

# LAMA-test střevní propustnosti; srovnání GC a enzymatické metody

Dastych M.<sup>1</sup>, Hyšpler R.<sup>3</sup>, Dastych M. jr.<sup>2</sup>, Novotná H.<sup>1</sup>, Číhalová J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Brno

<sup>2</sup>Interní gastroenterologická klinika Fakultní nemocnice Brno

<sup>3</sup>Klinika geriatrická a metabolická Fakultní nemocnice Hradec Králové

## SOUHRN

**Cíl práce:** Diferenční sacharidový absorpční test se široce používá pro vyšetření střevní propustnosti. Metodou volby pro stanovení manitolu a laktulózy v moči jsou chromatografické metody (GC, HPLC). V současné době jsou dostupné komerční enzymatické testy pro stanovení těchto cukrů v moči. Srovnávali jsme výsledky plynové chromatografie a enzymatické metody.

**Metodika:** Bylo vyšetřeno 17 vzorků moči pacientů, kteří podstoupili LAMA test, za použití plynové chromatografie a enzymatické metody na stanovení laktulózy a manitolu v moči. Výsledky těchto metod byly srovnány pomocí regrese podle Passinga-Bablocka.

**Výsledky:** Regrese podle Passinga-Bablocka vykazuje přítomnost proporcionální odchylky, pozitivní v případě manitolu ( $y = 1,1994x - 0,6512$ ) a negativní v případě laktulózy ( $y = 0,8125x - 0,0382$ ).

Patologicky zvýšená střevní propustnost byla stanovena v 6 případech GC metodou a v 5 případech enzymatickou metodou.

**Závěry:** Mezi GC a enzymatickou metodou na stanovení manitolu a laktulózy v moči existují proporcionální odchylky. Diagnostická použitelnost obou metod byla v našem souboru pacientů srovnatelná.

**Klíčová slova:** laktulóza, manitol, střevní propustnost, leaky gut syndrom.

## SUMMARY

**Dastych M., Hyšpler R., Dastych M. jr., Novotná H., Číhalová J.: LAMA-test of intestinal permeability; comparison of GC and enzymatic method**

**Objective:** Differential sugar absorption test with lactulose and mannitol is widely used for intestinal permeability investigation. The methods of choice for lactulose and mannitol determination in urine are GC and HPLC methods. At this time commercial enzymatic tests for this sugar determination in urine are available. We compared results of GC and enzymatic method.

**Methods:** 17 urine samples from patients undergoing LAMA sugar absorption test were analysed by using of GC and enzymatic method for lactulose and mannitol determination. The results of these methods were compared by Passing-Bablock regression method.

**Results:** Passing-Bablock regression demonstrates the presence of the proportional deviation, positive in case of mannitol ( $y = 1,1994x - 0,6512$ ), and negative in case of lactulose ( $y = 0,8125x - 0,0382$ ).

Pathological increased intestinal permeability was established in 6 cases by GC method and in 5 cases by enzymatic method.

**Conclusions:** The proportional deviation exists between GC and enzymatic method for lactulose and mannitol determination in urine. The diagnostic utility of both analytical methods was in our group of patients comparable.

**Key words:** lactulose, mannitol, intestinal permeability, leaky gut syndrom

## Úvod

Výsledkem správné morfologické a funkční integrity tenkého střeva je soulad mezi dvěma protichůdnými procesy. Na jedné straně to je maximálně efektivní proces absorpce živin a všech potřebných látek včetně specifických transportních mechanismů, na druhé straně potom vysoce účinná komplexní bariérová funkce bránící průniku bakterií, toxinů, antigenů a jiných toxicích látek do vnitřního prostředí organismu.

Permeabilitou, respektive propustností střeva, lze označit proces, při kterém látky pronikají mezibuněčnými prostory střevního epitelu neřízenou difúzí, při které závisí jejich průnik na propustnosti mezibuněčných prostor a na jejich koncentračním gradientu bez účasti specifického přenosového mechanismu [12, 13, 14].

