

Spektrofotometrická metoda stanovení D-laktátu v krevní plazmě a moči

Hyšpler R., Tichá A., Svobodová I., Zadák Z.

Centrum pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOUHRN

Cíl studie: Cílem metodického sdělení bylo zavedení a validace dostupné a praktické enzymatické metody stanovení D-laktátu v krevní plazmě a moči. Zavedená metoda byla využita ke stanovení koncentrací D-laktátu v plazmě v souboru 117 pacientů v perioperační péči.

Typ studie: Jedná se o metodické sdělení s uvedením výsledků prospektivní observační klinické studie.

Název a sídlo pracoviště: Centrum pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Materiál a metody: Krevní plazma je deproteinována ultrafiltrací, moč je analyzována přímo. Vlastním principem metody jsou dvě sprzęžené enzymové reakce katalyzované D-laktát dehydrogenázou při redukci nikotinamid-adenin-dinukleotidu a D-glutamát-pyruvát transaminázou. Měřena je konečná koncentrace redukováného nikotinamid-adenin-dinukleotidu při 340 nm. Soubor pacientů studie byl tvořen 117 pacienty podstupujícími resekci tlustého střeva nebo konečníku pro operabilní karcinom kolorekta. Odběry byly prováděny předoperačně, dvě hodiny po operaci a první až čtvrtý pooperační den.

Výsledky: V plazmě bylo dosaženo preciznosti CV 1,5 - 4,9% podle koncentrace. Kvantifikační limit metody je na koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Detekční limit metody je na koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$. Metoda je lineární v rozsahu 10 $\mu\text{mol/l}$ až 1 mmol/l . Bazální předoperační hodnoty 33,4 (26,4; 39,7) $\mu\text{mol/l}$ stouply již za dvě hodiny po ukončení operace na koncentraci 90,2 (78; 101) $\mu\text{mol/l}$, která dosáhla vrcholu v první pooperační den a následně došlo v průběhu dalších tří dní k návratu k původním hodnotám.

Závěr: Uvedená metoda může být vzhledem ke své dostupnosti, robustnosti i jednoduchosti snadno zavedena v biochemické laboratoři, kde se vyskytne požadavek na provádění tohoto vyšetření.

Klíčová slova: D-laktát, metabolická acidóza, syndrom krátkého střeva.

SUMMARY

Hyšpler R., Tichá A., Svobodová I., Zadák Z.: Spectrophotometric method for determination of D-lactate in blood plasma and urine

Objective: The aim of the study was to develop and validate an easily available and robust enzymatic method for determination of D-lactate in blood plasma and urine. The developed method was used for the evaluation of plasmatic D-lactate levels in patients in perioperative care.

Design: The article describes the methodology and presents the results of a prospective, observational study.

Settings: Center for Research and Development, University Hospital Hradec Králové

Material and Methods: Blood plasma was deproteinated by ultrafiltration; urine may be analysed directly. The principle of the method is the coupled reaction of D-lactate dehydrogenase reducing nicotinamide adenine dinucleotide and D-glutamate pyruvate transaminase. The end-point concentration of nicotinamide adenine dinucleotide is determined as absorbance at 340 nm. The patient cohort consisted of 117 patients operated for colorectal cancer. The blood samples were collected preoperatively, 2 hours after operation, and daily from the first to the fourth postoperative day. Data are presented as median (interquartile range).

Results: The precision achieved in plasma was 1.5 – 4.9%. A quantification limit of 10 $\mu\text{mol/L}$ and detection limit of 5 $\mu\text{mol/l}$ were found. The method is linear from 10 $\mu\text{mol/L}$ to 1 mmol/L . Basal preoperative values of 33.4 (26.4; 39.7) $\mu\text{mol/L}$ increased within two hours postoperatively to 90.2 (78; 101) $\mu\text{mol/L}$, and D-lactate concentration peaked on the first postoperative day. The concentration returned to basal values on the fourth day.

Conclusion: The described method may be used widely in clinical chemistry laboratories due to its availability, robustness and simplicity, wherever D-lactate testing is required.

Keywords: D-lactate, metabolic acidosis, short bowel syndrome.

Úvod

Soli kyseliny mléčné se v lidském organismu vyskytují ve dvou stereoizomerech, a to v L-laktátu a D-laktátu. L-laktát je široce známým produktem anaerobní glykolýzy a je běžně stanovován v biochemických laboratořích. Používané enzymatické metody, ať již s elektrochemickou nebo spektrofotometrickou detekcí, jsou specifické pro L-stereoizomer. Jedná se o primárně mikrobiální metabolit vznikající při fermentaci v lidském tlustém, případně tenkém střevě.

