

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA KOLARIČ (TOPOLOVEC)

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA KOLARIČ (TOPOLOVEC)

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH TESTOV V DIAGNOSTIKI LAKTOZNE
INTOLERANCE IN MOŽNOST NJIHOVE UPORABE V KLINIČNI PRAKSI**

**COMPARISON OF DIFFERENT TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF LACTOSE
INTOLERANCE AND THE POSSIBILITY OF THEIR USE IN CLINICAL
PRACTICE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na fakulteti za farmacijo ter na Gastroenterološki kliniki v Kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju asist. dr. Radu Janši, dr. med., za vse strokovne nasvete, koristna navodila in ostalo pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala gre možu, hčerki in sinu ter mojim staršem za vse vzpodbudne besede, pomoč, podporo, potrpežljivost, ki so mi jo izkazali tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Rada Janše, dr. med.

Sara Kolarič (Topolovec)

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Marija Bogataj

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.

Somentor: doc. dr. Rado Janša

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	LAKTOZNA INTOLERANCA.....	7
1.1.1	Laktoza in encim laktaza	7
1.1.2	Znaki in simptomi	9
1.1.3	Oblike laktoznih intoleranc	10
1.1.3.1	Primarna laktozna intoleranca.....	10
1.1.3.2	Sekundarna laktozna intoleranca	10
1.1.3.3	Prirojena (kongenitalna) laktozna intoleranca	10
1.2	DIAGNOSTIKA.....	11
1.2.1	Direktna diagnostika	11
1.2.2	Indirektna diagnostika.....	11
1.2.3	Načini diagnosticiranja pomanjkanja disaharidazne aktivnosti	11
1.2.4	Dihalni testi	14
1.2.4.1	Opis postopka izvedbe dihalnih testov	14
1.2.4.2	TESTIRANJE VODIKA V IZDIHANEM ZRAKU	15
1.2.4.3	DIHALNI TEST Z UPORABO IZOTOPA ¹³ C	16
1.3	ZDRAVLJENJE	17
2	NAMEN DELA	18
3	MATERIALI IN METODE.....	20
3.1	Predstavitev skupine preiskovancev	20
3.2	Bazalni odvzem krvi in določitev koncentracije glukoze v krvi	21
3.3	Potek obremenitvenega laktoznega tolerančnega testa (OLLT)	22
3.4	Interpretacija laktoznega tolerančnega testa	22
3.5	Postopek izvedbe dihalnih testov	23
3.5.1	Opis zbiranja vzorcev	23
3.5.2	Analiza vzorcev izdihanega zraka	24
3.6	Opis izračuna parametrov ¹³C- dihalnega testa z laktozo.....	28
4	REZULTATI.....	32
4.1	Statistična analiza podatkov in interpretacija rezultatov testov	32
4.1.1	H ₂ - dihalni test	34

4.1.2	Laktozni tolerančni test (LTT).....	35
4.1.3	¹³ C- dihalni test	36
5	RAZPRAVA.....	37
5.1	Interpretacija rezultatov H ₂ - dihalnega testa z laktozo	37
5.2	Interpretacija rezultatov laktoznega tolerančnega testa (LTT)	41
5.3	Interpretacija rezultatov ¹³ C – dihalnega testa z laktozo	41
6	SKLEP	54
7	LITERATURA.....	57
8	PRILOGA.....	60

KAZALO SLIK

Slika 1: Metabolizem ogljikovih hidratov.	2
Slika 2: Bakterijska fermentacija neprebavljene laktoze v debelem črevesu. (5).....	4
Slika 3: Molekula disaharida laktoze.	7
Slika 4: Hidroliza disaharida laktoze s pomočjo encima laktaze na monosaharidni enoti, glukozo in galaktozo.	8
Slika 5: Splošno načelo neinvazivnih testov izdihanega zraka z uporabo ¹³ C označenih substratov. Bistveni pogoj za veljavnost preskusa je tesna povezava med interpretacijo ter in vivo metabolizmom. (10)	16
Slika 6: Postopek izvedbe dihalnih testov. (9).....	24
Slika 7: Princip ¹³ C dihalnega testa. Test temelji na merjenju obogatitve ogljika v ogljikovem dioksidu v izdihanem zraku po zaužitju testnega obroka (vsebuje snov, označeno s ¹³ C v eni ali več funkcionalnih skupin v molekuli). (9).....	25
Slika 8: Shematski diagram, ki prikazuje princip H ₂ - dihalnega testa. (12).....	26
Slika 9: Primer interpretacije negativnega/normalnega H ₂ - dihalnega testa (A) in primer interpretacije pozitivnega/patološkega H ₂ - dihalnega testa (B). (12).....	37
Slika 10: pojav simptomov med izvajanjem H ₂ dihalnega testa z odmerkom 25 g laktoze (HBT-25) in z odmerkom 12,5 g laktoze (HBT-12,5). (17)	48

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Razmerje med spoloma preiskovancev.	20
Graf 2: Število preiskovancev v posameznih starostnih razredih.	21
Graf 3: Vsebnost vodika [ppm] v odvisnosti od časa [min] pri posameznem preiskovancu (P).....	34
Graf 4: Koncentracija glukoze [mmol/L] v odvisnosti od časa [min] pri posameznem bolniku (pacientu).	35
Graf 5: Hitrost razgradnje označenega substrata v odvisnosti od časa [min].	36
Graf 6: Primer negativnega H ₂ - dihalnega testa. Ni povišane količine H ₂ in ni pojava značilnih simptomov. Razlaga: normalne ugotovitve.....	39
Graf 7: Primer pozitivnega H ₂ - dihalnega testa. Povišana količina H ₂ in prisotnost simptomov po zaužitju testnega odmerka laktoze. Razlaga: intoleranca črevesa za testno snov.	40
Graf 8: Število bolnikov s pozitivnim rezultatom pri dveh ali več uporabljenih metodah.	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Substrati, ki jih hidrolizirajo disaharidaze in nastali produkti.....	3
Preglednica II: Povzetek testov za laktozno malabsorpcijo in toleranco (3).....	13
Preglednica III: Kriteriji vrednosti koncentracije glukoze v krvi na tešče (ob času 0).....	22
Preglednica IV: Primer interpretacije laktoznega tolerančnega testa.	23
Preglednica V: Rezultati testov (pozitivno/negativno) za posameznega preiskovanca.	32
Preglednica VI: Bolniki s pozitivnim rezultatom pri posamezni metodi.....	33
Preglednica VII: Vsebnost vodika (H ₂) v izdihanem zraku, izmerjena v različnih časovnih intervalih pri 14 preiskovancih s pozitivnim/negativnim rezultatom testa.	34
Preglednica VIII: Koncentracija glukoze v krvi, izmerjene v različnih časovnih intervalih, pri preiskovancih s pozitivnim rezultatom testa.	35
Preglednica IX: Vsebnost izotopa ¹³ C v izdihanem zraku, izmerjena v različnih časovnih intervalih.	36
Preglednica X: Primerjava H ₂ dihalnih testov z dvema različnima odmerkoma laktoze. (17)	46
Preglednica XI: Pojav simptomov pri obremenitvi z odmerkom 12,5 g laktoze (pozitivni ali negativni rezultat testa) glede na izid testa z odmerkom 25 g laktoze. (povzeto po 17)	47
Preglednica XII: Tipi substratov, ki jih uporabljamo pri ¹³ C- dihalnem testu in njihove diagnostične presnovne posledice.....	49
Preglednica XIII: Rezultati ocenjevanja ¹³ C- dihalnih testov po padajoči skupni vrednosti (10 substratov, ki so pokazali največ potenciala za uvrstitev v vsakdanjo klinično prakso). (21).....	51
Preglednica XIV: Slepo testiranje laktozne tolerance z večkratnim odmerkom. (3).....	53

POVZETEK

Laktozna intoleranca ali laktozna netoleranca je nezmožnost oz. nesposobnost za prebavo laktoze, mlečnega sladkorja, ki ga najdemo v mleku in mlečnih izdelkih. Gre za presnovno motnjo, ki se pojavi bodisi zaradi zmanjšane aktivnosti bodisi zaradi odsotnosti encima laktaze v prebavnem sistemu. Encim laktazo (LCT) proizvajajo epitelne celice tankega črevesa in je odgovoren za razgradnjo disaharida laktoze na monomerni enoti glukozo in galaktozo. Laktaza je tako bistvena za prehrabeno hidrolizo laktoze v mleku.

Primanjkljaj encima povzroči laktozno netoleranco. To stanje razvije večina ljudi v odrasli dobi, kar je popolnoma normalno in celo prevladujoče v globalni človeški populaciji.

Laktozna intoleranca ni bolezen in ni smrtno nevarna, razen pri novorojenčkih, če ostane nediagnosticirana.

Ker ima s prebavo laktoze večje ali manjše težave kar večina svetovne populacije (približno 70%), se primarna laktozna intoleranca ne uvršča med bolezni, zato klinično diagnosticiranje ni potrebno. Za redke primere, ko je diagnosticiranje potrebno, je na voljo nekaj testov.

V okviru doplomske naloge smo pri preiskovancih z dokazano oz. potrjeno laktozno intoleranco primerjali učinkovitost treh metod za dokazovanje motenj v presnovi laktoze:

1. Določanje glukoze v krvi/laktozni tolerančni test
2. H₂ (vodikov)- dihalni test
3. ¹³C- dihalni test

Predvsem nas je zanimala diagnostična vrednost dihalnih testov, ki trenutno še ne dosega kriterijev za vključitev v rutinsko klinično uporabo. Kljub temu se pojavlja vedno več raziskav o razvijanju in izboljševanju dihalnih testov, kar je zelo pozitivno za njihovo nadaljnjo uporabo in vključitev v vsakdanjo klinično prakso. Vsekakor pa zaenkrat največjo težavo pri izvedbi predstavlja standardizacija. Z izboljšanjem le-te, imajo dihalni testi veliko možnosti za vključitev v rutinsko klinično uporabo.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo nato metode ocenili in ugotavljali, katera med njimi je najbolj primerna za diagnosticiranje laktozne intolerance. Po rezultatih sodeč je bil najučinkovitejši laktozni tolerančni test, saj je dal največ pozitivnih rezultatov (51,7 %), sledil mu je vodikov dihalni test (37,9 %) in ¹³C- dihalni test (27,6 %). Ocenili smo, da nobena od treh metod ni dala dovolj zanesljivih rezultatov, da bi lahko metode primerjali med seboj po učinkovitosti. Nobena od treh metod ni dovolj zanesljiva za vključitev v klinično prakso. Potrebne bi bile izboljšave predvsem v smislu standardizacije.