Porucha této střevní bariérové funkce může vést k průniku bakterií a jejich toxinů do systémového oběhu s nebezpečím vzniku sepse a možností rozvoje multiorgánového selhání.

Makromolekuly s antigenními vlastnostmi mohou vyvolat místní i systémovou odpověď imunitního systému se závažnými alergickými projevy. Patologické příznaky a reakce provázející zvýšenou střevní propustnost vytvářejí tzv. syndrom děravého střeva (leaky gut syndrom) [7].

Schematicky lze velmi komplexní procesy na úrovni střevní sliznice rozdělit na transcelulární a paracelulární. Z výše uvedeného vyplývá, že zjišťování střevní propustnosti je zaměřeno na kvalitu a funkci paracelulárních struktur střevní sliznice.

Pro posouzení slizniční integrity (propustnosti) tenkého střeva se již několik desetiletí používá stanovení

vyučování nemetabolizovatelných cukrů v moči po jejich perorálním podání. Obvyklé schéma testu spočívá v perorálním podání dvou cukrů s různou molekulovou hmotností a různým mechanismem absorpce.

Monosacharidy, jako manitol nebo L-rhamóza, se vstřebávají transcelulární cestou a odrážejí stupeň absorpce malých molekul (menší než 0,65 nm).

Disacharidy, např. laktulóza nebo celobióza, přecházejí přes paracelulární junkční komplexy a jejich absorpce odpovídá permeabilitě pro velké molekuly (větší než 0,93 nm) [9].

Jedním z velmi častých způsobů vyjádření střevní propustnosti je hodnota poměru vyloučeného disacharidu (laktulóza; paracelulární transport) a monosacharidu (manitol; transcelulární transport) v pětihodinovém sběru moči po jejich perorálním podání. Tento způsob do značné míry eliminuje variabilitu způsobenou rozdíly v gastrointestinální motilitě, absorpční kapacitě, renálních funkcích a diuréze.

Jiným způsobem vyhodnocení testu je vyjádření množství laktulózy vyloučené v pětihodinovém sběru moči jako procento z perorálně podané dávky nebo přepočet zjištěné koncentrace laktulózy na kreatinin.

Pro stanovení laktulózy a manitolu jsou k dispozici chromatografické (GC, HPLC) a enzymatické analytické metody [4, 5, 6, 9, 10].

Metodou volby je simultánní stanovení manitolu a laktulózy plynovou chromatografií. Určitou nevýhodou této referenční metody je její vazba na specializované laboratorní pracoviště s dostatečnou kapacitou pro zpracování vzorků. Enzymatické metody stanovení laktulózy a manitolu byly do klinické praxe zavedeny v 70. letech minulého století a jsou nově dostupné i dnes formou komerčních souprav.

Cílem naší práce bylo vyzkoušet soupravy pro enzymatické stanovení manitolu a laktulózy v moči a porovnat získané výsledky s jejich paralelním stanovením metodou plynové chromatografie.

## Materiál a metody

Ke stanovení laktulózy a manitolu v moči jsme použili soupravu Sugar Absorption Test; Lactulose, Manitol in urine-enzymatic, Instruchemie, NL.

Stanovení bylo provedeno za použití firemní aplikace pro analyzátor Cobas Mira na OKBH FN Brno.

Jako referenční metodu jsme použili stanovení laktulózy a manitolu plynovou chromatografií na plynovém chromatografu HP 5890 II (Hewlett-Packard) a software Clarity (DataApex) na Klinice geriatrické a metabolické FN Hradec Králové.

Vzorek moči byl odpařen a cukry derivatizovány hydroxylaminem hydrochloridem na oximy (30 min při 75 °C) a následně bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem na trimethylsilylery (15 min při 75 °C). Alikvotní vzorek byl nastříknut na kapilární kolonu a analyty detekovány plamenoionizačním detektorem.

