Uloga asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u oksidativnom oštećenju gušterače tijekom akutne upale

Trgo, Gorana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:881204

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

GORANA TRGO

ULOGA ASIMETRIČNOG DIMETILARGININA (ADMA) U OKSIDATIVNOM OŠTEĆENJU GUŠTERAČE TIJEKOM AKUTNE UPALE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Split pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Radman, dr. med. i u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice „Merkur" pod vodstvom dr. sc. Marijane Vučić Lovrenčić, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj pomoći, strpljivosti i razumijevanju. Naročito zahvaljujem svojim mentoricama na izvrsnom savjetovanju i vodstvu koje su iskazale tijekom istraživanja i izrade ove doktorske disertacije.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

Uloga asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u oksidativnom oštećenju gušterače tijekom akutne upale

Gorana Trgo

Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, Split

SAŽETAK

Akutna upala gušterače (pankreatitis) praćena je oksidativnim i dušičnim stresom, no doprinos ovih mehanizama oštećenju tkiva i disfunkciji endokrinog dijela gušterače slabo je istražen. U ovom radu istraživana je uloga asimetričnog dimetilarginina (ADMA), endogenog inhibitora sintetaze dušičnog oksida (NOS), u razvoju oksidativno-dušičnog stresa te regulaciji glikemije na kliničkom modelu akutnog pankreatitisa.

Rezultati razotkrivaju akutni pankreatitis kao stanje značajnog poremećaja glukoregulacije, pojačanog oksidativnog i dušičnog stresa te poremećene ADMA-om posredovane regulacije sinteze dušičnog oksida (NO). Hiperglikemija i oksidativno-dušični stres identificirani su kao mogući značajni uzroci smanjene bioraspoloživosti ADMA-e tijekom akutnog pankreatitisa, a intolerancija glukoze mjesec dana nakon preboljelog pankreatitisa, koja je nađena u 64% ispitanika, u izravnoj je vezi s razinom ADMA-e tijekom akutne faze bolesti.

Do sada nepoznata nedostatna inhibicija sinteze NO u akutnom pankreatitisu značajno pridonosi oštećenju endokrine gušterače i kasnijem razvoju šećerne bolesti.

(81 stranica, 9 slika, 8 tablica, 114 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: akutni pankreatitis, dijabetes, asimetrični dimetilarginin, reaktivni kisikovi radikali, reaktivni dušikovi spojevi

Mentori: prof. dr. sc. Maja Radman, dr. med., Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

dr. sc. Marijana Vučić Lovrenčić, znanstvena savjetnica, Klinička bolnica „Merkur“, Zagreb

Ocjenjivači:

1. **Dr. sc. Marijana Popović Hadžija, viša znan. sur., IRB Zagreb**
2. **Doc. dr. sc. Zoran Tadić, PMF, Zagreb**
3. **Prof. dr. sc. Miljenko Solter, MF Zagreb, KBC „Sestre milosrdnice“**

University of Zagreb
Faculty of science
Department of Biology

Doctoral thesis

The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) response to oxidative damage in acute pancreatitis

Gorana Trgo

University Hospital Split, Spinčićeva 1, Split

SUMMARY

Acute pancreatitis is characterised by the oxidative and nitrosative stress, but contribution of these mechanisms to the tissue damage and endocrine pancreas dysfunction has been insufficiently studied. This study aimed to investigate the role of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric-oxide synthetase (NOS), in development of oxidative-nitrosative stress and potentially disturbed glucoregulation in the clinical model of acute pancreatitis.

Results reveal acute pancreatitis as a condition associated with a significant derrangement of glucoregulation and increased oxidative-nitrosative stress, as well as a disturbed ADMA-regulated nitric oxide (NO) synthesis. Both hyperglycaemia and oxidative-nitrosative stress were identified as potential significant determinants of decreased ADMA-bioavailibility during acute pancreatitis, while glucose intolerance, found in 64% of patients 1 month after acute pancreatitis, was found to be directly associated with ADMA-level during acute phase of illness.

Sofar unrecognized insufficient inhibition of NO-synthesis in acute pancreatitis contributes significantly to the endocrine pancreas damage and might be responsible for subsequent development of diabetes mellitus.

(81 pages, 9 figures, 8 tables, 114 references, original in Croatian)

Keywords: acute pancreatitis, diabetes, asymmetric dymethilarginine, reactive oxygen species, reactive nitrogen species

Mentors: Maja Radman, MD, PhD., professor, University of Split, School of medicine

Marijana Vučić Lovrenčić, PhD., scientific advisor, Merkur University Hospital, Zagreb

Reviewers:

1. **Marijana Popović Hadžija, PhD, senior research fellow, IRB Zagreb**
2. **Zoran Tadić, PhD, assistant professor, PMF, Zagreb**
3. **Miljenko Solter, PhD, professor, MF Zagreb, KBC „Sestre milosrdnice“**

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

Cilj istraživanja.....4

2. LITERATURNI PREGLED.....5

2.1. Akutni pankreatitis.....5

2.1.1. Anatomsko-fiziološke osnove gušterače.....5

2.1.2. Podjela akutnog pankreatitisa.....7

2.1.3. Epidemiologija akutnog pankreatitisa.....8

2.1.4. Etiologija akutnog pankreatitisa.....9

2.1.5. Patofiziologija akutnog pankreatitisa.....12

2.1.6. Laboratorijske osobitosti akutnog pankreatitisa.....19

2.1.7. Klinička slika i procjena težine bolesti.....20

2.2. Šećerna bolest.....22

2.2.1. Etiološka klasifikacija šećerne bolesti 22

2.2.2. Epidemiologija šećerne bolesti.....23

2.2.3. Biokemijske osnove inzulina.....24

2.2.4. Dijagnostički kriteriji šećerne bolesti.....26

2.3. Asimetrični dimetilarginin (ADMA).....27

2.4. 8-hidroksi-deoksigvanozin (8-OHdG).....30

2.5. Nitrotirozin.....31

2.6. Fruktozamin.....33

3. ISPITANICI I METODE.....34

3.1. Ispitanici.....34

3.2. Plan istraživanja.....35

3.3. Metode 37

3.3.1. Laboratorijske analize.....37

3.3.2. Statistička analiza.....40

3.3.3. Etička načela.....40

4. REZULTATI.....41

4.1. Demografske, antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika.....41

4.2. Biokemijski pokazatelji akutnog pankreatitisa.....43

4.3. Hormonsko-biokemijski pokazatelji važni za metabolizam ugljikohidrata....44

4.4. Oksidativni i dušični stres u akutnom pankreatitisu.....49

4.5. Asimetrični dimetilarginin (ADMA).....51

4.6. OGTT nakon akutnog pankreatitisa.....53

4.7. ADMA, NT i 8-OhdG u patofiziologiji šećerne bolesti nakon akutnog pankreatitisa.....54

5. RASPRAVA.....55

6. ZAKLJUČCI.....65

7. LITERATURA.....66

8. ŽIVOTOPIS.....77

9. PRILOG.....78
9.1. Popis kratica.....78
9.2. Popis objavljenih radova.....80

1. UVOD

Akutni pankreatitis je akutni upalni proces egzokrinog dijela gušterače s promjenjivim širenjem na okolna tkiva i/ili udaljene organske sustave, praćen pojavom boli u trbuhu i povećanjem serumske aktivnosti pankreasnih enzima poput amilaze i lipaze. Dva glavna uzročna čimbenika, žučni kamenci i alkoholizam su odgovorni za 80-90% svih slučajeva akutnoga pankreatitisa. Akutni pankreatitis nastaje kao posljedica aktivacije digestivnih zimogena (enzima) unutar acinarnih stanica gušterače, što dovodi do oštećenja acinusa i pojave kliničke slike akutne upale gušterače. Težina kliničke slike akutnoga pankreatitisa ovisi o infiltraciji gušterače upalnim stanicama, stvaranju i oslobađanju upalnih medijatora, reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala i citokina koji dovode do sindroma sustavnoga upalnoga odgovora (engl. *Systemic Inflamatory Response Syndrome*; SIRS) [1].

U stanicama aerobnih organizama tijekom metaboličkih procesa, neprekidno se stvaraju reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi. Ako njihovo stvaranje nadmaši njihovo uklanjanje, nastaje stanje oksidativnog i dušičnoga stresa. Oksidativni stres je stanje relativne ravnoteže organizma između prooksidacijske aktivnosti, odnosno produkcije reaktivnih kisikovih radikala, i antioksidacijskih procesa, odnosno deaktivacije slobodnih kisikovih radikala. Slobodni kisikovi radikali (eng. Reactive Oxygen Species; ROS) su spojevi koji posjeduje jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali. Takva kemijska struktura uzrokuje visoku nestabilnost ovih spojeva i tendenciju uzrokovanja destruktivnih kemijskih reakcija koji dovode do oštećenja staničnih organela. Najznačajniji reaktivni kisikovi spojevi su hidroksilni radikal, superoksid i vodikov peroksid (OH^-, O_2^- i H_2O_2). U eksperimentalnim istraživanjima dokazano je profilaktično djelovanje hvatača kisikovih radikala poput superoksid dizmutaze. Primjena superoksid dizmutaze na tkivo gušterače tijekom akutne upale smanjuje gušteračni edem i količinu oslobođenih enzima [2]. Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako je oksidativno oštećenje DNA prisutno kod mnoštva degenerativnih procesa poput karcinoma, srčanih bolesti i dijabetesa. Povećane koncentracije 8-hidroksideoksigvanozina (8-OHdG) su ustanovljene kod dijabetičnih bolesnika s mikrovaskularnim komplikacijama bolesti, poput nefropatije i retinopatije [3].

Dušikov oksid (NO) nastaje djelovanjem enzima NO sintetaze (NOS) iz aminokiseline L-arginina. NO uzrokuje relaksaciju glatkih mišićnih stanica, smanjuje agregaciju trombocita i adheziju leukocita. U nastanku poremećaja pankreatične mikrocirkulacije vrlo je važna promjena odnosa između dva najjača medijatora; endotelina i NO. Infuzija NO, fiziološkog antagonista endotelina pokazala je zaštitno djelovanje na pankreatičnu mikrocirkulaciju. Ravnoteža stvaranja i uklanjanja NO je iznimno važna u normalnim fiziološkim procesima. Velike količine slobodnih kisikovih radikala, prije svega superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot -}$), neutraliziraju se unutar stanice ograničenom reakcijom s NO, što rezultira nastankom iznimno toksičnog i reaktivnog intermedijara - peroksinitrita i drugih slobodnih dušikovih spojeva koji oštećenjem različitih biomolekula i staničnih organela vode nastanku oksidativno-dušičnog stresa [4]. Nitrotirozin je produkt nitracije tirozinskih ostataka unutar proteinske strukture, djelovanjem reaktivnih dušikovih spojeva poput peroksinitrita (ONOO-) i dušikova dioksida, koji se koristi kao biomarker staničnog oštećenja zbog oksidativno-dušičnog stresa. Ceriello A. i suradnici pokazali su kako su koncentracije nitrotirozina u plazmi oboljelih od šećerne bolesti bile značajno povećane, dok je nitrotirozin u plazmi kontrolne skupine ispitanika bio nemjerljiv [5].

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je posttranslacijska modifikacija arginina koji se proizvodi u svim stanicama organizma tijekom uobičajenih procesa sinteze proteina. Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako je ADMA nezavisni čimbenik kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta. Mehanizam kojim ADMA ostvaruje negativan učinak na kardiovaskularni sustav je kompetitivna inhibicija NOS. Oko 80% ADMA se degradira unutar stanica pomoću enzima dimetilarginin-dimetilaminohidrolaze (DDAH). Patološki čimbenici koji dovode do oksidativnog oštećenja endotelnih stanica, poput proupalnih citokina, hiperhomocisteinemije, hiperglikemije, infektivnih čimbenika i oksidiranog LDL-a mogu uzrokovati oštećenje funkcije DDAH i patološko nakupljanje ADMA. ADMA zatim blokira stvaranje NO što uzrokuje endotelnu disfunkciju. Zato DDAH-ADMA-NOS sudjeluje u pozitivnoj povratnoj sprezi organskog oštećenja. Uloga ADMA u patofiziologiji akutnoga pankreatitisa do sada nije istražena [6].

Blaga hiperglikemija se može pojaviti tijekom akutne upale gušterače u 50% bolesnika, i često se koristi kao marker za procjenu težine bolesti. Dugogodišnje praćenje

bolesnika s akutnim pankreatitisom pokazalo je kako ovi bolesnici imaju veću incidenciju abnormalne tolerancije glukoze kada ih se usporedi s kontrolnom skupinom ispitanika. Prevalencija abnormalne tolerancije glukoze u bolesnika s kroničnim pankreatitisom je i do 70%. Ako je prisutna kalcifikacija gušterače, prevalencija je još veća. Hiperglikemija djelovanjem protein kinaze C i djelovanjem na sustav elektronskog transporta i električnog potencijala mitohondrijske membrane, uzrokuje pojačano stvaranje slobodnih kisikovih i dušikovih radikala. Oštećen odgovor β-stanica gušterače u akutnoj upali pridonosi razvoju oštećene tolerancije glukoze i manifestne šećerne bolesti, pri čemu dvojak utjecaj oksidativnog i dušičnoga stresa s jedne strane i ADMA-e s druge strane nije rasvijetljen [7].

Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je utvrditi dinamiku stvaranja asimetričnog dimetilarginina tijekom akutne upale gušterače te utvrditi povezanost između oksidativnog stresa, dušičnoga stresa i ADMA na posljedični nastanak poremećaja tolerancije glukoze nakon akutnoga pankreatitisa. Hipoteza istraživanja jest da se praćenjem vrijednosti ADMA-e može dobiti integrirani uvid u jačinu oksidativnog stresa, utjecaj tog stresa na metabolizam NO u akutnoj upali gušterače te da je kasniji razvoj poremećene tolerancije glukoze u izravnoj vezi s jačinom oksidativnog oštećenja i deregulacije NO sustava.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Akutni pankreatitis

Akutni pankreatitis je akutni upalni proces egzokrinog dijela gušterače s promjenjivim širenjem na okolna tkiva i/ili udaljene organske sustave, praćen pojavom boli u trbuhu i povećanjem serumske aktivnosti pankreasnih enzima poput amilaze i lipaze [1,8-11].

2.1.1. Anatomsko-fiziološke osnove gušterače

Gušterača je retroperitonealni organ koji se proteže od konkaviteta dvanaesnika do hilusa slezene. U odraslih osoba, gušterača teži između 75 i 100 grama i duga je između 15 i 20 centimetara. Činjenica da je smještena duboko u trbušnoj šupljini i što leži fiksirana u retroperitonealnome prostoru objašnjava ponekad teško uočljivu simptomatologiju patoloških procesa koji je zahvaćaju.

Kirurški, gušterača se dijeli u četiri regije: glava, vrat, tijelo i rep. Glava se nalazi u konkavitetu dvanaesnika, a gušteračni zavinuti rep dotiče hilus slezene [12,13]. Gušteračno tkivo podijeljeno je u dvije odvojene funkcionalne jedinice: egzokrini i endokrini dio.

Egzokrini dio gušterače čini 80% ukupnoga gušteračnoga tkiva. Građen je od malih žljezdanih tvorbi (acinusa) obloženih cilindričnim stanicama koje proizvode i izlučuju brojne enzime potrebne za probavu. Normalno, enzimi i drugi proteini se sintetiziraju na ribosomima grubog endoplazmatskog retikuluma. Novosintetizirani proteini se transportiraju u malim transportnim vezikulama do Golgijeva kompleksa, a neki se posttranslacijski glikoziliraju i manozni ostatci se fosforiliraju [14,15]. Acinusi izlučuju amilaze, proteaze i lipaze, enzime odgovorne za razgradnju ugljikohidrata, proteina i masti. Svaka stanica sadrži mnoštvo vezikula koje služe za pohranu enzima. Proces oslobađanja enzima uključuje spajanje membrane vezikula sa staničnom membranom acinusa. Gušteračni sekret izlijeva se u manje kanaliće čijim spajanjem nastaje glavni pankreatični kanal ili Wirsungov kanal i akcesorni pankreatični kanal poznat pod nazivom Santorinijev kanal. Glavni pankreatični kanal izlijeva se zajedno s glavnim žučnim kanalom u dvanaesnik [16]. Pankreatična amilaza secenira se u aktivnome obliku i njezina funkcija je razgradnja škroba i glikogena u jednostavne šećere poput glukoze,

maltoze i dekstrina. Ovi jednostavni šećeri prolaze epitelne stanice tankoga crijeva (enterocite) pomoću mehanizama aktivnoga transporta [17]. Proteolitički enzimi zahtijevaju aktivaciju i seceniraju se kao proenzimi. Tripsinogen se pretvara u tripsin pomoću enzima enterokinaze u lumenu dvanaesnika. Stvoreni tripsin sudjeluje u aktivaciji drugih gušteračnih proenzima [18]. Spontanu aktivaciju tripsinogena u tkivu gušterače blokira pankreatični sekretorni tripsin inhibitor (PSTI) ili *SPINK1 (serine protease inhibitor Kazal type)*. Manjak PSTI zbog mutacije *SPINK1* gena je uzrok obiteljskoga pankreatitisa [19]. Tripsin aktivira ostale proenzime, pri čemu nastaju kimotripsin, elastaza, kalikrein, aminopeptidaza te fosfolipaza A i B. Za razliku od navedenih enzima amilaza i lipaza ne aktiviraju se pomoću tripsina. Svi ovi enzimi imaju važnu ulogu u probavi, npr. tripsin i kimotripsin sudjeluju u metabolizmu bjelančevina, amilaza u metabolizmu ugljikohidrata, a lipaza u metabolizmu masti. Otpuštanje enzima je stimulirano različitim neurohumoralnim mehanizmima. Glavni poticaj na sekreciju probavnih enzima gušterače iz acinarnih stanica su acetilkolin i kolecistokinin (CCK) [20,21]. Acetilkolin se oslobađa iz kolinergičnih vlakana n.vagusa i djeluje na muskarinske receptore. CCK može stimulirati vagalni refleks i djelovati preko vagalnih eferentnih vlakana. Acetilkolin vezan na receptore na površini acinarnih stanica rezultira stimulacijom fosfolipaze C, što uzrokuje degradaciju membranskih fosfolipida i otpuštanje sekundarnih glasnika IP3 i diacilglicerola [22]. IP3 stimulira intracelularno otpuštanje kalcija. Povećana razina intracelularnog kalcija stimulira otpuštanje probavnih enzima.

Endokrini dio gušterače čine stanice koje se nalaze između acinusa u tzv. Langerhansovim otočićima koje je 1869. godine otkrio njemački patolog Paul Langerhans. Sastoje se od α-stanica koje luče glukagon, β-stanica koje luče inzulin, δ-stanica koje luče somatostatin dok γ-stanice ili PP-stanice luče pankreatični polipeptid. β-stanice čine većinu stanica Langerhansovih otočića, njih 70-80%. Glavna funkcija β-stanica je sinteza, skladištenje i regulacija sinteze inzulina. Dva sporedna tipa stanica jesu stanice D1 i enterokromafine stanice. Stanice D1 izlučuju vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), dok enterokromafine stanice izlučuju serotonin [23,24].

2.1.2. Podjela akutnog pankreatitisa

Na temelju kliničke slike i podataka dobivenih dostupnim načinima pretraživanja akutni pankreatitis dijelimo na:

- *Blagi akutni pankreatitis* popraćen minimalnom disfunkcijom organa i sigurnim oporavkom. Predominantna patološka promjena jest intersticijski edem gušterače. Blagi oblik pankreatitisa susrećemo kod 80% bolesnika.
- *Teški akutni pankreatitis* obilježen je organskim zatajivanjem i lokalnim komplikacijama kao što su nekroza (inficirana ili neinficirana), pseudocista ili apsces. Teški akutni pankreatitis najčešće je manifestacija razvoja pankreasne nekroze. Teški oblik akutnoga pankreatitisa nalazimo kod 20% bolesnika. Četvrtina do trećina oboljelih od teškoga akutnoga pankreatitisa umire.
- *Akutna nakupina tekućine* nastaje rano, smještena je blizu gušterače, a nedostaje joj stijenka od granulacijskog i vezivnog tkiva. Nastaje u 30-50% slučajeva i najčešće se spontano povlači
- *Pankreasna nekroza i inficirana nekroza* lokalizirano je područje nevijabilnog pankreatičnog tkiva. Nastupi li infekcija, razvije se inficirana nekroza s golemim rizikom smrtnog ishoda
- *Pseudocista* je nakupina gušteračnog sekreta obuhvaćena stijenkom vezivnog ili granulacijskog tkiva
- *Gušteračni apsces* je intraabdominalna nakupina gnoja najčešće smještena uz samu gušteraču, nastaje kao posljedica akutnog pankreatitisa, a odraz je likvefakcije i sekundarne infekcije [25-28].

