato klasifikace používána v modifikované podobě i na Ústavu lékařské biochemie a lékařské diagnostiky (ÚLBLD) v Praze. Podskupiny C1 a C2 byly spojeny v jednu skupinu C a podskupina C3 byla označena jako skupina D (Tab 4).[59]

Tabulka 4: Modifikace návrhu bernské klasifikace používaná v současnosti na ÚLBLD, upraveno podle:[59]

		Morfologické změny	
Diabetes mellitus / steatorea		nepřítomny	přítomny
	nepřítomny	A	B
	přítomny	C	D

1. 2. 6 Jednotlivé formy chronické pankreatitidy

V současné době rozlišujeme 3 hlavní formy CHP: CHCP, pro niž je klasický výskyt kalcifikací, obstrukční CHP, charakteristickou obstrukcemi pankreatických vývodů, a AIP, založenou na imunologických reakcích. CHCP se dále dělí na podskupiny: alkoholická CHP, idiopatická CHP, tropická CHP a hereditární CHP.[16]

1. 2. 6. 1 Chronická kalcifikující pankreatitida

CHCP je charakteristická bolestí v oblasti břicha, opakovanými atakami s projevem AP, případně výskytem kamenů uvnitř pankreatických vývodů. Histologicky je tato forma spojována s tkáňovou fibrózou, poškozením acinárních buněk a výskytem zánětlivých buněk v pankreatu.[16] Pankreatický vývod bývá často zúžený proteinovými zátkami, což může vést k akumulaci uhličitanu vápenatého v pankreatu[60], jeho precipitaci na zátkách a tvorbě kamenů.[61] Uhličitan vápenatý je hlavním stavebním prvkem kalcifikací.[2] Kalcifikace se ojediněle vyskytují u všech typů CHP, ale charakteristické jsou hlavně pro alkoholickou a tropickou formu CHP.[16]

Nejrozšířenější formou CHP vůbec je alkoholická CHP. Ve vyspělých zemích je alkohol hlavní příčinou onemocnění u 55 - 80 % případů všech CHP.[32] Riziko vzniku CHP je závislé jak na množství konzumovaného alkoholu, tak na délce konzumace. Vývoj alkoholické CHP je mnohem pravděpodobnější u jedinců s vysokým příjmem tuků a proteinů, z tohoto důvodu je nejohroženější skupinou mužská populace mezi 40 a 50 lety.[62] U alkoholické CHP se endokrinní nedostatečnost vyskytuje průměrně po 13,1 letech, exokrinní po 19,8 letech a kalcifikace se objevují již po 8,7 letech od prvního projevu onemocnění.[7]

Další formou CHCP je idiopatická CHP, která je pozorována asi u 10 - 30 % nemocných s CHCP (Anglie), rovnoměrně u mužů a žen. Její zvláštností je, že se typicky vyskytuje ve dvou věkových skupinách - u mladých lidí okolo 20 let a pak v obvyklé skupině okolo 50 let.[60] Pro juvenilní formu je charakteristické, že pacienti mají vleklé návaly bolesti (až 90 %)[21], ale ve většině případů je postup morfologického a funkčního poškození pomalý a vzácnější, než u alkoholické CHP. Tato forma vykazuje jisté biochemické a klinické podobnosti s hereditární formou.[33] Pro pozdní formu je typické, že pacienti mívají mírné, případně vůbec žádné bolesti a prvním symptomem bývá až exokrinní či endokrinní

nedostatečnost. Obě formy se odlišují od alkoholické formy svou věkovou distribucí a celkově pomalejším výskytem kalcifikací.[33]

Tropická CHP bývá často diagnostikována jako idiopatická CHP a pravděpodobně má smíšenou etiologii. Příčinou může být výživa (malnutrice a manioková dieta) a genetické faktory. Nejčastěji se vyskytuje v Indii, Jižní Africe a Jižní Americe.[17] Objevuje se již v dětství a opět postihuje oboje pohlaví přibližně stejně.[62] Je charakteristická opakovanými atakami bolesti, funkční nedostatečností, výskytem kalcifikací a rozvojem diabetu mellitus.[61]

Hereditární CHP je geneticky podmíněnou formou a je spojována s autosomálně dominantní (penetrace 80 %)[63] mutací na chromosomu 7q35 v genu PRSS1.[23] Tato mutace má za následek jednodušší aktivaci trypsinogenu na trypsin, který je zároveň mnohem hůře inhibován.[14] I tato forma se projeví již v dětství (převážně do 10 let)[63] a představuje významně zvýšené riziko pro vznik karcinomu pankreatu.[62] Kalcifikace se objevují průměrně mezi 22 - 25 rokem a exokrinní a endokrinní nedostatečnost se projevuje v 29 - 38 letech. Jedná se o poměrně vzácnou formu CHP, prevalence v západních zemích je 0,3/100 000 obyvatel.[63]

1. 2. 6. 2 Obstrukční pankreatitida

Obstrukční CHP vykazuje méně častý výskyt než CHCP.[62] Jedná se o zúžení hlavního pankreatitického vývodu, které je charakterizováno protiproudým rozšířením kanálku, atrofií acinárních buněk, ischemií pankreatitické tkáně a rozšířením fibrózy. Obstrukční CHP se může rozvinout z mnoha příčin: trauma, jizvy po prodělané AP, nádory, pankreatické kameny, dysfunkce Oddiho svěrače, stenóza papily Vateri, PD atd. Pokud je tato forma brzy zaléčena, histologické a funkční poškození je částečně až úplně reverzibilní.[21]

1. 2. 6. 3 Autoimunitní pankreatitida

Autoimunitní forma má charakteristické klinické, serologické, histomorfologické i obrazové znaky a její prevalence je 1,9 - 6,6 % ze všech případů CHP[21], průměrný věk typický pro AIP je 59,4 roku.[13] Je to T-buňkami zprostředkované onemocnění s lymfoplasmatickými infiltracemi v pankreatické tkáni a fibrózou pankreatického

parenchymu. Sérové IgG nebo IgG4 a protilátky (laktoferinové protilátky (50 - 76 %), protilátky proti karbonové anhydráze II (30 - 59 %), a další méně specifické protilátky) jsou obvykle zvýšené. Hlavní nevýhodou diagnostiky AIP je nedostatek specifických biochemických znaků. JPS navrhla v roce 2002 jako diagnostická kritéria přítomnost protilátek, zvětšení pankreatu, zúžení pankreatitického vývodu, lymfoplasmatické infiltrace, pozitivní odpověď na steroidní léčbu a v 60 % případů spojení s dalšími autoimunitními chorobami (autoimunitní hepatitida, revmatoidni artritida, sklerotizující cholangitida, Sjögrenův syndrom, atd.). Klinicky má AIP mírné projevy: ataky bolesti jsou neobvyklé a kalcifikace a pseudocysty většinou chybí. Poškození exokrinní a endokrinní funkce má většinou mírný průběh. Na druhou stranu často dochází k rozvoji ikteru a úbytku hmotnosti.[21] V roce 2006 Chari et. al. představil HISORt kritéria pro diagnostiku AIP. Tato kritéria se zakládají na histologii, zobrazovacích technikách, serologii a odpovědi na steroidní léčbu.[64]

1. 2. 7 Diagnostika chronické pankreatitidy

Diagnostika CHP je obtížná, hlavně u pacientů s chronickou břišní bolestí bez projevů pankreatické nedostatečnosti nebo kalcifikací. Existuje sice široká škála metod pro diagnostiku CHP, ale chybí zlatý standard diagnostiky a diagnostická kritéria jsou známa jen pro pokročilá stádia CHP.[65] Diagnostika CHP může být založena buď pouze na morfologických, či histologických nálezech, nebo na kombinaci morfologických, funkčních a klinických charakteristik. Ideální test by měl být dostatečně citlivý a specifický, přesný a spolehlivý, široce dostupný, levný, jednoduše proveditelný a neměl by představovat žádné riziko pro pacienta. V současné době je diagnostika CHP založena na zobrazovacích metodách a funkční nedostatečnost je posuzována na základě přímých a nepřímých funkčních testů.[32]

Výzkumy napovídají, že i ve vývoji CHP, která je dosud definována nevratnými změnami, musí existovat fáze, kdy je poškození ještě málo rozsáhlé a mělo by být reverzibilní. Je tedy třeba najít biologické a/nebo zobrazovací metody, které by odhalily již toto stádium CHP.[50]

Genetické testování je stále velmi diskutovanou otázkou, neboť interpretace výsledků může mít dopad nejen na pacienta, ale i na jeho pokrevní příbuzné. V současné době jsou

dostupné genetické testy pro hlavní mutace na PRSS1, SPINK i CFTR. Jejich přínos v diagnostice CHP je ale malý, neboť mutace v těchto genech samy o sobě nevypovídají o přítomnosti ani vývojovém stupni CHP, pouze o jejím přirozeném původu. Neslouží tedy k diagnostice CHP jako takové, ale pomáhá při její klasifikaci.[32] Nevýhodou je i vysoká cena vyšetření.[66]

Hlavním bodem diagnostiky CHP jsou patologické změny tkáně. Chirurgický zásah v podobě laparoskopie nebo laparotomie by sice získal dostatečně velký vzorek pro analýzu, ale proti této metodě hovoří náročnost provedení, vysoké finanční nároky a v neposlední řadě i s chirurgickým zákrokem spojená rizika pro pacienta.[32]

1. 2. 7. 1 Zobrazovací techniky

Běžně jsou diagnosticky využívány čtyři hlavní zobrazovací techniky: CT, ERCP, EUS a MRI. Rozsáhlejší kalcifikace mohou být objeveny i u prostého rentgenového nebo US vyšetření oblasti břicha.[32] Někteří autoři dokonce pokládají transabdominální US za základní vyšetření při podezření na CHP.[13] Pokud jsou prokázány kalcifikace, CHP může být diagnostikována s 90% jistotou. CT a ERCP již pravděpodobně dosáhly svých technických limitů, EUS a MRI jsou dále rozvíjeny a zdokonalovány, neboť jejich role v diagnostice ještě nedosáhla svého vrcholu.[32]

Pro svou širokou dostupnost, neinvazivitu a relativně vysokou citlivost ke střední až těžké formě CHP bývá první volbou diagnostiky CHP CT vyšetření. Tato metoda je schopna rozpoznat záněty a nádory větší než 1 cm. CHP je u tohoto vyšetření diagnostikována především při přítomnosti kalcifikací v parenchymu a vývodech a/nebo rozšířením hlavního pankreatického vývodu v kombinaci s parenchymální atrofií.[32] Kalcifikace jsou viditelné na kontrastním i nekontrastním CT. Rozšíření vývodů jsou rozpoznatelná na kontrastním CT.[66] Pro CT bývá uváděna 47 - 80% citlivost a 90% specifičnost.[3] U pacientů s počáteční formou CHP je role CT omezena technickými limity metody a počáteční morfologické změny nemusí být identifikovány. Přesto CT představuje nejlepší screeningovou metodu pro detekci CHP a vyloučení jiného onemocnění s podobnými klinickými projevy.[32]

ERCP je často používaným diagnostickým testem hlavně u pacientů bez kalcifikací a steatorey. Hodí se k vyšetření u pacientů s podezřením na CHP s dysfunkcí Oddiho svěrače

a ke zjištění anatomických anomálií, jako třeba PD.[66] Pro posouzení změn na pankreatu je u této metody stále nejvíce používaná Cambridgská klasifikace (viz 1. 2. 5.), někdy v kombinaci s jinou klasifikací. Předpokládá se, že ERCP vyšetření není schopno detekovat poměrně velkou skupinu pacientů s počáteční formou onemocnění bez postřehnutelných změn na struktuře pankretu. Malé, přesto nezanedbatelné riziko pro pacienta (více než 20% riziko akutní post-ERCP pankreatitidy)[3] a poměrně vysoké finanční náklady staví ERCP do role sekundární diagnostické metody CHP. ERCP zůstává užitečným nástrojem pro diagnostiku u pacientů, kde jiné metody nepřinesly očekávané výsledky a u pacientů, u nichž není možné jiné vyšetření.[32] Jiný zdroj uvádí, že ERCP je stále považována za zlatý standard diagnostiky CHP.[13] Její citlivost je 66 % pro detekci malých změn a 93 % pro detekci pozdní fáze CHP.[3]

Oblíbenost a využití EUS jako diagnostického nástroje CHP v posledních letech stále stoupá. Umístění vysokofrekvenční sondy do blízkosti pankreatu umožňuje získání obrázků pankreatického parenchymu a struktury kanálků o vysokém rozlišení (< 1 mm), a to bez použití ionizující radiace. EUS je rovněž možno využít k získání vzorku pankreatické tkáně a pankreatické šťávy. Tato možnost kombinující zobrazovací metodu a vyšetření pankreatické funkce, histologii tkáně a zjištění molekulárních markerů dělá z EUS test první volby pro diagnostiku CHP. Přesto i u této metody jsou ještě jisté nedostatky. Za prvé „normální“ nález by měl být lépe a přesněji definován, hlavně v souvislosti s věkem a obezitou. Za druhé je třeba ještě dále standardizovat interpretace nálezů, neboť jsou dosud do značné míry závislé na individuálním pozorovateli. Dalším problémem je rozdíl v technické vybavenosti jednotlivých pracovišť, hlavně pokud jde o rozlišení monitorů a výkonnost procesorů.[31] Z pohledu pacienta je nevýhodou i to, že k tomuto vyšetření je stále zapotřebí sedace. EUS se hodí více k vyloučení, než potvrzení CHP, neboť dosahuje nezanedbatelného podílu falešně pozitivních výsledků u starších pacientů a diabetiků. Citlivost a specifičnost EUS velmi kolísá v závislosti na tom, s jakou metodou je srovnávána. Uvádí se citlivost 57 - 97 % a specifičnost 64 - 85 %.[3]