Provedení testu: před zahájením testu se pacient vymočil mimo sběrnou nádobu. Po vypití testovacího roztoku (Laktulóza 5 g, Manitol 2 g, Sacha-

róza 40 g/100 ml vody) kvantitativně sbíral moč po dobu 5 hodin do sběrné nádoby s přídavkem 0,5 ml 20% chlorhexidinu jako konzervans. Dva alikvotní vzorky sbírané moči pro enzymatické a chromatografické stanovení laktulózy a manitolu byly uchovány do provedení analýzy při -20 °C (stabilita 6 měsíců).

Vyšetřili jsme celkem 17 osob. Ve 13 případech se jednalo o pacienty s různým stadiem a aktivitou Crohnovy choroby.

Ke statistickému porovnání obou analytických metod jsme použili metodu regrese podle Passinga a Bablocka.

Ke statistickému zpracování jsme použili program Analyse-it.

## Výsledky

Koncentrace laktulózy a manitolu ve vzorcích moči stanovené enzymatickou a chromatografickou metodou jsou zobrazeny na grafech 1 a 2.

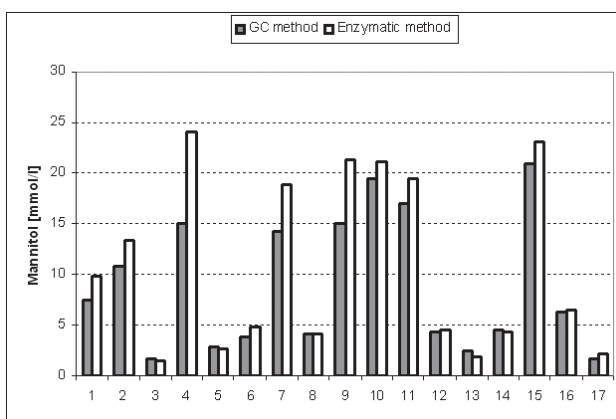


Fig. 1. Results of GC and enzymatic method (mannitol) by 17 different patients

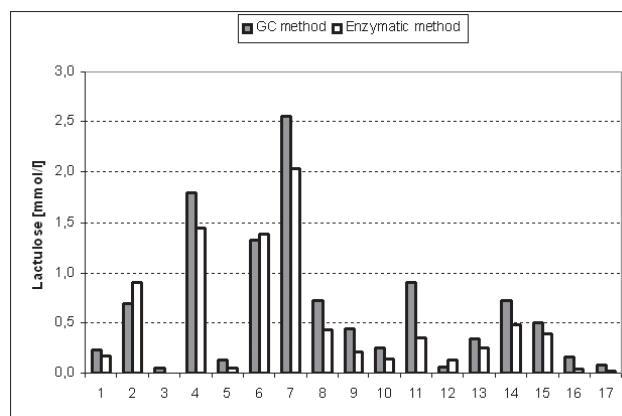
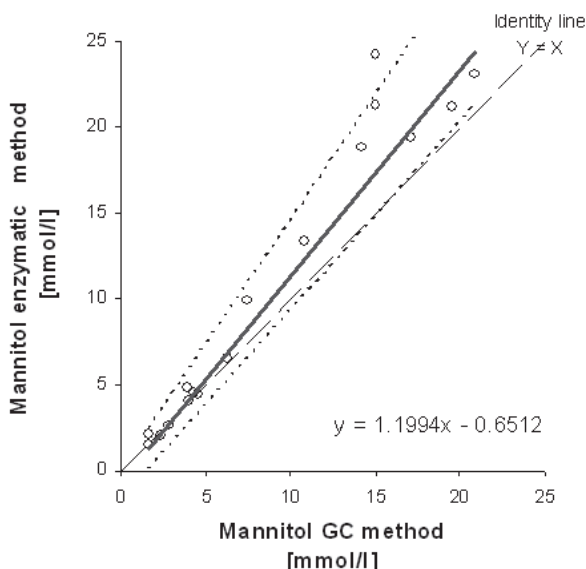