2.1.3. Epidemiologija akutnog pankreatitisa

Malo je epidemioloških podataka o pojavnosti akutnoga pankreatitisa. Godišnja incidencija akutnoga pankreatitisa je oko 20 slučajeva na 100.000 ljudi u zapadnim zemljama svijeta, ali također postoje i određene varijacije u rezultatima epidemioloških istraživanja koje u prvome redu proizlaze iz metodoloških razlika, teškoća u postavljanju točne dijagnoze i korištenja različitih dijagnostičkih kriterija. Muškarci češće obolijevaju od žena, a crnci češće obolijevaju od bjelačke populacije. Godišnja incidencija akutnoga pankreatitisa u bijelaca je 6, a u crnaca 21 na 100.000 stanovnika [29]. Posljednjih godina opaža se i značajan porast incidencije akutnoga pankreatitisa. Smatra se da je glavni uzrok tome porast incidencije pretilosti u općoj populaciji i porast potrošnje alkohola koji značajno povećavaju učestalost obolijevanja od žučnih kamenaca. Drugi najvažniji razlog porasta incidencije akutnoga pankreatitisa jest i uporaba mnogo osjetljivijih i specifičnijih testova određivanja serumske koncentracije pankreasnih enzima (amilaze i lipaze) što je rezultiralo 60-postotnim porastom incidencije dijagnoze akutnoga pankreatitisa u posljednjih 10 godina u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). Incidencija obično i raste sa životnom dobi, tako da se prvi napadaj akutnoga pankreatitisa prosječno javlja u šestome desetljeću života (53. god.). Veća pojavnost pankreatitisa je u urbanim sredinama. Mortalitet se kreće od 10 pa do 50%, što u prvome redu ovisi o težini kliničke slike [30]. Trideset do 75% pankreatitisa uzrokovano je bolestima žučnih vodova, u prvome redu žučnim kamencima. Više od 30% uzrokovano je učestalim i prekomjernim konzumiranjem alkoholnih pića (više od 100 g/dan) [10]. Pankreatitis alkoholne etiologije je mnogo češći u zapadnim zemljama svijeta i Japanu nego u azijskim zemljama [31]. Akutni pankreatitis predstavlja značajno financijsko opterećenje zdravstvenog sustava svake zemlje. Prosječno bolničko liječenje traje sedam dana, a 2003. god. trošak sedmodnevnog liječenja pankreatitisa u SAD-u bio je 9870 USD, a iste godine SAD su odvojile 2,2 milijarde USD za liječenje akutnoga pankreatitisa [32,33].

2.1.4. Etiologija akutnog pankreatitisa

Etiologija akutnoga pankreatitisa je kompleksna. Epidemiološki je ustanovljeno kako mnogo čimbenika može utjecati na porast incidencije pankreatitisa, a ponekad uzročni čimbenik ostaje nepoznat. Dva glavna uzročna čimbenika, žučni kamenci i alkoholizam su odgovorni za 80-90% svih slučajeva akutnoga pankreatitisa. Preostalih 10-20% je idiopatski, odnosno nepoznata podrijetla ili uzrokovano traumom, operacijom, nekim lijekovima, infekcijama ili toksinima.

Bolesti žučnih vodova

Iako je akutni pankreatitis povezan i s bolestima žučnoga mjehura (npr. akalkulozni kolecistitis), žučni kamenci predstavljaju najvažniji etiološki čimbenik razvoja akutnoga pankreatitisa. Kolelitijaza je prisutna u 30-75% bolesnika s akutnim pankreatitisom. Često su žučni kamenci previše maleni da bi ih se moglo dokazati rutinskim slikovnim metodama (ultrazvuk), pa se takvi oblici pankreatitisa nazivaju idiopatskim [34]. Mehanizam kojim žučni kamenci dovode do razvoja pankreatitisa nije u potpunosti poznat. Prema ”hipotezi zajedničkoga žučnoga voda” žučni kamenac dovodi do blokade protoka žuči u blizini spoja zajedničkoga žučnoga i pankreatičnoga voda, što uzrokuje retrogradni protok žuči u tkivo pankreasa, i na kraju dovodi do razaranja tkiva pankreasa djelovanjem žučnih soli i aktiviranih intrapankreasnih enzima [35].

Alkohol

U Hrvatskoj je alkohol odgovoran za najmanje 50% akutnih pankreatitisa u muškaraca i 30% u žena. Iako neki pacijenti razviju simptome akutnoga pankreatitisa nakon kratkotrajnog uzimanja alkohola, bolest se najčešće ne razvija ako osoba ne konzumira alkohol barem dvije godine, a najčešće nakon deset godina učestaloga korištenja alkoholnih pića. Priroda, odnosno vrsta konzumiranih alkoholnih pića (vino, pivo, žestoka alkoholna pića itd.) manje je značajna od količine unesenoga etanola. Otprilike 10-15% osoba koje unesu 100-150 g etanola dnevno doživjet će epizodu akutnoga pankreatitisa [36]. Etanol uzrokuje pankreatitis na nekoliko načina. Poznato je da etanol, osim što uzrokuje spazam Odijeva sfinktera, djeluje i kao izravni metabolički toksin koji

štetno djeluje na acinarne stanice gušterače u kojima interferira sa sintezom enzima. Početni učinak etanola je kratkotrajni porast gušteračne sekrecije nakon kojega slijedi inhibicija izlučivanja. Povećana koncentracija enzima uzrokuje precipitaciju kalcija na proteinskom matriksu što u konačnici dovodi do opstrukcije gušteračnih vodova i porasta tlaka. Neprimjerena aktivacija tripsina djelovanjem etanola je demonstrirana *in vitro*. Etanol također dovodi do poremećaja protoka krvi u gušterači, što može uzrokovati fokalnu ishemiju i nekrozu gušterače [37].

Tumori

U svakome slučaju akutnoga pankreatitisa kod pacijenata koji ne uzimaju alkohol i koji nemaju dokazanu bolest žučnih vodova trebalo bi postaviti sumnju na tumor. Približno 1-2% pacijenata s akutnim pankreatitisom ima tumor pankreasa koji dovodi do opstrukcije protoka gušteračnoga sekreta.

Iatrogeni pankreatitis

Akutni pankreatitis također je povezan s raznim operativnim zahvatima, najčešće zahvatima koji se izvode u blizini pankreasa poput pankreatične biopsije, distalne gastrektomije, splenektomije itd. Endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija (ERCP) je najčešći uzrok iatrogenog pankreatitisa zbog izravnoga oštećenja tkiva i porasta intraduktalnoga tlaka [38].

Lijekovi

Nekoliko lijekova je povezano s povećanom učestalošću akutnoga pankreatitisa poput tiazidnih diuretika, furosemida, estrogena, azatioprina, 6-merkaptopurina, metildope, sulfonamide, tetraciklina, prokainamida, nitrofurantoina i blokatora acetilkolinesteraze.

Vaskularne bolesti

Pankreasna ishemija može izazvati pankreatitis. Mogući uzroci su predoziranje ergotaminima, transkateterska embolizacija, embolija ateromatoznim plakovima iz aorte, vaskulitis u sklopu sistemnoga eritematoznoga lupusa.

Infekcije i infestacije

Iako se vjeruje kako zaušnjaci, *Coxsackie* virusi i *Mycoplasma pneumoniae* mogu uzrokovati pankreatitis, ni jedan od ovih infektivnih uzročnika nije izoliran iz tkiva pankreasa. Međutim, pokazano je kako 30% bolesnika u kojih se uzrok pankreatitisa ne može utvrditi ima povišeni titar protutijela usmjerenih protiv ovih uzročnika. Također, infestacije parazitima poput *Ascaris lumbricoides* i *Clonorchis sinensis* koji je endemičan u Japanu i Kini mogu biti uzrokom akutnoga pankreatitisa.

Hiperlipidemija

Povišena koncentracija triglicerida često se susreće u akutnome pankreatitisu. Umjerena hipertrigliceridemija može se pojačati djelovanjem dodatnih čimbenika kao što su dijabetes, konzumacija alkoholnih pića i trudnoća. Također, lipaze mogu uzrokovati povećanje koncentracije masnih kiselina unutar pankreatične mikrocirkulacije, što može dovesti do ozljede endotelnih stanica, formiranja mikrotromba i posljedične fokalne ishemije što na kraju rezultira nastankom akutnoga pankreatitisa [39].

Hiperparatireoidizam i hiperkalcemija

Hiperparatireoidizam je rijedak poremećaj koji uzrokuje 0,5% slučajeva akutnoga pankreatitisa. Hiperkalcemija uzrokovana drugim uzrocima (primjerice: koštane metastaze, parenteralna prehrana, intravenska primjena visokih doza kalcija) može izazvati pankreatitis [40].

Iatrogeni pankreatitis

Učestalost pankreatitisa nakon ERCP-a u većini studija ne prelazi 5%, a incidencija pankreatitisa ovisi o volumenu i tlaku kojim se kontrastno sredstvo injicira. Pankreatitis se često pojavi nakon prepunjenja vode i parenhimografije, kao i pri postojanju anomalije gušteračnih vodova.

2.1.5. Patofiziologija akutnog pankreatitisa

Akutni pankreatitis, prema davno prihvaćenoj teoriji, nastaje kao posljedica aktivacije digestivnih zimogena (enzima) unutar acinarnih stanica gušterače, što dovodi do oštećenja acinusa i pojave kliničke slike akutne upale gušterače. Težina kliničke slike akutnoga pankreatitisa ovisi o događajima koji slijede nakon aktivacije zimogenih enzima kao što su infiltracija gušterače upalnim stanicama, stvaranja i oslobađanja upalnih medijatora, reaktivnih kisikovih radikala i citokina koji dovode do sindroma sustavnoga upalnoga odgovora (eng. Systemic Inflamatory Response Syndrome; SIRS). Inicijalni poremećaj u akutnome pankreatitisu jest aktivacija tripsinogena u tripsin.

Prema *duktalnoj teoriji* smatra se kako ovi patofiziološki poremećaji nastaju kao posljedica povećanja tlaka u gušteračnom vodu i porasta propusnosti duktalnoga epitela s posljedičnom aktivacijom enzima. Povećani tlak u gušteračnom vodu nastaje kao posljedica refluksa žuči i gušteračnoga sekreta iz zajedničkoga žučnoga voda u tkivo pankreasa zbog zaglavljenog kamenca u pankreatičnoj ampuli, stenoze Odijeva sfinktera ili peripapilarnoga duodenalnoga divertikula. Mješavina žuči i gušteračnih enzima povećava propusnost duktalnoga epitela, tako da enzimi mogu doprijeti do intersticija i potaknuti lokalnu upalnu reakciju.

Prema *acinarnoj teoriji* autoaktivacija gušteračnih enzima nastaje kao posljedica pogrešno usmjerene bazolateralne sekrecije u gušteračni intersticij lizosoma i proenzimima bogatih zimogenih granula unutar acinarnih stanica. Najbolji primjer je ceruleinom izazvani akutni pankreatitis *in vivo.* Cerulein, sintetički analog kolecistokinina, primijenjen u visokoj dozi intravenski potiče maksimalnu sekreciju gušteračnih enzima i izaziva intersticijski oblik akutnoga pankreatitisa. Enzimska sekrecija bude blokirana, a u citoplazmi nastaju vakuole koje sadržavaju i digestivne enzime i lizosomne hidrolaze. Ovakva kolokalizacija može potaknuti aktivaciju tripsinogena u tripsin preko katepsina B.

Mješovita duktalno-acinarna teorija može se primijeniti na nastanak akutnoga alkoholnoga pankreatitisa, pri čemu alkohol dovodi do porasta intraduktalnoga tlaka, porasta propustljivosti duktalnoga epitela i izravnoga toksičnoga učinka alkohola [41].

U fiziološkim uvjetima tripsinogen se aktivira u dvanaesniku pomoću enzima enterokinaze. Nakon toga tripsin aktivira ostale proenzime prijeko potrebne za probavu. Niz je dokaza da je aktivacija tripsina nužna za nastanak akutnoga pankreatitisa. Tako se u eksperimentalnome edematoznome pankreatitisu hiperstimulacijom analogom kolecistokinina, ceruleinom, opaža povećana intrapankreasna aktivacija tripsina, a u serumu se rano mogu dokazati povišenje tripsinogena i aktivacijskoga peptida karboksipeptidaze-A1 kao markera aktivacije zimogena. Probavni se enzimi nalaze intracelularno, odijeljeni zimogenim granulama (tripsinogen, kimotripsinogen, proelastaza, proproteaza, kalikreinogen, prokarboksipeptidaza, profosfolipaza, lipaza, amilaza, ribonukleaza, deoksiribonukleaza). Nakupljanje lizosomalnih hidrolaza, npr. katepsina B, i digestivnih zimogena u acinusnim stanicama dovodi do približavanja obaju enzimskih odjeljaka i do aktivacije gušteračnih proenzima unutar stanice. Nakon toga nastaje oštećenje acinusne stanice i nastanka pankreatitisa. Intracelularna aktivacija tripsinogena zbiva se na dva načina: autoaktivacijom i aktivacijom preko lizosomalne proteaze katepsina B. U životinja s mutacijom gena za katepsin B pankreasna oštećenja bila su manja za 50%.

Kisikovi radikali

Oksidativni stres je stanje relativne ravnoteže organizma između prooksidacijske aktivnosti, odnosno produkcije reaktivnih kisikovih radikala, i antioksidacijskih procesa, odnosno deaktivacije slobodnih kisikovih radikala. Slobodni kisikovi radikali (eng. Reactive Oxygen Species; ROS) su spojevi koji posjeduju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali. Takva kemijska struktura uzrokuje visoku nestabilnost ovih spojeva i tendenciju uzrokovanja destruktivnih kemijskih reakcija koji dovode do oštećenja staničnih organela. Najznačajniji reaktivni kisikovi spojevi su hidroksilni radikal, superoksid i vodikov peroksid (OH^-, O_2^- i H_2O_2). Najznačajniji stanični izvor reaktivnih kisikovih radikala su mitohondriji. U normalnim uvjetima 95% molekularnog kisika se reducira do H_2O. Od preostalih 5% nastaju reaktivni kisikovi radikali. Osim mitohondrija slobodne radikale mogu stvarati ksantin-oksidaza, prostaglandin-sintetaza i aktivirani leukociti. U fiziološkim uvjetima zaštitni sustavi onemogućavaju citotoksično djelovanje kisikovih radikala. U tom sustavu sudjeluju enzimski inaktivatori kao superoksid

dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Visoke razine reaktivnih kisikovih radikala nastaju tijekom upalnih procesa. Tijekom pankreatitisa pojačana kemotaksija leukocita uzrokuje oslobađanje upalnih medijatora koji potiču stvaranje reaktivnih kisikovih radikala koji dovode do oštećenja staničnih struktura; proteina, lipida, DNA, kromosoma i staničnoga citoskeleta. U eksperimentalnim studijama istraživano je profilaktično djelovanje hvatača kisikovih radikala poput superoksid dismutaze. Primjena superoksid dizmutaze na *ex vivo* pankreas smanjila je gušterači edem i količinu oslobođenih amilaza [2].

Djelovanje proupalnih citokina

Upala je kompleksan proces koji uključuje imunološki sustav, kinin, komplement, koagulacijski sustav i fibrinolitički sustav. U ranim fazama upale, ozljeda tkiva je uzrokovana masom neutrofila, prvom linijom imunološke obrane, zatim slijede makrofazi, monociti i limfociti. Primarna funkcija upalnih stanica je da odstrane mikroorganizme, mrtve stanice i stanični debris. Ovaj je proces reguliran djelovanjem protein regulirajućih faktora ili citokina kao što su IL-8, IL-4, TNFα i slični. Kaskada reakcija započinje oštećenje stanice štetnim agensom. Ozljeda potiče reakciju koja uzrokuje značajnu proizvodnju kemoreaktanata. Ovi kemijski glasnici aktiviraju endotelne stanice na pojačani izražaj adhezijskih molekula, selektina, koji usporavaju protok leukocita. Integrini, glikoproteini izraženi na površini leukocita, imobiliziraju neutrofile na mjestu ozljede. Integrini se čvrsto vežu za intracelularne adhezijske molecule (ICAMs), adhezijske molekule endotelnih stanica (ELAMs) i adhezijske molekule vaskularnih stanica (VCAMs), izražene na površini endotela. Različiti citokini mogu uzrokovati pojačanu ekspresiju adhezijskih molekula, što u konačnici dovodi do boljeg usmjeravanja upalnih stanica na mjesto oštećenja.

Posljednjih godina predodžba o patogenezi pankreatitisa se temeljito promijenila. Napušten je tradicionalni koncept po kojem je autoaktivacija pankreasnih enzima glavni odlučujući čimbenik razvoja bolesti. Bolesnici s teškim oblicima akutnoga pankreatitisa očituju se sindromom sustavnoga upalnoga odgovora (SIRS) slično politraumatiziranim bolesnicima. Središnje mjesto u patofiziologiji akutnoga pankreatitisa zauzima aktivacija upalne kaskade, oslobađanje citokina i poremećaj mikrocirkulacije gušterače. Najvažniji

citokini koji se oslobađaju tijekom pankreatitisa su čimbenik tumorske nekroze (TNF-α), interleukini (IL) i transformirajući čimbenik rasta (TGF) [2].

Čimbenik tumorske nekroze-α (TNF-α)

TNF-α je primarni medijator upale u septičkom odgovoru kao i primarni medijator fatalnih komplikacija koje se često viđaju nakon teških trauma, opeklina, velikih operacija itd. TNF je mali protein koji se sintetizira u monocitima i drugim fagocitnim stanicama. Proizvodi se u transmembranskoj formi od 26 kDa i takav se luči van. Ovisno o cirkulirajućoj koncentraciji njegovo djelovanje može biti blagotvorno ili štetno. Kemotaktičan je za leukocite, regulira izražaj adhezijskih receptora (ICAM, ELAM) na upalnim stanicama, inducira različite druge citokine, potiče leukocitnu i endotelnu aktivaciju. Fiziološke koncentracije u tkivu su gotovo nemjerljive. U velikim koncentracijama inducira oslobađanje PAF-a, reaktivnih kisikovih radikala, NO itd. Jedan od najvažnijih citokina u patogenezi akutnoga pankreatitisa je TNF-α. Parenteralna primjena monoklonalnoga protutijela usmjerenoga na TNF-α ili njegov receptor značajno poboljšava preživljavanje štakora u eksperimentalnome modelu nekrotizirajućega pankreatitisa. TNF-α može uzrokovati direktno oštećenje duktalnih epitelnih stanica, mikrotrombozu pankreatične cirkulacije i edem. TNF-α također stimulira oslobađanje drugih proupalnih citokina poput IL-1, IL-6 i IL-8 [42,43].

Interleukini (IL)

IL-1, IL-6 i IL-8 pripadaju grupi proinflamatornih citokina koji igraju značajnu ulogu u patogenezi akutnoga pankreatitisa. Antagonisti IL-1 receptora (IL-1r) dovode do značajnoga smanjenja mortaliteta (do 30%) u životinjskome modelu teških oblika akutnoga pankreatitisa. IL-6 uglavnom proizvode mononuklearne stanice poput makrofaga i njegova glavna uloga je aktivacija B-limfocita i diferencijacija B-limfocita u plazma stanice koje proizvode imunoglobuline. Postoje značajne razlike u serumskoj koncentraciji IL-6 u pacijenata s blagim i teškim oblicima akutnoga pankreatitisa. Koncentracija IL-6 od 40 μmol/L indikativna je za teške oblike akutnoga pankreatitisa. IL-8 koji uglavnom proizvode neutrofilni granulociti djeluje kao snažan kemotaktički faktor te pospješuje kemotaksiju drugih upalnih stanica [42,44].

Transformirajući čimbenik rasta (TGF)

Van Laethem i sur. istraživali su ekspresiju TGF-β *in vitro* te su ustanovili da se značajna kemotaksija neutrofilnih granulocita i odlaganje fibronektina u tkivu gušterače događa u prva 24 sata pomoću TGF-β [45].

Poremećaj pankreasne mikrocirkulacije

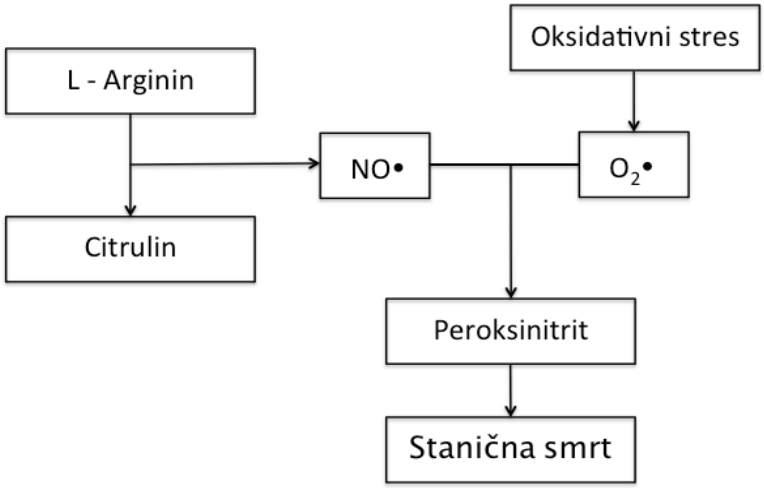
Neovisno o etiološkome čimbeniku akutni pankreatitis se u prvome redu očituje kao gušteračni edem. Takav edematozni pankreatitis poptuno se restituira u oko 85% oboljelih. U samo 15% oboljelih nastupa progresija bolesti s razvojem nekroze parenhima. U akutnome edematoznom pankreatitisu postoji homogeno povišena mikroperfuzija u smislu opće hiperemije. Nasuprot tomu, nekrotizirajući pankreatitis obilježen je progresivnim smanjenjem kapilarne perfuzije. Perfuzija je smanjena zbog konstrikcije arteriola i zbog pojačane leukocitno-endotelne interakcije. Otpor je u mikrocirkulaciji povećan, a dodatno se lokalno aktivira intravaskularno zgrušavanje. U nastanku poremećaja mikrocirkulacije važna je promjena odnosa između dva najjača medijatora: endotelina i dušičnoga oksida (NO).

Endotelin

Endotelin-1 (ET-1) je potentni vazokonstriktor pankreatične mikrocirkulacije i većinom ga proizvode endotelne stanice. U intaktnoj mikrovaskulaturi bitna je ravnoteža između vazokonstriktornih učinaka ET-1 i vazodilatatornih učinaka dušičnoga oksida (NO), što ga proizvodi endotelna NO sintetaza (eNOS). Povećanu ekspresiju prepro-ET-1 mRNA mogu potaknuti brojni upalni medijatori, angiotenzin, trombin itd. Nakon što ga oslobode endotelne stanice, ET-1 uzrokuje prolaznu vazodilataciju, nakon koje slijedi dugodjelujuća vazokonstrikcija. Nekoliko studija je pokazalo kako tkivo pankreasa posjeduje ETa i ETb receptore. Parenteralna primjena endotelina uzrokuje značajno smanjenje protoka krvi u gušterači što može uzrokovati fokalnu ishemiju. Povezano s tim je u transgeničnih životinja, koje imaju prekomjernu ekspresiju endotelinskih receptora, dokazan značajno teži klinički tijek akutnoga pankreatitisa [46].

Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid (NO) nastaje djelovanjem enzima NO sintetaze (NOS) iz aminokiseline L-arginina. Prvotno je otkriven u stanicama endotela, ali također je prisutan u trombocitima, makrofazima i u stanicama gušterače. NO uzrokuje relaksaciju glatkih mišićnih stanica, smanjuje agregaciju trombocita i adheziju leukocita [47]. Smanjena mikrovaskularna cirkulacija i oštećenje pankreasa je ublažena davanjem gliceril trinitrata koji djeluje kao NO donor [48]. Smanjena koncentracija NO uzrokuje povećanje adhezije i aktivacije leukocita što može uzrokovati pogoršanje različitih upalnih reakcija. Infuzija NO, fiziološkoga antagonista endotelina, pokazala je zaštitno djelovanje na mikrocirkulaciju pankreasa [49]. Poznato je kako u malim količinama NO djeluje zaštitno. Male količine reaktivnih dušikovih spojeva (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) reguliraju egzokrinu sekreciju gušterače povećavajući mikrocirkulatorni protok, blokirajući leukocitnu adheziju i aktivaciju katepsina, aktivatora tripsina. U vrlo visokim koncentracijama NO je letalni oksidativni agens [4]. Reakcijom s O_2 daje NO_2 i peroksinitrit koji smanjuju staničnu respiraciju, uzrokuju nitraciju proteina, staničnu nekrozu i apoptozu. Studije su pokazale da je koncentracija nitrata, metabolita NO, u plazmi pacijenata sa septičkim šokom povišena i da blisko korelira s APACHE-stupnjem težine bolesti. Shematski prikaz sinteze i oksidativne razgradnje NO preko peroksinitrita nalazi se na Slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz sinteze i oksidativne razgradnje NO preko peroksinitrita.

U stanjima povišenog oksidativnog stresa reakcijom NO i superoksidnog aniona (O_2^-) nastaje peroksinitrit koji uzrokuje stanje dušičnog stresa i staničnu smrt.

Promjena koncentracije intracelularnoga kalcija

Povećana koncentracija kalcija može potaknuti aktivaciju nekih proenzima i uzrokovati razaranje citoskeleta i mitohondrijsku disfunkciju s oštećenjem stanice. Povišena koncentracija kalcija potiče autoaktivaciju tripsinogena i stabilizaciju aktivnoga tripsina [50].

2.1.6. Laboratorijske osobitosti akutnog pankreatitisa

Laboratorijska dijagnostika

Aktivnost amilaze

Aktivnost serumske amilaze odražava aktivnost amilaze podrijetlom iz gušterače i žlijezda slinovnica. Povećanje koncentracije amilaze odraz je ispiranja izoamilaze iz oštećenih stanica. Aktivnost amilaze u pankreatitisu je povišena već prvoga dana i ostaje povišena 5-10 dana. U mnogim teškim intraabdominalnim stanjima kao što su crijevna ishemija ili perforacija, aktivnost amilaze zbog njezina oslobađanja iz lumena u sustavnu cirkulaciju raste.

Aktivnost lipaze

Određivanje aktivnosti lipaze u serumu za dijagnozu akutnoga pankreatitisa jednako je vrijedan dijagnostički test kao i određivanje aktivnosti amilaze. Osim u akutnome pankreatitisu, povišena aktivnost lipaze može se naći i kod uznapredovaloga zatajivanja bubrega i pri perforaciji crijeva. Za dijagnostičku točnost potrebno je odrediti vrijednosti obaju enzima [51].

Standardni krvni testovi

Broj leukocita obično je znatno povišen. Povišene serumske razine transferaza, alkalne fosfataze i bilirubina češće su udružene s bilijarnim pankreatitisom.

2.1.7. Klinička slika i procjena težine bolesti

Klinička slika akutnog pankreatitisa

Intenzivna bol je glavni simptom akutnog pankreatitisa. Bol je lokalizirana najčešće u epigastriju, a ponekad u lijevom donjem kvadrantu. U većine bolesnika dosegne maksimum tijekom 10 do 20 minuta, te je najčešće umjerena do jaka. Uz bol često se pojavljuje mučnina i povraćanje. Povraćanje može biti intenzivno i ne dovodi do popuštanja boli, i u tome se očituje razlika prema boli kod akutnog gastritisa.

Koža je blijeda, oznojena, a temperatura najčešće blago povišena. Žutica se opaža češće kod bilijarne etiologije pankreatitisa, a ponekad i kod alkoholne etiologije zbog edema gušterače. Trbuh je meteoristični, a stijenka je bolna na palpaciju. Peristaltika je oskudna ili se ne čuje. U najtežim slučajevima u kliničkoj slici dominira šok i cijanoza, a na koži se mogu vidjeti plavičaste pjege krvarenja, osobito na slabinama i oko pupka. U diferencijalnoj dijagnozi u obzir dolaze ruptura želuca i dvanaesnika, žučna kolika, akutna crijevna opstrukcija, infarkt donje stijenke miokarda i disecirajuća aneurizma abdominalne aorte.

Procjena težine bolesti

U procjeni težine bolesti razlikujemo klinička mjerila (Atlanta kriteriji) i biokemijske pokazatelje (Ransonovi i APACHE II bodovi).

Atlanta kriteriji

- *Organsko zatajivanje;* šok: sistolički tlak <90 mm Hg, respiratorna insuficijencija: $pO_2 \leq 60$ mm Hg, bubrežna insuficijencija: kreatinin > 2 mg/dL, gastrointestinalno krvarenje: > 500 mL/h.
- *Lokalne komplikacije:* nekroza, apsces, pseudocista.
- *Nepovoljni rani prognostički znakovi:* tri ili više Ransonovih kriterija, APACHE II score ≥ 8[114].

Ransonov indeks

U primjeni je od 1974. godine i obuhvaća ukupno 11 parametara. Studije su pokazale kako je prosječni Ransonov indeks u blagom pankreatitisu iznosio 1,6, u teškom 2,4, a u onom sa smrtnim ishodom 5,6.

Razlikujemo kriterije kod primitka u bolnicu i nakon 48 h.

Kod primitka: dob viša od 55 god., leukociti veći od 16, kalcij manji od 8 mg/dL, LDH veći od 350 U/L, AST veći od 250 U/L

Nakon 48 h: pad hematokrita veći od 10%, porast ureje veći od 5 mg/dL, glukoza veća od 200 mg/dL, pO_2 manji od 60 mmHg i sekvestracija tekućine veća od 6 L [52].

Apache II score

Više od 8 Apache II bodova znači 11-18% veći mortalitet bolesnika.

Hemoragična peritonealna tekućina, pretilost, znakovi zatajivanja organskih sustava, hipotenzija (sistolički tlak manji od 90 mmHg), tahikardija-frekvencija srca veća od 130, pO_2 manji od 60 mmHg, oligurija (diureza <50 mL/h), koncentracija kalcija manja od 1,9 mmol/L i serumski albumin manji od 33 g/L [53][114].

2.2 Šećerna bolest

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *Diabetes mellitus*) je skupina heterogenih poremećaja metabolizma ugljikohidrata, koji rezultiraju hiperglikemijom zbog apsolutnog ili relativnog nedostatka hormona inzulina. Ključni patofiziološki procesi u šećernoj bolesti događaju se na razini sinteze i izlučivanja inzulina u β-stanicama Langerhansovih otočića gušterače, odnosno na razini djelovanja inzulina na ciljna tkiva. Neovisno o etiopatogenezi, nedostatak inzulina rezultira nemogućnošću korištenja glukoze i energetskim iscrpljivanjem stanica, što značajno ujteče na metabolizam cijelog niza organskih sustava.

2.2.1. Etiološka klasifikacija šećerne bolesti

Suvremena klasifikacija šećerne bolesti obuhvaća sljedeće tipove bolesti:

Šećerna bolest tipa 1 je stanje kod kojeg, radi potpune destrukcije β-stanica Langerhansovih otočića gušterače, nema sinteze inzulina te dolazi do njegova apsolutnoga nedostatka**.**

Šećerna bolest tipa 2 predstavlja oko 90% svih oboljelih od šećerne bolesti. U monozigotnih blizanaca nasljeđe tog tipa čini oko 70-90%, a u osoba čija oba roditelja imaju bolest rizik obolijevanja je oko 40%. Četiri elementa koja metabolički determiniraju dijabetes tipa 2 su debljina, inzulinska rezistencija, disfunkcija sekrecije inzulina i jača sinteza endogene glukoze. Inzulinska rezistencija je jedan od najvažnijih elemenata dijabetesa tipa 2, te se definira kao rezistencija na metaboličke efekte inzulina (supresija glukoneogeneze, stimulacija unosa glukoze u stanice, inhibicija lipolize). U početku je reverzibilna, a zatim postaje ireverzibilna.

Ostali tipovi šećerne bolesti su:

Genetski defekti β-stanica

Genetski defekti inzulinskog djelovanja

Bolesti egzokrine gušterače (cistična fibroza, pankreatitis)

Kemijski i lijekovima uzrokovan dijabetes (tijekom liječenja HIV/AIDS-a i nakon transplantacije organa)

Gestacijski dijabetes (GDM) nastaje zbog inzulinske rezistencije i relativnog nedostatka inzulina tijekom trudnoće [54]

2.2.2. Epidemiologija šećerne bolesti

Aktualni podaci Međunarodne federacije za dijabetes svjedoče o 382 milijuna oboljelih od šećerne bolesti uz procjenu o porastu broja oboljelih na 592 milijuna do 2035. godine. Ovisno o populaciji, od 30% do čak 90% slučajeva odnosi se na ne-dijagnosticiranu šećernu bolest tipa 2 u asimptomatskoj fazi, koja, zbog izostanka odgovarajućeg liječenja, predstavlja visoki rizik za razvoj komplikacija i štetnih posljedica kronične hiperglikemije. Procjenjuje se da je 2013. godine u svijetu šećerna bolest izravno prouzročila 5,1 milijun smrti, dok su ukupni troškovi zdravstvene skrbi o oboljelima od šećerne bolesti premašili 500 milijardi dolara (10,8% ukupnih troškova zdravstvene zaštite). S obzirom na to da je glavni razlog metaboličkog sindroma pretilost, s javnozdravstvenog aspekta očekuje se značajan porast broja novodijagnosticiranih slučajeva dijabetesa zbog sjedilačkog načina života [55].

Pankreatični dijabetes, koji nastaje kao posljedica oštećenja gušterače upalnim zbivanjem, obuhvaća manje od 1% osoba s dijabetesom. Blaga hiperglikemija se može pojaviti tijekom akutne upale gušterače u 50% bolesnika, i često se koristi kao marker za procjenu težine bolesti. Dugogodišnje praćenje bolesnika s akutnim pankreatitisom pokazalo je kako ovi bolesnici imaju veću incidenciju abnormalne tolerancije glukoze u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ljudi [56]. Prevalencija abnormalne tolerancije glukoze u bolesnika s kroničnim pankreatitisom je od 60 do 70% [57-60]. Praćenje bolesnika s pankreatitisom pokazalo je tendenciju povećanja učestalosti pankreatičnoga dijabetesa tijekom vremena. Ako je prisutna kalcifikacija gušterače, prevalencija je i još veća od 70%. Trideset i tri posto pacijenata s pankreatitisom i dijabetesom ima kalcifikacije gušterače. Kalcifikacija je češće bila prisutna ako je pankreatitis uzrokovan prokomjernim konzumiranjem alkoholnih pića (više od 100 g/dan) [61].

2.2.3. Biokemijske osnove inzulina

U kontekstu regulacije glikemije najvažniji je endokrini bio gušterače, to jest β - stanice Langerhansovih otočića. Glavna funkcija β-stanica je sinteza, skladištenje i regulacija sinteze inzulina. Vagusna stimulacija inhibira sekreciju otpuštanjem vazoaktivnog intestinalnog peptida, inzulinskog antagonista.

Gušterača odrasle osobe ima oko 8 mg, tj. 200 i.j. inzulina [62]. Sinteza inzulina u stanicama započinje transkripcijom glasničke RNA i translacijom kojom se proizvodi preproinzulin koji je inaktivni protein i prekursor inzulinu. Preproinzulin se sastoji od B-aminoterminalnog lanca, A-karboksiterminalnog lanca i srednjeg dijela koji se naziva C-peptid. Posttranslacijski preproinzulin se modificira u proinzulin [63].

Proinzulin ima oko 5% biološke aktivnosti. Na endoplazmatskom retikulumu niz enzima, koji se nazivaju endopeptidaze, cijepaju proinzulin na dva dijela, pri čemu nastaje konačna molekula inzulina koja se sastoji od A i B lanca, povezana polipeptidnim lancem, tzv. C-peptidom (connecting-peptide). Inzulin i C-peptid pohranjuju se u obliku granula u Golgijevu aparatu gdje se egzocitozom u ekvimolarnom omjeru otpuštaju u kapilarnu mrežu.

Inzulin je mala bjelančevina. Relativna molekularna masa ljudskog inzulina iznosi 5508. Sastoji se od dva lanca aminokiselina, koji su međusobno povezani disulfidnim vezama. Ako se lanci aminokiselina odvoje jedan od drugoga, molekula inzulina gubi svoju funkcionalnost. Inzulin koji se izluči u krv cirkulira gotovo potpuno kao nevezan. Poluvrijeme života u plazmi iznosi samo 6 minuta, pa se zato u potpunosti odstrani iz plazme za 10-15 minuta. Gotovo sav inzulin odstrani se u jetri djelovanjem enzima inzulinaze. Osnovni okidač za lučenje inzulina je glukoza no također i neke aminokiseline i masne kiseline mogu stimulirati sintezu proinzulina.

Djelovanje inzulina na ciljne stanice započinje time što se inzulin najprije veže za receptorsku bjelančevinu u staničnoj membrani. Relativna molekularna masa receptorske bjelančevine je 300.000. Receptor se sastoji od četiri odvojene podjedinice koje se drže na okupu disulfidnim vezama; dvije alfa-podjedinice smještene izvan stanične membrane i dvije beta-podjedinice koje prolaze kroz staničnu membranu. Inzulin se veže na alfa-podjedinice. Inzulinski receptor je primjer receptora povezanoga s enzimima. Vezanjem inzulina autofosforilacija beta-podjedinice aktivira lokalnu tirozin-kinazu koja uzrokuje

fosforilaciju drugih unutarstaničnih enzima. Nekoliko trenutaka nakon što se inzulin veže za receptor, stanične membrane postaju znatno propusnije za glukozu. Nakon ulaska u stanicu glukoza se fosforilira uz pomoć enzima glukokinaze te nije u mogućnosti više izaći iz stanice [64]. Glukokinaza transformira glukozu u glukoza-6-fosfat. Razgradnja glukoze započinje glikolizom pri čemu se glukoza postupno razgrađuje do pirogrožđane kiseline uz stvaranje 2 molekule ATP-a. Reakcija glikolize zbiva se anaerobno. Pirogrožđana kiselina ulazi u ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus. Pirogrožđana kiselina oksidativnom fosforilacijom se pretvara u acetil-koenzim, a acetil-koenzim se povezuje s oksalacetatom u limunsku kiselinu. Krebsovim ciklusom se oslobađa CO_2, nastaje H_2O i ATP [65]. Povećan odnos ATP/ADP uzrokuje zatvaranje ATP-osjetljivih kalijevih kanala i staničnu depolarizaciju, što uzrokuje ulaz kalcijevih iona i oslobađanje granula u kojima je inzulin uskladišten [66].

Proces lučenja inzulina je bifazičan [67]. Prvi dio otpuštanja inzulina ovisan je o količini već sintetiziranog hormona u granulama Golgijeva aparata [68]. Druga faza je dugotrajnija jer je potrebna nova sinteza inzulina. Kada inzulin uđe u portalni krvotok, gotovo pola količine se metabolizira u jetri djelovanjem enzima inzulinaze. Ostali dio inzulina cirkulira i veže se za svoja receptorska mjesta.

Primjer biološke aktivnosti inzulina na ugljikohidrate je aktivacija fosfatidilinozitol-3-kinaze čime se stimulira translokacija glukoznog transportera-4 (GLUT4) na površinu masnih i mišićnih stanica. GLUT4 receptori se nalaze u citoplazmi u obliku vezikula koje se aktiviranjem otvaraju na površini stanice, a ako je razina glukoze u krvi mala, vraćaju se u citoplazmu. U jetri inzulin stimulira enzim heksokinazu i glikogen sintetazu koji proizvodi glikogen [69].

Inzulin također onemogućava aktivnost enzima lipaze koja hidrolizira trigliceride. Inzulin olakšava ulazak aminokiselina u stanice. Fiziološki kontraregulatorni hormoni inzulina su hormon rasta, kortizol, kateholamini, hormoni štitnjače. Niska koncentracija inzulina usporava sintezu glikogena i pokreće mehanizam glukoneogeneze u jetri. Zbog smanjenog ulaska glukoze u stanice, u uvjetima hipoglikemije počinje ketogeneza kako bi se osigurali alternativni izvori energije [70].

2.2.4. Dijagnostički kriteriji šećerne bolesti

Suvremene dijagnostičke smjernice Svjetske zdravstvene organizacije preporučuju postavljanje dijagnoze šećerne bolesti na temelju rezultata jednog od parametara glikemije: glukoze natašte, glukoze nasumično ili hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}), dok se oralni test opterećenja glukozom (oGTT) preporučuje za klasifikaciju disglikemije u asimptomatskih ispitanika kod kojih postoji potreba kliničkog praćenja statusa glikemije [71-73]. Dijagnostički kriteriji prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti

Dijagnoza	Glukoza (mmol/L)*		
	Natašte		Nasumično
Šećerna bolest	≥ 7,0	ili	≥ 11,1
	oGTT (75 g)		
Normoglikemija	< 6,1	i	< 7,8
Poremećena glikemija natašte	6,1 - 7,0	i	< 7,8
Poremećena tolerancija glukoze	< 7,0	i	7,8 – 11,0
Šećerna bolest	≥ 7,0	ili	≥ 11,1
	HbA_{1c} (%)		
Šećerna bolest	≥ 6,5		
Predijabetes	5,6 – 6,4		

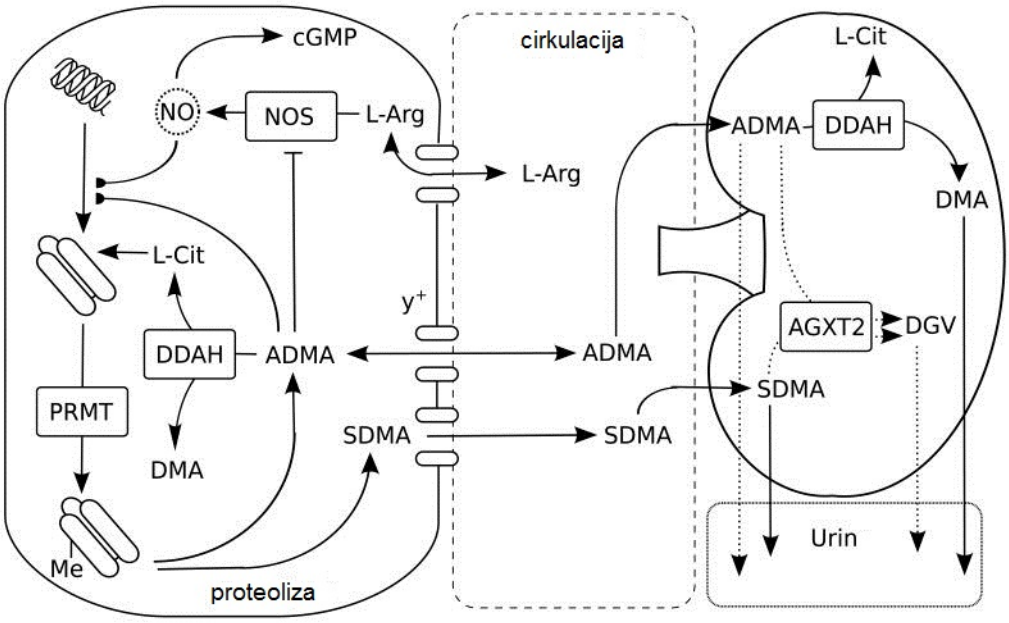
**dva uzastopna testiranja unutar 24 sata uz prisutne kliničke simptome šećerne bolesti*

2.3. Asimetrični-dimetilarginin (ADMA)

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je posttranslacijski modificirana moleukula arginina koji se proizvodi u svim stanicama organizma tijekom uobičajenih procesa sinteze proteina. Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako je ADMA biljeg endotelne disfunkcije i nezavisni čimbenik kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta [74,75]. Najvjerojatniji mehanizam kojim ADMA ostvaruje negativan učinak na kardiovaskularni sustav je kompetetivna inhibicija NOS, iako NO-nezavisni mehanizmi ne mogu biti isključeni [76]. Dušični oksid (NO) sintetizira se u endotelnim stanicama iz L-arginina djelovanjem NO-sintetaze (NOS). Endotelni NO je vazoprotektivan, pojačava preživljavanje i proliferaciju endotelnih stanica inhibirajući proliferaciju stanica glatke muskulature i sprečavajući adheziju trombocita i upalnih stanica na stijenku krvne žile. Samo slobodni ADMA, a ne vezani ADMA za proteine, u mogućnosti je blokirati NO-sintetazu [77]. Kako je NO-sintetaza intracelularni enzim, samo intracelularni ADMA može blokirati NO-sintetazu. ADMA se formira procesima metilacije argininskih ostataka proteina, nakon čega slijedi proteoliza i oslobađanje. Dva stanična puta su odgovorna za odstranjenje ADMA iz stanice. Prvi je enzimska degradacija ADMA djelovanjem dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (DDAH), enzima koji cijepa ADMA u citrulin i dimetilamin [78,79]. Drugi odvodi ADMA iz stanice pomoću kationskog transportera aminokiselina (CAT) koji se nalazi u staničnoj membrani [80]. Odstranjivanje iz plazme obavlja se renalnom sekrecijom. U stanjima kada se velika količina ADMA stvara u određenom organu i nakon što ADMA uđe u krvožilni sustav, postoji i značajna mogućnost oštećenja drugih organa.