ABSTRACT

Lactose intolerance is the inability to digest lactose, the sugar found in milk and dairy products. It is a metabolic disorder, that occurs either due to reduced activity or absence of the enzyme lactase in the digestive system. Normally, the body is able to process milk and other dairy products thanks to the enzyme lactase in the intestines. Lactase enzyme (LCT) is produced by the epithelial cells of the small intestine and it is responsible for degradation of disaccharide lactose to glucose and galactose monomer. The deficit of the enzyme causes lactose intolerance. Most people develop this condition in adulthood, which is perfectly normal and even dominant in the global human population. Lactose intolerance is not a disease and is not life-threatening, except in newborns, if left undiagnosed. Since the digestion of lactose causes larger or smaller problems to most of the world's population (approximately 70 %), the primary lactose intolerance is not considered a disease, thus clinical diagnosis is not required. For the rare cases where the diagnosis required, there are a few tests available.

In the present study, we compared the efficacy of three methods for demonstrating disturbances in the metabolism of lactose in patients with confirmed lactose intolerance:

1. Lactose tolerance test
2. H₂ (Hydrogen)- Breath test
3. ¹³C- Breath test

We were mainly interested in the diagnostic value of breath tests, which currently do not meet criteria for inclusion in routine clinical practice. Nevertheless, intensive research is being conducted on the development and improvement of breath tests, raising hopes for their implementation in clinical practice. However, test standardization remains a problem. Based on the results of this comparative study, lactose tolerance test was the most effective, since it gave the most positive results (51.7%), followed by a hydrogen breath test (37.9%) and ¹³C breath test (27.6%). None of three methods give sufficiently reliable results to be compared by efficacy. None of three methods is reliable enough to be included in clinical practice. It would require improvements, especially in terms of standardization.

SEZNAM OKRAJŠAV

LCT- encim laktaza

LM- laktozna malabsorpcija

GIT- gastrointestinalni trakt

OH- ogljikovi hidrati

GI- gastrointestinalni

KLJUČNE BESEDE: metabolizem, laktozna intoleranca, dihalni test, diagnostična vrednost, klinična praksa.

KEY WORDS: metabolism, lactose intolerance, breath test, diagnostic value, clinical practice.

1 UVOD

Slaba (nepopolna) prebava laktoze in posledično intoleranca se pojavljata pri velikem delu svetovnega prebivalstva in vplivata na kakovost življenja posameznikov. Razširjenost motnje prebave laktoze se razlikuje v različnih delih sveta in zajema različne odstotke populacije. V Evropi se razširjenost povečuje proti jugu in vzhodu, v južni Italiji in Turčiji dosega tudi 70 % celotnega prebivalstva (19). Gre za presnovno motnjo, ki se pojavi zaradi zmanjšane aktivnosti ali odsotnosti encima laktaze (LCT) v prebavnem sistemu. Izraz laktozna intoleranca (netoleranca) ali hipolaktazija je definiran kot nesposobnost odraslih za prebavo laktoze oz. mlečnega sladkorja. Izraz se uporablja za normalno znižanje laktazne aktivnosti (na 5-10% normalne aktivnosti) pri odraslih.

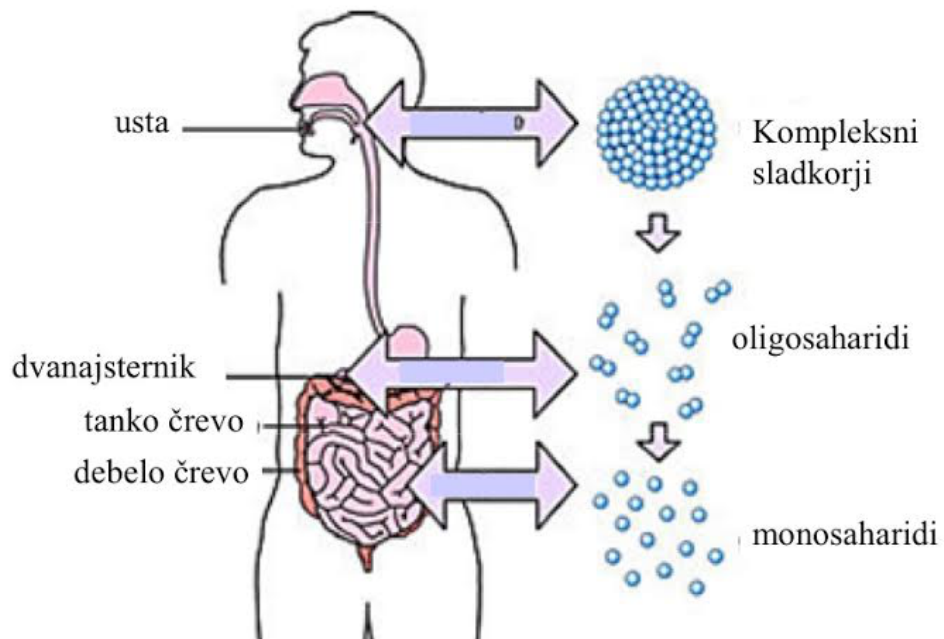
Laktozna malabsorpcija (LM) je pogosto bolezensko stanje, ki ga povzroči zmanjšano izražanje aktivnosti encima laktaze v tankem črevesu. Pri pacientih se to stanje izraža z različnimi trebušnimi simptomi (slabost, napihnjenost, bolečina, ...), ki nastopijo kot posledica zaužitja mlečnih izdelkov. Genetska osnova laktozne malabsorpcije je raziskana in na voljo je več različnih testov, vključno z genetskimi, endoskopskimi testi ter testi izdihanega zraka.

V primerjavi z laktozno malabsorpcijo pa je laktozna intoleranca slabše raziskana, in zato definirana kot motnja in ne bolezensko stanje. Ni smrtno nevarna, razen pri novorojenčkih, če ostane nediagnosticirana. Najpogostejši vzrok za laktozno intoleranco je pomanjkanje encima laktaze oz. zmanjšana proizvodnja encima laktaze v črevesnih resicah v tankem črevesu. Posamezniki s pomanjkanjem encima laktaze niso sposobni prebaviti disaharida laktoze na monosaharidne enote (na glukozo in galaktozo), zato po zaužitju laktoze pride do pojava različnih simptomov. Neprebavljena laktoza tako pride v debelo črevo, kjer jo metabolizirajo bakterije črevesne flore. Visoka osmotska obremenitev, ki jo povzroči laktoza v tankem črevesu, in pa bakterijski metaboliti, ki nastanejo po fermentaciji laktoze v debelem črevesu, imajo pomembno vlogo pri nastanku klasičnih simptomov laktozne intolerance, kot so diareja, napihnjenost, slabost, kruljenje in bolečine v trebušni votlini. Študije kažejo na to, da je tveganje za pojav simptomov laktozne intolerance po zaužitju laktoze odvisno od številnih dejavnikov kot so: odmerek laktoze, izražanje encima laktaze, stanje črevesne flore pri posamezniku in občutljivost gastrointestinalnega trakta (GIT). V

zadnjem času je bila laktozna intoleranca definirana kot pojav simptomov po zaužitju laktoze pri posameznikih z dokazano laktozno malabsorpcijo. Možnosti zdravljenja laktozne intolerance vključujejo dieto z zmanjšanim vnosom laktoze in encimsko nadomestitev (nadomestitev encima laktaze).

METABOLIZEM OGLJIKOVIH HIDRATOV

Ogljikovi hidrati (OH) predstavljajo za telo glavni eksogeni vir glukoze. Prehransko pomembni ogljikovi hidrati vsebujejo disaharide, ki so sestavljeni iz dveh kovalentno povezanih molekul sladkorja oz. iz dveh monosaharidov (1).



Slika 1: Metabolizem ogljikovih hidratov.

Splošno lahko proces prebave in absorpcije hranilnih snovi razdelimo v tri faze:

1. faza: raztapljanje in hidroliza beljakovin, maščob in ogljikovih hidratov iz zaužite hrane s pomočjo prebavnih encimov in žolča,
2. faza: absorpcija prebavljenih hranilnih snovi v epitelne celice tankega črevesa,
3. faza: transport hranilnih snovi preko limfne in portalne cirkulacije iz epitelnih celic do drugih delov telesa (1).

Pri človeku se prebava začne že v ustni votlini, kjer deluje encim alfa-amilaza, ki polisaharide (škrob, dekstrini) razgradi do enostavnih sladkorjev. Zadnji del cepitve di- in oligo-saharidov se izvrši pod vplivom površinskih encimov (disaharidaze, oligosaharidaze), ki jih izločajo celice sluznice tankega črevesa- enterociti (Slika 1). Tanko črevo je normalno neprepustno za disaharide. Potrebna je aktivnost črevesnih disaharidaz, ki disaharide razcepijo na monosaharidne komponente in tako omogočijo njihovo absorpcijo v tankem črevesu. Nastali monosaharidi se absorbirajo v kri v glavnem z aktivnim transportom preko enterocitov (1).

Encimi oz. encimski kompleksi za hidrolizo so štiri in jih s skupnim imenom imenujemo disaharidaze: laktaza, saharaza-izomaltaza, maltaza-glukoamilaza in trehalaza.

Preglednica I prikazuje substrat/-e, ki jih hidrolizirajo posamezni encimi in nastale monosaharidne produkte (4):

Preglednica I: Substrati, ki jih hidrolizirajo disaharidaze in nastali produkti.

Encim disaharidaza	Substrat/-i	Produkti
laktaza	laktoza (beta-1,4- vezava)	glukoza, galaktoza
saharaza-izomaltaza		
saharaza	saharoza (alfa-1,2- vezava) maltoza (alfa-1,4- vezava)	glukoza, fruktoza glukoza
izomaltaza	izomaltoza (alfa-1,6- vezava) maltoza (alfa-1,4- vezava)	glukoza glukoza
maltaza-glukoamilaza	maltoza (alfa-1,4- vezava)	glukoza
trehalaza	trehaloza (alfa-1,1- vezava)	glukoza

Disaharidaze so encimi, locirani na enterocitih ščetkaste membrane tankega črevesja.

Njihova funkcija je hidroliza disaharidov v monosaharide.

Od vseh prehrabnih sladkorjev se laktoza najpočasneje hidrolizira.