Stejně jako EUS i MRI v kombinaci s MRCP zaznamenává v současné době nárůst popularity u diagnostiky CHP. MRCP je neinvazivní, nevyužívá ionizující radiaci ani kontrastní látky[67] a většinou nevyžaduje sedativa, což z ní dělá metodu první volby u několika skupin pacientů, především u dětí[32] a u pacientů, u nichž hrozí vývoj post-ERCP pankreatitidy.[13] V kombinaci s MRI podává MRCP kompletní informace o pankreatu a

stavu pankreatické tkáně. Stejně jako EUS i MRI může dosáhnout až rozlišení okolo 1 mm.[32] Pro detekci kalcifikací má MRI nižší citlivost než CT.[66] Citlivost je uváděna okolo 75 % pro pokročilé stádium a 25 % pro rané formy. Hlavním přínosem je lepší zobrazení zúžení žlučového a pankreatického vývodu, v porovnání s ostatními neinvazivními zobrazovacími technikami.[3]

1. 2. 8 Diagnostika pankreatické insuficience

Z důvodu významné funkční rezervy musí být pankreas značně poškozen, aby došlo k výskytu klinicky rozpoznatelné funkční nedostatečnosti. Zlatým standardem pro posouzení exokrinní funkce pankreatu jsou invazivní testy, zakládající se na odběru pankreatických šťáv a jejich analýze. Funkční testy neslouží ani tak k diagnostice CHP, jako spíš k posouzení její závažnosti a rozsahu funkčního poškození. Nevýhodou funkčních testů jsou obtíže se srovnáváním mezilaboratorních výsledků z důvodu používání rozdílných substrátů a detailní metodiky, a dále časová náročnost.[32]

Jiné studie naopak přisuzují funkčním testům i důležitý diagnostický význam, a to hlavně u raných forem CHP, kde ještě nejsou viditelná poškození morfologie pankreatu. V tomto ohledu se měření zakládá na posouzení sekretorické kapacity v odpovědi na stimulaci sekretinem nebo CCK. Pokles objemu sekretované pankreatické šťávy by se měl projevit dříve než exokrinní, či endokrinní nedostatečnost.[7]

Na třech hlavních bodech využití funkčních testů se schodují obě strany: diagnostika pankreatické nedostatečnosti, pomůcka k zhodnocení závažnosti a rozvinutí CHP a posouzení vhodnosti, případně účinnosti léčby CHP.[7, 32]

Funkční testy se dělí do dvou velkých skupin: na přímé a nepřímé[7], v jiné literatuře na invazivní a neinvazivní.[68]

1. 2. 8. 1 Přímé funkční testy

Přímé funkční testy jsou založeny na přímém měření pankreatické sekrece (hydrogen uhličitan sodný a/nebo trávicí enzymy). Přímými testy se dá měřit jak koncentrace trávicích enzymů v pankreatické šťávě, tak sekretorická kapacita po přímé stimulaci sekretinem nebo CCK.[7] Hlavním technickým problémem měření objemu a složení pankreatických šťáv po stimulaci, bylo zabránit kontaminaci pankreatických šťáv šťávami

žaludečními a předejít vylití pankreatických šťáv do duodena.[69] Tyto testy jsou sice schopny odhalit i rané stádium onemocnění, ale jsou dostupné jen v několika málo specializovaných centrech na světě.[3] Přesto jsou pokládány za zlatý standard diagnostiky CHP.[70]

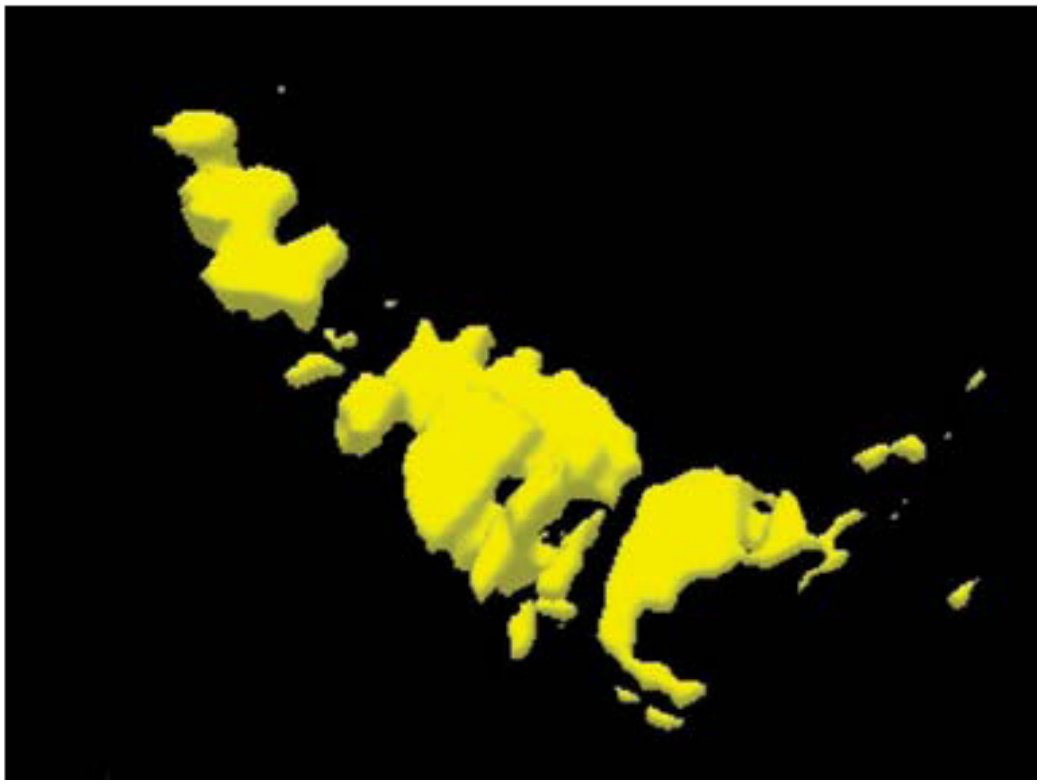
Sekretin stimuluje sekreci pankreatické šťávy bohaté na uhličitanové ionty a chudé na enzymy. U tohoto testu jsou zavedeny dvě sondy. První slouží k odebírání žaludečních šťáv tak, aby se zamezilo kontaminaci duodena a druhá sonda je zavedena přímo do duodena a slouží k odebírání pankreatických šťáv. Existuje mnoho modifikací tohoto testu, lišících se podáním substrátu a detailním provedením. Pacient musí na tento zákrok přijít nalačno a je mu odebrán vzorek z duodena i žaludku, pro zjištění bazálního pH obou šťáv. Rovněž může být změřen objem šťáv sekretovaných v určitém časovém intervalu. Poté je podán sekretin intravenózně nebo infúzí. V poslední době je upřednostňováno intravenózní podání, které vykazuje stejné, případně lepší výsledky než kontinuální infúze. Podávaná dávka je většinou vyšší než bývá fyziologická koncentrace, ale u pacientů je dobře snášena. Může být podán sekretin lidský, nebo prasečí. Po stimulaci je v časových intervalech měřen objem sekretovaných šťáv, jejich pH a koncentrace uhličitanových aniontů. Koncentrace uhličitanového aniontu bývá stanovována titrací kyselinou chlorovodíkovou nebo automatickými analyzátory. Tento test je pravděpodobně k CHP nejcitlivější. Citlivost pro počáteční stádium CHP je 75 % a více jak 97 % pro pozdní fázi. Specificita v porovnání s histologií je 90 %. Metoda může vykazovat falešně pozitivní výsledky pro pacienty, kteří v nedávné době prodělali ataky s projevem AP.[3]

CCK stimuluje sekreci šťáv bohatých na pankreatické enzymy. Měření po stimulaci CCK má tedy vztah k výskytu steatorey. Provedení tohoto testu je složitější než provedení sekretinového testu v tom, že je třeba zajistit žaludeční stimulaci duodena k sekreci CCK. Stimulační CCK je podáván většinou infúzí. Někdy může být CCK nahrazen cerulinem, který je možno připravit synteticky, nebo bombezinem.[3] Stejně jako u jiných přímých funkčních testů, i u CCK stimulovaném testu je odebírán a měřen objem sekretovaných šťáv po určitý časový úsek. Nevýhodou tohoto testu je, že CCK může vyvolávat pocity nausey daleko častěji než sekretinová infúze. U tohoto testu se rovněž doporučuje měření kontrolního substrátu pro kontrolu střevní perfuze. Modifikovaná verze testu měřící lipázu vykazuje vysokou citlivost pro počáteční i pozdní fázi CHP v porovnání s ERCP.[3]

V Evropě a Japonsku je používán hlavně kombinovaný sekretin-CCK test. Umožňuje

měření sekrece uhličitanových iontů i pankreatických enzymů najednou. Aby se zabránilo naředění pankreatických enzymů vodnatou pankreatickou šťávou stimulovanou sekretinem, podávají se substráty postupně. Některé studie ale uvádějí že tento kombinovaný test přináší jen málo informací navíc oproti samotnému sekretinovému testu.[3] Přesný postup vyšetření se liší mezi centry. K určení ztrát perfuzí je doporučováno použít neabsorbující se marker, například polyethylenglykol. To ale vyžaduje použití třetí sondy, což komplikuje provedení testu. Citlivost i specificita přesahují 90 %.[71]

Endoskopický test kombinuje výhody přímého testu a neinvazivní metody. Spočívá v měření uhličitanu a/nebo aktivity pankreatických enzymů ve vzorku pankreatické šťávy odebrané během endoskopického vyšetření po intravenózním podání sekretinu nebo CCK. Tato metoda slibuje do budoucna další vývoj. Protože tento test vyžaduje zavedení sondy minimálně na jednu hodinu, je doporučováno použití mírných sedativ pro zvýšení komfortu pacienta.[71]



Obrázek 1: MRCPQ vyšetření pankreatu, viditelná je oblast pankreatu, kde je po stimulaci sekretinem sekretována pankreatická šťáva, zdroj:[87]

Poslední dobou je prováděno několik výzkumů účinnosti MRCP diagnostiky pankreatické sekrece po stimulaci sekretinem, neboli kvantitativní MRCP (MRCPQ).

Výsledky MRCPQ měření objemu sekretovaných pankreatických šťáv po stimulaci sekretinem (Obr. 1) korelují s klinickými symptomy i konvenčními neinvazivními testy pankreatické funkčnosti (např.: stanovení E1 ve stolici). Výhodou je navíc i to, že se jedná o přímé neinvazivní měření čisté pankreatické šťávy bez kontaminace žlučí a žaludečními šťávami. Podmínky měření jsou snadno kontrolovány, nezáleží na výživě, nevadí enzymatická substituční léčba.[68]

1. 2. 8. 2 Nepřímé funkční testy

Nepřímé funkční testy jsou založeny na měření sekundárního efektu, který vychází z činnosti trávicích enzymů.[7] Jejich nevýhodou je, že nejsou schopny odhalit počáteční stádia onemocnění.[3]

Měření obsahu celkového tuku ve stolici za 72 hodin bývalo rutinním testem malabsorpce a zlatým standardem pro určení míry steatorey. Přesto měl tento test mnoho nedostatků, mimo jiné i nespecifičnost k pankreatickým chorobám (steatoreou se může projevit například Crohnova choroba).[3] Dalším problémem této metody je nutnost uchovávat všechny odebrané vzorky v chladu (v lednici) a dodržování přesné tukové diety (100 g tuku/24 h) po celých 6 dní (3 dny před prvním odběrem a po celou dobu odběru). U pacientů na enzymatické substituční léčbě je další komplikací to, že je třeba léčbu vysadit minimálně týden před odběrem, což s sebou nese nepříjemné projevy jako bolesti, krvácení, nebo plynatost.[3] Nepříjemný tento test není jen pro pacienty, ale i pro laboranty, neboť vzorky stolice nasbírané za 72 hodin musí být homogenizovány, což je zčásti manuální metoda. Nadějí bylo měření založené na blízkém infračerveném záření, jehož aplikace by mohla usnadnit zavedení testu do rutinní praxe. Ale ani tato modifikace neřeší výše vyjmenované problémy spojené s pacienty.[71] Exkrece více než 7 g tuku/24 hodin bylo diagnostikováno jako malabsorpce a více než 20 g/den jako steatorea.[66] Tento test je dnes využívána převážně z výzkumných důvodů.[3]

Lundhův test býval jedním z nejrozšířenějších nepřímých funkčních testů.[69] Po zavedení katetru do duodena byl podán testovací pokrm o objemu 300 ml a obsahem 6 % tuků, 5 % proteinů a 15 % cukrů. Obsah duodena byl pak odebírán buď ve čtyřech po sobě jdoucích třiceti minutových frakcích, nebo častěji v jednom dvou hodinovém sběru. Většinou byla měřena koncentrace trypsinu, neboť je málo citlivý ke změnám pH. V některých případech

se ještě pro kontrolu měřila i lipáza.[72]

Významným průlomem byl rozvoj radioimunometod. Brzy na to bylo objeveno, že v krvi zdravých lidí i pacientů s CHP se trypsin vyskytuje ve formě neaktivního prekurzoru tryspinogenu, pouze u pacientů s AP se přechodně objevují i aktivní formy trypsinu. Převážná většina imunochemických metod pro trypsinogen vykazovala ale určitou cross-reaktivitu s aktivní formou trypsinu a výsledky se tedy vztahovaly celkově k imunoreaktivnímu trypsinu (IRT). U pacientů s rozvinutou CHP byly hladiny IRT nízké, ale u pacientů s počáteční formou onemocnění nebyly významně odlišné od zdravých osob. Byly prováděny pokusy se stimulací pacientů intravenózně podaným bombesinem (hormonální působek stimulující sekreci pankreatických enzymů), ale tato metoda nebyla nikdy příliš oblíbena pro časovou náročnost.[8] Výhodou je ale to, že je to jediný funkční test využívající krevního séra.[3]