Metilacija lizina, histidina i arginina je poseban oblik posttranslacijske modifikacije kojim stanice šire funkcionalni repertoar svojih proteina. Terminalna gvanidino grupa arginina može se dimetilirati djelovanjem enzima protein-arginin-N-metiltransferaze (PRMT). Postoje dvije klase PRMT-a [81]. Tip I katalizira sintezu ADMA, dok tip II katalizira sintezu simetričnog dimetilarginina – SDMA (Slika 2). Oba tipa PRMT-a koriste *S*-adenozilmetionin (SAM), koji se sintetizira iz metionina i ATP-a, kao donora metilne grupe. Nakon transfera metilne grupe, SAM se konvertira u *S*-adenozilhomocistein, a zatim u homocistein. Pozitivna korelacija između visokih

koncentracija ADMA i homocisteina je ustanovljena u kliničkim istraživanjima kardiovaskularnog sustava [82,83].



Slika 2. Sinteza, distribucija, metabolizam i fiziologija endogenih metilarginina. Za razliku od SDMA, ADMA može blokirati sve tri izoforme NOS. Hidrolizom ADMA-e djelovanjem DDAH nastaje dimetilamin (DMA) i L-citrulin (L-Cit). DDAH ne djeluje na SDMA koji se izlučuje nepromijenjen putem urina Preuzeto i modificirano od Caplin B, Leiper J. Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitors in the Biology of Disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2012; 32: 1343-1353.

SDMA- simetrični dimetilarginin; DDAH- dimetilarginin dimetilaminohidrolaza; PRM- protein-arginin-N-metiltransferaza; L-Arg-L-arginin; AGXT2-Alanin-glioksalat-aminotransferaza2; DMG-dimetilguanido-valerat; DMA-dimetilamin.

Također, ustanovljena je i veza između povišenih razina autoantitijela, poput one kakva je prisutna u određenim kliničkim stanjima kao što je sistemski eritematozni lupus (SLE) i metilacije proteina. SLE je sistemska bolest karakterizirana prisutnošću autoantitijela, od kojih mnoga prepoznaju antigene stanične jezgre. Najznačajniji antigeni su dvolančana DNA i neki ribonukleoproteini. Postoji mogućnost kako pretjerana

proizvodnja ADMA tijekom nekih autoimunoloških oboljenja, poput SLE i reumatoidnog artritisa, igra značajnu ulogu u patologiji i napredovanju tih oboljenja.
Proteoliza metiliranih proteina je proces koji dovodi do oslobađanja slobodnog ADMA, koji za razliku od ADMA vezanog za proteine kompetitivno inhibira NOS.
Intracelularno smještena ADMA se metabolizira do citrulina i dimetilamina djelovanjem DDAH. Vrlo malen dio ADMA odstranjuje se urinarnom sekrecijom, dok više od 80% se odstranjuje djelovanjem DDAH. Oštećenje funkcije DDAH uzrokuje značajno povećanje koncentracije ADMA, što uzrokuje smanjeno stvaranje NO i ubrzanje procesa ateroskleroze [77,84]. DDAH je enzim koji je vrlo osjetljiv na oksidativni stres zbog toga što aktivno mjesto enzima sadrži sulfhidrilnu skupinu. Patološki čimbenici koji dovode do oksidativnog oštećenja endotelnih stanica, poput proupalnih citokina, hiperhomocisteinemije, hiperglikemije, infektivnih čimbenika i oksidiziranog LDL-a mogu uzrokovati oštećenje funkcije DDAH i patološkog nakupljanja ADMA. ADMA zatim blokira stvaranje NO što ponovno uzrokuje endotelnu disfunkciju. Stoga DDAH-ADMA-NOS sudjeluje u pozitivnoj povratnoj sprezi oštećenja organskih sustava [85,86].

2.4. 8-hidroksi-deoksigvanozin (8-OHdG)

U živim stanicama reaktivni kisikovi radikali (*eng.* reactive oxygen species; ROS) poput superoksidnog aniona, vodikova peroksida i hidroksilnog radikala se neprestano stvaraju kao nusprodukt normalnog staničnog metabolizma. Primarno mjesto sinteze ROS su mitohondriji. U normalnim fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala. Kada se naruši ravnoteža, u smjeru stvaranja radikala, stanice ulaze u stanje oksidativnog stresa. Tijekom oksidativnog stresa, povećene koncentracije ROS-a, uzrokuju oksidativno oštećenje lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Posljednjih godina mnoštvo je markera korišteno kao indikator oksidativnog statusa organizma. Određivanje nove karbonilne grupe, ditirozina i oksidiranog histidina koristilo se kao indikator oksidativnog oštećenja proteina [87-89]. U zadnje vrijeme, kao vrlo dobar indikator oksidativnog oštećenja, često se koristi određivanje urinarne koncentracije 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG) zbog jednostavnosti i neinvazivnosti. Mnoštvo studija je pokazalo kako je oksidativno oštećenje DNA prisutno kod mnoštva degenerativnih procesa poput karcinoma, bolesti koronarnih arterija i dijabetesa. Kvantifikacija urinarnog 8-OHdG kao specifičnog produkta oštećenja i popravka DNA molekule se može uraditi jednostavnim ELISA testom.

Nuklearna i mitohondrijska DNA molekula iz tkiva i limfocita je najčešće pogođena oksidativnim oštećenjem. Među purinskim i pirimidinskim bazama, gvanin je najskloniji oksidaciji. Tijekom oksidacije gvanina, hidroksilna grupa se veže na 8. poziciju molekule gvanina pri čemu nastaje 8-OHdG. Budući da oksidirana molekula DNA prolazi proces popravka i budući da su ti produkti popravka topljivi u vodi, oni će u potpunosti nemetabolizirani biti izlučeni urinom. Weimman i sur. su izračunali kako je ukupna urinarna ekskrecija 8-OHdG tijekom 24 sata 212 nmol i da količina izlučenog 8-OHdG predstavlja prosječno oksidativno oštećenje i popravak DNA na razini cjelokupnog organizma [90].

Nedavna istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju između povišene urinarne koncentracije 8-OHdG i karcinogeneze. Hidroksilacija gvanina dovodi do pogrešnog spajanja baza i mutageneze. Povećane koncentracije 8-OHdG opažene su kod nekih tumora, poput mioma i karcinoma dojke [91]. Također reaktivni kisikovi i dušikovi

radikali (peroksinitrit) se neprekidno stvaraju tijekom aterosklerotskog oštećenja krvnih žila, a stanice odgovorne za njihovu prekomjernu proizvodnju su u prvom redu makrofazi.

8-OHdG i šećerna bolest

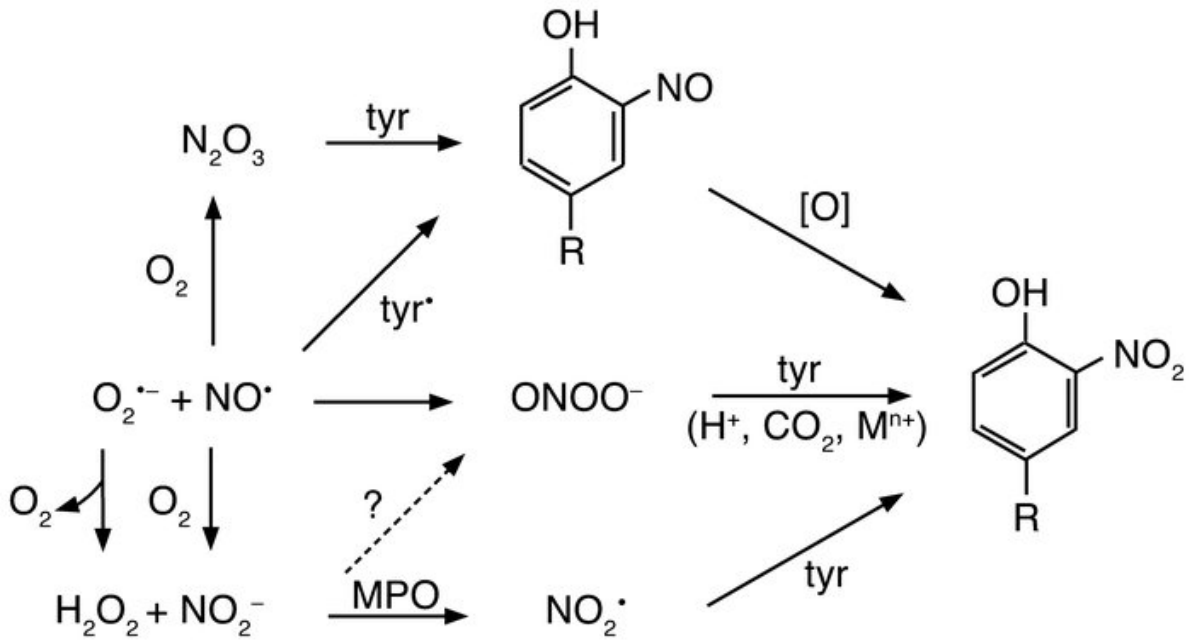
Posljednjih nekoliko godina pretkliničke i kliničke studije naglašavaju kako slobodni kisikovi radikali imaju vrlo važnu ulogu u patogenezi i komplikacijama šećerne bolesti tipa 1 i 2.

Povećane koncentracije slobodnih kisikovih radikala su pronađene u serumu oboljelih od šećerne bolesti, pogotovo kod pacijenata koji su imali lošu kontrolu glikemije. Pacijenti sa šećernom bolešću tipa 2 su imali statistički značajno veće koncentracije 8-OHdG u serumu od kontrolne skupine ispitanika. HbA_{1c} je pozitivno korelirao sa serumskim razinama 8-OHdG. Slobodni kisikovi radikali uzrokuje oštećenje endotela i ubrzano stvaranje NO što dodatno potiče process aterogeneze kod ovih bolesnika. Povećane koncentracije 8-OHdG su također ustanovljene kod bolesnika s mikrovaskularnim komplikacijama šećerne bolesti poput nefropatije i retinopatije [3].

2.5. Nitrotirozin

Nitrotirozin je produkt nitracije tirozina djelovanjem reaktivnih dušikovih spojeva poput peroksinitrita (ONOO-) i dušikova dioksida. Peroksinitrit je vrlo snažan oksidans i citotoksični agens koji se formira ograničenom reakcijom između dušičnog oksida (NO) i superoksidnog aniona ($O_2^{-\cdot}$) (Slika 3). Peroksinitrit može uzrokovati značajno oštećenje DNA molekule, staničnih membrana i lipida te uzrokovati modifikaciju strukturnih i funkcionalnih proteina nitracijom metioninskih, triptofanskih i cistinskih ostataka. Najznačajnije reaktivno svojstvo peroksinitrita jest sposobnost nitracije slobodnog tirozina i tirozinskih ostataka unutar polipeptida [92]. Komercijalno dostupna protutijela usmjerena protiv nitrotirozina su omogućila detekciju nitracijskih produkata tirozina u tkivima i plazmi tijekom raznolikih patoloških stanja praćenih oksidativnim stresom i stresom uzrokovanim djelovanjem reaktivnih dušikovih spojeva [93]. Iako peroksinitrit nije jedini reaktivni spoj dušika in vivo, smatra se kako je sinteza nitrotirozina prije svega posljedica povišenih koncentracija peroksinitrita [94]. Istraživanja su pokazala kako su koncentracije peroksinitrita značajno povećane u određenim kliničkim stanjima poput

demencije, Parkinsonove bolesti i dijabetesa. Ceriello A. i sur. su mjerili koncentraciju nitrotirozina, kao indirektnog parametra povećanih koncentracija peroksinitrita, u plazmi oboljelih od dijabetesa tipa 2. Istraživanje je pokazalo kako su koncentracije nitrotirozina u plazmi oboljelih bile značajno povećane, dok je nitrotirozin u plazmi kontrolne skupine ispitanika bio nemjerljiv. Ista skupina je pokazala kako akutna hiperglikemija uzrokuje apoptozu stanica miokarda djelovanjem peroksinitrita, te kako antioksidansi i blokatori proizvodnje NO-a imaju zaštitni učinak na srce [5]. Povećane koncentracije nitrotirozina također su prisutne u reumatoidnom artritisu, septičnom šoku i celijakiji. U svim ovim istraživanjima nitrotirozin nije bio mjerljiv u kontrolnoj skupini ispitanika.



Slika 3. Stvaranje nitrotirozina djelovanjem peroksinitrita na tirozinske ostatke proteina. Alternativni put uključuje djelovanje enzima mijeloperoksidaze (tyr=tirozin; tyr· = tirozil-radikal; modificirano prema Ref.93)

2.6. Fruktozamin

Fruktozamini su, u općenitom smislu, spojevi koji nastaju kao posljedica reakcije glikacije između šećera (poput fruktoze i glukoze) i primarnoga amina nakon čega slijedi reakcija izomerizacije putem tzv. Amadorijeve pregradnje.

Slično kao što HbA_{1c} nastaje kao glikacijom hemoglobina, fruktozamin u plazmi nastaje kao posljedica glikacije cirkulirajućih proteina. Budući da je albumin najzastupljeniji protein u plazmi, fruktozamin reflektira glikaciju albumina. Poluvrijeme života serumskog albumina je 20 dana, stoga koncentracija fruktozamina reflektira prosječnu koncentraciju glukoze u plazmi tijekom jednog kraćeg razdoblja (7-14 dana), dok HbA_{1c} reflektira prosječnu koncentraciju glukoze u krvi tijekom zadnja 2-3 mjeseca [95].

3. ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

U ovu opservacijsku studiju uključeno je 80 ispitanika starijih od 18 godina, muškog spola, s po 40 ispitanika u skupini oboljelih od akutnog pankreatitisa (u daljnjem tekstu „skupina oboljelih“) i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (u daljnjem tekstu „kontrolna skupina“)

Uvjeti za uključivanje *ispitanika oboljelih od pankreatitisa* u studiju su:

- Anamnestički podaci o abdominalnoj boli, febrilitetu, mučnini ili povraćanju na dan prijama u bolnicu.
- Vrijednosti amilaze u serumu > 91 U/L (referentni interval 23-91 U/L).
- Vrijednosti amilaze u mokraći >400 U/L (referentni interval <400 U/L).
- Vrijednosti lipaze u serumu >160 U/L (referentni interval 0-160 U/L).

Uvjeti za isključivanje *ispitanika oboljelih od pankreatitisa* u studiju su:

- Prethodna dijagnoza šećerne bolesti ili poremećene tolerancije glukoze.
- Neregulirana hipertenzija.
- Značajna anemija, popuštanje srca po NYHA klasifikaciji III ili IV, koji su na terapiji citostaticima ili u anamnezi imaju preboljelu zloćudnu bolest.
- Znakovi jetrene lezije, akutni ili kronični hepatitis, bubrežno zatajenje (kreatinin veći od 132 μmol/L).
- Nemogućnost shvaćanja naravi istraživanja.

Uvjeti za isključivanje kontrolnih ispitanika iz studije su:

- Prethodna dijagnoza šećerne bolesti ili poremećene tolerancije glukoze (provjereno testom oralnog opterećenja sa 75g glukoze).
- Vrijednosti HbA1c ≥ 5.7%.
- Neregulirana hipertenzija.
- Značajna anemija, popuštanje srca po NYHA klasifikaciji III ili IV, koji su na terapiji citostaticima ili u anamnezi imaju preboljelu zloćudnu bolest.
- Znakovi jetrene lezije, akutni ili kronični hepatitis, bubrežno zatajenje (kreatinin veći od 132 umol/L).
- Nemogućnost shvaćanja naravi istraživanja.

3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA

Svim ispitanicima će se uzeti demografski podaci i antropološki parametri:

- Dob u godinama (g), tjelesna težina u kilogramima; TT (kg), tjelesna visina u centimetrima; TV (cm), indeks tjelesne mase; ITM (kg/m^2), opseg struka u centimetrima; OS (cm), opseg bokova u centimetrima; OB (cm), vrijednosti sistoličkoga tlaka; RR_S (mmHg), vrijednosti dijastoličkoga tlaka; RR_D (mmHg).
- Svim ispitanicima će se izračunati i indeks inzulinske rezistencije HOMA-IR pomoću formule (GUP-natašte x INZ-natašte/22.5).

Svi parametri kontrolirat će se u prvih 24 sata nakon prijama u bolnicu, nakon 48 sati od prijama u bolnicu i nakon 10 dana od prijama u bolnicu.

Prvo uzorkovanje (kontrolna skupina i skupina oboljelih):

- Biokemijski parametri koji će se odrediti analizom krvnog uzorka u prvih 24 sata: glukoza u plazmi-natašte; GUP (mmol/L), inzulin-natašte; INZ (pmol/L), indeks inzulinske rezistencije HOMA-IR, C-peptid natašte (nmol/L), fruktozamin, korigiran prema koncentraciji serumskih proteina; FRUKT (μmol/g), HbA_{1c} (%), asimetrični dimetilarginin; ADMA (μmol/L), nitrotirozin; NT (nM).
- Analizom uzorka urina odredit će se u prvih 24 sata: 8-hidroksideoksigvanozin; 8-OHdG, normaliziran na koncentraciju kreatinina u istom uzorku urina (μg/mmol).

Drugo uzorkovanje (skupina oboljelih):

- Biokemijski parametri koji će se odrediti analizom krvnog uzorka nakon 48 sati: glukoza u plazmi-natašte; GUP (mmol/L), inzulin-natašte; INZ (pmol/L), indeks inzulinske rezistencije HOMA-IR, C-peptid natašte (nmol/L), fruktozamin, korigiran prema koncentraciji serumskih proteina; FRUKT (μmol/g), asimetrični dimetilarginin; ADMA (μmol/L), nitrotirozin; NT (nM).
- Analizom uzorka urina odredit će se nakon 48 sati: 8-hidroksideoksigvanozin; 8-OHdG, normaliziran na koncentraciju kreatinina u istom uzorku urina (μg/mmol).

Treće uzorkovanje (skupina oboljelih):

- Biokemijski parametri koji će se odrediti analizom krvnog uzorka nakon 10 dana: glukoza u plazmi-natašte; GUP (mmol/L), inzulin-natašte; INZ (pmol/L), indeks inzulinske rezistencije HOMA-IR, C-peptid natašte (nmol/L), fruktozamin, korigiran prema koncentraciji serumskih proteina; FRUKT (μmol/g), HbA_{1c} (%), asimetrični dimetilarginin; ADMA (μmol/L), nitrotirozin; NT (nM).
- Analizom uzorka urina odredit će se nakon 10 dana: 8-hidroksideoksigvanozin; 8-OHdG, normaliziran na koncentraciju kreatinina u istom uzorku urina (μg/mmol).

Četvrto uzorkovanje (skupina oboljelih -OGTT):

- Testom oralnog opterećenja sa 75 g glukoze (OGTT) ispitat će se postojanje oštećene tolerancije glukoze ili šećerne bolesti nakon 4 tjedna od početka akutne upale gušterače u skupini oboljelih. Klasifikacija glikemije odredit će se sukladno kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (v. Tablica 1).

3.3. METODE

3.3.1. Laboratorijske analize

Rutinske laboratorijske analize učinjene su tijekom kliničke obrade oboljelih u Centralnom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Split, a specifični biokemijski biljezi (ADMA, NT, 8-OH-dG i fruktozamin) u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice „Merkur“ u Zagrebu.

Hematološke pretrage krvi uključuju analizu broja leukocita (L), eritrocita (E), hemoglobina (Hgb), hematokrita (Htc). Biokemijske pretrage uključuju analizu koncentracije natrija (Na), kalija (K), kalcija (Ca), glukoze (GUP), inzulina (Inz), C-peptida, C-reaktivnog proteina (CRP), ukupnog i konjugiranog bilirubina, laktat dehidrogenaze (LDH), aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), gama glutamil transpeptidaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), amilaze i lipaze rutinskim laboratorijskim postupcima, te izračun indeksa inzulinske rezistencije HOMA-IR prema formuli: GUP-nataštex Inzulin-natašte/22,5.

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) u serumu je određivan kompetitivnom enzim-imunokemijskom analizom s deklariranim očekivanim vrijednostima u rasponu 0,40-0,75 μmol/L i osjetljivošću 0,05 μmol/L. Reakcija se odvija na mikrotitarskoj pločici, čije jažice su impregnirane molekulama ADMA. Acilirana ADMA iz uzorka seruma natječe se s molekulama ADMA vezanim za jažice za fiksnu količinu zečjih anti-ADMA antitijela iz reagensa. Nakon završetka reakcije antigen-antitijelo, višak slobodnog antigena i antitijela uklanja se iz jažica ispiranjem, a ostatak antitijela, čvrsto vezan za molekule ADMA fiksirane na jažicama detektira se pomoću sekundarnog anti-zečjeg IgG-antitijela obilježenog peroksidazom. Dodatkom kromogenog substrata (TMB-3,3□,5,5□-tetrametilbenzidin) razvija se boja, čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski (450 nm), a obrnuto je razmjeran koncentraciji ADMA u uzorku seruma. Koncentracija se očitava iz ne-linearne kalibracijske krivulje u 6 točaka (standardi ADMA: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 i 5,0 μmol/L), koja se radi sa svakom analitičkom serijom, kao i kontrola kvalitete u dvije koncentracijske razine za koju se koriste komercijalni kontrolni materijali (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Njemačka). Uzorci seruma bili su odvojeni od staničnog dijela krvi centrifugiranjem (15 min, 3000 o/min) te pohranjeni u ledenici do mjerenja ADMA (-20°C, 30-60 dana), u skladu sa specifikacijom proizvođača.