Fig. 2. Results of GC and enzymatic method (lactulose) by 17 different patients

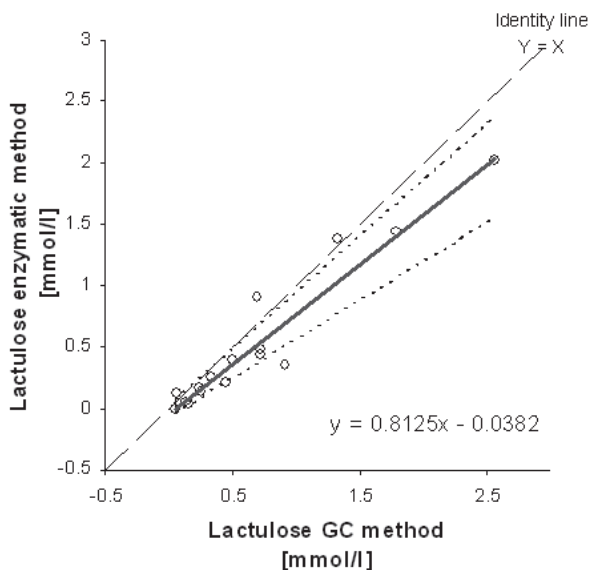
Koncentrace manitolu zjištěné enzymatickou metodou byly vyšší oproti plynové chromatografii, s většími rozdíly u vyšších hodnot.

Koncentrace laktulózy stanovené enzymatickou metodou byly naopak nižší, rovněž se závislostí na absolutní hodnotě.

Při statistickém vyhodnocení srovnatelnosti metod stanovení laktulózy a manitolu pomocí regrese podle Passinga-Babloka byl zaznamenán statisticky významný rozdíl způsobený proporcionální odchylkou. Grafickým vyjádřením přítomnosti proporcionální odchylky je sklon regresní přímky, který je rozdílný proti „identity line“  $Y = X$ ;  $45^\circ$ . V případě pozitivní proporcionální odchylky (manitol) probíhá regresní přímka nad „identity line“, při negativní (laktulóza) pod „identity line“ - grafy 3 a 4.



**Fig. 3.** Comparison of GC and enzymatic method (mannitol) by Passing-Bablok regression



**Fig. 4.** Comparison of GC and enzymatic method (lactulose) by Passing-Bablok regression

Hodnoty korelačních koeficientů byly 0,9611 pro laktulózu a 0,9719 pro manitol.

Z vyhodnocení srovnání výsledků stanovených metodou plynové chromatografie a enzymatickou metodou vyplynul závěr, že pro laktulózu i manitol existují statisticky významné rozdíly mezi oběma metodami způsobené proporcionální odchylkou, pozitivní v případě manitolu a negativní v případě laktulózy.

## Diskuse

Střevní propustnost se může měnit přechodně i dlouhodobě za různých patologických situací. Příčinou může být akutní pankreatitida, jaterní cirhóza, nespecifické záněty střeva, chemoterapie apod. [1, 3, 8, 11, 12, 13].

Z celé řady látek, které byly testovány za účelem hledání optimálního markeru střevní propustnosti, se v současné době používají dvě dvojice sacharidů: manitol a L-rhamóza pro transcelulární absorpci a laktulóza a celobióza pro paracelulární absorpci [2].

Laktulóza a manitol představují vhodné a v současné době nejčastěji používané látky pro měření střevní propustnosti, protože mají zanedbatelnou afinitu ke specifickému monosacharidovému transportnímu systému, jsou pasivně absorbovány, nemetabolizovány a v nezměněné podobě vylučovány do moči.