Podle studie zabývající se stanovením hladiny pěti pankreatických enzymů v séru, nelze toto měření využít k identifikaci pacientů s pankreatickou nedostatečností kvůli nízké citlivosti metod. Přesto hladina sérového trypsinogenu může být užitečným markerem v diagnostice CHP.[73] Citlivost stanovení trypsinogenu v séru se pohybuje pro střední a těžké formy CHP 33 - 65 %.[3]

Dalším nepřímým testem byl NBT-PABA test. N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoová kyselina (NBT-PABA) je modelový substrát, který je štěpen chymotrypsinem na volnou p-aminobenzoovou kyselinu (PABA). Žádný jiný enzym přítomný v duodenu nevykazuje tuto aktivitu. Substrát byl podán společně s pokrmem vhodně upraveným ke stimulaci pankreatické sekrece. Volná PABA se měřila buď v séru, nebo v podobě kyseliny hippurové (absorpce ve střevech a následná konjugace PABA s glycinem) v moči. Z množství volné PABA se nepřímo vypočítalo množství sekretovaného chymotrypsinu. Nevýhodou testu bylo to, že test mohl být značně zkreslen jiným onemocněním. U pacientů s intestinálním onemocněním byla ovlivněna absorpce PABA, u pacientů s jaterním onemocněním byla ovlivněna konjugace PABA s glycinem a u pacientů s onemocněním ledvin byla zase ovlivněna exkrece močí. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto několik modifikací testu, ale žádná se příliš nerozšířila.[8] Tento test již není komerčně dostupný.[71]

Testovací látkou byl také fluorescein dilaurát, syntetický ester jen špatně rozpustný ve vodě. Ten byl hydrolyzován specifickým pankreatickým enzymem na kyselinu laurelovou

a volný, ve vodě rozpustný fluorescein. Fluorescein byl absorbován v tenkém střevě, konjugován v játrech a vyloučen močí. Substrát byl podán společně s testovacím pokrmem a 1 L slabého čaje vypitého mezi 3. a 4. hodinou po podání substrátu. Po dobu 10 hodin byla sbírána moč. Obden byla stejná procedura zopakována se samotným fluoresceinem jako kontrolní měření.[69] Tento test již není komerčně dostupný.[71]

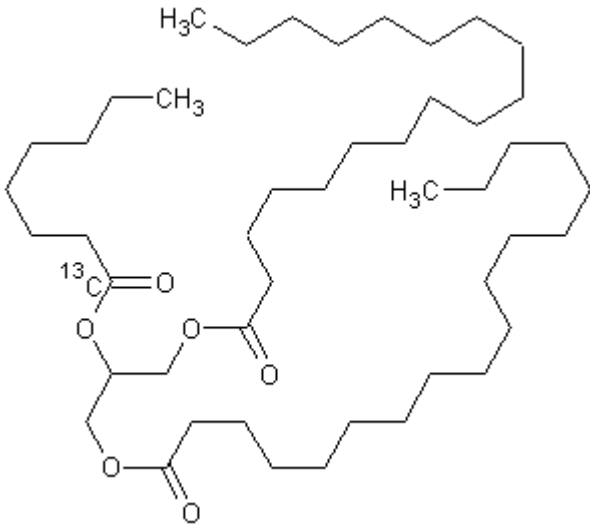
Pokles koncentrace pankreatických enzymů v sekretované šťávě se projeví i poklesem jejich koncentrace ve stolici. Nejvýraznější pokles sekrece je u trypsinu, ten je ale degradován při průchodu duodenem a intestinálním traktem. Z dalších proteáz je k tomuto účelu vhodný například chymotryspin, který je ale rovněž degradován střevní pasáží. Z tohoto důvodu vykazovalo měření aktivity chymotrypsinu často falešně negativní výsledky.[3] Naopak u chromogenního stanovení, jehož podstatou byla reakce chymotrypsinu s chromogenem a následné uvolnění spektrometricky stanovitelné látky, byl sledován vysoký podíl falešně pozitivních výsledků. Stejně jako chymotrypsin katalyzují hydrolýzu chromogenu i některé enzymy pocházející z mikrobiální flóry. V dnešní době se chymotrypsin stanovuje pomocí monoklonální protilátky.[74]

Výhodou chymotrypsinu je to, že nepodléhá degradaci ve stolici, neboť se naváže na nerozpustné zbytky. V tomto stavu je stabilní několik dní i při pokojové teplotě. Pro pozdější formu CHP má stanovení chymotrypsinu citlivost 50 - 80 % a specificitu 50 - 100 %. Test může být ovlivněn zvýšeným obsahem vody ve stolici při průjmu.[3]

K měření obsahu E1 ve stolici je využíváno imunometody s enzymaticky značenou monoklonální i polyklonální protilátkou (ELISA).[71] Pankreatická E1 byla izolována a charakterizována jako proteáza specifická pro pankreas a procházející minimální změnou při průchodu intestinálním traktem. Její hladina je ve stolici až 6x vyšší než v pankreatické šťávě.[8] Výhodou je, že toto měření není ovlivněno enzymatickou substituční terapií.[71] Normální hladina E1 ve stolici je více než 200 μg/g. U pacientů, kde je naměřena hodnota 100 - 200 μg/g je podezření na lehkou až střední funkční nedostatečnost, u pacientů s hodnotou nižší než 100 μg/g je podezření na těžkou funkční nedostatečnost.[66] I měření E1 je limitováno mnoha faktory, například tím, že je schopno odhalit až pokročilé stádium CHP se steatoreou. V porovnání s ERCP je citlivost této metody pro lehkou formu CHP 0 - 65 %, pro těžkou formu je to 33 - 100 %, specificita je uváděna 29 - 95 %. V porovnání s chymotrypsinem vykazuje E1 vyšší citlivost.[3] Hladina E1 výborně koreluje se sekretinovým testem[66] a s morfologickým aspektem poškození pankreatu.[59]

Obrázek 2: Odběrová nádobka na vzorek stolice, zdroj: DIALAB, http://www.dialab.s8.majorshop.cz/z702-nadobka-30-ml-pp-na-odber-stolice-nesterilni-bile-vicko, datum: 1. 5. 2012

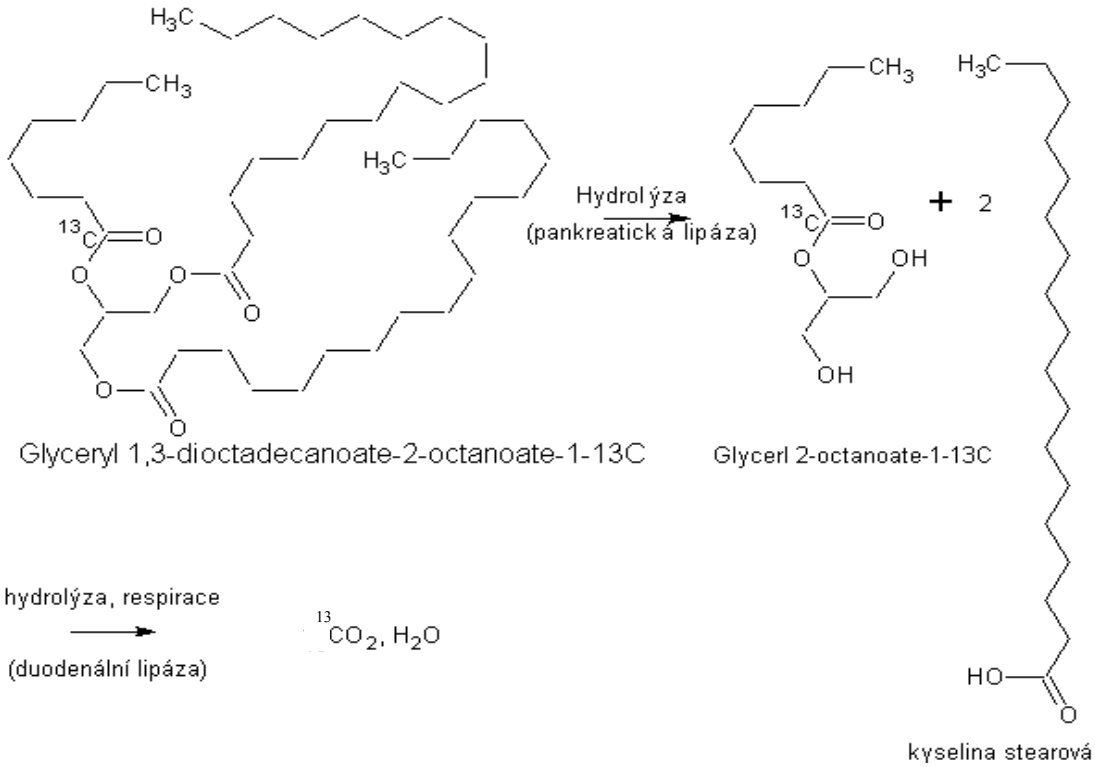
U dechových testů je orálně podán značený substrát spolu s testovacím pokrmem. Nejčastěji používaným substrátem jsou smíšené ^{13}C-triglyceridy (^{13}MTG, Obr. 3),



Obrázek 3: ^{13}MTG (Glyceryl 1,3-dioctadecanoate-2-octanoate-1-^{13}C), upraveno v programu ChemSketch podle Chemical book

cholesteryl ^{13}C-oktanoát, ^{13}C-hiolein a ^{13}C-triolein. V duodenu jsou ^{13}C značené MTG hydrolyzovány pankreatickými lipázami a ^{13}C značené metabolity jsou absorbovány a metabolizovány v játrech na $^{13}CO_2$, který je vylučován dechem (Obr. 4).[71] Zbytková frakce

nerozštěpeného substrátu ve stolici byla sledována v rozmezí 1 - 5 % z podaného množství.[75] ^{13}C-MTG dechový test dobře koreluje se steatoreou a umožňuje posouzení dynamiky a kinetiky trávicího procesu. Hodí se pro kvantitativní posouzení funkční insuficience a pro optimalizaci substituční terapie trávicími enzymy.[59]



Obrázek 4: Metabolismus ^{13}MTG, upraveno v programu ChemSketch podle : ^{13}C-Breath Tests in Medical Research and Clinical Diagnosis, Wetzel K., Fisher H., Fisher ANalysen Instrumente

Procentuální zastoupení vydechovaného $^{13}CO_2$ je měřeno hmotnostní spektrometrií nebo izotop-selektivní nondisperzní infračervenou spektrometrií (NDIRS). ^{13}C-triolein je optimální substrát k diagnostice tukové maldigesce a tento dechový test je tedy jednoduchou alternativou měření tuku ve stolici. Testy se hodí i ke kontrole účinnosti substituční léčby.[71]

1. 2. 9 Enzymatická substituční terapie

Na strávení průměrného obsahu tuků v jednom jídle je potřeba 25 000 - 40 000 jednotek lipázy.[76] U pacientů s pankreatickou exokrinní insuficiencí (PEI) je třeba lipázu podávat orálně, většinou společně s dalšími pankreatickými enzymy, před každým jídlem. Součástí

substance je i neutralizační činidlo (uhličitan), které má za úkol ochránit enzym před žaludečními šťávami.[61] Účinnost terapie je kontrolována klinicky, většinou sledováním tělesné hmotnosti a konzistence stolice.[76] U pacientů s CHP diagnostikovanou alespoň jednou ze zobrazovacích metod (ERCP, EUS, CT nebo MRCP) je u nás enzymatická substituční terapie předepisována automaticky.[77] Nejpoužívanějšími přípravky v Evropě jsou: Kreon (Hamburg, Německo), Pankreon (Hamburg, Německo) a Panzyrat (Ludwigshafen, Německo).[76] Doporučená dávka lipázy k hlavnímu jídlu se pohybuje mezi 25 000 - 75 000 jednotkami a mezi 10 000 - 25 000 jednotkami u svačiny, v závislosti na složení stravy. Důležité pro optimalizaci terapeutického efektu je dodržování časového rozložení podání substrátu od pozření potravy.[78]

Při výzkumu zaměřeném na negativní účinky enzymatické substituční terapie bylo zjištěno, že díky zpětné regulaci sekrece stimulačních hormonů, dochází ke snižování přirozené sekrece E1 vlivem substituční terapie. Tento mechanismus byl již pozorován u krys, kuřat, prasat a psů.[79]

2 Cíle

- Cílem práce byla literární rešerše poznatků o chronické pankreatitidě
- Dalším cílem práce bylo ověřit, jak spolu vzájemně korelují a jaká je vzájemná variabilita dvou rozdílných testů exokrinní funkce pankreatu - ^{13}C-MTG dechového testu a stanovení pankreatické elastázy 1 ve stolici, u zdravých jedinců sledovaných s frekvencí jeden měsíc po dobu půl roku
- Hlavním cílem práce bylo zjistit korelaci těchto dvou testů na souboru anonymizovaných dat pacientů s podezřením na chronickou pankreatitidu, testovaných na pracovišti ÚLBLD mezi lety 1999-2012

3 Materiál a metody

3. 1 Experimentálně získaná data

Experimentální data byla získána ve spolupráci se dvěma studenty 1. LF (David Tomeček a David Mrňák), kteří se zabývali hlavně preanalytikou použitých testů. Testy byly prováděny na čtyřech dobrovolnících, každý měsíc po dobu půl roku.