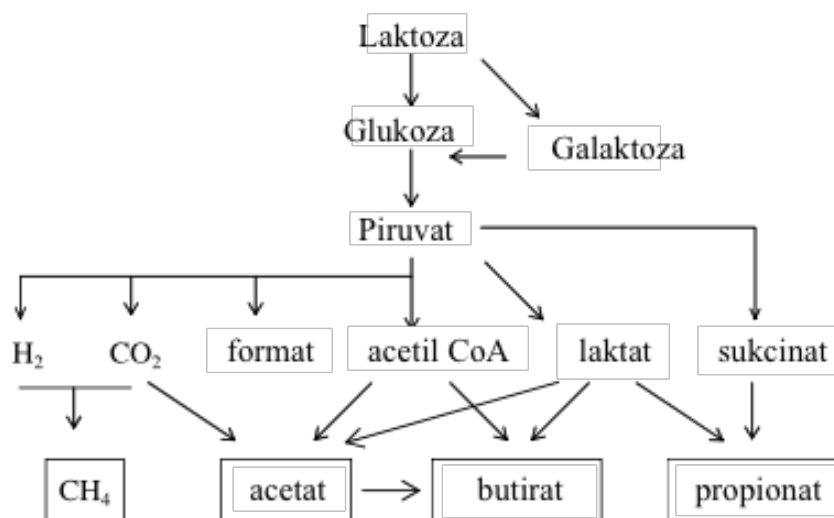
➤ Motnje v metabolizmu in absorpciji ogljikovih hidratov

Ogljikovi hidrati se absorbirajo v glavnem z aktivnim transportom, in sicer v obliki monosaharidov (1).

Disaharidaze so encimi, locirani na ščetkasti membrani tankega črevesa, ki hidrolizirajo disaharide v monosaharidne enote in imajo tako pomembno vlogo pri absorpciji ogljikovih hidratov (1).

Zmanjšana ali odsotna aktivnost enega ali več teh encimov v črevesni sluznici lahko privede do nezmožnosti posameznika za prebavo hrane v črevesju. Posledično pride do malabsorpcije ogljikovih hidratov, torej do nezmožnosti absorpcije hranilnih snovi, ki so bile prebavljene iz hrane skozi črevesje. Neprebavljeni disaharidi povzročajo v organizmu osmotsko obremenitev. Pride do kopičenja (privlaka) vode in elektrolitov v črevesju, kar povzroči vodeno diarejo. V debelem črevesu poteka bakterijska fermentacija ogljikovih hidratov in produkt le-te je nastanek plinov, zaradi katerih pride do čezmernega napenjanja, napihnjenosti in bolečin v trebuhu.

Bakterije debelega črevesa fermentirajo ogljikove hidrate, pri čemer nastajajo kratkoverižne maščobne kisline (v glavnem acetati, propionati in butirati) in plini (vodik, ogljikov dioksid, metan) (1) (Slika 2).



Slika 2: Bakterijska fermentacija neprebavljene laktoze v debelem črevesu. (5)

Ko zaradi slabe laktazne aktivnosti tanko črevo ni sposobno hidrolizirati vse zaužite laktoze, slabo prebavljena laktoza vstopi v debelo črevo, kjer jo fermentirajo bakterije debelega črevesa. Končni metaboliti bakterijske fermentacije laktoze so kratkoverižne maščobne kisline (v glavnem acetati, propionati in butirati) in plini (vodik, ogljikov dioksid in metan). Vmes nastanejo nekateri intermedii, ki se nadalje metabolizirajo do kratkoverižnih maščobnih kislin, ki pa se iz kolona izločijo po naslednjih poteh: absorpcija skozi debelo črevo, uporaba s strani kolonocitov, vključitev v bakterijsko maso (rast bakterij), izločanje v feces.

Nastali plini se delno absorbirajo iz črevesja v kri in se nato izločijo skozi pljuča ali iz njih nastajajo drugi metaboliti. Kratkoverižne maščobne kisline in plini se iz debelega črevesa hitro absorbirajo.

Podatki, ki kažejo na vpletenost metabolizma debelega črevesa pri laktozni intoleranci:

- bakterije kolona fermentirajo slabo prebavljeno laktozo,
- posamezniki, ki slabo prebavljajo laktozo in imajo podoben čas prehoda zaužite hrane skozi črevesje (OCTT- Orocecal Transit Time) in podobno stopnjo prebave laktoze v tankem črevesu, razvijejo simptome različne intenzitete (resnosti),
- prilagoditev na dolgoročno uživanje laktoze pri posameznikih, ki slabo prebavljajo laktozo, je lahko povezana z bakterijsko prilagoditvijo in posledično prilagoditvijo funkcije kolona,
- velik vpliv na pojav simptomov ima tudi uporaba antibiotikov, ki vplivajo na bakterijsko ravnovesje črevesne flore. 10-dnevna terapija pri posameznikih z laktozno intoleranco je zmanjšala prisotnost vodika v izdihanem zraku, prav tako pa tudi pojav simptomov. Z antibiotiki povezana diareja: zmanjšanje vsebnosti (količine) črevesnih bakterij vodi v nepopolno fermentacijo slabo prebavljenih OH v kolonu, kar vodi do pojava osmotske in sekretorne diareje,
- fekalne bakterije pacientov z laktozno intoleranco, in vitro inkubirane z laktozo, proizvedejo hitreje in več laktata, acetata, propionata in butirata kot tiste od pacientov z laktozno toleranco, ki samo slabo prebavljajo laktozo (5).

➤ Nepravilna aktivnost disaharidaz

Pomanjkanje disaharidazne aktivnosti lahko dokazano povzroči simptome pri odraslih in otrocih. Karakteriziramo lahko različne tipe primanjkljaja disaharidaz.

Disaharidazni primanjkljaj je lahko primaren (prirojen), pridobljen ali sekundaren. Pridobljena oblika pomanjkanja disaharidaz je najpogostejša oblika intolerance ogljikovih hidratov (1).

Sekundarni primanjkljaj nastane kot posledica poškodbe sluznice tankega črevesja, akutne črevesne infekcije (okužbe), ... Po okrevanju od osnovne bolezni se aktivnost encimov lahko obnovi (1).

Nizka disaharidazna aktivnost, kjer so histološke preiskave normalne, nakazuje na prirojene ali pridobljene pomanjkljivosti. Če je v histoloških preiskavah prisotna nenormalnost, je primanjkljaj sekundarne narave.

➤ Genetsko ozadje odsotnosti encima laktaze

Aktivnost encima laktaze se spreminja z razvojem posameznika. Pri večini ljudi doseže laktazna aktivnost svoj maksimum v času pozne nosečnosti. Po drugem, tretjem letu otrokove starosti se aktivnost laktaze začne postopno zmanjševati in doseže stabilno nizko raven/stopnjo v obdobju med petim in desetim letom starosti.

Kljub temu delež človeške populacije (zlasti belci, živeči na območju severne Evrope) ohrani dokaj visoko raven laktazne aktivnosti tudi v odrasli dobi.

Tako prisotnost kot odsotnost dejavnosti laktaze sta normalna človeška fenotipa.

Razširjenost prisotnosti encima laktaze je višja v večini regij Skandinavije, na britanskem otočju in v Nemčiji (80 - 95 %). Po drugi strani pa prisotnost laktaze opazimo pri samo 20 - 40 % odraslih Indijcih, 30 % Mehičanov, 30 % Afroameričanov in pri manj kot 10 % odraslih ljudi v jugovzhodni Aziji. Stopnjo prisotnosti laktaze v zadnjih časih povezujejo z razvojem kmetijstva skozi zadnjih 10000 let (3).

➤ Ugotavljanje aktivnosti disaharidaz- metodologija

Sluznico tankega črevesa, ki jo dobijo z biopsijo, homogenizirajo v pufru in jo nato inkubirajo s substratom disaharida (laktoza, saharoza, maltoza, palatinoza) v štirih ločenih reakcijah.

Disaharidaze iz sluznice katalizirajo hidrolizo disaharidov v monosaharide, vključno z monosaharidom glukozo. Po končani reakciji hidrolize izmerimo sproščeno glukozo, prav tako pa tudi celotno proteinsko koncentracijo homogenata. Aktivnost vsakega encima podajamo v $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ proteina.

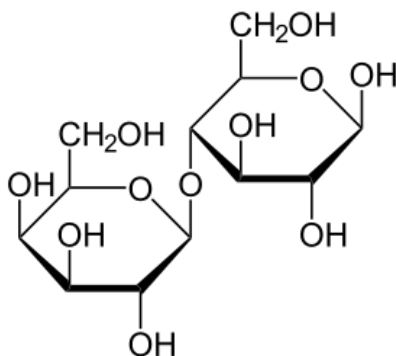
1.1 LAKTOZNA INTOLERANCA

1.1.1 Laktoza in encim laktaza

Laktoza ali mlečni sladkor spada v skupino ogljikovih hidratov in za človeško telo predstavlja pomemben vir energije. Sploh v prvem letu človekovega življenja predstavlja najpomembnejši vir energije, saj za dojenčka zagotavlja skoraj polovico celotne potrebe po energiji (3). Kemijsko je disaharid, sestavljen iz dveh monosaharidnih enot, glukoze in galaktoze, z empirično formulo $C_{12}H_{22}O_{11}$ ter molekulsko maso 342,296 g/mol. Glukoza in galaktoza sta povezani z β 1-4 glikozidno vezjo.

Laktoza (Slika 3) predstavlja glavni ogljikov hidrat v mleku sesalcev (človeško mleko vsebuje povprečno 7 % laktoze, medtem ko goveje povprečno 4-8 %), z izjemo nekaj plavutonožcev, kot so morski levi (3). V hrani se tako nahaja v glavnem v mleku in mlečnih izdelkih, kot aditiv (dodatek) pa je lahko dodana tudi v številna druga živila. Je tudi ena pogostih komponent v zdravilih, kjer služi kot pomožna snov. Zdi se, da spodbuja absorpcijo kalcija, fosfata, magnezija in mangana pri živalih in ljudeh (3).

V telesu se razgradi v prebavnem traktu s pomočjo encima laktaze, le tako se lahko absorbira.



Slika 3: Molekula disaharida laktoze.

Laktaza ali β -D-galaktozidaza (okrajšano LCT) je encim, ki ga najdemo v številnih organizmih. Tako pri ljudeh kot pri drugih sesalcih se nahaja na ščetksti membrani tankega črevesa. Spada v β -galaktozidazno družino encimov in je bistvenega pomena za prebavo

polnomastnega mleka. Njegova naloga je razgradnja oz. hidroliza laktoze (mlečnega sladkorja) na osnovni monosaharidni enoti, glukozo in galaktozo (Slika 4).