Optička gustoća očitana je na spektrofotometru StatFax1200 (Awareness Technology, SAD).

Nitrotirozin (NT) u serumu je određivan kompetitivnom enzim-imunokemijskom analizom s deklariranim mjernim rasponom 1,95 nmol/L – 8,0 μmol/L (OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit, CellBiolabs Inc, SAD). Metoda je namijenjena mjerenju koncentracije nitrotirozina u uzorcima biološkog materijala koji sadrže proteine (stanični lizat, pročišćeni proteini, serum, plazma). Analitički protokol sastoji se od dodatka uzoraka biološkog materijala u jažice mikrotitarske pločice presvučene nitriranim govođim albuminom. Nakon kratkotrajne inkubacije doda se nitrotirozinsko zečje poliklonsko antitijelo, a nakon ispiranja nevezanih komponenti sekundarno antitijelo obilježeno peroksidazom. Oksidacijom kromogenog substrata djelovanjem peroksidaze iz vezanog sekundarnog antitijela razvija se boja, čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski (450 nm), a obrnuto je razmjeran koncentraciji NT u uzorku. Koncentracija se očitava iz ne-linearne kalibracijske krivulje u 6 točaka (standardi NT: 1,95; 7,81; 31,25; 125; 500 i 2000 nmol/L), koja se radi sa svakom analitičkom serijom, kao i kontrola kvalitete u dvije koncentracijske razine za koju se koriste komercijalni kontrolni materijali (CellBiolabs Inc, SAD). Uzorci seruma bili su odvojeni od staničnog dijela krvi centrifugiranjem (15 min, 3000 o/min) te pohranjeni u ledenici do mjerenja NT (-20°C, 30-60 dana), u skladu sa specifikacijom proizvođača. Optička gustoća očitana je na spektrofotometru StatFax1200 (Awareness Technology, SAD). Prema nedavno objavljenim literaturnim podacima, očekivana koncentracija NT u serumu kreće se u rasponu od 1,95 do 16,0 nmol/L [96].

Fruktozamin u serumu je određivan automatiziranom kolorimetrijskom metodom s nitro-blue-tertrazoliumom - NBT (Integra 400-Plus, Roche Diagnostics, SAD). Metoda se temelji na reducirajućim svojstvima fruktozamina u alkalnim uvjetima, pri kojima dolazi do proporcionalne redukcije NBT-a, što se prati promjenom absorbancije na 530 nm. S obzirom na disproteinemiju koja prati akutni pankreatitis, rezultati su normalizirani na koncentraciju ukupnih serumskih proteina pomoću formule:

Fruktozamin-korigirani (μmol/g proteina) = fruktozamin (μmol/L) x 72/ serumski proteini (g/L).

8-OHdG, oksidativni produkt DNA, je mjeren u urinu kompetitivnom enzim-imunokemijskom analizom s deklariranim mjernim rasponom 0,5 - 200 μg/L (JaICA-Japan Institute for the Control of Ageing, Niken, Japan). Metoda je namijenjena mjerenju koncentracije 8-OHdG u uzorcima urina, a dostupna je i modifikacija za mjerenje 8-OHdG u uzorcima seruma/plazme. Analitički protokol sastoji se od dodatka uzoraka urina u jažice mikrotitarske pločice presvučene molekulama 8-OHdG. Nakon kratkotrajne inkubacije doda se primarno anti-8-OhdG poliklonsko antitijelo, a nakon ispiranja nevezanih komponenti sekundarno anti-mišje antitijelo obilježeno peroksidazom. Oksidacijom kromogenog substrata (TMB- 3,3□,5,5□-tetrametilbenzidin) djelovanjem peroksidaze iz vezanog sekundarnog antitijela razvija se boja, čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski (450 nm), a obrnuto je razmjeran koncentraciji 8-OhdG u uzorku. Koncentracija se očitava iz ne-linearne kalibracijske krivulje u 6 točaka (standardi 8-OHdG: 0,5; 2,0; 8,0; 20,0; 80,0 i 200 μg/L), koja se radi sa svakom analitičkom serijom, kao i kontrola kvalitete u dvije koncentracijske razine za koju se koriste komercijalni kontrolni materijali (JaICA-Japan Institute for the Control of Ageing, Niken, Japan). Uzorci urina bili su pohranjeni u ledenici do mjerenja 8-OHdG (-20°C, 30-60 dana). Nakon otapanja, uzorci su bili promućkani na mućkalici (vortex), centrifugirani (10 min, 3000 o/min) i bistri supernatans korišten za analizu, sukladno specifikaciji proizvođača. Optička gustoća očitana je na spektrofotometru StatFax1200 (Awareness Technology, SAD). Rezultati su normalizirani na koncentraciju kreatinina u istom uzorku urina pomoću formule:

8-OHdG/kreatinin (μg/mmol) = 8-OHdG (μg/L) / kreatinin u urinu (mmol/L)

Prema nedavno objavljenim literaturnim podacima, očekivana koncentracija 8-OHdG u urinu kreće se u rasponu 1.06 ± 0.83 μg/mmol [97].

3.3.2. Statistička analiza

Svi podaci su uneseni u tablicu načinjenu u programu Microsoft Excel. Kontinuirane varijable su prikazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SV±SD). Kolmogorov-Smirnovljev test je korišten za testiranje distribucije podataka. χ^2 testom je ispitana razlika među grupama. Usporedba između kontrolne skupine i skupine oboljelih za prvo mjerenje je analizirana Studentovim t-testom za normalno distribuirane podatke, a Mann Whitney U-testom za neparametrijske podatke. Pearsonovim testom korelacije određena je povezanost između kontinuiranih varijabli. Razlika u varijablama unutar skupine oboljelih za prvo, drugo i treće mjerenje testirano je analizom varijance (ANOVA) s odgovarajućim *post-hoc* testom. U svim analizama vrijednost $P<0.05$ smatra se statistički značajnom. Rezultati su prikazani u tablicama i slikama. Cjelokupna statistička obrada napravljena je pomoću SPSS statističkog paketa za Windows, verzija 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.3.3. Etička načela

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Sva ispitivanja su provedena prema smjernicama koje omogućuju pravilno provođenje ispitivanja i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom ispitivanju-uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju te Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske. Obavijest za ispitanike i pisana suglasnost učinjene su u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i zakonom o zaštiti prava pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

4. REZULTATI

4.1. Demografske, antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika

Kontrolnu skupinu i skupinu oboljelih čini po 40 ispitanika muškog spola. Svi ispitanici su stariji od 18 godina.

Ustanovljena je statistički značajna razlika između dvije ispitivane skupine za opseg struka (OS); (t=2,21; *P*=0,03) i vrijednost sistoličkog arterijskog tlaka (RR_S); (t=2.05; *P*=0,045), dok za ostale parametre: srednja dob; (t=0,315; *P*=0,775), indeks tjelesne mase (ITM); (t=0,790; *P*=0,432), opseg bokova (OB); (t=1,21; *P*=0,228) i vrijednost dijastoličkog arterijskog tlaka (RR_D); (t=1,21; *P*=0,554) nije bilo razlika (t-test, Tablica 2).

Tablica 2. Demografske i antropometrijske karakteristike ispitanika u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih prvog dana hospitalizacije.

	Skupina		
	Kontrola (SV±SD)	**Oboljeli (SV±SD)**	***P***
Dob (g)	61,33±2,53	60,07±3,11	0,755
ITM (kg/m^2)	27,3±3,9	26±4,9	0,432
OS (cm)	90±18	98±16	**0,030**
OB (cm)	97,4±3,9	102,6±13	0,228
RR_S (mmHg)	125±9	130±15,6	**0,045**
RR_D (mmHg)	82±8	82,2±8	0,554

t-test

Od 40 ispitanika u skupini oboljelih, samo jedan ispitanik razvio je znakove lokalnih komplikacija u vidu pankreasne nekroze, dok je kod ostalih klinički tijek bolesti ukazivao na blagi oblik akutnog pankreatitisa prema revidiranim Atlanta kriterijima [114].

Uz stalnu kontrolu arterijskog tlaka zbog opasnosti od hipotenzije, pacijenti su bili tretirani nadoknadom tekućine u prva 24 sata uz praćenje acidobaznog statusa. Sporadično su, u epizodama jačih bolova, bili primjenjivani analgetici s centralnim djelovanjem (tramadol, pentazocin). Redukcija egzokrine sekrecije gušterače, eliminacijom podražaja za izlučivanje pankreasnog soka, postignuta je aplikacijom nazogastrične sonde. Tijekom prvih 48 sati bolesnici nisu primali ništa na usta.

4.2. Biokemijski i upalni pokazatelji akutnog pankreatitisa

Akutni pankreatitis karakterizira porast jetrenih i gušteračnih enzima te sustavna upalna reakcija organizma. Vrijednosti laktat dehidrogenaze (LDH), aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferase (ALT) su rutinski biokemijski pokazatelji hepatocelularne nekroze. Potvrđena je statistički značajna razlika između dvije ispitivane skupine za sva tri pokazatelja (Tablica 3). Aritmetička sredina vrijednosti LDH je za 150 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=3,469; *P*=0,0017), aritmetička sredina vrijednosti AST je za 190,1 U/L (t=3,477; *P*=0,0017), dok je aritmetička sredina vrijednosti ALT za 264,53 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=3,253; *P*=0,003).

Tablica 3. Pokazatelji hepatocelularne nekroze i kolestaze, gušteračnih enzima i upalnih biljega u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih prvog dana hospitalizacije.

	Skupina		
	Kontrola (SV±SD)	**Oboljeli (SV±SD)**	***P***
LDH (U/L)	147±10	297±41,8	**0,0017**
AST (U/L)	15,8±1,7	205,9±54,6	**0,0017**
ALT (U/L)	16,47±2,24	281±81,3	**0,003**
ALP (U/L)	88,2±6	168,5±34,97	**0,024**
GGT (U/L)	24,13±1,8	391,3±80,03	**<0,001**
Amilaza (U/L)	39,73±4,16	1175±280	**<0,001**
Lipaza (U/L)	20,73±4,29	2342±600	**<0,001**
L ($x10^9$)	6±0,51	13,3±1,14	**<0,001**
CRP (mg/dl)	2,7±0,65	50,27±15,2	**0,041**

t-test

Vrijednosti alkalne fosfataze (ALP) i gama glutamil transpeptidaze (GGT) se koriste kao biokemijski pokazatelji kolestaze, te je t-testom potvrđena statistički značajna razlika između dvije ispitivane skupine za oba pokazatelja. Aritmetička sredina

vrijednosti ALP je za 80,2 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=2,427; *P*=0,024), dok je aritmetička sredina vrijednosti GGT za 367,17 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=4,587; *P*<0,001).

Kao vrlo osjetljivi i specifični biokemijski pokazatelji destrukcije tkiva gušterače i definitivne dijagnoze pankreatitisa, vrijednosti amilaze i lipaze u serumu se svakodnevno rutinski koriste. I u ovom istraživanju potvrđena je statistički značajna razlika između dvije ispitivane skupine (t-test, Tablica 3). Aritmetička sredina vrijednosti aktivnosti amilaze je za 1135,27 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=4,05; *P*<0,001), dok je, isto tako, aritmetička sredina vrijednosti lipaze za 2321,27 U/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=3,874; *P*<0,001).

Akutna upala gušterače praćena je sustavnom upalnom reakcijom organizma. Srednja vrijednost broja leukocita je za $7{,}3x10^9$/L veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=5,835; *P*<0,001), dok je srednja vrijednost CRP-a za 47,57 veća u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika (t=3,12; *P*=0,041, t-test, Tablica 3).

4.3. Hormonsko-biokemijski pokazatelji važni za metabolizam ugljikohidrata

Akutni pankreatitis uzrokuje poremećaj regulacije glikemije. Usporedili smo najvažnije hormonsko-biokemijske pokazatelje regulacije glikemije u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih u tri navrata: prvo mjerenje je učinjeno unutar 24 sata (P1), drugo nakon 48 sati (P2) i treće 10. dana od prijema u bolnicu (P3). U odnosu na kontrolnu skupinu, u skupini oboljelih ustanovljene su statistički značajne razlike za vrijednosti glukoze u plazmi (GUP) i fruktozamina u sva tri mjerenja te C-peptida samo u trećem mjerenju (Tablica 4). Medijan koncentracije glukoze bio je za 1,2 mmol/L, 1,7 mmol/L i 1,7 mmol/L viši u odnosu na kontrolu u P1, P2 i P3 mjerenju (P<0,001 u svim mjerenjima; Mann-Whitney U-test). Medijan koncentracije fruktozamina bio je za 33 μmol/g, 24 μmol/g i 15 μmol/g viši u odnosu na kontrolu u P1, P2 i P3 mjerenju (P<0,001 za P1 i P2; P=0,017 za P3;Mann-Whitney U-test). Nismo utvrdili statistički značajnu razliku vrijednosti inzulina (P=0,085; 0,171; 0,137) te HbA1c (P=0,093; - ; 0,154) niti u jednom mjerenju, dok su vrijednosti C-peptida bile u trećem mjerenju više u odnosu na kontrolu

za 0,19 nmol/L (P=0,001). Vrijednosti HOMA-IR statistički su se značajno razlikovale samo u trećem mjerenju u usporedbi s kontrolnim vrijednostima (P=0,0014).

Tablica 4. Vrijednosti pokazatelja glukoregulacije i endokrine funkcije gušterače: glukoza (GUP), fruktozamin (FRUKT), HbA_{1c}, inzulin, C-peptid i HOMA-IR u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja (P1=unutar 24 sata, P2= nakon 48 sati i P3=10. dan hospitalizacije).

	Skupina			
	Kontrola	**Oboljeli**		
		P1	**P2**	**P3**
GUP (mmol/L)	4,6 (2,9-5,9)	**5,8* (3,7-15,8)**	**6,3* (4,1-26,3)**	**6,3* (4,5-23,6)**
INZ (pmol/L)	71 (19,6-239,3)	47,5 (4,7-305)	41,9 (2,2-435)	85 (6,5-587)
C-peptid (nmol/L)	0,82 (0,4-1,93)	0,59 (0,01-3,83)	0,81 (0,21-3,81)	**1,1** (0,22-4,06)**
FRUKT (µmol/g)	221 (199-298)	**254* (185-401)**	**245* (178-490)**	**236*** (189-419)**
HbA_{1c} (%)	5,1 (4,7-5,3)	5,3 (4,9-5,6)	-	5,65 (4,7-5,7)
HOMA-IR (1/1)	1,30 (0,38-2,92)	1,17 (0,36-5,99)	1,20 (0,38-7,52)	**1,69**** (0,43-27,80)

Medijan (min-max), Mann-Whitney U-test: *P<0,001; **P=0,001; ***P=0,017; ****P=0,0014 *vs.* kontrola

Statistička analiza hormonsko-biokemijskih pokazatelja regulacije glikemije u skupini oboljelih kroz vrijeme razotkrila je značajnu dinamiku promjena u koncentracijama inzulina, C-peptida i fruktozamina, pri čemu su koncentracije inzulina i C-peptida rasle, a koncentracije fruktozamina padale tijekom oporavka od akutnog pankreatitisa, dok se vrijednosti glukoze u plazmi nisu značajno mijenjale (Tablica 5, Slika 4 i 5). Nije dokazana statistički značajna razlika vrijednosti glukoze u plazmi (GUP) u promatranom razdoblju (χ^2=0,525; *P*=0,769). Značajna dinamika inzulina kroz

vrijeme (χ^2=10,2; P=0,006) posljedica je značajnog porasta koncentracije na 10. dan hospitalizacije, u odnosu na početne i kontrolne vrijednosti nakon 48 sati (Z=2,8, *P*=0,005 i Z=3, *P*=0,002). Vrijednost inzulina nakon 48 sati se nije statistički značajno razlikovala od vrijednosti mjerene pri prijemu (Z=0,339, *P*=0,734).

Tablica 5. Vrijednosti pokazatelja glukoregulacije i endokrine funkcije gušterače: glukoza (GUP), fruktozamin (FRUKT), HbA_{1c}, inzulin, C-peptid i HOMA-IR u skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja (P1=unutar 24 sata, P2= nakon 48 sati i P3=10. dan hospitalizacije).

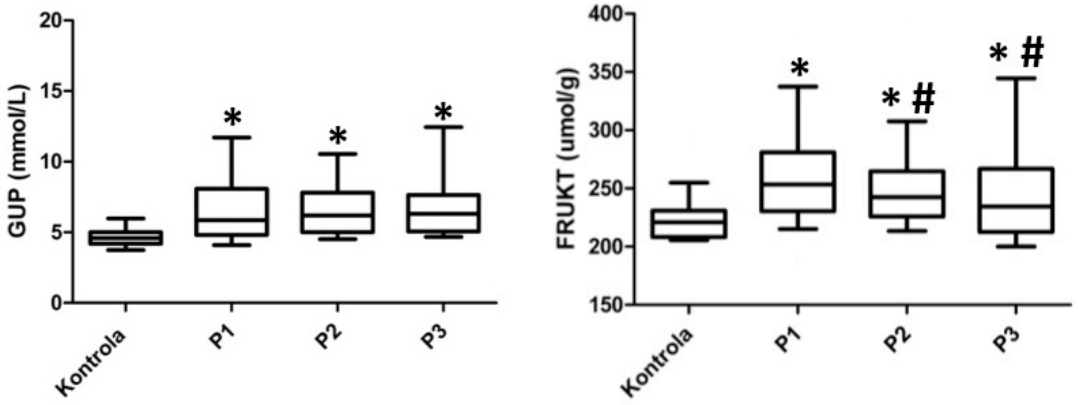
	Oboljeli			**P**
	P1	**P2**	**P3**	
GUP (mmol/L)	5,8 (3,7-15,8)	6,3 (4,1-26,3)	6,3 (4,5-23,6)	0,769
INZ (pmol/L)	47,5 (4,7-305)	41,9 (2,2-435)	85 (6,5-587)	**0,006**
C-peptid (nmol/L)	0,59 (0,01-3,83)	0,81 (0,21-3,81)	1,1 (0,22-4,06)	**<0,001**
FRUKT (µmol/g)	254 (185-401)	245 (178-490)	236 (189-419)	**<0,001**
HbA1c (%)	5,3 (4,9-5,6)	-	5,65 (4,7-5,7)	0,462*
HOMA-IR (1/1)	1,17 (0,36-5,99)	1,20 (0,38-7,52)	1,69 (0,43-27,80)	0,095

Medijan (min-max), Friedman test, *Wilcoxon test

Sličnu dinamiku pokazuje C-peptid čija se koncentracija statistički značajno mijenjala s vremenom mjerenja. (χ^2=17,4; *P*<0,001). Medijan C-peptida je porastao nakon 10 dana za 0,3 nmol/L u odnosu na vrijednosti mjerene nakon 48 sati (Z=3,6, *P*<0,001) i za 0,49 nmol/L nego kod prijema u bolnicu (Z=2,0, *P*=0,044), dok se nakon 48 sati nije statistički značajno razlikovala u odnosu na početnu vrijednost (Z=1,38, *P*=0,166). Značajna dinamika koncentracija fruktozamina kroz vrijeme (χ^2=15,1; *P*<0,001) rezultat je pada vrijednosti nakon 48 sati (Z=2,74, *P*=0,006) i 10. dana hospitalizacije u odnosu na

početnu vrijednost (Z=2,8, *P*=0,005), dok se koncentracije fruktozamina nakon 48 sati i 10. dana hospitalizacije nisu značajno razlikovale (Z=1,21; *P*=0,222). Također, nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji HbA1c na početku i 10. dana hospitalizacije (Wilcoxon-test; Z=0,735; *P*=0,462).

A **B**



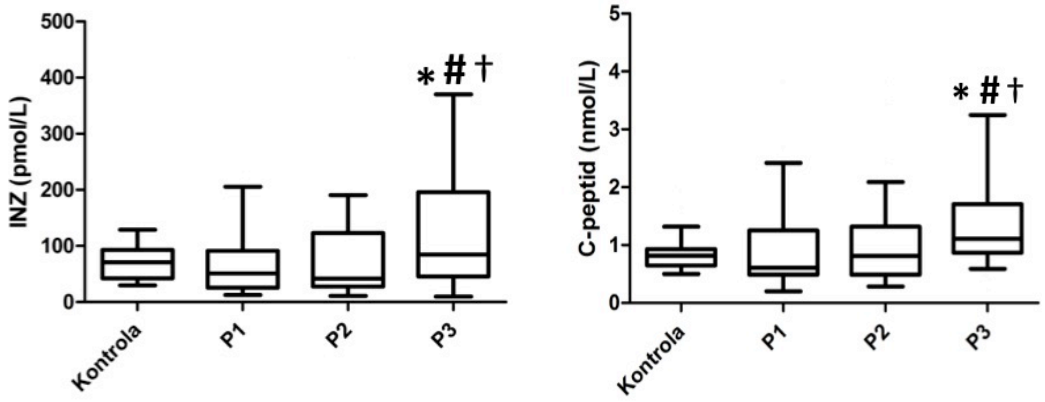
Slika 4. Pokazatelji glukoregulacije u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja.

A. Glukoza u plazmi-**GUP** (mmol/L): **P*<0,001 vs. Kontrola

B. Fruktozamin-**FRUKT** (μmol/g): **P*<0,001 vs. Kontrola; #*P*<0,01 vs. Oboljeli-P1

P1= unutar 24 sata; P2=48 sati; P3= 10. dan hospitalizacije zbog akutnog pankreatitisa.

A **B**



Slika 5. Vrijednosti inzulina i C-peptida u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja.