Dobrovolník 1: (žena, 22 let, 48kg, 158 cm)
Dobrovolník 2: (muž, 23 let, 74 kg, 183 cm)
Dobrovolník 3: (muž, 23 let, 75 kg, 185 cm)
Dobrovolník 4: (muž, 23 let, 91 kg, 185 cm)

Vzorky stolice byly odebírány přímo dobrovolníky do laboratoří poskytnutých odběrných nádobek (objem 30 ml, různí dodavatelé, obdobné nádobky viz Obr. 2, str. 34) vždy 0 - 5 dní před dechovým testem. Vzorek byl odebrán pomocí odběrné lžičky připojené ke šroubovacímu uzávěru nádobky. Objem odebraného vzorku odpovídal objemu lžičky. Vzorky byly uchovávány v lednici a přineseny do laboratoře na ÚLBLD v den dechového testu dobrovolníka. Před odběrem vzorku nebyl nijak měněn jídelníček dobrovolníků, ani jejich životospráva.

Vzorky dechu dobrovolníků byly rovněž odebírány přímo dobrovolníky v gastroenterologické laboratoři ÚLBLD. Dobrovolníci přišli nalačno (k pití od večera pouze voda) a po celou dobu testu pozřeli pouze testovací pokrm se značeným substrátem a pili pouze vodu.

Odběr vzorku dechu do hliníkových odběrných vaků (objem 2 L, dodavatel: FAN Fisher ANalysen, Německo) probíhal následujícím způsobem: hluboký výdech ústy, pak hluboký nádech nosem a po 10 sekundách zadržování dechu byl bez přídechu vydechnut vzduch ústy do odběrového vaku. Ten byl neprodleně uzavřen plastovou uzávěrkou.

Byly odebrány dva nulové (kontrolní) vzorky před pozřením značeného substrátu a testovacího pokrmu. Poté dostal každý dobrovolník testovací pokrm: 4 křehké kukuřičné plátky (cca. 6,5 g/plátek, bez lepku a cholesterolu) a Rama (2 x 10g, pouze rostlinný tuk, bez mléčných proteinů). Personálem laboratoře byl navážen ^{13}C-MTG substrát (250 mg,

dodavatel: Campro Scientific). Substrát byl smíchán s Ramou a spolu s ní namazán na kukuřičné plátky. Bylo třeba dbát zvýšené opatrnosti, aby byl vmíchán všechen podaný substrát. Nádobka, ve které byl substrát byla vypláchnuta teplou vodou a tato voda byla vypita k testovacímu pokrmu. Hodinu po pozření pokrmu se značeným substrátem byl odebrán první vzorek dechu dobrovolníků výše popsaným způsobem. Celkem bylo odebráno 6 vzorků dechu v rozmezí 6 hodin po podání substrátu. Vzorky byly odebírány přesně po 60 minutách. Mezi odebíráním jednotlivých vzorků byli dobrovolníci v klidu a neopouštěli prostory ÚLBLD. Po odebrání vzorků byly odběrové vaky napojeny na analyzátor s IR spektrometrem (HeliFAN plus, Fisher ANalysen Instr, Německo) a analyzovány. Protože analyzátor měl jen čtyři vývody, byly nejprve proměřeny vzorky 1 - 3 a jeden nulový vzorek a poté vzorky 4 - 6. Analýza každého vzorku byla provedena čtyřikrát.

3. 2 Metodiky

3. 2. 1 Materiál a přístroje

Materiál

- 4 křehké kukuřičné plátky/osoba, cca. 6,5 g/plátek, bez lepku a bez cholesterolu
- 2x Rama, 10g , pouze rostlinný tuk, bez mléčných proteinů
- Hliníkové vaky pro odběr vzorků dechu, 2 l, dodavatel: FAN Fisher ANalysen, Německo
- Nádobka na odběr stolice, 30 ml (různí dodavatelé)
- ^{13}C-MTG: Glyceryl 1,3-dioktadekanoát-2-oktanoát-1-^{13}C, ($^{13}CC_{46}H_{90}O_6$), 99% ^{13}C, dodavatel: Campro Scientific
- ELISA kit: ScheBo - Pancreatic Elastase 1 (ScheBo, Biotech, Německo)
    - 12 odlamovaných ELISA-proužků (8 cel každý) s monoklonální protilátkou proti lidské pankreatické E1
    - Koncentrát extrakčního pufru (cat. no.:02), 100 ml, fosfátový pufr s detergentem a azidem sodným, pH 7,2
    - Vymývací/vzorkový pufr, 100 ml fosfátového pufru s detergentem, pH 7,2
    - Standardy E1 (koncentrace: 15 µg E1/g stolice, 50 µg E1/g stolice, 150 µg E1/g

stolice, 500 µg E1/g stolice), vodný roztok s azidem sodným

- Kontrola (200 µg E1/g stolice ± 15 %), vodný roztok s azidem sodným
- Komplex monoklonální protilátky anti-E1-biotin a peroxidázy -Streptavidin, vodný roztok
- Roztok barvícího substrátu, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) diamonium (ABTS), vodný roztok
- Stop-roztok (alkalický vodný roztok)

- pacientské vzorky (24 vzorků stolice, 7x24 vzorků dechu)

Přístroje

- Analytické váhy: H 10, METTLER TOLEDO
- Automatická promývačka: ELx50 Microplate Strip Washer, BioTek
- ELISA reader: Tecan Spektra II Microplate Reader, Luminometr, STL Labinstruments
- Software: KIM, verze 2.13
- Analyzátor vzorků dechu: HeliFAN plus, Fisher ANalysen Instruments
- Software: FANci verze 2.07
- Software: MicrosoftOffice - Excel, přepočet vytvořen MUDr. Petrem Kocnou, CSc., dosud nepublikován
- Statistický program: Statistica, verze 10.0, StatSoft, Inc.
- Další přístroje: Multikanálová pipeta (PIPETMAN NEO, Glison), automatické pipety, vortex

3. 2. 2 Stanovení elastázy 1 ve stolici (FELA)

Provedeno personálem gastroenterologické laboratoře ÚLBLD

Měřeny vzorky stolice čtyř dobrovolníků, každý měsíc po dobu půl roku

Stanovení E1 ve stolici se provádí pomocí komerční ELISA sady firmy ScheBo.Biotech. Tato sada je založena na nekompetitivní imunoanalýze. Cely ELISA destičky jsou potaženy monoklonální protilátkou proti lidské E1. E1 ze vzorků a standardů se během první inkubace naváže na ukotvené protilátky. Poté se přidá do každé cely peroxidázový komplex s monoklonální protilátkou proti lidské E1, který se naváže na již imobilizovanou

E1. Po vymytí je přidán barvící substrát (ABTS), který se po oxidaci peroxidázou zbarví do tmavozeleného zabarvení. Po přidání stopovacího roztoku je barevná reakce ukončena. Koncentrace oxidovaného ABTS je zjišťována fotometricky. Měří se optická hustota při vlnové délce 405 nm.

Pracovní postup:

Příprava vorkového/vymývacího pufru

100 ml pufru bylo zředěno 400 ml destilované vody. Zředěný pufr je stabilní po 6 měsíců při teplotě 4 - 8 °C.

Příprava ELISA destičky

Destička byla vytemperována na pokojovou teplotu ještě před otevřením. Byl vyndán potřebný počet proužků. Nepoužité ELISA proužky byly ponechány v neporušené ochranné fólii.

Příprava vzorku

100 ml koncentrátu extrakčního pufru bylo zředěno 400 ml destilované vody. Takto připravený roztok je stabilní po dobu 6 měsíců při teplotě 4 - 8 °C.

Byla zvážena prázdná vzorkovací nádobka i s víčkem a vzorkovací lžičkou na analytických vahách. Byla odebrána část vzorku (asi 100 mg) zváženou vzorkovací lžičkou. Vzorek byl i se vzorkovací lžičkou vložen do zvážené nádobky a byla odečtena hmotnost vzorku. Ke zváženému vzorku byl přidán extrakční pufr v závislosti na hmotnosti vzorku, tak aby výsledná koncentrace byla 10 mg vzorku/ml extrakčního pufru.

Vzorek byl zhomogenizován na vortexu při pokojové teplotě. Homogenizace je důležitá k úplné extrakci E1. Po pěti minutách byl postup zopakován. E1 je velmi stabilní a roztok tedy může být měřen až další den (24 h, 4 - 8 °C).

Vzorkový extrakt je zředěn připraveným vzorkovým/vymývacím pufrem v poměru 1:250 (10 µl vzorkového extraktu + 2,5 ml pufru). Protože vzorky vyšly mimo lineární část kalibrační křivky, byly ještě 5x zředěny a přeměřeny poslední měsíc sledování. Mezi prvním měřením a druhým měřením byly uchovávány při teplotě −25 °C.

Dávkování na ELISA destičku (Tab. 5)

Všechny roztoky byly dávkovány v objemu 50 µl a měly duplikát

Tabulka 5: Dávkování na ELISA destičku

	1	2	3	4
A	Blank	Blank	Vz3	Vz3
B	STD1	STD1	Vz4	Vz4
C	STD2	STD2	Vz5	Vz5
D	STD3	STD3	Vz6	Vz6
E	STD4	STD4	Vz7	Vz7
F	CON	CON	Vz8	Vz8
G	Vz1	Vz1	Vz9	Vz9
H	Vz2	Vz2	Vz10	Vz10

Blank 50 µl vzorkového/vymývacího pufru

Standard (STD) 50 µl každého standardu

Standard 1 odpovídá 15 µg E1/g stolice

Standard 2 odpovídá 50 µg E1/g stolice

Standard 3 odpovídá 150 µg E1/g stolice

Standard 4 odpovídá 500 µg E1/g stolice

Kontrola (CON) 50 µl

Kontrola odpovídá 200 µg E1/g stolice ± 15 %

Vzorky (Vz1 - Vz4) 50 µl extraktu stolice z každého vzorku dobrovolníků

Vzorky (Vz4 - VzX) 50 µl extraktu stolice vzorků pacientů (počet podle potřeby, každý měsíc jinak)

Inkubace a promývání

Destička byla ponechána inkubovat 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl opatrně vylit obsah jednotlivých cel. Každá cela byla třikrát promyta vzorkovým/promývacím pufrem pomocí automatické promývačky. Destička byla odkapána na čistý papír k zajištění úplného odstranění zbývající tekutiny.

Inkubace s komplexem anti-E1-biotinu a peroxidázy-Streptavidinu

Multikanálovou pipetou bylo napipetováno 50 µl komplexu protilátky a peroxidázy do každé cely. Poté následovala inkubace 15 minut v temnu a při pokojové teplotě. Po uplynutí 15 minut byl opět opatrně vylit obsah jednotlivých cel a každá byla třikrát promyta vzorkovým/promývacím pufrem pomocí automatické promývačky. Destička byla odkapána na čistý papír k zajištění úplného odstranění zbývající tekutiny.

Barevná reakce

Multikanálovou pipetou bylo přidáno 100 µl roztoku ABTS do každé cely. Inkubace trvala 15 minut v temnu a při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby bylo do každé cely přidáno 100 µl stopovacího roztoku. Obsah jednotlivých cel byl promíchán zatřepáním destičkou.

Měření

Byla měřena optická hustota při vlnové délce 405 nm 5 - 30 minut po zastavení reakce. Před měřením byl dobře promíchán obsah cel.

Vyhodnocení

Z naměřené optické hustoty standardů při vlnové délce 405 nm byla vytvořena kalibrační přímka. Její správnost byla ověřena kontrolním vzorkem. Do kalibrační přímky byly dosazeny hodnoty optické hustoty vzorků a byla odečtena koncentrace E1 [µg/g stolice]. Hodnoty > 200 µg/g byly vyhodnoceny jako pankreatická exokrinní suficience (PES), hodnoty 200 - 100 µg/g by byly vyhodnoceny jako lehká nedostatečnost a hodnoty < 100 µg/g by byly vyhodnoceny jako těžká PEI. Vzorky všech dobrovolníků měly koncentraci E1 > 200 µg/g (Tab. 6, str.: 49).

Z klinického hlediska je důležité pouze to, jestli je pacient nad nebo pod hranicí 200 µg/g. Část kalibrační křivky od 15 do 500 µg/g je lineární, ale pro vyšší hodnoty již křivka lineární není. Protože pankreatická funkce pacienta je hodnocena jako PES nezáleží již u vysokých hodnot na absolutní hodnotě. Pro naše účely byl ale tento údaj potřeba přesný, proto byly všechny vzorky poslední měsíc měření zředěny 5x aby se nacházely v lineární části závislosti a přeměřeny. Mezi prvním měřením neředěných vzorků a tímto druhým měřením byly vzorky skladovány při teplotě −25 °C.

3. 2. 3 Dechový test s ^{13}C-značeným substrátem (MTG)

Měřeny vzorky výdechu (7 vzorků/měření/dobrovolník) čtyř dobrovolníků, každý měsíc

po dobu půl roku.

Dechový test zaznamenává, jaké procento nalačno podaného substrátu je rozštěpeno pankreatickou lipázou a vyloučeno v podobě $^{13}CO_2$. Sekrece lipázy je stimulovaná testovacím pokrmem, který je podán společně se substrátem. Testovaná osoba musí přijít nalačno (pití od večera pouze čistá voda). Po dobu testu může osoba pít pouze neperlivou vodu a nesmí jíst. Diabetici můžou sníst jeden banán. Doba testu je 6 hodin a je odebírán jeden vzorek výdechu za hodinu. Analyzátorem je zjišťován poměr $^{13}CO_2$ oproti $^{12}CO_2$ ve vzorku výdechu. Poměr je vztažen na nulový vzorek každého pacienta.