Potenciál D-laktátu způsobit metabolickou acidózu se zvýšeným anion gapem je znám velmi dlouho. Základní klinickou situací, která vede ke vzniku D-laktátové acidózy je zmenšená délka tenkého střeva při zachované kontinuitě střeva tlustého. V této situaci přichází do tlustého střeva zvýšené množství nestrávených sacharidů, které jsou v tlustém střevě metabolizovány na organické kyseliny. To vede ke snížení pH střevního obsahu pod fyziologický interval a tato situace vede k přerůstání acidorezistentních bakterií typu *Lactobacillus fermenti* a *Lactobacillus acidophilus*, kte-

ré produkují D-laktát. D-laktát je absorbován a v případě, že dojde k překročení metabolizační kapacity enzymu dehydrogenázy D-2-hydroxykyselin přítomné v játrech a v ledvinách a eliminační kapacity do moči, dochází k rozvoji D-laktátové acidózy s významnými klinickými důsledky. Tento enzym je navíc inhibován při acidóze, což vede k začarovanému kruhu [1, 2]. Klinicky významným zdrojem D-laktátu se mohou stát i enterokoky, k jejichž přerůstání může dojít např. při léčbě vankomycinem v průběhu léčby hematologických onemocnění [3].

Dalším zdrojem D-laktátu in vivo je methylglyoxalová metabolická cesta (obr. 1). Methylglyoxal je vysoce toxický aldehyd pyruvátu a je tvořen jak při metabolismu aminokyselin přes 3-aminoaceton, tak při metabolismu mastných kyselin přes aceton a především je vedlejším produktem anaerobní glykolýzy, kde vzniká přeměnou dihydroxyacetonfosfátu [4]. Methylglyoxalová cesta je aktivována zvýšeným buněčným příjmem výše uvedených substrátů, především glukózou, laktátem nebo glycerolem. Změny plazmatických koncentrací D-laktátu způsobené fluktuací této metabolické cesty jsou však maximálně v řádu desítek $\mu\text{mol/l}$. Přesto však může být plazmatická koncentrace D-laktátu využita jako indikátor aktivity methylglyoxalové metabolické cesty, protože D-laktát je jejím koncovým metabolitem a je mnohem snáze stanovitelný než methylglyoxal [4].

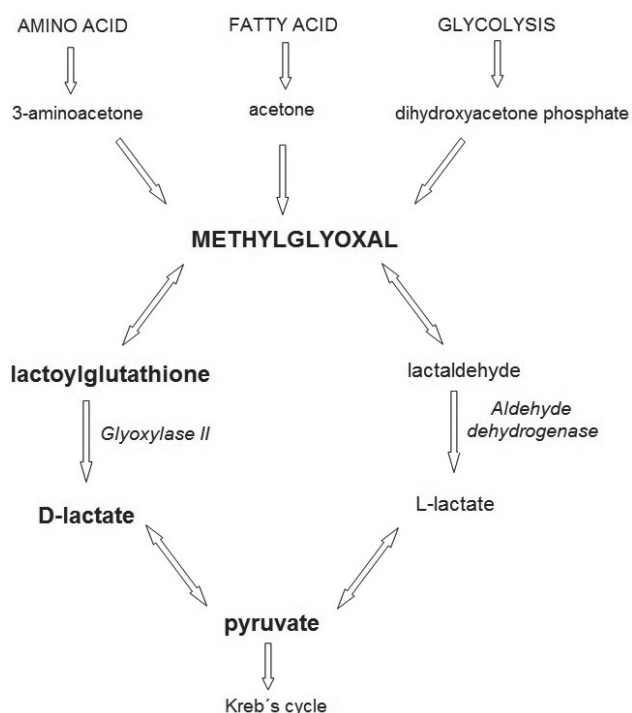


Fig. 1. Methylglyoxal metabolite pathway as a source of D-lactate

Zajímavým nálezem je rovněž podíl D-laktátové acidózy na diabetické ketoacidóze [5]. Bylo zjištěno, že u tohoto klinického stavu se plazmatické koncentrace D-laktátu pohybují v oblasti $3,82 \pm 2,5 \text{ mmol/l}$ a D-laktát se tudíž na metabolické acidóze významně podílí. V této studii byla u kompenzovaných diabetiků změřena koncentrace $0,47 \pm 0,55 \text{ mmol/l}$ a $0,25 \pm 0,35 \text{ mmol/l}$ u zdravých kontrol. Na tomto výrazném zvýšení