A. Inzulin-**INZ** (pmol/L): **P*<0,01 vs. Kontrola; #*P*=0,002 vs. P2; †*P*=0,005 vs. P1

B. C-peptid (nmol/L): **P*=0,001 vs. Kontrola; #*P*<0,01 vs. P2; †*P*=0,044 vs. P1

P1= unutar 24 sata; P2=48 sati; P3= 10. dan hospitalizacije zbog akutnog pankreatitisa.

4.4. Oksidativni i dušični stres u akutnom pankreatitisu

Oboljeli od akutnog pankreatitisa imali su značajno više koncentracije nitrotirozina u serumu od zdravih kontrola, i to kako neposredno nakon primanja u bolnicu, tako i nakon 48 sati i 10. dana hospitalizacije (Tablica 6, Slika 6). Medijan koncentracija nitrotirozina gotovo je peterostruko veći od zdravih kontrola u sva tri mjerenja, što upućuje na visoku razinu oksidativno-dušičnog stresa u akutnom pankreatitisu.

Koncentracija 8-OHdG u mokraći bila je značajno viša na početku i 10. dana hospitalizacije, dok razlika vrijednosti nakon 48 sati, nije dosegnula razinu statističke značajnosti u odnosu na vrijednosti izmjerene u mokraći zdravih kontrola (Tablica 7, Slika 6).

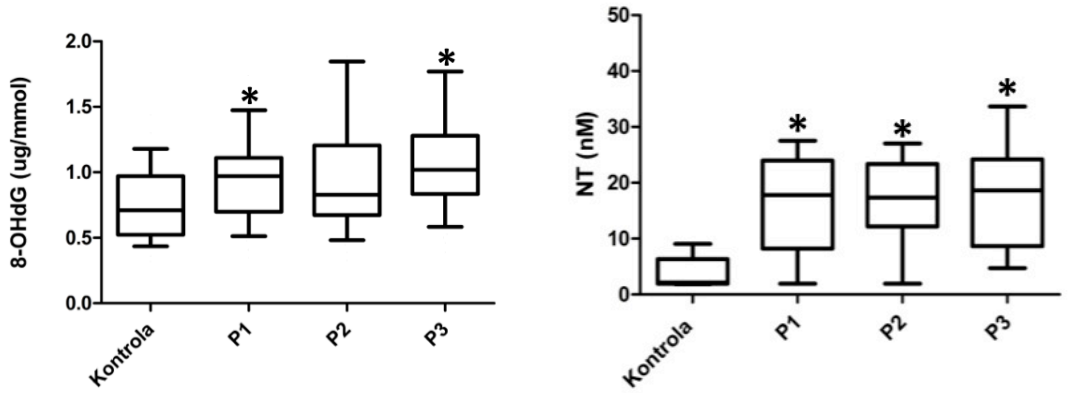
Tablica 6. Vrijednosti nitrotirozina (NT) i 8-hidroksi-gvanozina (8-OHdG) u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja (P1=unutar 24 sata, P2= nakon 48 sati i P3=10. dan hospitalizacije).

	Skupina			
	Kontrola	**Oboljeli**		
		P1	**P2**	**P3**
NT (nmol/L)	2,73 (1,85-9)	**17,80* (1,95-30,00)**	**17,34* (1,95-27,17)**	**18,66* (1,65-63,72)**
8-OHdG (µg/mmol)	0,70 (0,32-1,44)	**0,97** (0,35-2,89)**	0,84 (0,33-2,95)	**1,03* (0,39-4,52)**

medijan (min-max); Mann-Whitney U-test *P<0,001, **P=0,008 *vs. K*ontrola

U skupini oboljelih od akutnog pankreatitisa nije dokazana statistički značajna razlika vrijednosti nitrotirozina (χ^2=0,729; *P*=0,694), kao ni statistički značajna razlika vrijednosti 8-OHdG između početnoga mjerenja unutar 24 sata, nakon 48 sati i nakon 10 dana od primitka u bolnicu (χ^2=3,12; *P*=0,209).

A **B**



Slika 6. Pokazatelji oksidativnog (8-hidroksi-deoksiguanozin, 8-OhdG) i dušičnog (nitrotirozin, NT) stresa u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja.

A. 8-OHdG u urinu (μg/mmol): **P*<0,01 vs. Kontrola

B.NT u serumu (nmol/L): **P*<0,001 vs. Kontrola

P1= unutar 24 sata; P2=48 sati; P3=10. dan hospitalizacije zbog akutnog pankreatitisa.

4.5 Asimetrični-dimetilarginin (ADMA)

Akutni pankreatitis uzrokuje smanjenje koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u serumu (Tablica 7, Slika 7). Mann-Whitney U-testom potvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima asimetričnog dimetilarginina (ADMA) između ispitanika skupine oboljelih neposredno nakon primanja u bolnicu (P1) i kontrolne skupine (Δ-ADMA= -0,16 μmol/L, Z=3,77; P<0,001).

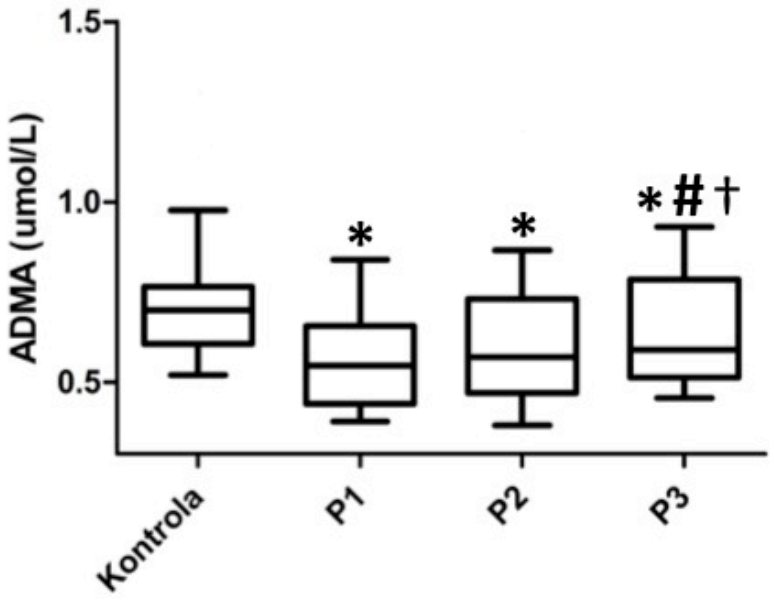
Tablica 7. Vrijednosti ADMA u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih tijekom promatranog razdoblja (P1=unutar 24 sata, P2= nakon 48 sati i P3=10. dan hospitalizacije).

	Skupina			
	Kontrola	**Oboljeli**		
		P1	**P2**	**P3**
ADMA (μmol/L)	0,7	**0,54***	**0,57****	**0,59*****
	(0,49-1,33)	**(0,33-1,33)**	**(0,28-1,2)**	**(0,34-1,16)**

medijan (min-max); Mann-Whitney U-test *P<0,001, **P=0,004, ***P=0,029 *vs.* Kontrola

Značajna razlika u koncentraciji ADMA u odnosu na kontrolnu skupinu uočava se u skupini oboljelih i 48 sati (P2) i 10. dana (P3) hospitalizacije (Δ-ADMA= -0,13 μmol/L; Z=2,9; P=0,004 Δ-ADMA= -0,11 μmol/L; Z=2,2; P=0,029),

U skupini oboljelih od akutnog pankreatitisa uočena je značajna dinamika koncentracije ADMA kroz vrijeme (χ^2=8,5; P=0,014). Vrijednost ADMA nakon 48 sati nije se statistički značajno razlikovala od vrijednosti mjerene pri dolasku (Z=1,64; P=0,100), no 10. dana hospitalizacije medijan ADMA je porastao za 0,02 μmol/L u odnosu na vrijednosti mjerene nakon 48 sati (Z=2,0; P=0,044), odnosno za 0,05 μmol/L u odnosu na vrijednosti izmjerene kod prijema u bolnicu (Z=3,2; P=0,002).

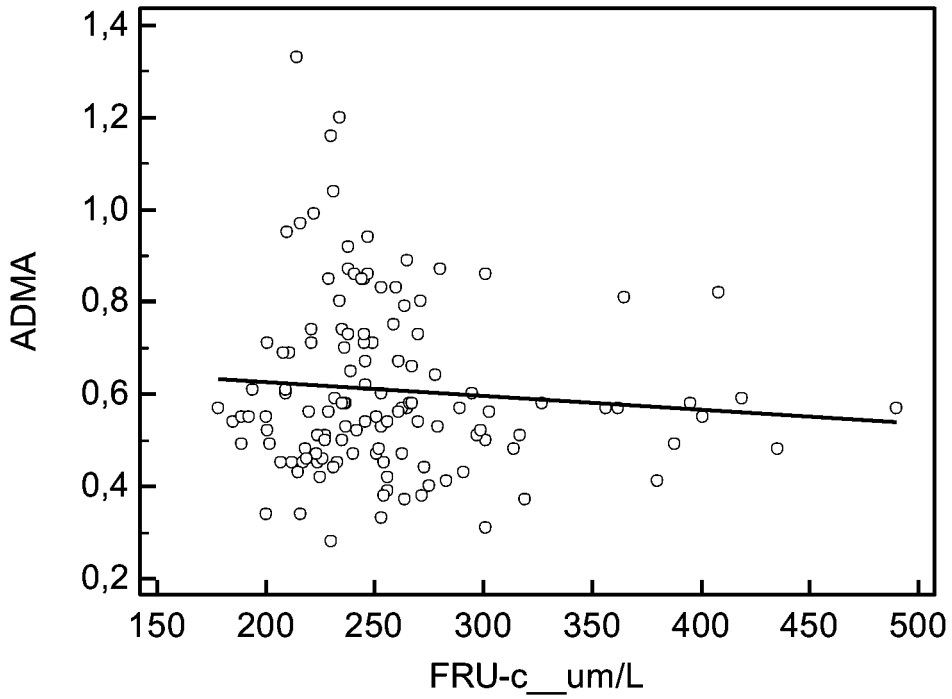


Slika 7. Promjene vrijednosti ADMA-e tijekom akutnog pankreatitisa

*****P<0,05 *vs.* kontrola; #P=0,044 *vs.* P2; †P=0,002 *vs.* P1

P1= unutar 24 sata; P2=48 sati; P3= 10. dan hospitalizacije zbog akutnog pankreatitisa.

Linearnom regresijskom analizom uočena je značajna negativna povezanost fruktozamina (r=-0,3621, *P*=0,0028) i ADMA-e u skupini oboljelih u sva tri mjerenja (Slika 8).



Slika 8. Odnos ADMA i fruktozamina u skupini oboljelih od akutnog pankreatitisa (r=-0,3621, *P*=0,0028).

4.6. OGTT nakon akutnog pankreatitisa

Oralni test opterećenja sa 75 g glukoze (oGTT) je učinjen kod oboljelih od akutnog pankreatitisa 30 dana nakon primitka u bolnicu. Od ukupno 40 uključenih ispitanika, njih 33 je završilo test. Klasifikacija glikemije izvršena je sukladno kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije [71]. Kod 12 ispitanika (36,3%) nađen je poremećaj tolerancije glukoze, dok je 8 ispitanika (24,2%) imalo manifestnu šećernu bolest. Rezultati nisu grafički prikazani.

4.7. ADMA, NT i 8-OHdG u patofiziologiji šećerne bolesti nakon akutnog pankreatitisa

Potvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima ADMA, nitrotirozina i 8-OHdG u trećem mjerenju, odnosno deset dana nakon primanja u bolnicu, između ispitanika nakon preboljelog akutnog pankreatitisa s normoglikemijom i onih s poremećenom tolerancijom glukoze (Δ-ADMA = -0,12 μmol/L, P=0,041; Δ-nitrotirozin=12,56 nmol/L, P=0,040; Δ-8OhdG=0,29 μg/mmol, P=0,032; Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba vrijednosti ADMA u skupini ispitanika s preboljelim pankreatitisom klasificiranih prema nalazu oGTT u skupinu normoglikemije (GUP-120 min <7,8 mmol/L) i hiperglikemije (GUP-120 min ≥7,8 mmol/L).

	Oboljeli od akutnog pankreatitisa		
	Normoglikemija (N=13)	**Hiperglikemija (N=20)**	**P**
	ADMA (μmol/L)		
P1	0,58(0,33-0,85)	0,50(0,37-1,33)	0,101
P2	0,69(0,28-1,2)	0,55(0,31-0,99)	0,118
P3	0,67(0,49-1,16)	0,55(0,34-0,71)	**0,041**
	NT (nmol/L)		
P1	12,06 (1,95-25,78)	18,97 (1,95-30,05)	0,153*
P2	12,44 (1,95-27,17)	16,91 (11,81-27,17)	0,192
P3	9,77 (4,29-19,4)	22,32 (5,79-26,58)	**0,040**
	8-OhdG (μg/mmol)		
P1	0,92 (0,41-1,51)	0,97 (0,35-2,26)	0,500*
P2	0,77 (0,58-1,89)	0,91 (0,33-2,45)	0,299
P3	0,92 (0,39-1,31)	1,21 (0,46-4,52)	**0,032**

medijan (min-max); Mann-Whitney U-test

P1= unutar 24 sata; P2=48 sati; P3= 10. dan hospitalizacije zbog akutnog pankreatitisa.

5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dinamiku stvaranja asimetričnog dimetilarginina (ADMA) tijekom akutne upale gušterače te utvrditi utjecaj ADMA-e na stanje oksidativnog i dušičnoga stresa te poremećaj tolerancije glukoze koji se javlja kao posljedica pankreatitisa.

Posljednjih godina akutni pankreatitis postao je značajan zdravstveni problem. Prosječna životna dob prve epizode akutne upale gušterače je 53 godine. Prosječna životna dob naših bolesnika bila je 60 godina. Mnogobrojna epidemiološka istraživanja upućuju na značajno povećanje učestalosti akutne upale gušterače u zapadnim zemljama svijeta. Uvriježeno je mišljenje kako glavne uzroke tog povećanja predstavlja povećanje incidencije pretilosti i porast potrošnje alkohola u općoj populaciji. Kako bismo to provjerili, svim našim ispitanicima uzeli smo anamnestičke podatke i razne antropometrijske pokazatelje. Analizom antropometrijskih pokazatelja poput tjelesne visine, tjelesne težine i indeksa tjelesne mase (ITM) nismo ustanovili statistički značajnu razliku između kontrolne skupine zdravih ispitanika i skupine oboljelih od akutnog pankreatitisa. Obje skupine ispitanika imale su ITM veći od 25 kg/m^2, što u populacijskim istraživanjima označava prekomjernu tjelesnu težinu. Prosječni ITM kod ispitanika s pankreatitisom bio je 26±4,9, dok je kod kontrolnih ispitanika bio 27±3,9. Meta-analiza koju su proveli Hong S. i suradnici pokazala je kako pretilost zapravo nije povezana s povećanom učestalošću obolijevanja od akutne upale gušterače, ali kako pretili bolesnici s akutnom upalom gušterače imaju veću učestalost lokalnih i sistemskih komplikacija, kao i veći mortalitet [98]. Od 40 ispitanika s akutnim pankreatitisom uključenih u ovo istraživanje, samo jedan je imao težu lokalnu komplikaciju u vidu pankreasne nekroze, dok su ostali imali blaži tijek bolesti. Od ostalih antropometrijskih pokazatelja samo se vrijednost sistoličkog arterijskog tlaka statistički značajno razlikovala među grupama, pri čemu je prosječna vrijednost sistoličkog tlaka bila za 5 mmHg veća u skupini s pankreatitisom. Ova razlika najvjerojatnije je uvjetovana pojavom značajne boli koja je ujedno i jedan od glavnih simptoma upale gušterače.

I pretilost i pretjerano konzumiranje alkoholnih pića pridonose stvaranju žučnih kamenaca koji se ujedno i smatraju najznačajnijim etiološkim čimbenikom nastanka akutne upale gušterače. Mehanizam kojim žučni kamenci uzrokuju nastanak upale gušterače nije u potpunosti razjašnjen, ali prema hipotezi zajedničkoga žučnog voda smatra se kako žučni kamenci uzrokuju blokadu protoka žuči što dovodi do razaranja tkiva gušterače zbog povećanja intraduktalnog tlaka, djelovanja žučnih soli i gušteračnih enzima. Blokada protoka žuči odnosno jetrena kolestaza uzrokuje posljedično povećanje koncentracije jetrenih enzima, dok razaranje tkiva gušterače djelovanjem žučnih soli i aktivacija zimogena uzrokuje povećanje koncentracije serumske razine gušteračnih enzima [1].

Blokada protoka žuči i oštećenje acinarnih stanica gušterače koji se događaju tijekom opstrukcije zajedničkog žučnog i pankreatičnog voda žučnim kamencem, karakterizirana je značajnim porastom jeterenih aminotransferaza i gušteračnih enzima. Nekroza acinarnih stanica gušterače uzrokuje oslobađanje amilaze i lipaze koje se rutinski koriste kao vrlo osjetljivi i specifični biokemijski pokazatelji oštećenja gušterače. T-testom smo potvrdili statistički značajnu razliku između dvije ispitivane skupine. Srednja vrijednost serumske razine amilaze bila je za 1135,27 U/L veća u skupini pankreatitisa, dok je srednja vrijednost serumske razine lipaze bila za 2321,27 U/L veća u skupini oboljelih, što potvrđuje dijagnozu akutne upale gušterače. Prosječne vrijednosti pokazatelja kolestaze poput alkalne fosfataze (ALP) 168,5±34,97 i gama glutamil transpeptidaze (GGT) 391,3±80,03 bile su statistički značajno veće u skupini oboljelih nego u kontrolnoj skupini ispitanika, što govori u prilog žučnim kamencima kao etiološkom čimbeniku nastanka upale gušterače u našem uzorku bolesnika.

Oštećenje acinusnih stanica oslobađa mnogobrojne vazoaktivne posrednike (NO, endotelin) i citokine (interleukini, TNF-alfa, faktor aktivacije trombocita-PAF) [43]. Oslobođeni posrednici potiču povećanu endotelijsku ekspresiju adhezijskih molekula i aktivaciju leukocita. Oslobađanjem istih medijatora u endotelu potiče se vazokonstrikcija, zgrušavanje i povećanje propusnosti krvožilne stijenke što dovodi do poremećaja mikrocirkulacije. Leukocitno-endotelijska interakcija nižega afiniteta odvija se preko selektina, adhezija većega afiniteta odvija se putem integrina i intracelularne adhezijske molekule (ICAM-1) nakon čega nastupa leukocitna infiltracija tkiva i gušteračna upala.

Istraživanje Rau B. i suradnika pokazalo je kako u induciranom teškom obliku akutnog pankreatitisa induciranom taurokolatom neutrofilni leukociti putem TNF-α ovisnog mehanizma uzrokuju apoptozu i nekrozu acinarnih stanica gušterače. Blokada adhezije neutrofilnih leukocita monoklonskim protutijelima usmjerenim na ICAM-1 značajno smanjuje oštećenje gušterače te oslobađanje i aktivaciju zimogenih enzima [99]. I kod naših bolesnika ustanovili smo statistički značajnu razliku vrijednosti upalnih čimbenika poput leukocita (L) i C-reaktivnog proteina (CRP). Srednja vrijednost broja L bila je za $7{,}3x10^9$/L, dok je srednja vrijednost CRP-a bila za 47,57 mg/dl veća u skupini oboljelih, potvrđujući kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do izrazite leukocitoze i značajne upalne reakcije. Istraživanje Imamura T. i suradnika je pokazalo kako vrijednosti CRP-a tijekom akutne upale gušterače značajno rastu i kako se CRP može koristiti i kao jedan od čimbenika procjene težine bolesti. Autori su također ustanovili kako se mjerenjem vrijednosti CRP-a visoko rezolucijskim CRP testom, akutna upala gušterače može prepoznati i prije nastupa kliničke slike [100]. U našem uzorku, međutim, nismo ustanovili povezanost težine kliničke slike s vrijednošću L i CRP-a.

Akutni pankreatitis povezan je sa značajnim poremećajem regulacije glikemije. Upalna reakcija i oštećenje acinarnih stanica aktivacijom zimogena vodi oštećenju endokrinog dijela gušterače, Langerhansovih otočića i β-stanica, što dovodi do poremećaja lučenja inzulina i drugih gušteračnih hormona važnih u metabolizmu ugljikohidrata. Poremećaj odgovora inzulina dovodi do poremećaja regulacije glukoze u krvi, a u teškim slučajevima i do manifestne šećerne bolesti. Istraživanje Malecka-Panas E. i suradnika pokazalo je kako tijekom akutnog pankreatitisa dolazi do pojave hiperglikemije uz sniženje koncentracije inzulina u plazmi koji su mjerili natašte i nakon opterećenja sa 75 g glukoze [101]. Također, istraživanje Perusciove J. pokazalo je kako je poremećaj lučenja inzulina nakon akutnog pankreatitisa u izravnoj vezi s morfološkim promjenama gušterače. Blagi pankreatitis prati manji poremećaj lučenja inzulina za razliku od teških oblika pankreatitisa poput gušteračnog apscesa ili gušteračne nekroze [102]. I u našem istraživanju usporedili smo najvažnije hormonsko-biokemijske čimbenike regulacije glikemije između kontrolne skupine i skupine oboljelih ispitanika. Vrijednosti HbA1c nisu se značajno razlikovale između dvije skupine (5,1% vs. 5,3%), potvrđujući kako naši ispitanici nisu prethodno bolovali od šećerne bolesti. Sve

čimbenike regulacije glikemije u skupini bolesnika mjerili smo neposredno nakon prijema, 48 sati i 10 dana nakon prijema u bolnicu. Naši rezultati statistički značajne razlike u vrijednostima glukoze u plazmi i fruktozamina između kontrolne skupine i skupine oboljelih potvrđuju nalaze prethodna istraživanja kako akutni pankreatitis uzrokuje poremećaj regulacije glikemije [56-58]. Budući da je akutni pankreatitis praćen poremećajem koncentracije serumskih proteina i gubitkom tekućine, rezultate fruktozamina smo normalizirali s obzirom na koncentraciju serumskih proteina, te smo Friedmanovim testom ustanovili kako su se vrijednosti fruktozamina statistički značajno mijenjale s vremenom mjerenja u skupini oboljelih. Najveće vrijednosti fruktozamina izmjerene su neposredno nakon prijema u bolnicu, dok su se vrijednosti fruktozamina 10 dana nakon prijema približavale vrijednostima u kontrolnoj skupini ispitanika. Vrijednosti glukoze nisu se statistički značajno mijenjale s vremenom mjerenja u skupini oboljelih. Vrijednosti inzulina i C-peptida nisu se statistički značajno razlikovale između kontrolne skupine i skupine oboljelih od pankreatitisa nakon sva tri mjerenja, ali slično kao i u prethodno navedenim istraživanjima primijetili smo kako je koncentracija inzulina neposredno nakon početka upale bila smanjena u usporedbi s kontrolnom skupinom. Friedmanovim testom utvrđivali smo dinamiku promjena vrijednosti inzulina u skupini oboljelih, te utvrdili statistički značajnu razliku dinamike INZ tijekom boravka u bolnici, pri čemu su se vrijednosti inzulina s vremenom povećavale i približavale vrijednostima inzulina kontrolne skupine ispitanika. Sličnu dinamiku ustanovili smo i s vrijednostima C-peptida. Najvjerojatnije objašnjenje ovih rezultata jest da rezolucijom akutne upale dolazi do oporavka odgovora beta-stanica Langerhansovih otočića na promjene koncentracije glukoze.