Pracovní postup:

Příprava testovacího pokrmu se značeným substrátem

Personálem laboratoře bylo naváženo 250 mg substrátu. Substrát byl smíchán s 20 g Ramy a rozetřen spolu s ní na čtyři křehké kukuřičné plátky. Před pozřením testovacího pokrmu byly odebrány dva kontrolní vzorky dechu (viz 3. 1.).

Odběr vzorků dechu

Vzorky dechu byly odebírány výše popsaným způsobem (viz 3. 1.).

Měření

Vaky se vzorky byly napojeny na přístroj (Obr. 5). Protože má přístroj pouze čtyři vstupy, byly nejprve proměřeny vzorky č. 1, 2 a 3 a jeden z nulových vzorků. V druhém měření byly změřeny vzorky 4, 5 a 6. Pro měření byl spuštěn příslušný software. Byla zvolena záložka Breath tests, series, a poté do příslušných kolonek vypsáno jméno testované osoby a počty vzorků. Každý vzorek byl měřen 4x. Analýza jednoho vzorku trvá 3 - 4 minuty.

Obrázek 5: přístroj pro analýzu vzorků dechu HeliFAN plus, zroj: Fisher ANalysen, http://www.fan-gmbh.de/products.htm

Přístroj k analýze využívá NDIRS. Princip měření je založen na specifické absorpci infračerveného (IR) záření ve střední vlnové délce 2 - 8 μm. Je registrován rozdíl energie (teploty) mezi přijímačem IR záření a referenční celou plněnou plynem (N_2) neabsorbujícím IR záření. Rozdíl teplot je registrován kovovou membránou jako rozdíl tlaku. Pracovní teplota detektoru je 50 °C.

Přístroj vyžaduje kalibraci, pokud interní kontrola systému prokazuje hodnoty mimo nastavené limity (zhruba 2x měsíčně). Ke kalibraci slouží vzorek výdechu operátora.

Vyhodnocení

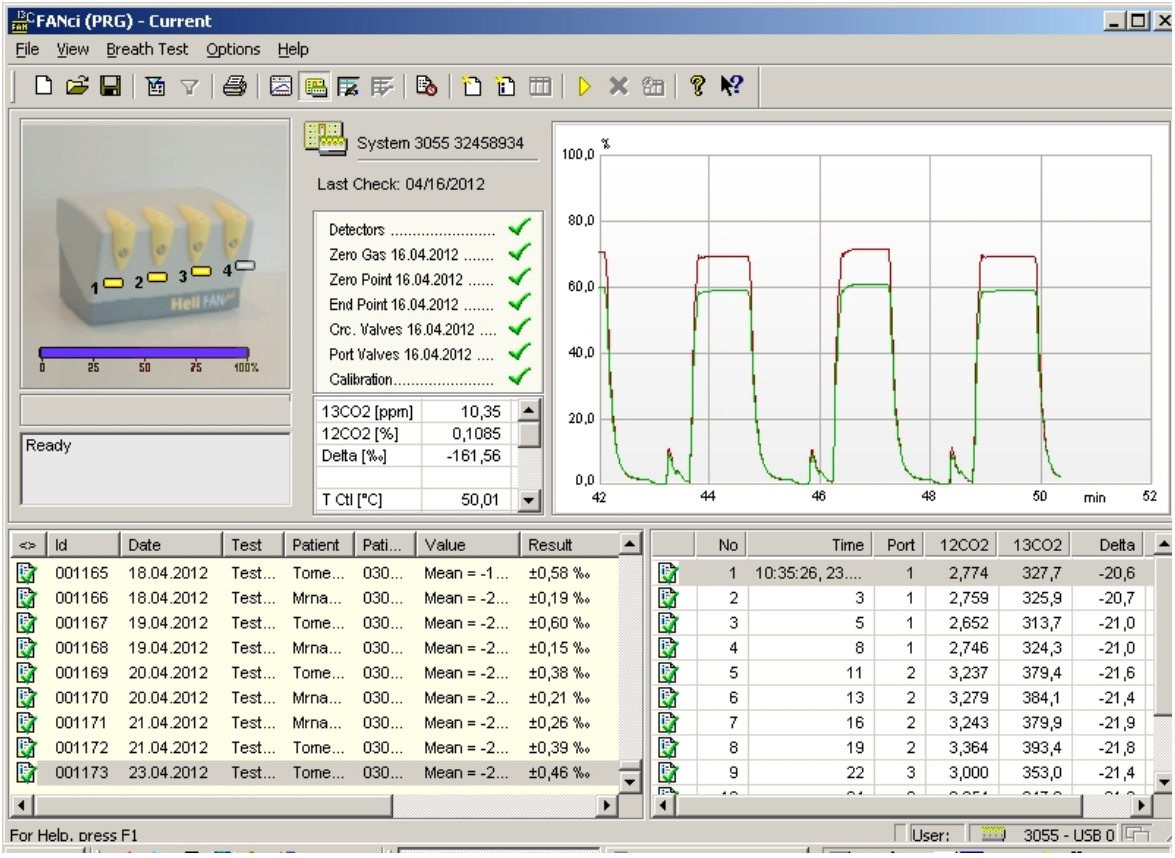
Výsledky dechového testu byly vyhodnoceny příslušným softwarem (Obr. 6) a uvedeny ve formě δ [‰] (1).

$$\delta = 1000 \cdot \left(\frac{R_{vz}}{R_{st}} - 1\right) \qquad (1)$$

Kde δ [‰] udává rozdíl obsahu $^{13}CO_2$ ve vzorku a standardu proti samotnému standardu. R_{vz} je podíl $^{13}CO_2$ ve vzorku oproti $^{12}CO_2$ ve vzorku (2) a R_{st} je podíl $^{13}CO_2$ v standardu oproti $^{12}CO_2$ v standardu (3). R_{st} = 0,0111237 (mezinárodní standard výskytu izotopu ^{13}C v přírodě).

$$R_{vz} = \frac{^{13}CO_{2,vz}}{^{12}CO_{2,vz}} \qquad (2)$$

$$R_{st} = \frac{^{13}CO_{2,st}}{^{12}CO_{2,st}} \qquad (3)$$



Obrázek 6: Print Screen softwaru pro vyhodnocování dechového testu

V programu MicrosoftOffice - Excel byl spočítán aritmetický průměr δ pro všechna čtyři opakovaná měření vzorku. Byl spočítán kumulativní procentuální výdej $^{13}CO_2$ oproti podané dávce (cPDR) (4).

$$cPDR = m.(1-e^{\kappa t})^{\beta} \qquad (4)$$

Kde *t* je čas, *m* je absolutní procentuální kumulativní výdej $^{13}CO_2$ oproti podané dávce, κ a β jsou přepočty na nelineární regresní analýzu. cPDR byl poté korelován na věk, pohlaví, výšku a váhu pacienta (bazální metabolický výdej, BMR)[80] (Obr. 7 a 8).

sex	vek1	alfa	beta	gamma	
M		3	0,08	0,54	1,74
M		10	0,07	0,57	2,16
M		18	0,06	-0,04	2,94
M		30	0,05	-0,01	3,67
F		3	0,07	0,68	1,53
F		10	0	1,95	0,84
F		18	0,06	1,18	0,41
F		30	0,03	0,01	3,53

sex	vek1	alfa	beta	gamma	
F		18	0.06	1.18	0,41

BMR = aW + bH + g

Obrázek 7: Korelace na věk, pohlaví, výšku (H) a váhu (W) - BMR, vytvořeno MUDr. Petrem Kocnou, CSc.

Hodnota > 30 % byla vyhodnocena jako PES, hodnota < 30 % byla hodnocena jako PEI. Všichni dobrovolníci měli hodnoty nad 30 %. (Tab. 6, str.: 49) Většina laboratoří používá přepočet pouze na plochu povrchu těla (BSA , není zahrnut věk a pohlaví), kde je hranice 23 %.

3. 3 Data pro statistické zpracování

Pracoviště ÚLBLD poskytlo anonymizovaná data o testech souvisejících s PEI provedených na tomto pracovišti v letech 1999-2012. Jednalo se o stanovení pankreatické E1 monoklonální protilátkou (ScheBo.Biotech, Pancreatic Elastase 1) (FELA) i polyklonální protilátkou (Bioserv, Fecal pancreatic Elastase 1) (PELA) a dechové testy s ^{13}MTG (MTG). Tato data byla retrospektivně zpracována pro každou diagnostickou skupinu pacientů. Použitá klasifikace byla modifikací návrhu Bernské klasifikace (viz 1. 2. 5., tabulka 4).

Kalkulace MTG dechového testu

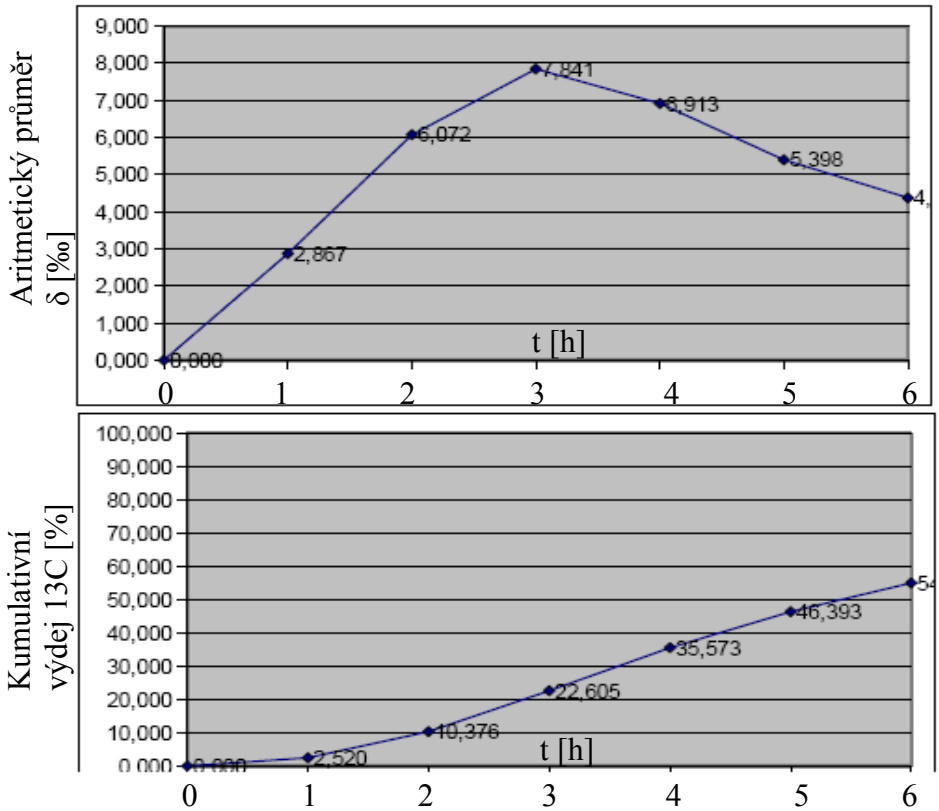
Identifikace pacienta:

Jméno:			
Rod.číslo:			
hmotnost H (kg)	49	**Lékař:**	dr.Kocna
výška V (cm)	158	**Diagnóza:**	Z001
BSA	1,46	**Pracoviště:**	UKBLD-diplomka
		Datum:	12.12.2011
sex M/F	F		
věk	22		
	89		
BMR	5,07		
P mmol/hod	**526,50**		

Kumulativní výdej 13C, simplifikovaný výpočet = **54,979**

Čas měření	1	2	3	4	průměr	průměr-T0	%13C
delta 0	1,056	0,366	-0,624	-0,798	0,000	0,000	0,000
delta 60	2,790	2,638	3,024	3,014	2,867	2,867	5,039
delta 120	6,179	6,356	5,825	5,928	6,072	6,072	10,674
delta 180	7,728	7,780	7,904	7,950	7,841	7,841	13,783
delta 240	8,009	6,998	6,523	6,120	6,913	6,913	12,152
delta 300	5,839	5,154	5,298	5,300	5,398	5,398	9,489
delta 360	4,561	4,373	4,071	4,476	4,370	4,370	7,682

enrichment E	99	Konstanta R PDB = 0,0112375	
počet atomů N	1		
mol.váha M	752	BSA=w^0,5378 * h^0,3963 * 0,024265	
dávka mg m	250		
produkce P	526,50	P=300 mmol/h * BSA	438,95
dávka C13	0,33	D=m * n/M	



Obrázek 8: Vyhodnocení testu v programu MicrosoftOffice-Excel, korelace na věk a pohlaví vytvořeny MUDr. Kocnou.