Kemijsko spada laktaza med disaharidaze. To so glikozidne hidrolaze, encimi, ki razgrajujejo disaharide v enostavne sladkorje oz. monosaharide. V skupino disaharidaz spadajo naslednji encimi: laktaza, maltaza (glukoamilaza), saharaza- izomaltaza in trehalaza. Omenjeni encimi izvajajo hidrolitične aktivnosti, ki potekajo na enterocitih "ščetkaste membrane" tankega črevesa. Ti encimi "ščetkaste membrane" niso prosto gibljivi v črevesnem lumnu, temveč so pripeti kot integralni membranski proteini v plazemski membrani enterocitov.

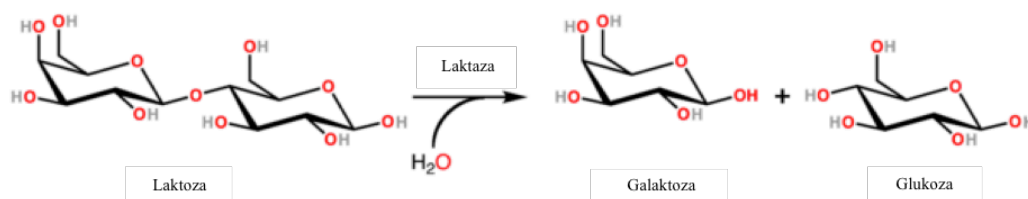
Enterociti ali črevesne absorptivne celice (celice sluznice tankega črevesja, površinske absorpcijske celice) so preproste visokoprizmatske epitelne celice in tvorijo površino črevesnih resic. Najdemo jih v tankem črevesu, v debelem črevesu oz. kolonu in v slepem izrastku črevesja oz. slepiču (1).

Genetska okvara katerega od disaharidaznih encimov je vzrok za disaharidazno intoleranco.

Primankljaj encima povzroči nepopolno prebavo mlečnega sladkorja. Pri nekaterih ljudeh se delovanje encima laktaze zmanjša do te mere, da človeku povzroča črevesne težave.

Zdravniki tovrstne simptome največkrat označijo za bolezen laktozne intolerance.

Encim laktazo je mogoče kupiti v obliki prehranskega dopolnila, dodaja se mleku pri proizvodnji mlečnih izdelkov brez laktoze.



Slika 4: Hidroliza disaharida laktoze s pomočjo encima laktaze na monosaharidni enoti, glukozo in galaktozo.

1.1.2 Znaki in simptomi

Simptomi laktozne intolerance se običajno razvijejo nekaj ur po zaužitju mlečnih izdelkov in lahko vključujejo:

- napihnjenost
- krče in bolečine v predelu trebuha,
- diarejo,
- slabost,
- bruhanje,
- kruljenje (1).

Pri poročanju posameznikov o simptomih imajo poleg slabe prebave laktoze velik vpliv tudi psihološki faktorji in funkcionalne bolezni prebavil posameznika. Vzroki za pojav simptomov so relativno slabo raziskani. Prav tako še vedno niso jasni mehanizmi, preko katerih slaba prebava laktoze povzroča omenjene simptome. Poleg nizke laktazne aktivnosti v tankem črevesu so številni faktorji, ki sodelujejo pri razvoju in pojavu simptomov. Ti faktorji so: količina zaužite laktoze, prehod skozi gastrointestinalni trakt, spol, starost, nosečnost ter številni drugi (3).

Izrazitost simptomov je odvisna od stopnje pomanjkanja encima laktaze.

Prisotnost/odsotnost pojava simptomov pri izvajanju dihalnih testov ima velik pomen za postavitev diagnoze. Pozitivni rezultat testa ob prisotnosti simptomov potrjuje laktozno intoleranco, medtem ko pozitiven rezultat testa brez prisotnosti simptomov potrjuje laktozno malabsorpcijo.

Obstajajo številne študije, ki poročajo o povezavi med simptomi, razvitimi po zaužitju testnega odmerka laktoze in rezultati dihalnih testov (7, 18, 19).

1.1.3 Oblike laktoznih intoleranc

Dojenčki so sposobni prebavljati laktozo, ker njihova telesa proizvajajo encim laktazo. S staranjem se produkcija laktaze zmanjšuje oz. izzveni, tako odrasli izgubijo sposobnost prebave laktoze. Glede na genetiko, vzrok in čas, ko zbolimo za laktozno intoleranco, ločimo tri vrste laktozne intolerance: primarna, sekundarna in prirojena (kongenitalna) (1).

1.1.3.1 Primarna laktozna intoleranca

Je motnja, ki se pojavi kmalu po obdobju dojenja in je najpogostejša oblika laktozne intolerance. Najbolj izrazita in razširjena je v okoljih, kjer nimajo tradicije mlekarstva oz. ljudje uživajo zelo malo ali nič mleka in mlečnih izdelkov.

1.1.3.2 Sekundarna laktozna intoleranca

Nastane kot posledica bolezni, ki poškodujejo črevesni epitelij (npr. celiakija, bakterijske in virusne okužbe črevesja, ulkusna bolezen, Chronova bolezen, gastritis...), strupov/zdravil, operacij na črevesju in drugih dejavnikov, ki prizadanejo epiteljske celice črevesja in s tem normalno izločanje in delovanje encima laktaze.

1.1.3.3 Prirojena (kongenitalna) laktozna intoleranca

Obstajata dve vrsti kongenitalne laktozne intolerance, ki imata enake simptome.

Kongenitalna laktozna intoleranca (CLD) se deduje avtosomno recesivno in je prisotna od rojstva. Do te oblike laktozne intolerance pride, ko otrok podeduje dve kopiji okvarjenega gena od obeh staršev. S tem je novorojenčku onemogočena sinteza laktaze, kar povzroča hudo drisko, bruhanje in dehidracijo, bolečine v trebuhu, poškodbe jeter, nastanek sive mreže. Simptomi so prisotni takoj po rojstvu. Včasih so zaradi te nepravilnosti dojenčki običajno umrli, danes pa so na voljo prehranske formule brez laktoze, ki dojenčkom zagotavljajo normalno prehranjenost. Po obdobju dojenja oz. obdobju uživanja brezlaktoznih formul imajo otroci s prirojeno laktozno intoleranco običajno enake potrebe kot ljudje s sekundarno intoleranco. Druga vrsta kongenitalne laktozne intolerance (FLD = Familial Lactase Deficiency) je posledica okvarjenega proteina encima laktaze. Za razliko od CLD se pri FLD encim laktaze normalno proizvaja, vendar pa je encim nefunkcionalen in neučinkovit.

1.2 DIAGNOSTIKA

Ker ima s prebavo laktoze večje ali manjše težave kar večina svetovne populacije (približno 70 %), primarne laktozne intolerance ne uvrščamo med bolezni in klinično diagnosticiranje običajno ni potrebno. Za redke primere, ko je diagnosticiranje potrebno, pa je na voljo nekaj testov. Obstajajo direktna metoda in indirektna metode.

1.2.1 Direktna diagnostika

Opravi se biopsija sluznice srednjega dela tankega črevesa (jejunum). Nato se neposredno določi količina oz. aktivnost encima laktaze. Metoda lahko predstavlja referenčni standard in ima to prednost, da lahko izključi druge pogoje, ki vodijo v pojav sekundarne laktozne malabsorpcije (npr. celiakija). Metoda je zelo draga, uporabljamo jo večinoma le v raziskovalne namene (4).

1.2.2 Indirektna diagnostika

Najpogosteje uporabljan test je test izdihanega vodika oz. vodikov dihalni test. Neprebavljeno laktozo, ki pride v črevesje, presnavljajo črevesne bakterije, pri čemer nastajajo plini vodik, ogljikov dioksid in metan. Vodik prehaja v kri in se izloča skozi pljuča. Po zaužitju določene količine laktoze, ki mora biti večja od še tolerirane (npr. 50 g), jemljemo vzorce izdihanega zraka, ki jih nato analiziramo (8). Bakterijska fermentacija je edini vir molekularnega vodika v telesu. Na podlagi tega dejstva test pokaže sposobnost prebavljanja laktoze: več vodika v izdihanem zraku, slabša je sposobnost prebavljanja laktoze.

1.2.3 Načini diagnosticiranja pomanjkanja disaharidazne aktivnosti

- Oralni laktozni tolerančni test

Metoda po Holzel-u (1959) za prikaz laktozne malabsorpcije se uporablja tudi za prikazovanje (ponazoritev) absorpcije ostalih disaharidov. Po zaužitju laktoze pride do dviga nivoja glukoze v krvi. Po zaužitju 50 g disaharida se pri normalnih (zdravih) osebah krvni sladkor poveča za najmanj 20 mg/100 ml čez normalno raven na tešče. Pri pacientih z disaharidazno pomanjkljivostjo je prirastek krvnega sladkorja ponavadi manjši kot 20 mg/100 ml. Ta diagnostična metoda je izredno

natančna, kljub neznanim spremenljivkam, kot so hitrost praznjenja želodca, stopnja absorpcije monosaharidov in očistek glukoze iz krvi (4).

Natančna študija o vrednotenju tolerančnih testov (McGill in Newcomer) je pokazala pravilno napoved absorpcije ali malabsorpcije v 80 % obravnavanih primerov. Do lažno pozitivnih rezultatov pride najbolj verjetno, če uporabljamo vensko kri, lažno negativni rezultati pa se lahko pojavijo pri uporabi kapilarne krvi. Pri otrocih odmerki disaharidaze prilagodimo na kg telesne teže pri odraslih pa vrednosti glede na telesno težo ne variirajo (4).

- Radiološki test

Malabsorpcijo disaharidov lahko prikažemo z rentgensko sliko trebušne votline, ki jo opravimo eno uro po zaužitju mešanice približno 120 ml barijevega sulfata (Micropaque) in 25 g disaharida. Če se disaharid prosto absorbira, se rentgenska slika ne razlikuje od tiste, ki smo jo posneli, ko je bolnik zaužil samo suspenzijo barijevega sulfata (Micropaque) brez disaharida (4).

Barijev sulfat je anorganska spojina, brez vonja in je netopna v vodi. Gre za belo kristalinično snov, ki ga v obliki suspenzije pogosto uporabljamo v klinične namene kot rentgensko kontrastno sredstvo. Najpogosteje ga uporabljamo pri radioloških preiskavah gastrointestinalnega trakta (4).

Opisani test je enako natančen kot tolerančni test (Laws, Spencer and Neale, 1967).