Reaktivni kisikovi radikali (ROS) su izuzetno toksični spojevi kisika koji imaju jedan nespareni elektron, što uzrokuje stanje njihove izuzetne nestabilnosti i reaktivnosti. ROS aktiviraju programiranu staničnu smrt, mijenjaju proizvodnju citokina i izražaj adhezijskih molekula, te uzrokuju oštećenje DNA molekule i peroksidaciju lipida [102]. Nadalje, proizvodi peroksidacije lipida su kemotaktični te uzrokuju daljnje pojačanje jakosti upalnog procesa pri čemu dolazi do stvaranja sustava pozitivne povratne sprege upalnog oštećenja [103]. U posljednje vrijeme, kao indikator oksidativnog oštećenja, često se koristi određivanje urinarne koncentracije 8-hidroksi-deoksigvanozina (8-OHdG)

zbog jednostavnosti i neinvazivnosti. Mnoga istraživanja pokazala su kako je oksidativno oštećenje DNA prisutno kod degenerativnih procesa poput ateroskleroze i dijabetesa [90,91]. Budući da oksidirana molekula DNA prolazi proces popravka i budući da su ti produkti popravka topljivi u vodi, oni će u potpunosti nemetabolizirani biti izlučeni urinom [104]. Kako bismo ustanovili stupanj oksidativnog stresa organizma, mjerili smo koncentraciju 8-OHdG u urinu u kontrolnoj skupini ispitanika i skupini oboljelih. Mann-Whitney U-testom dokazali smo statistički značajnu razliku u vrijednostima 8-OHdG mjerenog neposredno nakon prijama, 48 sati nakon prijema i 10 dana nakon prijema u bolnicu, potvrđujući kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do prekomjerna stvaranja slobodnih kisikovih radikala i posljedičnog oštećenja molekule DNA.

U našem istraživanju do sada smo pokazali kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do leukocitoze, hiperglikemije i prekomjerna stvaranja slobodnih radikala kisika. Slične rezultate prikazali su Ihara Y. i suradnici, koji su izvijestili o tome da hiperglikemija tijekom šećerne bolesti uzrokuje povećano stvaranje slobodnih kisikovih radikala, oštećenje DNA i povećano stvaranje 8-OHdG [105]. Suzuki S. i suradnici pokazali su kako je učestalost dijabetičnih komplikacija proporcionalna urinarnoj koncentraciji 8-OHdG [106].

Uloga NO u svekolikoj humanoj fiziologiji kompleksna je, i po mnogo čemu jedinstvena. Male količine bioraspoloživog NO, koje se sinteniziraju iz arginina djelovanjem skupine enzima sintetaza dušikova oksida (NOS) nužne su za održavanje normalne funkcije endotela, dok je upravo endotelna disfunkcija prepoznata kao rani patogenetski čimbenik u razvoju čitavog niza bolesti. Endotelna disfunkcija nastaje zbog poremećaja biološke funkcionalnosti NO, a ona, pak, može biti posljedica nedostatne sinteze NO, poremećaja u njegovim interakcijama s ciljnim tkivima, ili inaktivacije NO djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. Poznato je kako NO-sintetaza (NOS) ima različit profil ekspresije tijekom akutne upale gušterače. Reaktivni dušikovi spojevi (RNS) se konstantno proizvode u tkivu gušterače te su odgovorni za regulaciju sekrecije egzokrine gušterače. Male količine RNS-a štite tkivo gušterače povećanjem mikrocirkulatornog protoka te ujedno inhibiraju leukocitnu infiltraciju i lučenje katepsina, važnog medijatora aktivacije tripsinogena. S druge strane, povećanje ekspresije inducibilne NO-sintetaze (iNOS), kakvo se događa tijekom akutne upale gušterače,

uzrokuje ekstremno oslobađanje NO, upalnu reakciju, inhibiciju stanične respiracije i nitraciju proteina, što dovodi do smrti stanica putem nekroze ili apoptoze [107]. U stanicama sisavaca, NO predstavlja zaštitu protiv oksidativnog stresa. Ovaj antioksidativni učinak može biti važan u smanjenju ozljede tkiva oksidativnim procesima povezanim s djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. Primjerice, poznato je kako je akutni pankreatitis praćen značajnim povećanjem koncentracije superoksida. Postoje oprečni rezultati u dostupnoj literaturi o tome jesu li učinci NO zaštitni ili štetni, kao i dokazi kako NO uzrokuje staničnu smrt samo u uvjetima istodobno prisutnog oksidativnog stresa, kada dolazi i do povećanog stvaranja superoksida. Pokazano je kako u prisutnosti visoke razine superoksida, nastajanje peroksinitrita postaje ovisno o produkciji NO. Peroksinitrit svoj toksični učinak ostvaruje nitracijom makromolekula ili kao selektivni oksidans, što dovodi do nekroze ili apoptoze [108]. Formiranje nitrotirozina posljedica je peroksinitritne aktivnosti, i povećane razine nitrotirozina otkrivene su u gotovo svim stanjima povezanim s oksidativnim stresom. Tijekom upale gušterače, pokazano je kako su hepatociti oko središnje vene najosjetljiviji na oštećenje peroksinitritom i da peroksinitrit uzrokuje apoptozu i nekrozu tih stanica. I u ovom istraživanju je, kroz značajnu razliku vrijednosti AST, ALT i LDH, potvrđeno da hepatocelularno oštećenje prati upalu gušterače.

Kako bismo ustanovili stupanj dušičnog stresa organizma, mjerili smo koncentraciju nitrotirozina u kontrolnoj skupini ispitanika i skupini oboljelih od pankreatitisa. Statistički značajno više koncentracije nitrotirozina imali su oboljeli u sve tri vremenske točke mjerenja u odnosu na zdrave kontrole (P<0,001). Ovi rezultati potvrđuju kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do prekomjerna stvaranja reaktivnih dušikovih spojeva poput peroksinitrita. Slično mjerenje koncentracije nitrotirozina u plazmi oboljelih od dijabetesa tipa II proveli su Ceriello A. i suradnici. Rezultati njihova istraživanja razotkrili su značajno više koncentracije nitrotirozina u plazmi dijabetičnih bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, kod kojih je nitrotirozin bio gotovo nemjerljiv [5].

Nakon što smo ustanovili kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do značajno povećanog stvaranja RNS-a, idući cilj istraživanja bio je utvrditi uzrok tog povećanja. Nedavno objavljena istraživanja naglašavaju ulogu asimetričnog dimetilarginina

(ADMA) kao jednog od glavnih endogenih inhibitora NO-sintetaze (NOS) i time važnog čimbenika u metabolizmu NO [76]. Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako je ADMA nezavisni čimbenik kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta [113]. Povećanje koncentracije ADMA-e uzrokuje smanjenu sintezu NO što dovodi do oštećenja endotelne funkcije i ubrzanja procesa ateroskleroze. Povećanje koncentracije ADMA-e najčešće nastaje kao posljedica inhibicije enzima odgovornog za degradaciju ADMA-e, dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (DDAH), štetnim djelovanjem različitih kardiovaskularnih čimbenika rizika poput hipertenzije i dijabetesa [109]. Međutim, nedavno ustanovljena, na prvi pogled kontroverzna veza između ADMA-e i svekolikog mortaliteta u populacijama sa i bez šećerne bolesti, otvorila je prostor postavljanju nove hipoteze, prema kojoj bi upravo niža, a ne viša koncentracija ADMA-e u oboljelih od šećerne bolesti predstavljala veći rizik općeg mortaliteta, dok je u populaciji bez šećerne bolesti veza između koncentracije ADMA-e i mortaliteta pozitivna [112]. Naime, oksidativni stres u šećernoj bolesti uzrokuje „otkapčanje“ (engl. *uncoupling*) NOS-a, koji postaje generator superoksidnog anionskog radikala i daljnjeg oksidativnog stresa. U takvim uvjetima, ADMA, kao endogeni inhibitor NOS-a može odigrati zaštitnu ulogu, dok bi upravo nedostatak ADMA-e mogao pridonijeti oksidativno-dušičnom stresu i njegovim štetnim posljedicama. Zanimljivo, iako su dosadašnja istraživanja uloge NO postigla kontroverzne rezultate, uloga ADMA-e u patofiziologiji akutnog pankreatitisa do sada nije istraživana.

Usporedili smo koncentraciju ADMA-e između kontrolne skupine ispitanika i skupine oboljelih od akutnog pankreatitisa i ustanovili kako u oboljelih postoji statistički značajno niža koncentracija ADMA u sva tri mjerenja. Neposredno nakon prijema u bolnicu medijan ADMA-e je bio za 0,16 μmol/L niži, 48 sati nakon prijema za 0,13 μmol/L niži, dok je 10 dana nakon prijema 0,11 μmol/L niži nego u kontrolnoj skupini ispitanika. Friedmanovim testom smo ustanovili kako su se vrijednosti ADMA-e statistički značajno mijenjale u skupini oboljelih i nakon 10 dana od prijema u bolnicu - pribiližavale su se vrijednostima u kontrolnoj skupini ispitanika. Za razliku od prethodno navedenih istraživanja koja naglašavaju kako porast koncentracije ADMA-e predstavlja nezavisni čimbenik kardiovaskularnog morbiditeta, naše istraživanje pokazalo je kako pad koncentracije ADMA-e ima negativan utjecaj u patofiziologiji akutne upale gušterače.

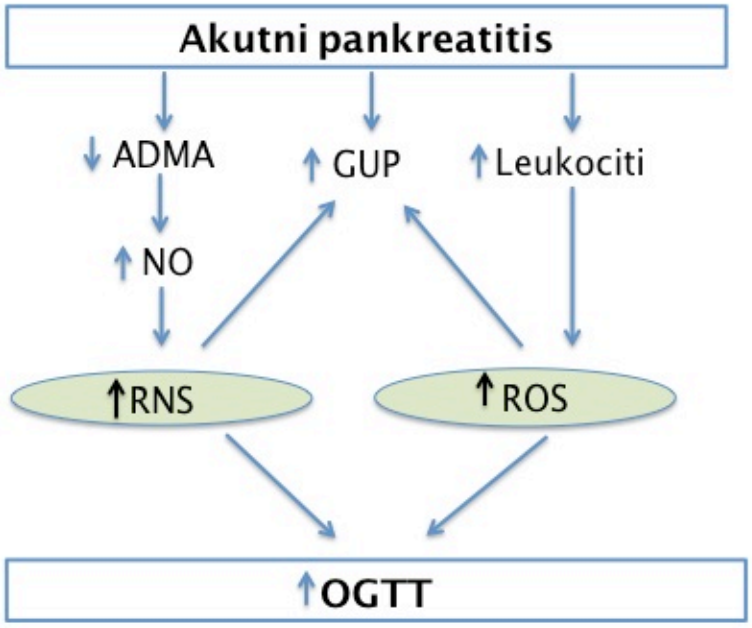
Dobiveni rezultati sukladni su hipotezi M. Anderssohn i sur. [112], te rezultatima koje su objavili Zoccali C. i sur., a koji su pokazali kako je upravo pad koncentracije ADMA-e tijekom akutne bakterijske infekcije praćen porastom leukocita, proinflamatornih citokina, CRP-a i nitrotirozina, a rezolucijom infekcije dolazi do postupnog oporavka koncentracije ADMA-e prema kontrolnim vrijednostima [110]. Buchwalow I. i suradnici nedavno su rafiniranom imunohistokemijskom tehnikom pokazali kako tijekom akutnog pankreatitisa dolazi do pozitivne regulacije puta sinteze i djelovanja NO u endokrinom i egzokrinom tkivu gušterače, uz porast koncentracije, kako NO, tako i čimbenika oksidativnog i dušičnog stresa, odnosno nitrotirozina i 8-hidroksi-guanozina *in situ*, u tkivu gušterače zahvaćene upalnim procesom [111]. Rezultati ovog istraživanja, prvog na kliničkom modelu, bacaju novo svjetlo na patofiziološke mehanizme uključene u tijek akutnog pankreatitisa i upućuju na značajnu ulogu ADMA-e u patofiziologiji akutne upale gušterače. Pad razine ADMA-e uzrokuje nedostatnu inhibiciju NOS što rezultira porastom NO i stanjem oksidativno-dušičnog stresa koji vodi oštećenju tkiva gušterače (Slika 9). Nije rasvijetljeno je li snižena koncentracija ADMA-e posljedica usporene sinteze ili ubrzane razgradnje, no neprijeporno je utvrđeno da je fruktozamin u inverznoj korelaciji s razinom ADMA-e, što upućuje na mogući utjecaj hiperglikemije na metabolizam ADMA-e u akutnom pankreatitisu.

Dugogodišnje praćenje bolesnika s akutnim pankreatitisom pokazalo je kako oni imaju veću incidenciju abnormalne tolerancije glukoze Prevalencija abnormalne tolerancije glukoze u bolesnika s kroničnim pankreatitisom je i do 70%. Ako je prisutna i kalcifikacija gušterače, prevalencija je i još veća. Bolesnici s pankreatitisom imaju abnormalnu sekreciju inzulina kao i abnormalni odgovor inzulina na oralnu i intravensku primjenu glukoze.

Kako bismo provjerili toleranciju glukoze, mjesec dana nakon prijema u bolnicu, ispitanike koji su preboljeli akutni pankreatitis podvrgnuli smo testu oralnog opterećanja sa 75 g glukoze. Ustanovili smo kako je značajan broj bolesnika (60%) imao poremećenu toleranciju glukoze ili manifestnu šećernu bolest. Kako bismo ustanovili povezanost ADMA, NT i 8-OHdG s disglikemijom klasificirali smo bolesnike prema u dvije kategorije: normoglikemije i hiperglikemije. Utvrdili smo statistički značajnu razliku u vrijednostima ADMA, nitrotirozina i 8-OHdG 10. dana hospitalizacije između ove dvije

grupe, pri čemu su vrijednosti ADMA bile niže, dok su vrijednosti nitrotirozina i 8-OHdG bile više u bolesnika s oštećenom tolerancijom glukoze. Ovaj rezultat dodatno potvrđuje utjecaj ADMA-e i posljedičnog oksidativnog i dušičnog stresa na nastanak poremećaja tolerancije glukoze nakon preboljelog akutnog pankreatitisa. Tome svakako pridonosi i opaženi porast indeksa inzulinske rezistencije 10. dana hospitalizacije, što upućuje na složenost mehanizama kojima pankreatitis utječe na razvoj netolerancije glukoze, a koji, osim sinteze i izlučivanja inzulina iz oštećene gušterače, uključuju i njegovo djelovanje na ciljna tkiva što je vrijedno daljnjih istraživanja.

Zaključno, ovo istraživanje prvi put rasvjetljava ulogu ADMA-e u patofiziologiji akutne upale gušterače. Rezultati ovog kliničkog istraživanja neprijeporno dokazuju da je oksidativno-dušični stres u akutnom pankreatitisu dijelom posredovan i deficitom ovog važnog fiziološkog inhibitora NOS-a. Osim što pridonose boljem razumijevanju patofizioloških procesa, rezultati imaju potencijalnu primjenu u pronalaženju novih dijagnostičkih pokazatelja i terapijskih mogućnosti za liječenje akutnog pankreatitisa.



Slika 9. Uloga ADMA-e u patofiziologiji akutne upale gušterače – shematski prikaz

7. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dinamiku stvaranja asimetričnog dimetilarginina (ADMA) tijekom akutne upale gušterače te utvrditi povezanost između oksidativnog stresa, dušičnoga stresa i ADMA na posljedični nastanak poremećaja tolerancije glukoze. Istraživanje je uključilo 40 zdravih ispitanika i 40 ispitanika oboljelih od akutnog pankreatitisa. Rezultati istraživanja upućuju na zaključke:

1. Akutni pankreatitis karakterizira porast jetrenih i gušteračnih enzima te sustavna upalna reakcija organizma. Potvrđena je statistički značajna razlika pokazatelja hepatocelularne nekroze (AST, ALT, LDH), hepatocelularne kolestaze (ALP, GGT), gušteračnih enzima (amilaza, lipaza) i upalnih čimbenika (L i CRP) između kontrolne skupine i ispitanika s pankreatitisom.
2. Akutni pankreatitis uzrokuje poremećaj regulacije glikemije. Pokazano je kako tijekom akutne upale gušterače dolazi do porasta glukoze u plazmi, fruktozamina, inzulina i C-peptida.
3. Akutni pankreatitis praćen je stanjem oksidativnog i dušičnog stresa. Vrijednosti nitrotirozina, kao pokazatelja količine reaktivnih dušikovih spojeva, bile su značajno veće u oboljelih od akutnog pankreatitisa, kao i vrijednosti 8-hidroksigvanozina, kao pokazatelja stanja oksidativnog stresa.
4. Akutni pankreatitis uzrokuje sniženje koncentracije ADMA-e. Istraživanjem je pokazana značajna razlika u vrijednostima ADMA-e između kontrolnih ispitanika i onih s pankreatitisom.
5. Akutni pankreatitis uzrokuje poremećaj tolerancije glukoze i šećernu bolest dokazanu OGTT-om. Poremećaj tolerancije glukoze potvrđen je u 36,3%, a šećerna bolest u 24,2% bolesnika nakon akutne upale gušterače.
6. Ovim istraživanjem prvi put se objašnjava uloga ADMA-e u oksidativno-dušičnom stresu akutnog pankreatitisa. Pokazali smo kako je oštećenje gušteračnih acinusa oksidativnim i dušičnim stresom tijekom upale gušterače dijelom posredovan i deficitom ovog važnog fiziološkog inhibitora NO-sintetaze.
7. Poremećaj tolerancije glukoze u izravnoj je vezi s jačinom oksidativnog oštećenja i deregulacije NO sustava putem inhibicije ADMA.

7. LITERATURA

1. **Frossard JL**, Steer ML, Pastor CM (2008) Acute pancreatitis. *Lancet* 371: 143-52.
2. **Sanfey H., Sarr MG, Bulkley GB, Cameron JL (1986) Oxygen-derived free** radicals and acute pancreatitis: a review. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* 548: 109-18.
3. **Dandona P.**, Thusu K., Cook S., Snyder B., Makowski J., Armstrong D., Nicotera T. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*. 347: 444-5.
4. **Al-Mufti RA**, Williamson RC, Mathie RT. (1998) Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. *Gut* 43: 564-70.
5. **Ceriello A.**, Mercuri F., Quagliaro L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L., Taboga C. (2001) Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 44: 834-8.
6. **Teerlink T**. (2005) ADMA metabolism and clearance. *Vascular medicine* 10 Suppl 1: S73-81.
7. **Sjoberg RJ**, Kidd GS. (1989) Pancreatic diabetes mellitus. *Diabetes care* 12: 715-24.
8. **DiMagno MJ**, DiMagno EP. (2007) New advances in acute pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology* 23: 494-501.
9. **Van Geenen EJ**, van der Peet DL, Bhagirath P., Mulder CJ, Bruno MJ. (2010) Etiology and diagnosis of acute biliary pancreatitis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 7: 495-502.
10. **Wang GJ**, Gao CF, Wei D., Wang C., Ding SQ. (2009) Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG* 15: 1427-30.
11. **Williams HU**, Busch FC. (1907) The Etiology and Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *The Journal of medical research* 17: 35-55.

12. **Pansky B**. (1990) Anatomy of the pancreas. Emphasis on blood supply and lymphatic drainage. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* 7: 101-8.
13. **Zsebok Z.**, Meszaros G. (1957) [Surgical and radiographic anatomy of the pancreas]. *Acta medica Academiae Scientiarum Hungaricae* 11: 139-58.
14. **Gomori G**. (1945) The Histology of the Normal and Diseased Pancreas. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 21: 99-111.
15. **Motta PM**, Macchiarelli G., Nottola SA, Correr S. (1997) Histology of the exocrine pancreas. *Microscopy research and technique* 37: 384-98.
16. **Singer MV**, Niebergall-Roth E. (2009) Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: role of enteropancreatic reflexes and cholecystokinin. *Cell biology international* 33: 1-9.
17. **Beaudoin AR**, Vachereau A, St-Jean P. (1983) Evidence that amylase is released from two distinct pools of secretory proteins in the pancreas. *Biochimica et biophysica acta* 757: 302-5.
18. **Chen JM**, Kukor Z., Le Marechal C., Toth M., Tsakiris L., Raguenes O., Ferec C., Sahin-Toth M. (2003) Evolution of trypsinogen activation peptides. *Molecular biology and evolution* 20: 1767-77.
19. **Rai P.**, Sharma A., Gupta A., Aggarwal R. (2014) Frequency of SPINK1 N34S mutation in acute and recurrent acute pancreatitis. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*.
20. **Calpena Rico R.**, Medrano Heredia J., Pardo Correcher JM, Diego Estevez M., Vazquez Rojas JL, Candela Polo F., Barragan Ortiz J., Garcia Cortes MJ, Arrese Caballero R. (1987) [Study of exocrine pancreas function stimulated by secretin and CCK (cholecystokinin) in the dog]. *Revista espanola de las enfermedades del aparato digestivo* 71: 411-6.
21. **Konturek JW**, Gabryelewicz A., Kulesza E., Konturek SJ, Domschke W. (1995) Cholecystokinin (CCK) in the amino acid uptake and enzyme protein secretion by the pancreas in humans. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* 17: 55-61.