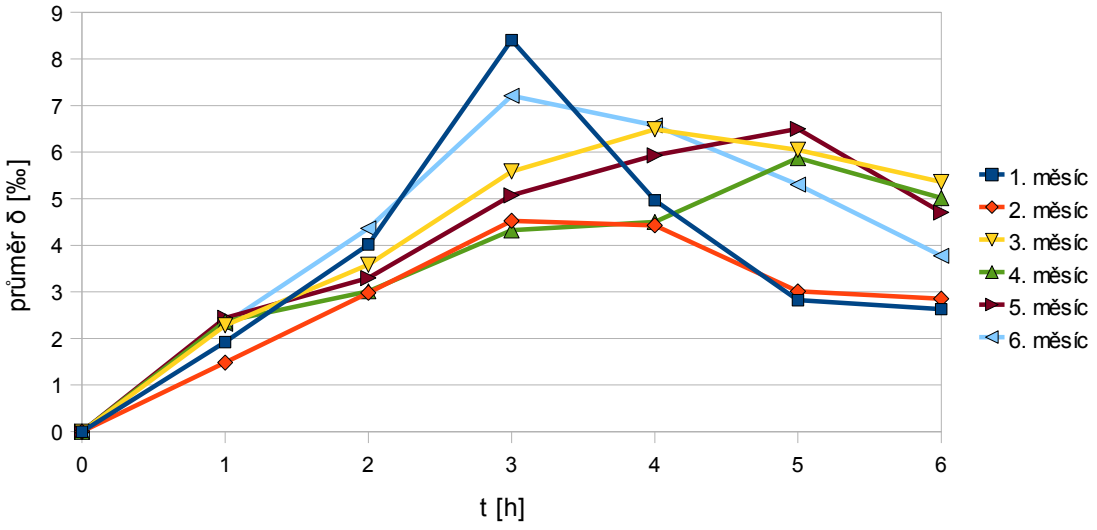
4 Výsledky

4. 1 Experimentálně získaná data

Tabulka 6: Výsledky FELA a MTG testu dobrovolníků sledovaných s frekvencí jeden měsíc po dobu půl roku. Pro porovnání byl MTG test uveden i v přepočtu na BSA

	Test	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	6. měsíc
Dobrovolník 1	FELA [µg/g]	980	880	1305	1045	1560	1220
	MTG (BMR) [%]	55,40	54,98	59,47	62,84	56,65	60,64
	MTG (BSA) [%]	46,19	45,84	49.58	52,39	47,23	50,56
Dobrovolník 2	FELA [µg/g]	750	1785	1610	1620	1455	1450
	MTG (BMR) [%]	61,14	46,57	69,55	58,89	66,74	72,11
	MTG (BSA) [%]	45,46	34,62	51,71	43,78	49,62	53,61
Dobrovolník 3	FELA [µg/g]	1600	1910	1360	2215	2005	1845
	MTG (BMR) [%]	96,19	77,58	57,94	70,11	60,05	46,95
	MTG (BSA) [%]	71,76	57,94	43,22	52,30	44,79	35,02
Dobrovolník 4	FELA [µg/g]	1380	715	980	855	665	955
	MTG (BMR) [%]	56,26	83,52	69,99	58,96	55,82	58,20
	MTG (BSA)[%]	41,11	61,03	51,14	43,09	40,79	42,53

Během půl ročního měření bylo zaznamenáno, že i u jedné měřené osoby výrazně kolísá časový profil vylučování $^{13}CO_2$ v dechu v období 6 měsíců (Obr. 9). Obdobná variabilita



Obrázek 9: Variabilita výdeje ^{13}C po podání ^{13}C-značeného substrátu u dobrovolníka 2 sledovaná každý měsíc po dobu půl roku

byla sledována u všech dobrovolníků.

4. 2 Korelace experimentálně získaných dat

Výsledky testů byly vyneseny proti sobě a vypočten korelační faktor *r* (Tab. 7). Byla použita Pearsonova korelace v programu Statistica, verze 10.0, StatSoft, Inc.

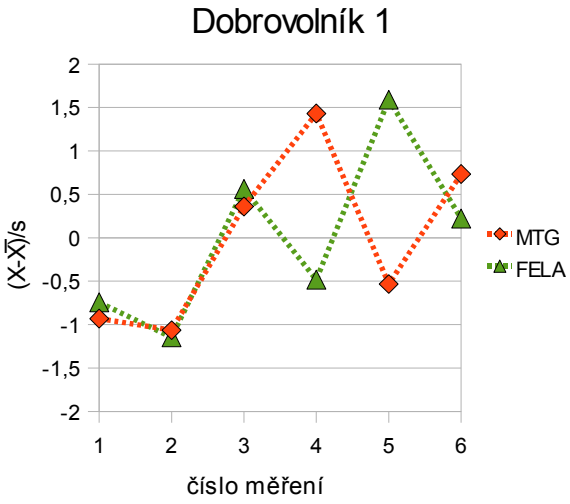
Tabulka 7: Korelace stanovení E1 ve stolici (FELA) a dechového testu (MTG) pro čtyři dobrovolníky sledované po dobu 6 měsíců (n=24)

	FELA-MTG (BMR)	FELA-MTG (BSA)
r	0,065	0,032

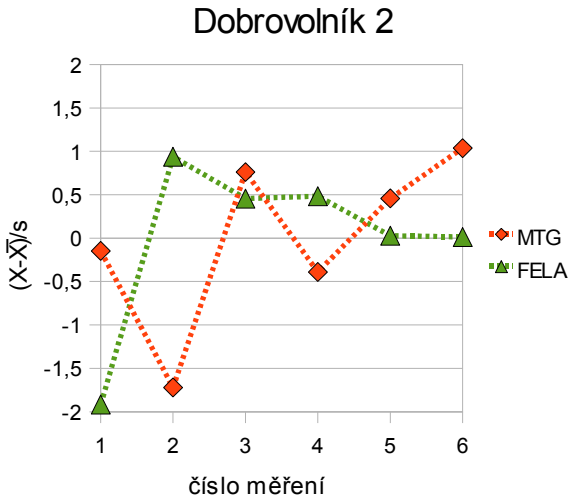
Pro lepší posouzení trendů obou testů u jednotlivé osoby (Obr. 10a - d) byly výsledky obou testů převedeny pomocí Studentovy t-statistiky na bezrozměrné hodnoty (5).

$$\frac{(x-\bar{x})}{s} \qquad (5)$$

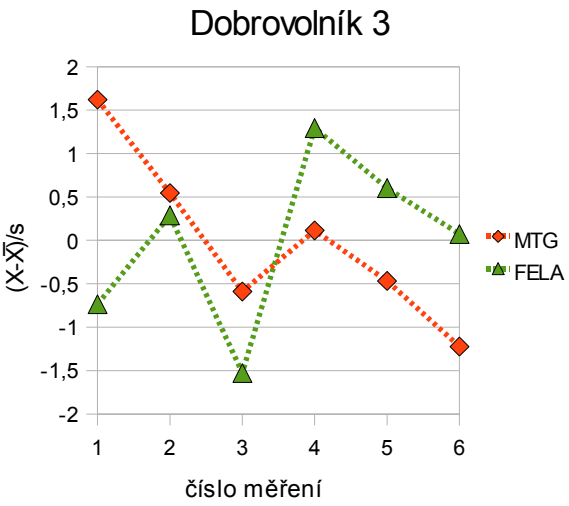
Kde x je naměřená hodnota, $\bar{x}$ je aritmetický průměr z naměřených hodnot a s je odhad směrodatné odchylky.



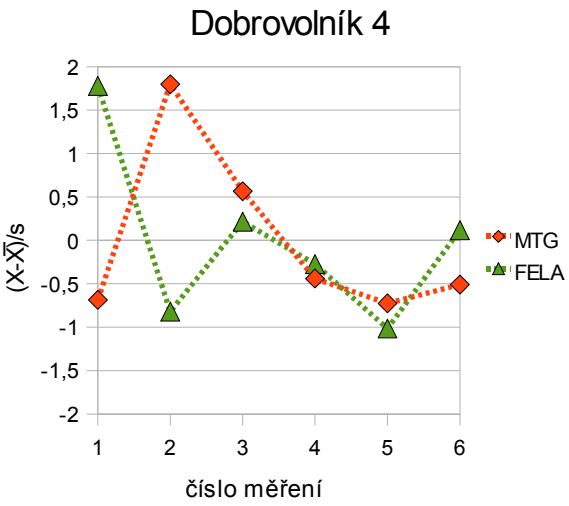
Obrázek 10a: Trendy MTG a FELA testu u dobrovolníka 1 měřeného každý měsíc po dobu šesti měsíců



Obrázek 10b: Trendy MTG a FELA testu u dobrovolníka 2 měřeného každý měsíc po dobu šesti měsíců



Obrázek 10c: Trendy MTG a FELA testu u dobrovolníka 3 měřeného každý měsíc po dobu šesti měsíců



Obrázek 10d: Trendy MTG a FELA testu u dobrovolníka 4 měřeného každý měsíc po dobu šesti měsíců

4. 3 Korelace dat FELA, PELA a MTG poskytnutých pracovištěm ÚLBLD

Byla použita Pearsonova korelace a byl zjištěn korelační koeficient *r* pro metody FELA-MTG, PELA-MTG a FELA-PELA (Tab. 8-10) pro každou diagnostickou skupinu pacientů. Bohužel byla každá dvojice testů použita u jinak velkého souboru pacientů (*n*).

Tabulka 8: Korelace FELA a MTG pro jednotlivé diagnostické skupiny pacientů.

	n	% zastoupení mužů	průměrný věk	r
Kontroly	73	46,6%	45,63	0,095
A	56	53,6%	50,77	0,090
B	27	66,7%	48,63	0,398
C	28	57,1%	55,82	0,356
D	40	87,5%	51,68	0,363

Tabulka 9: Korelace PELA a MTG pro jednotlivé diagnostické skupiny pacientů.

	n	% zastoupení mužů	průměrný věk	r
Kontroly	30	56,7%	46,77	0,332
A	27	55,6%	52,00	0,144
B	18	61,1%	46,89	0,415
C	13	69,2%	56,23	0,587
D	22	90,9%	49,14	− 0,008

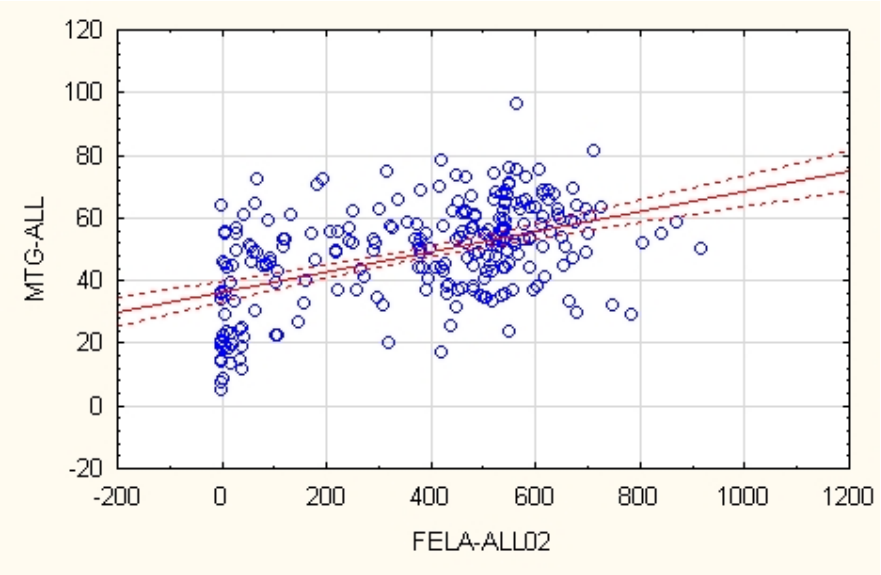
Tabulka 10: Korelace FELA a PELA pro jednotlivé diagnostické skupiny pacientů.

	n	% zastoupení mužů	průměrný věk	r
Kontroly	73	41,6%	49,75	0,514
A	56	41,7%	53,18	0,567
B	38	55,3%	47,26	0,762
C	22	63,6%	55,36	0,331
D	43	83,7%	52,28	0,733

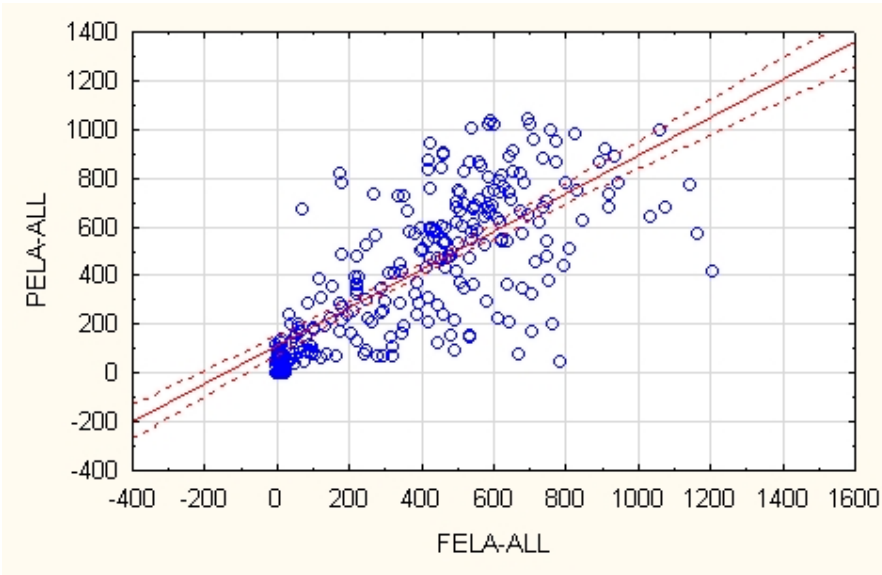
Byla vyhodnocena i celková korelace pro metody MTG-FELA (Obr. 11) a PELA-FELA (Obr. 12), kde byli zahrnuti i pacienti, u kterých nebylo známo zařazení do diagnostické skupiny (Tab. 11)

Tabulka 11: Korelace testů MTG-FELA a PELA-FELA napříč všemi diagnostickými skupinami pacientů

	n	r
MTG-FELA	249	0,475
PELA-FELA	277	0,740



Obrázek 11: Korelace MTG-FELA pro všechny diagnostické skupiny pacientů. Pearsonova korelace použita v programu Statistica



Obrázek 12: Korelace PELA-FELA pro všechny diagnostické skupiny pacientů. Pearsonova korelace použita v programu Statistica

Pro testy MTG a FELA byli pro každou diagnostickou skupinu spočítání pacienti, jejichž pankreatická funkce byla oběma testy potvrzena jako PES. Bylo vypočteno jejich procentuální zastoupení v každé diagnostické skupině (Tab. 12).