MICROPAQUE: barijev sulfat je naveden kot aktivna učinkovina v naslednjih državah: Avstrija, Belgija, Švica, Češka, Francija, Nemčija, Grčija, Madžrska, Luksemburg, Slovenija, Tunizija (4).

- Merjenje disaharidazne aktivnosti enterocitov
- Genetski testi
- Ostali testi (testi blata - pri dojenčkih in majhnih otrocih, pri katerih drug testi niso izvedljivi; testi urina) (4).

Povzetek testov za diagnosticiranje laktozne malabsorpcije in intolerance navaja

Preglednica II.

Preglednica II: Povzetek testov za laktozno malabsorpcijo in toleranco (3).

	H₂- dihalni test	Laktozni tolerančni test	Genetski testi	Laktazna aktivnost na ščetkasti membrani
Načelo preskusa	porast vodika v izdihanem zraku po izzivu obremenitve z laktozo	porast krvnega sladkorja po izzivu obremenitve z laktozo	genski polimorfizem	encimska aktivnost encima laktaze v biopsiji vzorca
Mejna vrednost	>20 ppm znotraj 3 ur	<1.1 mmol/L znotraj 3 ur		<17-20 IU/g
Dostopnost za testiranje	dobra	odlična	spremenljiva	redka
Lažno pozitivno (nepravilno diagnosticirana malabsorpcija)	Hiter GI- prehod, bakterijsko zaraščanje tankega črevesa.	Hiter GI- prehod, oslABLJena toleranca glukoze.	Redko pri belcih (<5%)	Redko verjetno
Lažno negativno (neupravičeno izključena malabsorpcija)	Ni produkcije H ₂ . Popolna prilagoditev debelega črevesa.	Nihanja krvnega sladkorja.	Vsi vzroki sekundarne laktozne malabsorpcije.	Neenotno izražanje encima.
Sekundarni vzroki	ne moremo jih izključiti	ne moremo jih izključiti	ne moremo jih izključiti	lahko jih izključimo (histopatologija dobljena po enakem postopku)
Ocena laktozne tolerance	mogoča	mogoča	ni mogoča	ni mogoča
Komentar	Metoda izbire za oceno laktozne malabsorpcije in tolerance.	Redko izvajana zaradi slabše občutljivosti in specifičnosti.	Dokončni test za neprisotnost laktaze pri belcih. Manj primeren pri ostalih populacijah. Neprimeren pri bolnikih s črevesnimi obolenji, zaradi katerih jim grozi sekundarno pomanjkanje laktaze.	Referenčni standard za odkrivanje pomanjkanja laktaze (primarno ali sekundarno).
Cena	nizka	najnižja	visoka	najvišja

1.2.4 Dihalni testi

Uporaba dihalnih testov v medicini:

- za preiskovanje hlapnih organskih in anorganskih spojin v izdihanem zraku
- za oceno encimske oziroma metabolne funkcije
- za določitev diagnoze bolezni
- za spremljanje napredovanja bolezni in učinkovitosti terapije

Dihalni testi so lahko kvalitativni in kvantitativni. Kvalitativni podajo informacijo o prisotnosti bolezni, kvantitativni pa informacijo o resnosti bolezni. Razlikujejo se tudi glede na število odvzetih vzorcev izdihanega zraka, glede na čas izvedbe, glede na čas, ki poteče med odvzetimi zaporednimi vzorci, in glede na metodo merjenja izotopske sestave.

1.2.4.1 Opis postopka izvedbe dihalnih testov

Pred izvedbo testa mora biti preiskovanec tešč 12 ur, najbolje preko noči. Med izvajanjem samega testa mora mirovati, ne sme kaditi, pije lahko samo negazirano vodo. S tem se izognemo hiperventilaciji, ki bi lahko vodila do napačne interpretacije rezultatov testa, prav tako bi CO₂ raztopljen v vodi lahko vplival na količino izdihanega ogljikovega dioksida in posledično na rezultate testa (8).

Preiskovanec mora najmanj teden dni pred izvedbo testa prenehati z jemanjem zdravil, ki bi lahko imela vpliv na rezultate testa. Vsa navedena navodila je potrebno natančno upoštevati, saj lahko vsaka nedoslednost pri izvedbi testa vodi do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov.

Prvi vzorec izdihanega zraka odvezamemo pred zaužitjem testnega obroka, se pravi ob času 0. Namenjen je določitvi osnovne bazalne linije, ki nam pove, koliko je naravno prisotnega ¹³CO₂ v izdihanem zraku. Preiskovanec enakomerno in počasi pihne skozi slamico v epruveto toliko zraka, da se epruveta orosi in jo takoj zamaši. Nato zaužije standardizirani testni obrok (tekoči ali trdni, odvisno od zelene preiskave). Nadaljnji odvzem vzorcev nato poteka po enakem postopku, ponavadi v časovnem razmaku 15 oz. 30 minut. Število vzorcev izdihanega zraka je odvisno od posamezne preiskave.

1.2.4.2 TESTIRANJE VODIKA V IZDIHANEM ZRAKU

Vodikov (H_2) dihalni test se v klinični praksi že več kot 30 let uporablja za diagnosticiranje pomanjkanja encima laktaze. Ta test izkorišča dejstvo, da normalna črevesna flora metabolizira laktozo v vodik (H_2) in v kratkoverižne maščobne kisline. Z difuzijo skozi črevesno steno doseže vodik splahnčni venski obtok, od koder se transportira naprej skozi portalni sistem do jeter in v sistemski krvni obtok ter se sčasoma izdiha skozi pljuča. Edini vir vodika v izdihanem zraku je posledica bakterijske fermentacije v črevesju. Na podlagi občutljivosti in specifičnosti povišanja koncentracije vodika v izdihanem zraku, potem sklepamo na laktozno intoleranco. Gre za enostaven, neinvazivni test. Medtem ko H_2 - dihalni test velja za 'zlati standard' med neinvazivnimi testi za odkrivanje laktozne intolerance, so informacije o občutljivosti in specifičnosti simptomov, ki se razvijejo kot odgovor na zaužitje določene količine laktoze, še vedno omejene. Zdravniki ga uporabljajo tudi za testiranje na izdihan metan, saj mnoge študije kažejo na to, da nekateri posamezniki (35 % ali več) ne proizvajajo vodika, temveč metan, nekateri kombinacijo obeh plinov, so pa tudi taki, katerih organizem ne proizvaja nobenega od teh dveh plinov. Povišanje koncentracije vodika in/ali metana v izdihanem zraku po zaužitju specifičnega ogljikovega hidrata kaže na to, da ni prišlo do popolne absorpcije sladkorja.

Testiranja potekajo v bolnišnicah in v kliničnih centrih. Lahko jih izvajamo ob različnem času v dnevu, najpogosteje se izvajajo na tešče zjutraj. Bolniki pred testiranjem dobijo natančna navodila o postu, uporabi zdravil ali dodatkov ter drugih življenjskih navadah (kajenje, telesna aktivnost, ...), ki se jih morajo držati. Sam postopek izvajanja testa se med posameznimi zdravstvenimi ustanovami lahko rahlo razlikuje, v glavnem pa je postopek naslednji:

- odvzem vzorca izdihanega zraka
- zaužitje testnega odmerka, ki vsebuje ogljikov hidrat, ki ga preizkušamo
- odvzem vzorcev izdihanega zraka v intervalu 15-20 minut v obdobju 3 ur
- poročanje o morebitnih simptomih po zaužitem testnem obroku (napihnenost, bolečina, diareja).

1.2.4.3 DIHALNI TEST Z UPORABO IZOTOPA ^{13}C

^{13}C dihalni testi predstavljajo neinvazivno diagnostično sredstvo in se uporabljajo v znanstvenih in kliničnih preiskavah številnih fizioloških in patofizioloških procesov. Temeljijo na merjenju obogatitve ogljika v izdihanem zraku ogljikovega dioksida po zaužitju testnega obroka, ki vsebuje označen ^{13}C v specifični funkcionalni skupini molekule. Običajno je v naravi del ogljika v obliki neradioaktivnega izotopa ^{12}C . To vrednost izmerimo kot bazično vrednost. Če v črevesju pride do razgradnje laktoze, se ^{13}C ogljik vgradi v CO_2 in tega potem izdihamo. Zato izraz obogatitev ogljika.

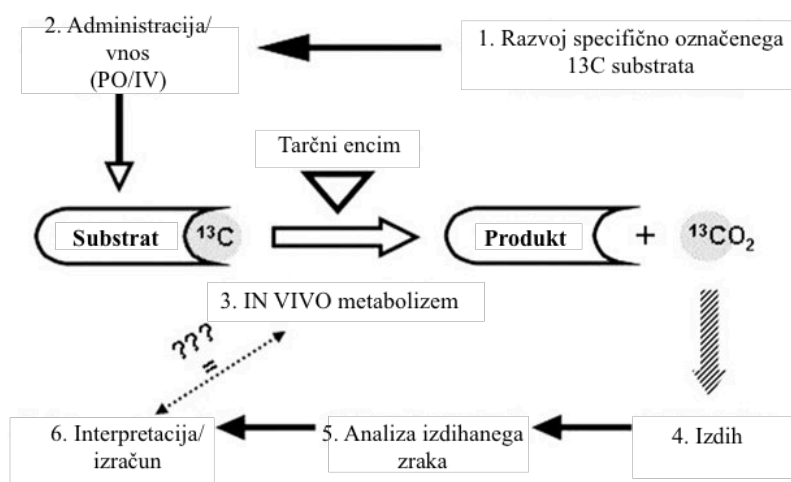
Uporabljamo jih za določitev diagnoze bolezni, za oceno metabolne funkcije, spremljanje napredovanja bolezni in učinkovitosti terapije.

Prvotno so pri dihalnih testih uporabljali ogljikov izotop 14, ki je radioaktiven, zato je bila uporaba pri nosečnicah in otrocih strogo prepovedana. Danes je v uporabi neradioaktivni ogljikov izotop 13, ki je z vidika radioaktivnih učinkov povsem nenevaren in je primeren tudi za uporabo pri otrocih, nosečnicah in doječih materah (9).

^{13}C se v izdihanem zraku lahko meri z nedisperzivno infrardečo spektrometrijo in z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (Slika 5).

Kljub njihovi široki uporabi v kliničnih preiskavah pa še večina dihalnih testov ni del klinične prakse. Njihova pomanjkljivost je predvsem v standardizaciji obrokov in izotopov med posameznimi laboratoriji, zaradi česar pride do različnih rezultatov preiskav.