22. **Singh J.**, Adeghate E. (1998) Effects of islet hormones on nerve-mediated and acetylcholine-evoked secretory responses in the isolated pancreas of normal and diabetic rats. *International journal of molecular medicine* 1: 627-34.

23. **Plisetskaya EM**. (1989) Physiology of fish endocrine pancreas. *Fish physiology and biochemistry* 7: 39-48.

24. **Engelking LR**. (1997) Physiology of the endocrine pancreas. *Seminars in veterinary medicine and surgery* 12: 224-9.

25. **Balthazar EJ**, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. (1990) Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 174: 331-6.

26. **O'Connor OJ**, Buckley JM, Maher MM. (2011) Imaging of the complications of acute pancreatitis. *AJR American journal of roentgenology* 197: W375-81.

27. **Isenmann R.**, Rau B., Beger HG. (2001) Early severe acute pancreatitis: characteristics of a new subgroup. *Pancreas* 22: 274-8.

28. **Banks PA**, Bollen TL, Dervenis C., Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS. (2013) Acute Pancreatitis Classification Working G. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 62: 102-11.

29. **Appelros S.**, Borgstrom A. (1999) Incidence, aetiology and mortality rate of acute pancreatitis over 10 years in a defined urban population in Sweden. *The British journal of surgery* 86: 465-70.

30. **Lowenfels AB**, Maisonneuve P., Sullivan T. (2009) The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis. *Current gastroenterology reports* 11: 97-103.

31. **Dufour MC**, Adamson MD. (2003) The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 27: 286-90.

32. **Banks PA**. (2002) Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy* 56: S226-30.

33. **Gullo L.**, Migliori M., Olah A., Farkas G., Levy P., Arvanitakis C., Lankisch P., Beger H. (2002) Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 24: 223-7.

34. **Farinon AM**, Ricci GL, Sianesi M., Percudani M., Zanella E. (1987) Physiopathologic role of microlithiasis in gallstone pancreatitis. *Surgery, gynecology & obstetrics* 164: 252-6.

35. **Cucher D.**, Kulvatunyou N., Green DJ, Jie T., Ong ES. (2014) Gallstone pancreatitis: a review. *The Surgical clinics of North America* 94: 257-80.

36. **Roberts SE**, Akbari A., Thorne K., Atkinson M., Evans PA. (2013) The incidence of acute pancreatitis: impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 38: 539-48.

37. **Malagelada JR**. (1986) The pathophysiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 1: 270-8.

38. **Feurer ME**, Adler DG. (2012) Post-ERCP pancreatitis: review of current preventive strategies. *Current opinion in gastroenterology* 28: 280-6.

39. **Gumaste VV**. (1996) Hyperlipidemia and pancreatitis: the chicken or the egg? *The American journal of gastroenterology* 91: 1275-6.

40. **Frick TW**, Mithofer K., Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Warshaw AL. (1995) Hypercalcemia causes acute pancreatitis by pancreatic secretory block, intracellular zymogen accumulation, and acinar cell injury. *American journal of surgery* 169: 167-72.

41. **Sakorafas GH**, Tsiotou AG. (2000) Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *Journal of clinical gastroenterology* 30: 343-56.

42. **Pooran N.**, Indaram A., Singh P., Bank S. (2003) Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology* 37: 263-6.

43. **Hughes CB**, Gaber LW, Mohey el-Din AB, Grewal HP, Kotb M., Mann L., Gaber AO. (1996) Inhibition of TNF alpha improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *The American surgeon*. 62: 8-13.

44. **Bhatia M.**, Brady M., Shokuhi S., Christmas S., Neoptolemos JP, Slavin J. (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *The Journal of pathology* 190: 117-25.

45. **Van Laethem JL**, Robberecht P., Resibois A., Deviere J. (1996) Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 110: 576-82.

46. **Foitzik T.**, Eibl G., Hotz HG, Faulhaber J., Kirchengast M., Buhr HJ. (2000) Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 128: 399-407.

47. **Gentiloni Silveri N.**, Mazzone M., Portale G., Carbone L. (2001) Nitric oxide. A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva medica* 92: 167-71.

48. **Shao LM, Chen QY**, Chen MY, Cai JT. (2010) Nitroglycerin in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a meta-analysis. *Digestive diseases and sciences*. 55: 1-7.

49. **Werner J.**, Rivera J., Fernandez-del Castillo C., Lewandrowski K., Adrie C., Rattner DW, Warshaw AL. (1997) Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 121: 23-30.

50. **Frick TW**, Fernandez-del Castillo C., Bimmler D., Warshaw AL. (1997) Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini. *Gut* 41: 339-43.

51. **Keim V.**, Teich N., Fiedler F., Hartig W., Thiele G., Mossner J. (1998) A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain. *Pancreas* 16: 45-9.

52. **Ranson JH**. (1997) Diagnostic standards for acute pancreatitis. *World journal of surgery* 21: 136-42.

53. **Yeung YP**, Lam BY, Yip AW. (2006) APACHE system is better than Ranson system in the prediction of severity of acute pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 5: 294-9.

54. **American Diabetes A**. (2013) Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care* 36 Suppl 1: S11-66.

55. **International Diabetes Federation.** IDF Diabetes Atlas, 6th edition. IDF 2014.

56. **Schulthess G.**, Kolyvanos Naumann U., Kaser L., Vetter W. (2005) [Chronic pancreatitis. Main symptoms: chronic abdominal pain, weight loss in steatorrhea, secondary diabetes mellitus]. *Praxis* 94: 1139-45.

57. **Raue G.**, Keim V. (1999) [Secondary diabetes in chronic pancreatitis]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* Suppl 1: 4-9.

58. **Bank S.**, Marks IN, Vinik AI. (1975) Clinical and hormonal aspects of pancreatic diabetes. *The American journal of gastroenterology* 64: 13-22.

59. **Sarles H.**, Sarles JC, Camatte R., Muratore R., Gaini M., Guien C., Pastor J., Le Roy F. (1965) Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis. *Gut* 6: 545-59.

60. **James O.**, Agnew JE, Bouchier IA. (1974) Chronic pancreatitis in England: a changing picture? *British medical journal* 2: 34-8.

61. **Rao RH**. (1988) Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocrine reviews* 9: 67-87.

62. **Wrenshall GA**, Bogoch A., Ritchie RC. (1952) Extractable insulin of pancreas; correlation with pathological and clinical findings in diabetic and nondiabetic cases. *Diabetes* 1: 87-107.

63. **Pfeffer SR**, Rothman JE. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annual review of biochemistry* 56: 829-52.

64. **Matschinsky FM**. (1996) Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-41.

65. **Crabtree B.**, Newsholme EA. (1985) A quantitative approach to metabolic control. *Current topics in cellular regulation* 25: 21-76.

66. **Sharp GW**. (1979) The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 16: 287-96.

67. **Sherman A**. (1996) Contributions of modeling to understanding stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells. *The American journal of physiology* 271: E362-72.

68. **Griffiths G.**, Simons K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234: 438-43.

69. **Karnieli E.**, Armoni M. (2008) Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295: E38-45.

70. **Felig P.**, Wahren J., Sherwin R., Hendler R. (1976) Insulin, glucagon, and somatostatin in normal physiology and diabetes mellitus. *Diabetes* 25: 1091-9.

71. **World Health Organisation.** Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Report of a WHO/IDF consultation**.** WHO, Geneve, 2006.

72. **World Health Organisation.** Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated report of a WHO consultation. HO, Geneve, 2011.

73. **Deckers JG**, Schellevis FG, Fleming DM. (2006) WHO diagnostic criteria as a validation tool for the diagnosis of diabetes mellitus: a study in five European countries. *The European journal of general practice* 12: 108-13.

74. **Valkonen VP**, Paiva H., Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T., Laakso J., Laaksonen R. (2001) Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 358: 2127-8.

75. **Zoccali C.**, Bode-Boger S., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L., Cataliotti A., Bellanuova I., Fermo I., Frolich J., Boger R. (2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358: 2113-7.

76. **Cooke JP**, Ghebremariam YT. (2011) DDAH says NO to ADMA. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 1462-4.

77. **Dayoub H.**, Achan V., Adimoolam S., Jacobi J., Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M., Vallance P., Patterson AJ, Cooke JP. (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 108: 3042-7.

78. **Ogawa T.**, Kimoto M., Sasaoka K. (1989) Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *The Journal of biological chemistry* 264: 10205-9.

79. **MacAllister RJ**, Parry H., Kimoto M., Ogawa T., Russell RJ, Hodson H., Whitley GS, Vallance P. (1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British journal of pharmacology* 119: 1533-40.

80. **Mann GE**, Yudilevich DL, Sobrevia L. (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological reviews* 83: 183-252.

81. **Gary JD**, Clarke S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 61: 65-131.

82. **Holven KB**, Haugstad TS, Holm T., Aukrust P., Ose L., Nenseter MS. (2003) Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. *The British journal of nutrition* 89: 359-63.

83. **Yoo JH**, Lee SC. (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158: 425-30.

84. **Achan V.**, Broadhead M., Malaki M., Whitley G., Leiper J., MacAllister R., Vallance P. (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 1455-9.

85. **Sydow K.**, Munzel T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Supplements* 4: 41-51.

86. **Ueda S.**, Kato S., Matsuoka H., Kimoto M., Okuda S., Morimatsu M., Imaizumi T. (2003) Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation research* 92: 226-33.

87. **Stocker R.**, Keaney JF, Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* 84: 1381-478.

88. **Finkel T.**, Holbrook NJ. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-47.

89. **Finkel T**. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology* 15: 247-54.

90. **Dalle-Donne I.**, Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* 52: 601-23.

91. **Wu LL**, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. (2004) Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 339: 1-9.

92. **Ischiropoulos H**. (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics* 356: 1-11.

93. **Pacher P.**, Beckman JS, Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 87: 315-424.

94. **Pacher P.**, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. (2005) Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Current medicinal chemistry* 12: 267-75.

95. **Braatvedt GD**, Drury PL, Cundy T. (1997) Assessing glycaemic control in diabetes: relationships between fructosamine and HbA1C. *The New Zealand medical journal* 110: 459-62.

96. **Profumo E.**, Di Franco M., Buttari B., Masella R., Filesi C., Tosti ME, Scrivo R., Scarno A., Spadaro A., Saso L., Rigano R. (2012) Biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Mediators of inflammation* 2012: 503942.

97. **Pacheco SA**, Torres VM, Louro H., Gomes F., Lopes C., Marcal N., Fragoso E., Martins C., Oliveira CL, Hagenfeldt M., Bugalho-Almeida A., Penque D., Simoes T. (2013) Effects of occupational exposure to tobacco smoke: is there a link between environmental exposure and disease? *Journal of toxicology and environmental health Part A* 76: 311-27.

98. **Hong S.**, Qiwen B., Ying J., Wei A., Chaoyang T. (2011) Body mass index and the risk and prognosis of acute pancreatitis: a meta-analysis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 23: 1136-43.

99. **Rau B.**, Paszkowski A., Esber S., Gansauge F., Poch B., Beger HG, Moller P. (2001) Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 23: 80-8.

100. **Imamura T.**, Tanaka S., Yoshida H., Kitamura K., Ikegami A., Takahashi A., Niikawa J., Mitamura K. (2002) Significance of measurement of high-sensitivity C-reactive protein in acute pancreatitis. *Journal of gastroenterology* 37: 935-8.

101. **Malecka-Panas E.**, Gasiorowska A., Kropiwnicka A., Zlobinska A., Drzewoski J. (2002) Endocrine pancreatic function in patients after acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology* 49: 1707-12.

102. **Perusciova J**. (1989) Glucose tolerance and secretion of insulin in chronic pancreatitis. *Acta Univ Carol Med Monogr* 131: 1-92.

103. **Kylanpaa ML**, Repo H., Puolakkainen PA. (2010) Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* 16: 2867-72.

104. **Xiang F.**, Shuanglun X., Jingfeng W., Ruqiong N., Yuan Z., Yongqing L., Jun Z. (2011) Association of serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels with the presence and severity of coronary artery disease. *Coronary artery disease* 22: 223-7.

105. **Ihara Y.**, Toyokuni S., Uchida K., Odaka H., Tanaka T., Ikeda H., Hiai H., Seino Y., Yamada Y. (1999) Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 927-32.

106. **Suzuki S.**, Hinokio Y., Komatu K., Ohtomo M., Onoda M., Hirai S., Hirai M., Hirai A., Chiba M., Kasuga S., Akai H., Toyota T. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* 45: 161-8.

107. **Ang AD**, Adhikari S., Ng SW, Bhatia M. (2009) Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide production in acute pancreatitis and associated

lung injury. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* 9: 150-9.

108. **Lin KT**, Xue JY, Nomen M., Spur B., Wong PY. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry* 270: 16487-90.

109. **Miyazaki H.**, Matsuoka H., Cooke JP, Usui M., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T. (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141-6.

110. **Zoccali C.**, Maas R., Cutrupi S., Pizzini P., Finocchiaro P., Cambareri F., Panuccio V., Martorano C., Schulze F., Enia G., Tripepi G., Boger R. (2007) Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 22: 801-6.

111. **Buchwalow I.**, Schnekenburger J., Tiemann K., Samoilova V., Bankfalvi A., Poremba C., Schleicher C., Neumann J., Boecker W. (2013) L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. *Scientific reports* 3: 1899.

112. **Anderssohn M.,** Schwedhelm E., Luneburg N., Vasan RC, Boger R. (2010) Asymmetric dimethyl-arginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intruguing interaction with diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research 7:105-118*.

113. **Bouras G.,** Deftereos S., Tousoulis D., Giannopoulos G., Chatzis G., Tsounis D., Cleman MW, Stefanadis C. (2013) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Current topics in medicinal chemistry 2:180-200*.

114. **Banks PA,** Bollen TL, Dervenis C., Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS, Acute Pancreatitis Classification Working G. (2013) Classification of acute pancreatitis-2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 62(1):102-111.

8. ŽIVOTOPIS

Gorana Trgo rođena je 7. listopada 1955. godine u Splitu. Gimnaziju je završila u Splitu, a Medicinski fakutet u Zagrebu 1980. godine. Obvezni liječnički staž obavila je u Domu zdravlja Split, a zatim radila kao liječnik obiteljske medicine u Splitu. Specijalistički ispit iz interne medicine za potrebe Doma zdravlja Split položila je 1993. godine. Poslijediplomski studij iz Gastroenterologije završava na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1991. godine. Nakon završene specijalizacije radi kao specijalist interne medicine u Domu zdravlja Split, a od 1995. na Odjelu gastroenterologije Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Split. Magistrirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2006. godine na temu "Vrijednost određivanja izražaja proteina p53 u kolorektalnim karcinomima". Supspecijalistički ispit iz Gastroenterologije polaže 2008. godine. Član je Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskoga gastroenterološkog društva.
Udana je i majka troje djece.

9. PRILOG

9.1. Popis kratica

SIRS-sindrom sustavnog upalnog odgovora (*eng*. Systemic inflamatory response syndrom)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (*eng*. Reactive oxygen species)

OH^- - hidroksilni radikal

O_2^- - superoksidni anion

H_2O_2 -vodikov peroksid

8-OHdG - 8-hidroksi-deoksigvanozin

NO - dušični oksid

NOS -NO sintetaza (*eng*. NO-sintetase)

$ONOO^-$ - peroksinitrit

ADMA - asimetrični dimetilarginin

PSTI - pankreatični sekretorni tripsin inhibitor

CCK - kolecistokinin

ICAM - intracelularna adhezijska molekula

IL - interleukini

TNF-α - čimbenik nekroze tumora (eng. Tumor necrosis factor)

TGF - transformirajući čimbenik rasta

ET - endotelin

RNS - reaktivni dušikovi spojevi (eng. Reactive nitrogen species)

NDDG - National Diabetes Data Group

OGTT - oralni test opterećenja glukozom (eng. Oral glucose tolerance test)

GUP - glukoza u plazmi

DDAH - dimetilarginin-dimetilaminohidrolaza

CAT - kationski transporter aminokiselina (eng. cationic aminoacid transporter)

NT - nitrotirozin

FRUKT - fruktozamin

HbA1c - glikozilirani hemoglobin A1c

INZ - inzulin

CRP - C-reaktivni protein

LDH - laktat-dehidrogenaza

AST - aspartat-aminotransferaza

ALT - alanin-aminotransferaza

ALP - alkalna fosfataza

GGT - gama glutamil transpeptidaza

ITM - indeks tjelesne mase

OS - opseg struka

OB - opseg bokova

$\mathbf{RR_S}$ - vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka

$\mathbf{RR_D}$ - vrijednosti dijastoličkog arterijskog tlaka

L - leukociti

9.2. Popis objavljenih radova

1. Milostić Kazimir, Tomić Snježana, Trgo Gorana, Olujić I. Influence of differentiation grade expressed by Gleason score on survival in prostate cancer patients. Acta Clinica Croatica. 171-177 (poster, domaća recenzija, sažetak).
2. Puljiz Ž., Hozo I., Kovač D., Trgo G., Bonacin D., Tadin I., Bratanić A., Rošić-Despalatović B., Štimac D. Prediktori nealkoholnog steatohepatitisa u bolesnika s nejasnim porastom aktivnosti alanin-aminotransferaze. (poster, domaća recenzija, sažetak).
3. Tomić S., Anđelinović Š., Puljak L., Pešutić-Pisac V., Bezić J., Milostić K., Trgo G. Prognostic significance of lymphatic and blood vessel invasion by tumor cells in colorectal carcinoma. Acta Clinica Croatica (poster, domaća recenzija, sažetak).
4. Sučić A., Fabijanić D., Kardum D., Banić M., Bonacin D., Trgo G. Utjecaj Helicobacter pylori infekcije na težinu koronarne bolesti. Liječnički vjesnik.
5. Mirić, D., Trgo, G., Bulović, D., Kristić, J., Roguljić, A. Epidemiološke analize bolesnika liječenih zbog ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti u Splitu od 1988. do 1997. godine. Liječnički vjesnik. 1998. 42-42 (poster, domaća recenzija, sažetak).
6. Ivanković, M., Radman, M., Gverović-Antunica, A., Tesanović, S., Trgo, G., Demarin, Vida. Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on cerebrovascular reactivity in diabetics with retinopathy. Annals of Saudi medicine. 33(2) (2013); 130-133 (članak, znanstveni).
7. Bonacin, Damir; Fabijanić, Damir; Radić, Mislav; Puljiz, Željko; Trgo, Gorana; Bratanić, Andre; Hozo, Izet; Tocilj, Jadranka. Gastroesophageal reflux disease and pulmonary function: a potential role of the dead space extension. Medical science monitor. 18 (2012) 5; 271-275 (pregledni rad, znanstveni).
8. Ivanković, M., Radman, Maja; Gverović-Antunica, A., Tesanovic, S., Trgo, Gorana; Demarin, V. Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on cerebrovascular reactivity in diabetics with retinopathy. Annals of Saudi medicine. 33 (2013); 130-133 (članak, ostalo).
9. Bozić, Ivo; Capkun, Vesna; Bozić, D., Karabuva, S., Čaljkušić, Krešimir; Trgo, Gorana; Carević, Vedran; Fabijanić, Damir. Anticoagulant therapy in patients with

permanent atrial fibrillation - evidence based medicine and clinical practice. Liječnički vjesnik. 135 (2013); 129-134 (članak, znanstveni).

10. Božić, Ivona; Čapkun, Vesna; Božić, Dorotea; Karabuva, Svjetlana; Čaljkušić, Krešimir; Trgo, Gorana; Carević, Vedran; Fabijanić, Damir. Antikoagulantno liječenje u bolesnika s trajnom fibrilacijom atrija - medicina utemeljena na dokazima i klinička praksa. Liječnički vjesnik: glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora. 135 (2013), 5-6; 129-134 (članak, znanstveni).

11. Mirić, Dinko; Božić, Ivo; Giunio, Lovel; Vuković, Ivo; Lozo, Petar; Vujičić, Marija; Trgo, Gorana; Čulić, Viktor. Epidemiološke osobitosti infarkta miokarda u Splitu tijekom Domovinskog rata. Liječnički vjesnik. 120 (1998); 64-64 (kratko priopćenje, znanstveni).

12. Božić, Ivona; Cvitković, Ivana; Carević, Vedran; Čaljkušić, Krešimir; Trgo, Gorana; Fabijanić, Damir. Procjena tromboembolijskog rizika i rizika krvarenja u bolesnika s nereumatskom atrijskom fibrilacijom primjenom CHA2DS2-VASc i HASBLED bodovnih sustava. Liječnički vjesnik. 135 (2013), 3-4; 86-91 (pregledni rad, stručni).

13. Perić, Irena; Barišić, Igor; Pavličević, Ivančica; Kokeza, Josipa; Trgo, Gorana. Hemoptize. Medica Jadertina. Supplement. 42 (2012); 139-145 (članak, stručni).

14. Trgo, Gorana; Tonkić, Ante; Šimunić, Miro; Puljiz, Željko. Successful endoscopic removal of a lighter swallowed 17 months before. Case Reports in Gastroenterology. 6 (2012), 2; 238-242 (članak, stručni).