Metodicky jsou v současné době pro stanovení manitolu a laktulózy dostupné metody plynové a kapalinové chromatografie a enzymatická metoda. I když bylo srovnání provedeno pouze na malém počtu vyšetření, svědčí výsledky statistického vyhodnocení pro přítomnost proporcionální odchylky, pozitivní v případě manitolu a negativní v případě laktulózy.

## Závěr

Mezi metodami stanovení manitolu a laktulózy plynovou chromatografií a enzymatickým testem byly nalezeny statisticky významné rozdíly způsobené proporcionální odchylkou.

S rostoucí koncentrací se rozdíly mezi metodami zvyšují, přičemž srovnávaná enzymatická metoda poskytuje v těchto koncentracích vyšší výsledky u manitolu a nižší u laktulózy. V další práci bychom chtěli pomocí ROC analýzy ověřit platnost hodnotících kritérií pro poměr laktulóza/manitol, pro hodnotu laktulózy přepočítané na kreatinin a procento vyloučené laktulózy z podané dávky.

## Literatura

1. **Ammori, B. J., Leeder, P. C., King, R. F et al.** Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J. Gastrointest. Surg.*, 1999, 3, p. 252–262.
2. **Blomquist, L., Bark, T., Hedenborg, G., Svenberg, T., Norman, A.** Comparison between the lactulose/manitol and  $^{51}\text{Cr}$ -ethylenediaminetetraacetic acid/ $^{14}\text{C}$ -mannitol methods for intestinal permeability. Frequency distribution pattern and variability of markers and marker ratios in healthy subjects. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1993, 3, p. 274–280.
3. **Daniele, B., Secondulfo, M., De Vivo, R. et al.** Effect of Chemotherapy with 5-Fluorouracil on intestinal Permeability and Absorption in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Gastroenterology*, 2001, 32, 3, p. 228–230.
4. **Dumas, F., Aussel, C., Pernet, P., Martin, C., Giboudeau, J.** Gas chromatography applied to the lactulose-mannitol intestinal permeability test. *J. Chromatogr.*, 1994, 654, p. 276–281.

5. Farhadi, A., Keshavarzian, A., Holmes, E.W., Fields, J., Zhang, L., Banan, A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, 784, 1, p. 145–154.
6. Hessels, J., Snoeyink, E. J., Platenkamp, A. J., Voortman, G., Steggink, J., Eidhof, H. H. Assessment of intestinal permeability: enzymatic determination of urinary mannitol, raffinose, sucrose and lactose on Hitachi analyzer. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, 41, 1, p. 33–38.
7. Keshavarzian, A., Holems, E. W., Patel, M., Iber, F., Fields, J. Z., Pethkar, S. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage. *Am. J. Gastroenterol.*, 1999, 1, p. 200–207.
8. Kohout, P., Šenkeřík, M., Novotný, A. et al. Střevní propustnost u pacientů s nespecifickými střevními záněty – multicentrická studie. *Čes. a slov. Gastroent. a Hepatol.*, 2002, 56, 2, s. 53–60.
9. Marsilio, R., D'Antiga, L., Zancan, L., Dussini, A., Zaccchello, F. Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in studies of intestinal permeability in pediatrics. *Clin. Chem.*, 1998, 44, p. 1685–1691.
10. Miki, K., Butler, R., Moore, D., Favidson, G. Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol, and lactulose in urine by HPLC for testing intestinal permeability in pediatric practice. *Clin. Chem.*, 1996, 42, p. 71–75.
11. Penalva, J. C., Martínez, A., Esteban, A. et al. Intestinal Permeability Alteration in Acute Pancreatitis. *Pancreatology*, 2002, 2, p. 167–187.
12. Soderholm, J. D., Olaison, G., Lindberg, E. et al. Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *GUT*, 1999, 44, p. 96–100.
13. Welcekr, K., Martin, A., Kole, P., Siebeck, M., Gross, M. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Med. Res.*, 2004, 9, 10, p. 456–460.
14. Zhengwu, S., Xiandong, W., Andersson, R. Role of intestinal Permeability in Monitoring Mucosal Barrier Function. History, Methodology, and Significance of Pathophysiology. *Digestive Surgery*, 1998, 15, p. 386–397.