Tabulka 12: Pacienti, u kterých oba testy (MTG i FELA) potvrdily PES

	Celkově ve skupině	Oběma testy potvrzeno PES	%
Kontroly	73	66	90,4
A	56	51	91,1
B	27	13	48,2
C	28	17	60,7
D	40	5	12,5

5 Diskuse

5. 1 Půlroční sledování čtyř dobrovolníků

U čtyř dobrovolníků byly prováděny dva testy k posouzení exokrinní funkce pankreatu každý měsíc po dobu půl roku, celkem tedy 6 měření/metoda/dobrovolník. Předpoklad byl, že u jedince by se mohly v průběhu půl roku lišit výsledky FELA testu. Tento předpoklad byl založen na faktu, že FELA test nemá kontrolované podmínky a obsah pankreatické E1 ve stolici je ovlivněn mnoha faktory (pravidelnost stolice, intervaly mezi stolicí, doba odebrání vzorku - ráno nalačno x během dne po jídle, strava, pohyb, průjmy, atd). Tento test tedy nevypovídá přímo o funkčnosti pankreatu, ale spíše o míře poškození sekreční části (acinárních buněk).[80] Oproti tomu MTG test by měl vykazovat málo kolísající výsledky pro jednu osobu, neboť je měřena odpověď na stimulaci testovacím pokrmem za kontrolovaných podmínek (jedinec je po celou dobu měření v laboratoři a je tedy v klidu, na lačno je podán pokaždé stejný, přesně definovaný, testovací pokrm, výsledek je vztažen na nulový vzorek daného jedince pro daný den, atd).[80] Podle předpokladu FELA testy vykazovaly značný intraindividuální rozptyl (Tab. 6). V námi testovaném souboru dobrovolníků ale výrazně kolísaly i výsledky MTG testu pro 3 ze 4 testovaných osob (Tab. 6). Je zajímavé, že každý jedinec vykazuje každý měsíc jiný časový průběh odbourávání a/ nebo vylučování substrátu (Obr. 9) To by mohlo být příčinou velké variability výsledků, neboť při některém měření má výdej značeného substrátu po dobu 6 hodin rovnoměrný tvar píku, jindy test končí těsně za píkem a celková hodnota je tedy nižší.

Při subjektivním hodnocení trendů obou testů (Obr. 10 a-d) nebyla vysledována žádná pravidelnost. Souhrnně je navýšení hodnot jednoho testu doprovázeno z 50 % navýšením a z 50 % snížením hodnot druhého test. U dobrovolníka 2 bylo navýšení hodnot jednoho testu ve všech případech doprovázeno snížením hodnot u druhého testu, naopak u dobrovolníka 3 bylo navýšení hodnot u jednoho testu až na jednu výjimku doprovázeno i navýšením hodnot druhého testu. V literatuře nebyl nalezen žádný obdobný výzkum, se kterým by bylo možno naše výsledky porovnat.

Pokud vezmeme všechny výsledky jako nezávislé výsledky 24 různých testů (4 osoby x 6 měsíců) a vypočteme Pearsonovu korelaci, je zřejmé, že spolu obě metody naprosto nekorelují (r = 0,065). Ještě nižší korelační koeficient (r = 0,032) získáme pokud MTG

přepočteme na BSA a ne BMR. Pro malý počet měření a hlavně z důvodu, že BMR a BSA jsou každé jinak závislé na testovaném jedinci (věk, pohlaví, váha, výška x váha, výška), nemůžeme brát tento výsledek v potaz.

5. 2 Korelace dat FELA, PELA a MTG poskytnutých pracovištěm ÚLBLD

Data poskytnutá pracovištěm ÚLBLD byla použita ke zjištění korelace prováděných testů. Předpoklad byl, že testy FELA-MTG a PELA-MTG by spolu neměly korelovat, neboť, jak již bylo řečeno výše, má každá metoda jiné uspořádání. Naopak metody FELA a PELA by spolu měly korelovat, neboť jimi byl měřen obsah E1 v tom samém vzorku.[80] Korelace byla vypočtena pro každou diagnostickou skupinu, neboť nás zajímalo, jestli je pro některé diagnostické skupiny korelace významně jiná, než u ostatních skupin. Je zajímavé, že metody PELA-MTG (Tab. 9) vykazují vyšší korelaci než metody FELA-MTG (Tab. 8), ale může to být dáno jinou testovanou skupinou pacientů. PELA-MTG vykazují nejlepší korelaci pro skupinu C (n =13, r = 0,587). U skupiny D má křivka opačný směr, než by měla mít, proto vyšel korelační koeficient záporný (r = -0,008). FELA - MTG vykazují nejlepší korelaci pro skupinu B (n = 27, r = 0,398).

Metody FELA-PELA (Tab. 10) vykazovaly dobrou korelaci hlavně pro skupiny B (n = 38, r = 0,762) a D (n = 43, r = 0,733). Naopak nízkou korelaci pro skupinu C (n = 22, r = 0,331). Nízká korelace pro skupinu C může být důsledkem toho, že u pacientů skupiny C jsou sice vyvinuty klinické komplikace a měla by tedy být snížena funkčnost pankreatu (lepší korelace s MTG testem), zatímco morfologické změny nejsou pozorovány (lépe korelují s FELA testem).

Námi zjištěná souhrnná korelace MTG-FELA bez ohledu na diagnostickou skupinu pacientů (n = 249, r = 0,475) příliš neodpovídá výsledkům zjištěným u pacientů po chirurgickém zákroku na pankreatu (n = 112, R^2 = 0,14).[81] Naopak námi zjištěná souhrnná korelace pro metody PELA-FELA (n = 277, r = 0,740) leží zhruba uprostřed intervalu udávaném literaturou a je srovnatelná s korelací (r = 0,7865)[82] uváděnou v belgické studii publikované v roce 2004. Korelace PELA - FELA se pohybuje od r = 0,633 (cit.[83]) po r = 0,86 (cit.[84]).

Výsledné korelace jsou zkresleny tím, že retrospektivně zpracovaná data byla zjišťována

z diagnostických důvodů. Nebylo tedy třeba ředit vzorky stolice, které se ocitly mimo lineární část kalibrační křivky, neboť tito pacienti byli určitě nad hodnotou cut off.

Pro testy používané v současnosti na ÚLBLD (FELA, MTG) bylo spočteno procento pacientů v každé diagnostické skupině, kteří měli oběma testy exokrinní funkci pankreatu posouzenou jako dostatečnou. Tito pacienti mají sice diagnostikovanou CHP různého stupně, ale funkčnost pankreatu mají zachovanou a nepotřebují tedy enzymatickou substituční léčbu.

Obecně lze říci, že funkční testy mezi sebou vykazují sice matematicky-signifikantní korelaci, ale klinický význam při porovnávání testů s korelačním koeficientem je výrazně nižší. Pro PABA test a sekreci pankreatických polypeptidů je korelační koeficient $r = 0{,}342$ ($p < 0{,}001$)[85], pro stanovení tuku ve stolici a PABA test $r = 0{,}355$ ($p < 0{,}001$)[85], stanovení tuku ve stolici vykazuje se sekrecí pankreatických polypeptidů korelaci $r = 0{,}245$ ($p = 0{,}015$)[85] a obsah E1 ve stolici a CCK stimulovaný test vykazují korelaci $r = 0{,}83$ ($p < 0{,}001$).[86] Pro Lundhův test a endoskopické posouzení pankreatické exokrinní funkce je korelační koeficient $r = 0{,}597$ (cit.[87]). Prakticky stejná korelace byla sledována i u MRCPQ a stanovení E1 ve stolici ($r = 0{,}573$).[88]

U nás je představitelem enzymatické substituční léčby přípravek Kreon. Obsahuje více než 20 000 jednotek lipázy v jednotce lékové formy. Ten je předepisována automaticky všem pacientům s diagnostikovanou CHP alespoň jednou z těchto zobrazovacích metod: ERCP, EUS, CT nebo MRCP. Cena balení 100 tablet je 1800 Kč.[77] Přibližné náklady na léčbu jsou asi 20 000 Kč/osoba/rok (18 Kč/tableta x 3 jídla denně x 365 dní/rok). Přitom MTG test vyjde asi na 2500 Kč/osoba a FELA přibližně na 500 Kč/osoba (záleží na aktuální ceně substrátu a ELISA kitu).[89] Z toho vyplývá, že by mělo být ekonomicky výhodnější, pokud by každý pacient s diagnostikovanou CHP byl testován i funkčními testy. Podle našich výsledků totiž funkční testy poukazují na to, že 12,5 % - 91 % (Tab. 12) pacientů s CHP (v závislosti na diagnostické skupině) netrpí PEI.

6 Závěr

- Byla zpracována literární rešerše na téma chronická pankreatitida s použitím 79 literárních zdrojů.
- U čtyř dobrovolníků byly po dobu 6 měsíců sledovány výsledky dvou testů posuzujících exokrinní funkci pankreatu. Byl měřen obsah E1 ve stolici ELISA metodou a pomocí dechového testu funkční odpověď pankreatu na stimulaci. Potvrdil se předpoklad o vyšší variabilitě FELA testu, který nemá kontrolované podmínky. Bylo zjištěno, že i dechový test u testovaných osob vykazoval významnou variabilitu, a to i v časovém průběhu odbourávání podaného substrátu a/nebo jeho vylučování. Trendy výsledků obou testů u jednotlivce po dobu půl roku po subjektivním zhodnocení nevykazují žádnou pravidelnost.
- Data z měření E1 ve stolici a dechových testů provedených na ÚLBLD mezi lety 1999-2012 byla retrospektivně zpracována a byla provedena jejich korelace pro každou diagnostickou skupinu pacientů. Z hodnot korelačních koeficientů lze usuzovat, že stanovení E1 a dechový test spolu nekorelují a že tedy výsledky obou testů mají informační hodnotu. MTG je v současné době jediný test použitelný pro optimalizaci enzymatické substituční léčby, FELA je oproti tomu jednoduchý screeningový test. Korelační koeficient (okolo 0,5 - 0,7) pro stanovení E1 monoklonální a polyklonální protilátkou vykazuje poměrně dobrou korelaci ve všech diagnostických skupinách, kromě skupiny C. Souhrnná korelace MTG-FELA nám vyšla vyšší, než u nalezené literatury. Námi zjištěná souhrnná korelace PELA-FELA se shoduje s nalezenou literaturou.

V současné době jsou obecně zaujímány dva pohledy na klasifikaci CHP. Pohled morfologický a pohled funkční. Optimální klasifikace by byla kombinací obou pohledů, ale z důvodu nejednotného názoru na funkční testy, zatím taková neexistuje.

7 Seznam literatury

1. Ellis, H.: Anatomy of the pancreas, *Surgery*, **25**, 72-73, 2007
2. Narasimhulu, K.V., Gopal, N.O., Rao, J.L., Vijayalakshmi, N., Natarajan, S., Surendran, R., Mohan, V.:Structural studies of the biomineralized species of calcified pancreatic stones in patients suffering from chronic pancreatitis, *Biophys Chem*, **114**, 137-147, 2005
3. Draganov, P.V.: Pancreatic function testing: Here to stay for the 21st century, *World J Gastroenterol*, **14**, 3149-3158, 2008
4. Chandra, R., Liddle, R.A.: Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion, *Curr Opin Gastroenterol*, **25**, 441-446, 2009
5. Kittnar, O., et al.: *Lékařská fyziologie*, Grada, Praha, 2011
6. Keller, P.J., Allan, B.J.: Protein composition of human pancreatic juice, *J Biol Chem*, **25,** 281-287, 1967
7. Chowdhury, R.S., Forsmark, C.E.: Review article: pancreatic function testing, *Aliment Pharmacol Ther*, **17**, 733-750, 2003
8. Goldberg, D.M.: Proteases in the evaluation of pancreatic function and pancreatic disease, *Clin Chim Acta*, **291**, 201-221, 2000
9. Dítě, P., et al.: *Chronická pankreatitida*, Galén, Praha, 2002
10. Howard, J.M., Hess, W.: *History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ*, Kluwer Academic, New York, 2002
11. Büchler, M., Friess, H., Uhl, W., Malfertheiner, P.: *Chronic pancreatitis: Novel concepts in biology and therapy*, Wiley-Blackwell, Oxford, 2002
12. Braganza, J.M., Lee, S.H., McCloy, R.F., McMahon, M.J.: Chronic pancreatitis, *Lancet*, **377**, 1184-1197, 2011
13. Witt, H., Apte, M.V., Keim, V., Wilson, J.S.: Chronic pancreatitis: Challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy, *Gastroenterology*, **132**, 1557-1573, 2007
14. Whitcomb, D.C.: Molecular and genetic mechanism of acute and chronic pancreatitis, *International Congress series*, **1255**, 49-60, 2003
15. Banks, P.A.: Classification and diagnosis of chronic pancreatitis, *J Gastroenterol*, **42**, 148-151, 2007