se pravděpodobně podílí oba mechanismy vzniku D-laktátu. Hyperglykemie pravděpodobně vede ke zvýšenému přísunu fermentabilních substrátů pro laktobacily a rovněž zvýší genezi D-laktátu cestou methylglyoxalu. Zvýšené koncentrace D-laktátu byly rovněž zjištěny v moči a v plazmě pacientů trpících diabetem 2. typu [6]. D-laktát může být aplikován pacientům v rámci infuzní léčby jako součást racemické směsi DL-laktátu přítomného např. v Hartmannově roztoku [7]. Množství aplikovaného D-laktátu koreluje se zvýšenou mortalitou pacientů po traumatech.

Diagnostický přínos stanovení D-laktátu je však ještě širší. D-laktát byl poprvé použit k diagnostice akutní mezenterické ischemie Murrayem [8]. Byla zjištěna signifikantní korelace mezi vzestupem plazmatického D-laktátu a poškozením střeva zjištěného mikroskopicky v pokusu na laboratorních potkanech. Stejná závislost byla zjištěna i u pacientů trpících akutní mezenterickou ischemií při srovnání s akutním břichem z jiných příčin [9-13].

Jak vyplývá z výše uvedeného, D-laktát je významnou markerovou sloučeninou jak pro klinickou praxi, tak pro výzkumné účely. Byly vypracovány a publikovány metody spektrofotometrické [14], fluorimetrické [15] nebo chromatografické [16]. Přesto toto vyšetření nebylo v ČR prováděno, protože nebyl komerčně dostupný validovaný analytický kit a zároveň pro značné obtíže při zavádění chromatografických metod separací stereoizomerů. Cílem práce bylo zavedení a validace snadno dostupné enzymatické metody se spektrofotometrickou detekcí, která by tuto analýzu zpřístupnila klinickým laboratořím. Tato metoda byla odzkoušena na souboru 117 pacientů monitorovaných v perioperačním období. Zavedená metoda je ekonomicky dostupná, rychlá, robustní a dvouletá stabilita reagentů umožňuje laboratoři se vypořádat s relativně nízkou frekvencí požadavků na toto vyšetření.

Materiál a metody

Pro stanovení je využívána sestava enzymů D-Lactic Acid Assay Procedure od firmy Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Irsko. Tento kit je výrobem určen pro stanovení D-laktátu v potravinářských produktech, např. víně, pivě, jogurtu, octu, sýru nebo kyselém zelí. Výhodou této sestavy je pořízení všech reagentů najednou a jejich vyrovnaná kvalita. Principem metody jsou dvě spřažené enzymové reakce (obr. 2). První reakce je katalyzována D-laktát dehydrogenázou, která oxiduje D-laktát na pyruvát při redukci nikotinamid-adenin-dinukleotidu. Protože rovnováha této reakce je posunuta silně doleva, je nezbytná přítomnost druhé reakce, která odčerpává pyruvát reakcí s D-glutamátem za katalýzy D-glutamát-pyruvát transaminázou. Originální standard D-laktátu je dodáván v koncentraci $1,66 \text{ mmol/l}$ a tento roztok je nutné zředit konzervačním vodným roztokem 0,02 % azidu sodného na pracovní standardy o koncentracích 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$.

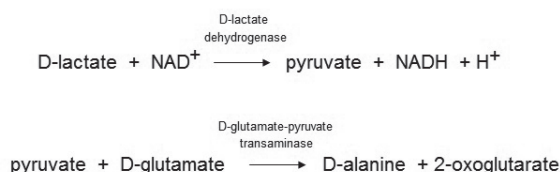


Fig. 2. Reactions employed in the method

Chemikálie a laboratorní materiál

Azid sodný, L-laktát, kyselina cholová byly zakoupeny u firmy Sigma – Aldrich (Saint Louis, USA). Výrobem použitých centrifugačních filtrů Amicon Ultra 0,5 ml s membránou Ultracel 30 kDa byl Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Stanovení bylo provedeno na spektrofotometru UV-1700 PharmSpec (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Výsledky byly zpracovány analytickým software SigmaPlot12.0 (Systat Software, Point Richmond, USA).