Interpretacija le-teh pa je odvisna od posamezne ustanove, ki preiskavo izvaja.



Slika 5: Splošno načelo neinvazivnih testov izdihanega zraka z uporabo ^{13}C označenih substratov. Bistveni pogoj za veljavnost preskusa je tesna povezava med interpretacijo ter in vivo metabolizmom. (10)

1.3 ZDRAVLJENJE

Namen zdravljenja laktozne intolerance je, da je usmerjeno v izboljševanje prebavnih simptomov, ne pa v zmanjševanje malabsorpcije laktoze. Prav tako je priporočljivo zmanjšati vnos laktoze, ne pa ga povsem izključiti (3).

V slepi študiji so dokazali, da lahko večina bolnikov, ki so samoporočali o laktozni intoleranci, zaužije vsaj 12 g laktoze (kar je ekvivalentno 250 ml mleka) dnevno, brez da bi se pojavili simptomi. Pri zaužitju laktoze skupaj z drugimi živili pa je tolerirana meja celo do 18 g laktoze dnevno (3).

Prav tako je potrebno poudariti, da količina laktoze, ki je prisotna v tabletah (< 500mg), zelo malo verjetno povzroči GI težave pod kakršnimikoli pogoji.

Opazovalne študije poročajo o izboljšanju trebušnih težav po omejitvi vnosa laktoze pri do 85 % bolnikih z IBS (IBS- Irritable Bowel Syndrom ali sindrom razdražljivega črevesa) z laktozno malabsorpcijo. Randomizirana kontrolirana preizkušanja pa niso ugotovila signifikantnih izboljšav pri prehranskih ali encimsko nadomestnih zdravljenjih. Vzrok za pomanjkanje učinkovitosti teh preizkušanj je lahko, ker je laktoza le eden izmed mnogih slabo prebavljivih, fermentirajočih ogljikovih hidratov in dietnih vlaken v prehrani. Zato celo pri bolnikih s pomanjkanjem encima laktaze omejitev vnosa laktoze redko zagotovi popolno olajšanje simptomov.

Ena izmed možnosti zdravljenja laktozne intolerance je uvedba eliminacijske oz. izločitvene diete, kjer iz prehrane izločijo hitro fermentirajoče oligo-, di-, monosaharide in poliole (sladkorne alkohole). Številne raziskave v zadnjih letih kažejo na to, da gre za enega najbolj učinkovitih načinov za odpravljanje simptomov razdražljivega črevesa.

Druga izmed možnosti je nadomestitev encima laktaze, vendar pri tem pride do spremembe okusa same hrane. Pri prebavi laktoze proizvedeni glukoza in galaktoza sta slajši od prvotnega sladkorja.

Ena izmed strategij vključuje probiotike, ki spremenijo črevesno floro, in ima lahko pozitivne učinke pri bolnikih s ponavljajočimi se prebavnimi motnjami (6).

2 NAMEN DELA

Glede na velik obseg motenj v absorpciji hranilnih snovi smo poskušali ugotoviti, katera metoda daje najbolj zanesljive rezultate pri pacientih z dokazano laktozno intoleranco. V dosedanji klinični praksi je imelo pri diagnosticiranju laktozne intolerance ključno vlogo merjenje količine glukoze v krvi. Ta metoda ostaja v ospredju obravnave teh bolnikov tudi danes. Njena prednost je v enostavni izvedbi in nizki ceni, vendar ima tudi nekaj ključnih pomanjkljivosti, kot so slaba občutljivost in specifičnost. Hkrati je metoda invazivna in tako neprijetna za preiskovanca (večkratni odvzem vzorcev krvi).

Dihalni testi na tem področju predstavljajo konkurenčen in hkrati nov potencialen diagnostični pristop pri obravnavi bolnikov z omenjeno motnjo.

Izbrali smo tri različne metode, ki nam pomagajo pri diagnozi laktozne intolerance, in jih primerjali med seboj.

Dihalni test z vodikom (H_2) in dihalni test z uporabo stabilnega izotopa ^{13}C bomo primerjali z metodo analize glukoze v krvi oz. z laktoznim tolerančnim testom.

V ta namen bomo zbrali bolnike (skupno 29 bolnikov), ki se zdravijo na Gastroenterološki kliniki Kliničnega centra v Ljubljani. Vsi imajo postavljeno (potrjeno) diagnozo: laktozna intoleranca. Opravili bomo meritve in zbrali podatke za nadaljno statistično analizo.

Cilj diplomske naloge je najti najbolj ustrezno metodo za vrednotenje laktozne intolerance in oceniti ali ovrednotiti možnost uporabe le-te v klinični praksi. V raziskavi bomo bolnikom z laktozno intoleranco:

- izmerili koncentracijo glukoze v krvi pri času 0 (bazalni odvzem krvi) in nato ponovno po določenem času po zaužitju testnega obroka z znano količino laktoze,
- določili delež neradioaktivnega stabilnega izotopa ^{13}C v izdihanem zraku bolnikov z laktozno intoleranco pred zaužitjem testnega obroka in v različnih časovnih intervalih po zaužitju le-tega,
- določili delež vodika (H_2) v izdihanem zraku bolnikov z laktozno intoleranco pred zaužitjem testnega obroka in v različnih časovnih intervalih po zaužitju testnega obroka.

Dobljene rezultate bomo zbrali, statistično ovrednotili in izračunali, katera metoda je najbolj specifična in občutljiva. Glede na rezultate bomo skušali ugotoviti, ali bi katerega izmed dihalnih testov lahko uvedli v klinično prakso za ugotavljanje in diagnosticiranje laktozne intolerance. Rezultati bodo pokazali pomen obeh testov v klinični praksi ter njuno uporabnost oz. morebitno zamenljivost.

3 MATERIALI IN METODE

V okviru raziskave, v kateri smo primerjali ustreznost/učinkovitost treh različnih metod, ki nam pomagajo pri diagnosticiranju laktozne intolerance, smo preiskovancem s pomočjo bazalnega odzema krvi določili koncentracijo glukoze v krvi (laktozni tolerančni test). S pomočjo dihalnih testov pa smo v vzorcih izdihanega zraka določili odstotke kumulativno izločenega ^{13}C (dihalni test s ^{13}C označenim substratom- samo nekaj bolnikov) ter količino izločenega H_2 v ppm (vodikov dihalni test). Testiranje je trajalo 3 ure, preiskovanci so prišli zjutraj in so morali biti tešči 12 ur (preko noči). Meritve smo opravili v laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Ob koncu raziskave smo pridobljene podatke statistično ovrednotili in na podlagi dobljenih rezultatov ocenili, katera od treh uporabljenih metod je najbolj primerna za diagnosticiranje laktozne intolerance.

3.1 Predstavitev skupine preiskovancev

V skupino preiskovancev smo zajeli bolnike s sumom na laktozno intoleranco, ki se ambulantno zdravijo na Gastroenterološki kliniki v Ljubljani. Udeležence smo kontaktirali po telefonu ter jih seznanili s samim potekom preiskave in jih povabili k sodelovanju. Vsi udeleženci so sodelovali prostovoljno in so pisno privolili v izvedbo testa ter kasnejšo uporabo podatkov v namen raziskave.

V raziskavi je sodelovalo 29 bolnikov, 15 žensk in 14 moških (Graf 1). Zaradi neuspešnih dihalnih testov smo pri testiranju z uporabljenim izotopom ^{13}C lahko uporabili in analizirali le osem od 29 bolnikov.



Graf 1: Razmerje med spoloma preiskovancev.

Povprečna starost vseh preiskovancev je bila 36,6 leta (Graf 2). Najmlajši preiskovanec je imel 17 let, najstarejši pa 77 let. Vsem sodelujočim v raziskavi smo tudi izmerili njihovo telesno maso in telesno višino.



Graf 2: Število preiskovancev v posameznih starostnih razredih.

3.2 Bazalni odvzem krvi in določitev koncentracije glukoze v krvi

Preiskovancem, ki so bili 12 ur tešči (preko noči) smo odvzeli vzorec krvi ob času 0 in določili koncentracijo glukoze v serumu in se ravnali po navodilih kriterijev vrednosti koncentracije glukoze v krvi (Preglednica III).

Kri smo jemali iz prsta z lanceto (Beckton Dickinson, Anglija). Pri določanju glukoze v krvi vzamemo kri z antikoagulantom (EDTA, Li-heparin ali K- oksalat oz. citrat).

Koncentracija glukoze v krvi hitro pada, zato moramo plazmo čimprej ločiti od celic.

Dodamo inhibitor glikolize Na-fluorid, ki kompleksira magnezijeve ione in s tem upočasni glikolizo. V serumu, ki ni hemoliziran, kontaminiran ali mikrobiološko obdelan, je koncentracija glukoze na sobni temperaturi stabilna do 8 ur, pri 4 °C pa do 3 dni.

Koncentracijo glukoze v polni krvi smo izmerili z oksidazno metodo.

Preglednica III: Kriteriji vrednosti koncentracije glukoze v krvi na tešče (ob času 0).

	Glukoza na tešče
Normalna vrednost	3,5-5,6 mmol/L
Hiperglikemija (povišana vrednost)	>5,6 mmol/L
Hipoglikemija (znižana vrednost)	<3,5

3.3 Potek obremenitvenega laktoznega tolerančnega testa (OLLT)

Preiskovancu smo najprej po zgoraj opisanem postopku odvzeli prvi vzorec krvi pred zaužitjem raztopine laktoze in v njem izmerili/določili koncentracijo glukoze v krvi ob času 0. Če je bila izmerjena koncentracija glukoze na tešče 7 mmol/L ali več, smo test zaključili. Pri bolnikih s koncentracijo glukoze pod 7 mmol/L smo nato izvedli obremenitev z raztopino laktoze, in sicer 50 g laktoze v 250 ml vode. Raztopino so morali zaužiti v 5 minutah (čas se šteje od prvega požirka). Preiskovanci so morali med izvedbo testa sedeti, pred in med testom niso smeli kaditi, pili so lahko samo vodo. Sledil je odvzem vzorcev krvi po 30, 60, 90, 120, 150 in 180 minutah po zaužitju raztopine laktoze in določitev koncentracije glukoze v krvi (Priloga 8).

3.4 Interpretacija laktoznega tolerančnega testa

Pri zdravih ljudeh je koncentracija glukoze po vnosu laktoze (c_2) za več kot 1,1 mmol/L večja od koncentracije pred vnosom (c_1). Primer negativnega, torej normalnega izvida: $c_1=4,9$ mmol/L in $c_2=8,0$ mmol/L. Primer pozitivnega, torej patološkega izvida: $c_1=5,2$ mmol/L in $c_2=5,8$ mmol/L (Preglednica IV).