16. Chari, S.T.: Chronic pancreatitis: classification, relationship to acute pancreatitis and early diagnosis, *J Gastroenterol*, **42**, 58-59, 2007
17. Strobel, O., Büchler, M.W., Werner, J.: Surgical therapy of chronic pancreatitis: Indications, techniques and results, *Int J Surg*, **7**, 305-312, 2009
18. Jupp, J., Fien, D., Johnson, C.D.: The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **24**, 219-231, 2010
19. Spanier, B.W.M., Dijkgraaf, M.G.W., Bruno, M.J.: Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **22**, 45-63, 2008
20. Lankisch, P.G., Assmus, C., Maisonneuve, P., et al.: Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County: A study in a defined German population, *Pancreatology,* **2**,831-837, 2002
21. Dítě, P., Novotný, I., Trna, J., Ševčíková, A.: Autoimmune pancreatitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **22**, 131-143, 2008
22. Šváb, J.: *Chirurgické léčení chronické pankreatitidy*, Grada, Praha, 2003
23. Lata, J., Bureš, J., Vaňásek, T., et al.: *Gastroenterologie*, Galen, Praha, 2010
24. Cameron, J.L. Kieffer, S., Anderson, W.J., Zuidema, G.D.: Internal pancreatic fistulas: Pancreatic ascites and pleural effusions, *Ann. Surg.*, **184**, 587-593, 1976
25. Bhasin, D.K., Malhi, N.S., Nagi, B., Singh, K.: Pancreatic ascites treated by endoscopic pancreatic sphincterotomy alone: a case report, *Gastrointest Endosc*, **57**, 802-804, 2003
26. DiMagno, M.J., DiMagno, E.P.: Chronic pancreatitis, *Curr Opin Gastroenterol*, **26**, 490-498, 2010
27. Layer, P., Yamamoto, H., Kalthoff, L., Clain, J.E., Bakken, L.J., DiMagno, E.P.: The different courses of early and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis, *Gastroenterology*, **107**, 1481-1487, 1994
28. Habashi, s., Draganov, P.V.: Pancreatic pseudocyst, *World J Gastroenterol*, **15**, 38-47, 2009
29: Srikanth, G., Sikora, S.S., Baijal, S.S., Ayyagiri, A., Kumar, A., Saxena, R., Kapoor, V.K.: Pancreatic abscess: 10 years experience, *ANZ J Surg*, **72**, 881-886, 2002
30. Materne, R., Vranckx, P., Pauls, C., Coche, E.E., Deprez, P., Van Beers, B.E.: Pancreaticopleural fistula: Diagnosis with magnetic resonance pancreatography,

Chest, **117**, 912-914, 2000

31. Wakefield, S., Tutty, B., Britton, J.: Pancreaticopleural fistula: a rare complication of chronic pancreatitis, *Postgrad Med J*, **72**, 115-116, 1996
32. Etemad, B., Whitcomb, D.C.: Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments, *Gasroenterology*, **120**, 682-707, 2001
33. Keller, J., Layer, P.: Idiopatic chronic pancreatitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **22**, 105-113, 2008
34. Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Anderson, J.R., et al.: Pacreatitis and the risk of pancreatic cancer: International Pancreatitis Study Group, *N Engl J Med*, **328**, 1433-1437,1993
35. Lévy, P., Barthet, M., Mollard, B.R., Amouretti, M., Marion-Audibert, A-M., Dyard, F.: Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications, *Gastroenterol Clin Biol*, **30**, 838-844, 2006
36. Ammann, R.W., Muellhaupt, B., et al.: The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis, *Gastroenterology*, **116**, 1132-1140, 1999
37. Renner, I.G., Rinderknecht, H., Valenzuela, J.E., Douglas, A.P.: Studies of pure pancreatic secretions in chronic alkoholic subjects without pancreatic insufficiency, *Scand J Gastroenterol*, **15**, 241-44, 1980
38. Apte, M.V., Norton, I.D., Haber, P.S., McCauqhan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., Wilson, J.C.: Both ethanol and protein deficiency increased messenger RNA levels for pancreatic lithostathine, *Life Sci*, **58**, 485-492, 1996
39. Apte, M.V., Norton, I.D., Haber, P.S., Korsten, M.A., McCauqhan, G.W., Pirola, R.C., Wilson, J.C.: Chronic ethanol administration decreases rat pancreatic GP2 content, *Biochem Biophys Acta*, **1336**, 89-98, 1997
40. Haber, P.S., Wilson, J.C., Apte, M.V., Korsten, M.A., Pirola, R.C.: Chronic ethanol consumption increases the fragility of rat pancreatic zymogen granules, *Gut*, **35**, 1474-78, 1994
41. Wilson, J.C., Apte, Thomas, M.C., Haber, P.S., Pirola, R.C.: Effects of ethanol, acetaldehyde and cholesteryl etsters on pancreatic lysosomes, *Gut*, **33**, 1099-1104, 1992
42. Kirk, G.R., White, J.S., McKie, L., Stevenson, M., Young, I., Claments, W.D., Rowlands, B.J.: Combined antioxidant therapy reduces pain and improves quality

of life in chronic pancreatitis, *J Gastrointest Surg*, **10**, 499-503, 2006

43. Criddle, D.N., Murphy, J., Fistetto, G., Barrow, S., Tepikin, A.V., Neoptolemos, J.P., Sutton, R.,Petershen, O.H.: Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of APT synthesis, *Gastroenterology*, **130**, 781-793, 2006
44. Tolstrup, J.S., Kristiansen, L., Becker, U., Gronbaek, M.: Smoking and risk of acute and chronic pancreatitis among women and men: a population-based cohort study, *Arch Intern Med*, **169**, 603–609, 2009
45. Lin, Y., Tamakoshi, A., Hayakawa T., Ogawa, M., Ohno, Y.: Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research committee on intactable pancreatic diseases, *Pancreas*, **21**,109-114, 2000
46. Cotton, P.B.: Congenital anomaly of pancreas divisum as cause of obstructive pain and pancreatitis, *Gut*, **21**, 105-114, 1980
47. Spicak, J., Poulova, P., Plucnarova, J., Rehor, M., Filipova, H., Hucl, T.: Pancreas divisum does not modify the natural course of chronic pancreatitis, *J Gastroenterol*, **42**, 135-139, 2007
48. Bhadada, S.K., Udawat, H.P., Bhansali, A., Rana, S.S., Sinha, S.K., Bhasin, D.K.: Chronic pancreatitis in primary hyperparathyroidism: comparison with alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis, *J Gastroenterol Hepatol*, **23**, 959-964, 2008
49. Sarner, M., Cotton, P.B.: Classification of pancreatitis, *Gut*, **25**, 756-759, 1984
50. Otsuki, M.: Chronic pancreatits: The problems of diagnostic criteria, *Pancreatology*, **4**, 28-41, 2004
51. Stevens, T., Lopez, R., Adler, D.G., et al.: Multicenter comparison of the interobserver agreement of standard EUS scoring and Rosemont classification scoring for diagnosis of chronic pancreatitis, Gastrointest Endosc, **71**, 519-526, 2010
52. Lukáš, K., Žák, A., et al.: *Gastroenterologie a hepatologie*, Grada, Praha, 2007
53. Büchler, M.W., Martignoni, M.E., Friess, H., Malfertheiner, P.: A proposal for a new clinical classification of chronic pancreatitis, *BMC Gastroenterology*, **9**, 2009
54. Ammann, R.W.: Zurich workshop on alcoholic chronic pancreatitis (letter to the editor), *Int J Pancreatol*, **23**, 81-82, 1998

55. Bagul, A., Siriwardena, A.K.: Evaluation of the Manchestre classification systém for chronic pancreatits, *JOP J Pancreas*, **7**, 390-396, 2006

56. Schneider, A., Löhr, J.M., Singer, M.V.: The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification systém based on a review of previous classifications of the disease, *J Gastroenterol*, **42**, 101-119, 2007

57. Krechler, T., Kocna, P., Vaníčková, Z., Švestka, T., Lukáš, M., Doseděl, J., Kohout, P., Žák, A.: Stanovení elastázy 1 ve stolici - využití v diagnostice chronické pankreatitidy, *Čas Lék Čes*, **145**, 480-483, 2006

58. Krechler, T., Kocna, P., Vaníčková, Z., Švestka, T., Doseděl, J., Kohout, P., Bortlík, M., Lukáš, M.: Přínos stanovení elastázy I ve stolici u chronické pankreatitidy, *Bulletin HPB*, **12**, 2004

59. Kocna, P., Vaníčková, Z., Krechler, T., Lukáš, M., Doseděl, J., Kohout, P.: Testy exokrinní funkce pankreatu - elastáza 1 ve stolicci a dechový test s ^{13}C-MTG, *Bulletin HPB*, **14**, 97-99, 2006

60. Lesniak, R.J., Hohenwalter, M.D., Taylor, A.J.: Spectrum of causes of pancreatic c alcifications, *AJR*, **178**, 79-86, 2002

61. Steer, M.L., Waxman, I., Freedman, S.: Chronic pancreatitis, N Engl J Med, **332**, 1482 - 1490, 1995

62. Mitchell, C.: Chronic pancreatitis, *Medicine*, **31**, 122-125, 2003

63. Rebours, V., Lévy, P., Ruszniewski, P.: An overview of hereditary pancreatitis, *Dig Liv Dis*, **44**, 8-15, 2012

64. Sugumar, A., Chari, S.: Autoimmune pancreatitis: an update: HISORt criteria, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **3**, 197-204, 2009

65. Mullady, D.K., Early, D.: Endoscopic methods for the diagnosis of chronic pancreatitis, *Tech Gastrointest Endosc*, **11**, 19-25, 2009

66. Ahmed, S.A., Wray, C.J., Rilo, H.R., Choe, K.A., Gerlud, A., Howington, J., Lowry, A.M., Matthews, J.B.: Chronic pancreatitis: Recent advances and ongoing challenges, *Curr Probl Surg*, **43**, 135-238, 2006

67. Mönkemüller, K.E., Kahl, S., Malfertheiner, P.: Endoscopic therapy of chronic pancreatitis, *Dig Dis*, **22**, 280-291, 2004

68. Gillams, A., Pereira, S., Webster, G., Lees, W.: Correlation of MRCP quantification (MRCPQ) with conventional non-invasive pancreatic exocrine function tests,

Abdom Imaging, **33**, 469-473, 2008

69. Lankisch, P.G.: Exocrine pancreatic function tests, *Gut*, **23**, 777-798, 1982
70. Lankisch, P.G., Chronic pancreatitis, *Curr Opin Gastroenterol*, **23**, 502-507, 2007
71. Muñoz, J.E.D.: Diagnosis of chronic pancreatitis: Functional testing, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **24**, 233-241, 2010
72. Ihse, I., Arnesjö, B., Kuqelberg, C., Lilja, P.: Intestinal activities of trypsin, lipase, and phospholipase after a test meal. An evaluation of 474 examinations, *Scand J Gastroenterol*, **12**, 663-668, 1977
73. Pezzilli, R., Talamini, G., Gullo, L.: Behaviour of serum pancreatic enzymes in chronic pancreatitis, *Digest Liver Dis*, **32**, 233-237, 2000
74. Kaspar, P., Möller, G., Wahlefeld, A.: New photometric assay for chymotrypsin in stool, *Clin Chem*, **30**, 1753-1757, 1984
75. Kocna, P., Vaníčková, Z., Krechler, T., Lukáš, M., Doseděl, J.: Test exokrinní funkce pankreatu-13C-MTG dechový test, *Bulletin HPB*, **12**, 2004
76. Layer, P, Keller, J., Lankisch, P.G.: Pancreatic enzyme replacement therapy, *Curr Gastroenterol Rep*, **3**, 101-108, 2001
77. aislp, mikro-verze AISLP, 2012.2
78. Sikkens, E.C.M., Cahen, D.L., Kuipers, E.J., Bruno, M.J.: Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **24**, 337-347, 2010
79. Walkowiak, J., Witmanowski, H., Strzykala, K., Bychowiec, B., Sogin, T., Borski, K., Herzig, K.-H.: Inhibition of endogenous pancreatic enzyme secretion by oral pancreatic enzyme treatment, *Eur J Clin Invest*, **33**, 65-69, 2003
80. MUDr Petr Kocna, CSc., ústní sdělení
81. Nakamura, H., Morifuji, M., Murakami, Y., Uemura, K., Ohge, H., Hayashidani, Y., Sudo, T., Sueda, T.:Usefulness of a 13C-labeled mixed triglyceride breath test for assessing pancreatic exocrine function after pancreatic surgery, *Surgery*, **145**, 168-175, 2009
82. Miendje, Y., Maisin, D., Sipewa, M.J., Deprez, P., Buts, J.P., De Nayer, P., Philippe, M.: Polyclonal versus monoclonal ELISA for the determination of fecal Elastase 1: diagnostic value in cystic fibrosis and chronic pancreatic insufficiency, *Clin Lab*, **50**, 419-424, 2004

83. Erickson, J.A., Aldeen, W.E., Grenache, D.G., Ashwood, E.R.: Evaluation of a fecal pancreatic elastase-1 enzyme-linked immunosorbent assay: Assessment versus an established assay and implication in classifying pancreatic function, *Clin Chim Acta*, **397**, 87-91, 2008

84. Borowitz, D., Lin, R., Baker, S.S.: Comparison of monoclonal and polyclonal ELISAs for fecal Elastase in patients with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **44**, 219-223, 2007

85. Maartense, S., Ledeboer, M., Masclee, A.A.M.: Chronic pancreatitis: relation between function and morphology, *Dig Liv Dis,* **36**, 61–67, 2004

86. Stevens, T., Conwell, D., Zuccaro, G., Van Lente, F., Khandwala, F., Hanaway, P., Vargo, J.J., Dumot, J.A.: Analysis of pancreatic elastase-1 concentrations in duodenal aspirates from healthy subjects and patients with chronic pancreatitis, *Dig Dis Sci*, **49**, 1405-1411, 2004

87. Jensen, N.M., Larsen, S.: A rapid, endoscopic exocrine pancreatic function test and the lundh test: a comparative study, *Pancreatology*, **8**, 617–624, 2008

88. Manfredi, R., Perandini, S., Mantovani, W., Frulloni, L., Faccioli, N., Pozzi Mucelli, R.: Quantitative MRCP assessment of pancreatic exocrine reserve and its correlation with faecal elastase-1 in patients with chronic pancreatitis, *Radiol Med*, **117**, 282-292, 2012

89. Kocna, P., Kohout, P.: Klinický, terapeutický a ekonomický přínos testů exokrinní pankreatické funkce, *Sborník - Symposium o morfologii a funkci střeva - XVIII*, str. 17, 2012