*Práce byla podpořena grantem Interní grantové agentury MZ ČR, NR 9084-3.*

*Do redakce došlo 4. 7. 2006.*

*Adresa pro korespondenci:  
Doc. MUDr. Milan Dastyč, CSc.  
OKBH Fakultní nemocnice Brno  
Jihlavská 20  
62500 Brno  
e-mail: mdast@fnbrno.cz*

## Zaujalo nás

### Lysofosfatidylcholin a sekreční fosfolipáza A2 u cévních chorob: mediátor endotelové dysfunkce a aterosklerózy

Lysofosfatidylcholin (LPC) je nejbojažnější složkou oxidovaných lipoproteinů o nízké hustotě (oxLDL), které mají značný podíl na vzniku a rozvoji aterosklerózy: Poškozují normální funkci cévního endotelu tím, že nepříznivě ovlivňují jeho vazorelaxační aktivitu, podporují jeho proliferaci a zvýšení permeability, stimulují adhezi a aktivaci lymfocytů, iniciují chemotaxi makrofágů, ovlivňují migraci a proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny, usnadňují shlukování krevních destiček, nepříznivě ovlivňují koagulační kaskádu. Řadu těchto efektů zprostředkuje transdukční dráha protein-kinázy C (PKC). Podobným mechanismem je modulována ještě aktivita iontového proudu v buněčné membráně, vazba na specifický oxLDL-receptor nebo na receptory sdružené s G-proteinem, tedy posilování oxidačního stresu vyvíjeného na cévní stěnu. Lysofosfatidylcholin vzniká v cévní stěně enzymovým účinkem sekreční fosfolipázy A2-II (sPLA2-II); zvýšená aktivita sPLA2-II byla proto nedávno zařazena mezi nezávislé rizikové faktory pro onemocnění koronárních arterií. Bylo prokázáno, že sPLA2-II podporuje tvorbu bioaktivních lipidů, stimuluje proliferaci buněk cévní hladké svaloviny, vývoj lipidového jádra aktivovanými makrofágy,

sekreci cytokinů, vazbu na proteoglykan extracelulární matrix cévní stěny, což podporuje shlukování a nahromadění lipidů, tvorbu ateromu. Nekatalytický aterogenní efekt sPLA2-II je přisuzován vazbě na M-tyt receptoru (prokázán u králíčích svalů). Je třeba dalšího výzkumu, který by podrobněji objasnil molekulové mechanismy výše uvedených efektů a umožnil podpořit údaje získané v experimentech *in vitro* klinickými zkušenostmi. Cirkulující hladina sPLA2-II může být nejen nezávislým rizikovým faktorem pro postižení koronárních arterií, ale může předpovídat další kardiovaskulární příhody, kupř. restenózu u pacientů po koronární kardioplastice. Neméně důležitá je skutečnost, že může být důležitým cílem pro léčení těchto situací. Byly již objeveny farmakologické inhibitory jejich proaterogenních aktivit (kupř. preparát LYS15920, petrosaspongionolid M z mořské houby *Petrosaspongia nigra* nebo kakspongionolid z *Fasciospongia cavernosa*). Příznivý účinek mají i současně užívané léky jako simvastatin, atorvastatin nebo nesteroidní antiflogistika: alminoprofen, indomethacin a aspirin nebo antikoaglyns heparin. Více se o tom všem dočtete v přehledném referátu "Lysofosfatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: Mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis" autorů Panagiotis Kougias et al. [Med. Sci. Monit., 2006, 12 (1): RA5-16].

*Jaroslav Masopust*