Postup metody

Krevní plazma s antikoagulantem EDTA byla přefiltrována pomocí centrifugačních filtrů (500 µl plazmy, přetížení 14 000 g, 10 minut). Pracovní reagens bylo připraveno smícháním 19 ml redestilované vody, 7 ml roztoku R1 (glycylglycinový pufr), 1,4 ml roztoku R2 (NAD⁺), 280 µl suspenze R3 (D-glutamát-pyruvát transamináza) a 280 µl suspenze R4 (D-laktát dehydrogenáza). Vzniklých 27,9 ml bylo důkladně promícháno a použito ke stanovení do dvou hodin.

Do zkumavky s 250 µl filtrátu vzorku nebo standardem bylo přidáno 900 µl reagens, promícháno a ponecháno reagovat 10 min při laboratorní teplotě. Byla stanovena absorbance vzorku v květě 1 cm při 340 nm proti redestilované vodě. Kalibrace byla prováděna v koncentracích 0, 100 a 200 µmol/l.

Protokol klinické studie

Studovaný soubor byl tvořen 117 pacienty podstupujícími resekci tlustého střeva nebo konečníku pro operabilní karcinom kolorekta. Kontrolní odběr na bazální koncentraci D-laktátu byl proveden v den přijetí k operaci před začátkem předoperačních příprav (den -1). Následně byly vzorky krve odebírány dvě hodiny po operaci (den 0) a následně první až čtvrtý pooperační den v rámci standardních odběrů (celkově šest stanovení). Byla zaznamenávána klinická data, především rozvoj komplikací, doba pobytu na JIP a doba hospitalizace.

Data jsou prezentována jako medián (interkvartilový interval).

Výsledky

Validace metody

Na koncentrační hladině 38,9 µmol/l v plazmě bylo dosaženo preciznosti CV 4,89%, na koncentrační hladině 264 µmol/l v plazmě preciznosti CV 1,52% a v moči na koncentrační hladině 597 µmol/l v moči bylo dosaženo preciznosti CV 2,66%. Preciznosti byly vypočteny z deseti opakovaných stanovení.

Kvantifikační limit metody je na koncentraci 10 µmol/l, kdy je dosahováno variačního koeficientu 18,5%. Detekční limit metody je na koncentraci 5 µmol/l. Metoda je lineární v rozsahu 10 µmol/l až 1 mmol/l. Zpětné výtěžky metody se pohybují od 93 do 100% a jsou ukázány v Tabulce 1. Ultrafiltrace brání interferenci hemolýzy, lipemie a nekonjugovaného bilirubinu. Konjugovaný bilirubin do koncentrace 200 µmol/l rovněž do ultrafiltrátu neproniká (vyšší koncentrace nebyly ověřovány). Jedinou zjištěnou interferencí byla zvýšená absorbance ultrafiltrátu při 340 nm při obstrukčním ikteru. Spektrum ultrafiltrátu plasmy při obstrukčním ikteru a kontrolní plasmy mezi 310 a 500 nm je demonstrováno na obr. 3. Příčinu zvýšené absorbance v oblasti ultrafialového spektra ultrafiltrátu ikterických vzorků se nepodařilo objasnit. V této klinické situaci je nezbytný odečet absorbance směsi 250 µl ultrafiltrátu a 900 µl destilované vody.

Table 1: Analytical recoveries of the method (analyses performed in triplicates)

Calculated concentration (µmol/L)	Measured concentration (µmol/L)	Recovery (%)
77	77.1	100.2
328	321	97.8
596	569	95.4
863	805	93.3

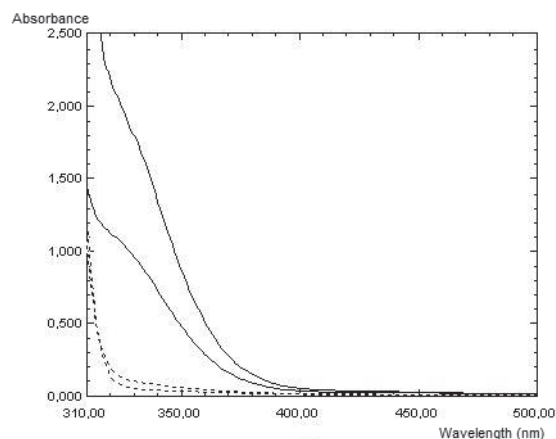


Fig. 3. Spectra of ultrafiltrates (full line - icteric samples, dashed line - control samples)

Stanovení D-laktátu u pacientů v perioperační péči

Výsledky stanovení jsou demonstrovány na obr. 4. Bazální předoperační hodnoty se pohybovaly v intervalu 33,4 (26,4; 39,7) µmol/l. Již v odběru za dvě hodiny po ukončení operace došlo ke statisticky významnému vzestupu koncentrace D-laktátu v plazmě na 90,2 (78; 101) µmol/l ($p < 0,05$), který dosáhl vrcholu v první pooperační den 112 (79,1; 139) µmol/l a následně došlo v průběhu dalších tří dní k návratu k původním hodnotám.