Preglednica IV: Primer interpretacije laktoznega tolerančnega testa.

Rezultat izvida	konc. pred vnosom laktoze (c_1)	konc. po vnosu laktoze (c_2)
negativen/normalen	4,9 mmol/L	8,0 mmol/L
pozitiven/patološki	5,2 mmol/L	5,8 mmol/L

3.5 Postopek izvedbe dihalnih testov

Izvajali smo dihalni test s ^{13}C označenim substratom in vodikov (H_2) dihalni test. Pred izvedbo obeh testov so sodelujoči preiskovanci dobili ustrezna in jasna navodila. Dan pred preiskavo jim je bila zahtevana hrana z manj vlakninami (odsvetovani polnozrnatni izdelki, sadje in zelenjava), in ker je preiskava zajemala obremenitev z laktozo, smo jim dan pred preiskavo prepovedali uživanje mleka.

Pred izvedbo dihalnega testa so morali biti preiskovanci tešči 12 ur (preko noči). Zadnji obrok so zaužili večer pred preiskavo ob 18. uri, do 24. ure so lahko pili samo še bistro tekočine (voda, čaj). Na dan preiskave so ostali tešči, tudi brez tekočine (niti vode). Med izvajanjem samega testa so morali mirovati in niso smeli kaditi. S tem se izognemo hiperventilaciji, ki lahko vodi v napačno interpretacijo rezultatov testa. Pili so lahko le negazirano vodo, saj bi vsaka zaužita pijača, ki vsebuje raztopljen CO_2 , lahko vodila do sprememb v količini izdihanega ogljikovega dioksida in posledično do napačne interpretacije rezultatov ^{13}C dihalnega testa. Prav tako jim je bilo predhodno naročeno, da morajo zadnja dva tedna pred izvedbo testa prenehati z jemanjem zdravil (predvsem antibiotiki), ki bi lahko imela vpliv na same rezultate testa. Da bi dobili čim bolj točne in zanesljive rezultate, so morali natančno upoštevati vsa dana navodila, saj bi lahko vsaka nedoslednost pri sami izvedbi testa vodila do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov.

Dihalni test je trajal 3 ure. Preiskovanci so vsake pol ure pihnil v aparat oz. epruveto, katero smo takoj zamašili. Po prvem vpihu so zaužili ustrezno količino laktoze (50 g laktoze raztopljene v 250 ml vode), nato do konca preiskave niso zaužili ničesar več.

3.5.1 Opis zbiranja vzorcev

Prvi vzorec izdihanega zraka smo odvzeli pred zaužitjem testnega obroka, ob času 0. Pri odvzemu vzorca preiskovanec enakomerno in počasi pihne skozi slamico v epruveto toliko zraka, da se epruveta orosi (Slika 6). Nato smo epruveto takoj zamašili (slika 6A). Ta

vzorec je bil namenjen določitvi bazalne linije, ki predstavlja naravno prisoten H_2 ali $^{13}CO_2$ v izdihanem zraku. Vsebnost le-tega se razlikuje od posameznika do posameznika.

Potem, odvisno od želene preiskave, preiskovanec zaužije standardizirani tekoči ali trdni testni obrok (slika 6B). V našem primeru je bil testni obrok voda, kateri smo dodali ^{13}C laktozo (D-Lactose – $1^{13}C$, 100 mg; FW 361,30 for R&D use only, Isotech).

Odvzem nadaljnjih vzorcev je potekal nato po enakem postopku v časovnem razmaku 30 minut, torej ob času 30, 60, 90, 120, 150 in 180 minut po zaužitju testnega obroka (slika 6C). Prav tako smo v enakih časovnih intervalih, torej ob časih 30, 60, 90, 120, 150 in 180 minut, odvzeli vzorce venozne krvi, v katerih smo določili koncentracijo krvnega sladkorja.



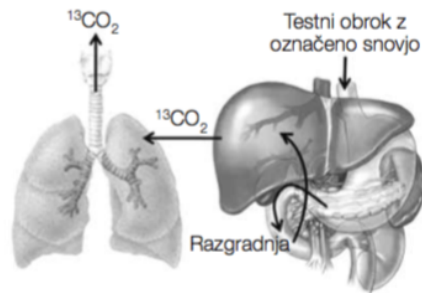
Slika 6: Postopek izvedbe dihalnih testov. (9)

3.5.2 Analiza vzorcev izdihanega zraka

➤ ^{13}C dihalni test z laktozo (Slika 7):

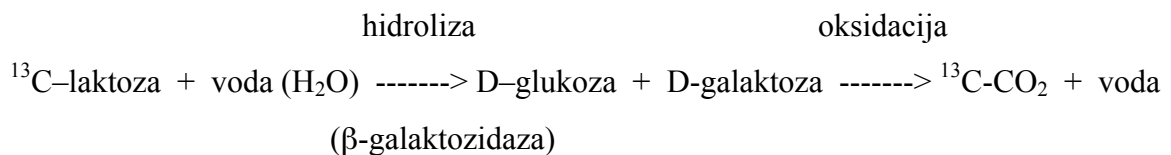
sestavo vzorcev izdihanega zraka smo izmerili s pomočjo masnega spektrometra za analizo stabilnih izotopov (IRMS). Gre za najstarejšo in najpogosteje uporabljano metodo za analizo stabilnih izotopov. Uporabili smo masni spektrometer Analytical precision 2002, Northweek, UK. Deluje po principu kontinuiranega pretoka ter omogoča sklopitev plinskega kromatografa z masnim spektrometrom (tip plinskega kromatografa z masno detekcijo – Analytical precision AP, država Anglija). V plinskem kromatografu se CO_2 loči od ostalih komponent vzorca, nato poteka analiza. Tako v masni spektrometer skozi injektor prehaja izoliran CO_2 skupaj z nosilnim plinom (helij). Na enak način smo opravili tudi analizo standardnega CO_2 . Celoten proces poteka avtomatizirano.

Najprej pride do ionizacije vzorca. Pri tem nastane žarek ionov, ki potujejo skozi elektromagnet, kjer poteče ločitev ionov glede na njihovo razmerje med maso in nabojem. Ionski žarek se tako loči na posamezne ione, te pa ločeno zaznajo posamezni detektorji. Tako dobimo podatke o relativni zastopanosti ionov z različnim razmerjem med maso in nabojem v vzorcu (9).



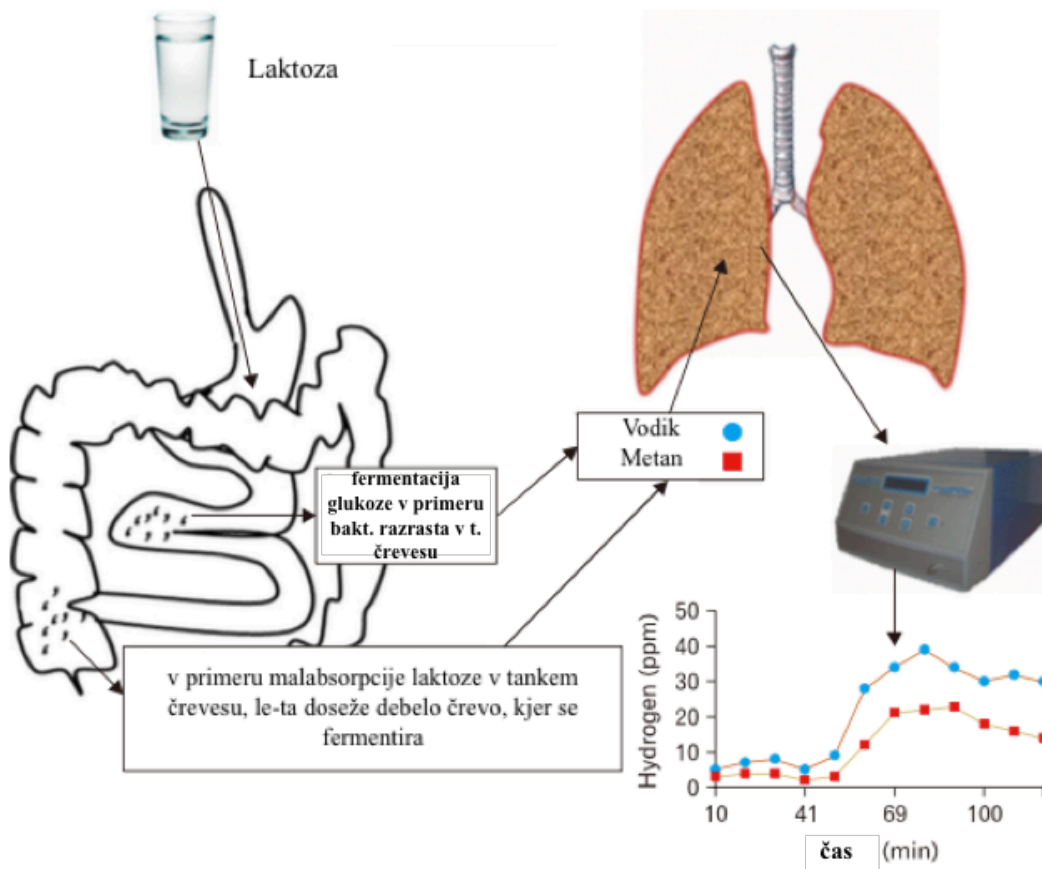
Slika 7: Princip ^{13}C dihalnega testa. Test temelji na merjenju obogatitve ogljika v ogljikovem dioksidu v izdihanem zraku po zaužitju testnega obroka (vsebuje snov, označeno s ^{13}C v eni ali več funkcionalnih skupin v molekuli). (9)

Metabolizem substrata:



➤ Vodikov (H_2) dihalni test z laktozo:

vodik v izdihanem zraku ocenjujemo z uporabo plinskega kromatografa Gastrolyzer. Vodik, ki ga proizvedejo bakterije, se absorbira skozi stene tankega ali debelega črevesa ali obeh. Kri, ki vsebuje vodik, potuje v pljuča, tam se vodik sprosti in izloči z izdihanim zrakom. Na tak način ga lahko izmerimo. Nekaj odstotkov posameznikov (15-30 % ljudi) ima prisotno bakterijo, ki dve molekuli vodika pretvori v eno molekulo metana (CH_4). Taki ljudje na testu ne izdihajo veliko vodika, čeprav je pri njih lahko prisotna malabsorpcija katerega od ogljikovih hidratov (10).