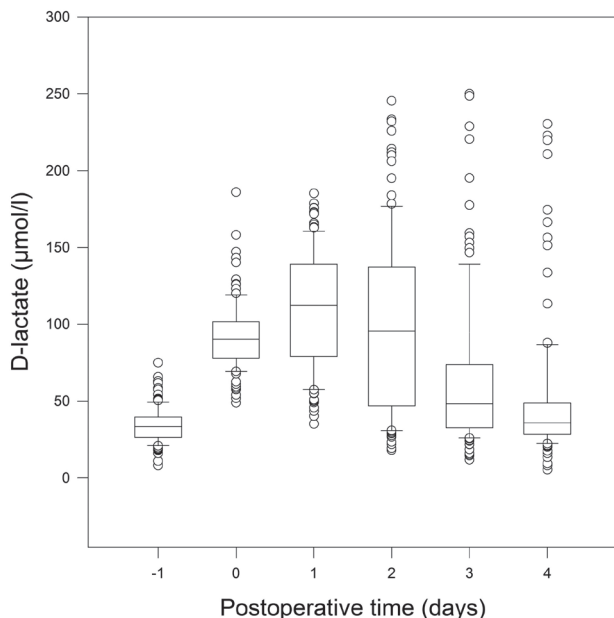


Fig. 4. The plasma concentrations of D-lactate in perioperative period

Diskuse

Byla zavedena a validována metoda pro stanovení plazmatického D-laktátu v krvi a moči z dostupných reagensů. Metoda splňuje požadované analytické znaky a může být využita jak pro diagnostiku pacientů se suspektní D-laktátovou acidózou, tak pro pacienty se syndromem krátkého střeva, diabetem nebo pro studium D-laktátu jako produktu detoxikace methylglyoxalu. Ultrafiltrace vzorků plazmy je nezbytná pro přítomnost interferujících látek ve vysokomolekulární frakci plazmy [14]. Tento postup poskytuje lepší výsledky ve srovnání s deproteinací plazmy pomocí kyseliny sulfosalicylové nebo jinými postupy vedoucími k naředění vzorku deproteinačním činidlem. Enzym D-laktátdehydrogenáza je vysoce specifický, a proto výsledky metody nejsou ovlivněny významnými interferencemi, jako například organickými kyselinami [14]. Úpravou postupu doporučeného výrobcem kitu pro potravinářské produkty bylo dosaženo výrazně lepší senzitivity, která umožňuje i měření nízkých fyziologických koncentrací. Podstatou této úpravy je zvýšení podílu ultrafiltrátu plazmy v reakční směsi. Jeho složení nenarušuje průběh použitých enzymatických reakcí.

Potenciální využití metody bylo demonstrováno v klinické studii. Bazální, předoperační hodnoty jsou zcela v souladu s publikovanými hodnotami [6, 14, 15]. V pooperačním období došlo k významnému vzestupu plazmatických koncentrací D-laktátu v důsledku poruchy bariérové a metabolické funkce enterocytů, která je následkem operační zátěže. Ve studovaném souboru bylo zaznamenáno dvanáct případů střevních komplikací. Hodnoty D-laktátu se však u těchto pacientů statisticky významně neliší od nekomplikovaných pacientů. Je to patrně způsobeno nízkou senzitivitou D-laktátu k ischemii střevní tkáně při standardní operaci karcinomu kolorekta a vykazuje dostatečnou senzitivitu i specifickou až u masivní ischemie při obstrukci a mesenterica [8, 9].

Závěr

Uvedená metoda může být vzhledem ke své dostupnosti, robustnosti i jednoduchosti snadno zavedena v biochemické laboratoři, kde se vyskytne požadavek na provádění tohoto vyšetření. Její analytické znaky splňují současné požadavky a dvouletá expirace enzymatické sestavy umožňuje dostupnost metody i při relativně nízké frekvenci požadavků na toto vyšetření jak z oblasti řešení výzkumných projektů, tak z oblasti péče o neobvyklé klinické stavy.

Literatura

- Kowlgi Gurukripa, N., Chhabra, L.** D-Lactic Acidosis: An Underrecognized Complication of Short Bowel Syndrome. *Gastroenterology Research Practice*, 2015, ID 476215, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/476215>
- Bongaerts, G., Tolboom, J., Naber, T., Bakkeren, J., Severijnen, R., Willems, H.** D-Lactic Acidemia and Aciduria in Pediatric and Adult Patients with Short Bowel Syndrome. *Clinical Chemistry*, 1995, 41, 1, p. 107-110.
- Mendu, D. R., Fleisher, M., McCash, S. I., Pessin, M. S., Ramanathan, L. V.** D-lactic acidosis mediated neuronal encephalopathy in acute lymphoblastic leukemia patient: an under diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 441, p. 90-91.
- Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M., Zello, G. A.** D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. *Journal of Nutrition*, 2005, 135, 7, p. 1619-1625.
- Lu, J., Zello, G. A., Randell, E., Adeli, K., Krahn, J., Meng, Q. H.** Closing the anion gap: Contribution of D-lactate to diabetic ketoacidosis. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412, 286-291.
- Scheijen, J. L. J. M., Hanssen, N. M. J., van de Waarenburg, M. P. H., Jonkers, D. M. A. E., Stehouwer, C. D. A., Schalkwijk, C. G.** L(+) and D(-) Lactate Are Increased in Plasma and Urine Samples of Type 2 Diabetes as Measured by a Simultaneous Quantification of L(+) and D(-) Lactate by Reversed-Phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Experimental Diabetes Research*, 2012, article ID 234812, doi: 10.1155/2012/234812.
- Kuwabara, K., Hagiwara, A., Matsuda, S., Fushimi, K., Ishikawa, K. B., Horiguchi, H., Fujimori, K.** A community-based comparison of trauma patient outcomes between D- and L-lactate fluids. *American Journal of Emergency Medicine*, 2013, Vol. 31, p. 206-214.
- Murray, M. J., Barbore, J. J., Cobb C. F.** Serum D(-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *Journal of Surgical Research*, 1993, 54, p. 507-509.
- Murray, M. J., Gonze, M. D., Nosák, L. R., Coby, C. F.** Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *The American Journal of Surgery*, 1994, 167, p. 575-578.
- Düzgün A. P., Gülgez, B., Özmutlu, A., Ertorul, D., Bugdayci, G., Akyürek, N., Coskun, F.** The Relationship Between Intestinal Hypoperfusion and Serum D-Lactate Levels During Experimental Intra-Abdominal Hypertension. *Digestive Disease and Sciences*, 2006, 51, p. 2400-2403.
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Friess, H.** Beyond Lactate: Is There a Role for Serum Lactate Measurement in Diagnosing Acute Mesenteric Ischemia? *Digestive Surgery*, 2012, 29, p. 226-235.

12. **Shi, H., Wu, B., Wan, J. Liu, W., Su, B.** The role of serum intestinal fatty acid binding protein levels and D-lactate levels in the diagnosis of acute intestinal ischemia. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2015, 39, 3, p. 373-378.
13. **Nielsen, C., Kirkegard, J., Erlandsen, E. J., Lindholt, J. S., Mortensen, F. V.** D-lactate is a valid biomarker of intestinal ischemia induced by abdominal compartment syndrome. *Journal of Surgical Research*, 2015, 194, 2, p. 400-404.
14. **Martí, R., Varela, E., Segura, R. M., Alegre, J., Surinach, J. M., Pascual, C.** Determination of D-lactate by enzymatic methods in biological fluids: study of interferences. *Clinical Chemistry*, 1997, 43, 6, p. 1010-1015.
15. **Haschke-Becher, E., Baumgartner, M., Bachmann, C.** Assay of D-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clinica Chimica Acta*, 2000, 298, p. 99-109.
16. **Sewell, A. C., Heil, M., Blieke, A., Mosandi, A., Böhles, H.** Rapid Enantiomeric Differentiation of Urinary Metabolites in a Patient with Bacterial Overgrowth Syndrome. *Clinical Chemistry*, 2000, 46, 9, p. 1444-1445.
Podpořeno grantem MZ ČR NT13 536-4/12.

Do redakce došlo 9. 7. 2015

*Adresa pro korespondenci:
MUDr. Radomír Hyšpler, Ph.D.
Centrum pro výzkum a vývoj,
Fakultní nemocnice Hradec Králové,
Sokolská 581, Hradec Králové
E-mail: rhyspler@lfhk.cuni.cz*