Slika 8: Shematski diagram, ki prikazuje princip H_2 -dihalnega testa. (12)

Vodikov dihalni test (Slika 8) izvedemo pri preiskovancih, ki so tešči preko noči. Večer pred izvajanjem testa jim je bilo odsvetovano izogibati se hrani, ki vsebuje ogljikove hidrate, ki se počasneje absorbirajo (krompir, kruh,...) ter vlaknin, saj bi lahko prišlo do zakasnjene izločanja vodika v izdihanem zraku.

Pred testom si bolniki umijejo zobe in izperejo usta z antiseptično raztopino ter vodo iz pipe. S tem odpravimo pojav predčasnih vrhov (peakov) v kromatogramu, ki se pojavijo kot posledica delovanja ustnih bakterij na testni sladkor.

Na začetku testiranja odvzamemo 3-4 vzorce izdihanega zraka, v katerih določimo količino prisotnega vodika. Iz njih izračunamo povprečje vodika v izdihanem zraku, kar predstavlja bazalno vrednost vodika. Vzorce izdihanega zraka se zbirajo bodisi v vrečko bodisi v brizgo. Po določitvi bazalne linije bolnik zaužije testni odmerek sladkorja, ki ga preiskujemo, v našem primeru 50 g laktoze. Nato jemljemo vzorce izdihanega zraka vsakih 30 minut po zaužitju, in sicer skupaj 180 minut (3 ure) (Priloga 8). Pri porastu za 20

ppm opravimo še eno meritev čez 30 minut in nato zaključimo s testiranjem. Če ni porasta ob 180. minuti, opravimo še meritev ob 210. minuti. Vrednosti zapisujemo v dnevnik, hkrati pa je na voljo tudi posebna računalniška oprema za snemanje vrednosti izdihanega zraka. Vzporedno z izvajanjem testiranja spremljamo tudi morebitni pojav različnih simptomov po zaužitju preiskovanega sladkorja.

Običajno izvajamo vodikov dihalni test vzporedno z laktoznim tolerančnim testom, ki vključuje oceno krvnega sladkorja. Tudi mi smo opravljali oba testa hkrati (12).

3.6 Opis izračuna parametrov ^{13}C - dihalnega testa z laktozo

Rezultate ^{13}C - dihalnega testa smo podali kot odstotek kumulativne količine izločenega ^{13}C v merjenem času (odstotki izdihanega ^{13}C).

Rezultat meritev izrazimo z vrednostjo delta (δ), ki predstavlja relativno izotopsko sestavo preiskovanega vzorca glede na izbrani standard (Enačba 1). Vrednost delta je izražena v promilih (‰) (9).

$$\delta = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000$$

[Enačba 1]

R_{vz} – razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v vzorcu

R_{st} – razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v standardu

Standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine. Mednarodne standarde določata Mednarodna agencija za jedrsko energijo na Dunaju in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA. Spojine so izbrane tako, da so izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi. Vrednost delta vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0‰ (9).

Za ogljik je bil privzet karbonatni standard fosila *Belemnite americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$ (9).

Vrednost R, ki podaja razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), je vedno podana kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu. Pozitivne vrednosti delta pomenijo višje izotopsko razmerje R v vzorcu v primerjavi s standardom, kar pomeni več težjega izotopa. Negativne vrednosti delta pa pomenijo nižje izotopsko razmerje R v vzorcu v primerjavi s standardom, torej vzorec vsebuje manj težjega izotopa (9).

Če je prisoten aktivni encim, se izotopsko razmerje po zaužitju testnega obroka znatno poveča. Pri zmanjšani aktivnosti encima je povečanje manjše. Če pa je encim neaktiven oz. odsoten, ostane razmerje nespremenjeno v primerjavi z izmerjenim razmerjem pred zaužitjem testnega obroka (9).

Delež $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku izračunamo za vsak vzorec ob vseh časih meritve (Enačba 2).

$$\%^{13}\text{C}_{t_x} = \frac{\frac{\delta^{13}\text{C}_{t_x} + 1}{1000}}{\frac{1}{0,0112372} + \frac{\delta^{13}\text{C}_{t_x} + 1}{1000}} \cdot 100 \quad [\text{Enačba 2}]$$

Pri izračunu deleža ^{13}C v izdihanem zraku je potrebno upoštevati tudi meritev bazalne linije pred zaužitjem testnega obroka. Bazalno meritev torej opravimo pred zaužitjem testnega obroka in le-ta nam da podatek o običajni količini ^{13}C , vnešeni v telo z zaužito hrano. Rezultate bazalne meritve upoštevamo pri izračunu deleža ^{13}C v vzorcu, in sicer vrednost bazalne meritve odštejemo od vsake izračunane vrednosti $\%^{13}\text{C}$ ob času t . (Enačba 3). Na tak način izvzamemo vpliv $^{13}\text{CO}_2$, izdihanega v bazalnih pogojih (9).

$$\%^{13}\text{C}_{t_y} = \%^{13}\text{C}_{t_x} - \%^{13}\text{C}_{t_0} \quad [\text{Enačba 3}]$$

$\%^{13}\text{C}_{t_0}$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku ob meritvi bazalne linije ob času t_0 pred zaužitim test. obrokom

$\%^{13}\text{C}_{t_x}$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku v času t po zaužitju test. obroka

$\%^{13}\text{C}_{t_y}$ – delež ^{13}C v vzorcu

Vrednost R , ki podaja razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) se pred in po zaužitju testnega obroka spremeni, če je prisoten aktiven encim (9).

Glede na zaužito količino substrata in čas izračunamo hitrost razgradnje označenega substrata po naslednji enačbi (Enačba 4):

$$\%^{13}C/h = \frac{\frac{\%^{13}C_{t_x} \cdot V_{CO_2}}{100}}{\frac{\%^{13}C_{sub} - \%^{13}C_{t_0} \cdot \frac{m_{sub}}{M_{sub}}}{100}} \cdot 100\% \quad [\text{Enačba 4}]$$

$\%^{13}C_{t_x}$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku v času t po zaužitju test. obroka

V_{CO_2} – volumen izdih. ogljikovega dioksida, izražen v mmol/h/m²

$\%^{13}C_{sub}$ – delež izotopa ^{13}C v zaužitem označenem substratu

$\%^{13}C_{t_0}$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku ob meritvi bazalne linije ob času t_0 pred zaužitim test. obrokom

m_{sub} - masa zaužitega test. substrata izražena v mg

M_{sub} – molska masa označenega substrata, izražena v g/mol

Volumen izdihanega ogljikovega dioksida v eni uri izračunamo po enačbi 5 (Enačba 5).

Pri tem je potrebno upoštevati telesno površino (BSA- Body Surface Area), ki jo izračunamo po enačbi 6 iz podatkov o telesni teži v kilogramih (kg) in telesni višini v centimetrih (cm) (9).

$$V_{CO_2} = BSA(m^2) \cdot \frac{5mmol}{m^2} \cdot \frac{min}{60 min/h} \cdot 60 min/h \quad [\text{Enačba 5}]$$

V_{CO_2} – volumen izdihanega ogljikovega dioksida

BSA – telesna površina (izračunamo jo po Enačbi 6), izražena v m²

$$BSA (m^2) = \sqrt{\frac{m (kg) \cdot h(cm)}{3600}} \quad [\text{Enačba 6}]$$

m – telesna teža, izražena v kg

h – telesna višina, izražena v cm

Kumulativna količina izločenega ^{13}C je definirana kot celotna količina izotopa ^{13}C , ki se izloči v izdihanem zraku ob določenem času, glede na količino s substratom vnešenega ^{13}C . Izračunamo jo po Enačbi 7 (9).

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

$\%^{13}\text{C}/h(t_i)$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku v času t_i po zaužitju test. obroka (izračunamo po enačbi 4)

$\%^{13}\text{C}/h(t_{i-1})$ – delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku v času t_{i-1} po zaužitju test. obroka (izračunamo po Enačbi 4)

t_i in t_{i-1} – čas, izražen v urah, pri katerem se izloči delež izotopa ^{13}C v izdih. zraku

Kumulativna količina izločenega ^{13}C nikoli ne doseže 100 % saj se določen delež ^{13}C zadrži v telesu v obliki bikarbonata, določena količina pa se ga vključi v druge metabolne cikle (9).

4 REZULTATI

4.1 Statistična analiza podatkov in interpretacija rezultatov testov

Vse preiskovance smo testirali s tremi različnimi metodami in ovrednotili dobljene rezultate (Preglednica V).

Preglednica V: Rezultati testov (pozitivno/negativno) za posameznega preiskovanca.

Št. pacienta (št. P)	Rezultati testa		
	Laktozni tolerančni test	H ₂ - dihalni test	¹³ C- dihalni test
1	negativen	/	/
2	pozitiven	/	/
3	pozitiven	pozitiven	/
4	pozitiven	pozitiven	/
5	negativen	negativen	/
6	pozitiven	*ni izvedljiv	/
7	negativen	/	pozitiven
8	negativen	/	/
9	pozitiven	pozitiven	pozitiven
10	pozitiven	*ni izvedljiv	pozitiven
11	pozitiven	*ni izvedljiv	pozitiven
12	negativen	/	/
13	pozitiven	negativen	pozitiven
14	negativen	/	/
15	pozitiven	/	/
16	pozitiven	pozitiven	/
17	negativen	/	/
18	pozitiven	pozitiven	/
19	negativen	/	/
20	negativen	mejno poz.	/
21	negativen	/	/
22	negativen	/	/
23	pozitiven	pozitiven	/
24	negativen	pozitiven	pozitiven
25	pozitiven	pozitiven	pozitiven
26	negativen	/	/
27	pozitiven	pozitiven	/
28	negativen	pozitiven	pozitiven
29	pozitiven	pozitiven	/
Skupaj pozitiven	15	11	8
Skupaj pozitiven v %	51,7	37,9	27,6

* - Test ni bil izvedljiv, ker po eni uri začetna vrednost ni padla pod 10 ppm.

/ - Izmerjena vrednost od začetka do konca testa je bila 0.

Po koncu testiranja smo zbrali dobljene rezultate in bolnike s pozitivnim rezultatom pri posamezni metodi razvrstili glede na to, pri kolikih od izvajanih metod so imeli pozitiven rezultat (Preglednica VI). Zanimali so nas predvsem preiskovanci, ki so imeli pozitiven rezultat pri vsaj dveh od treh izvajanih metod.

Preglednica VI: Bolniki s pozitivnim rezultatom pri posamezni metodi.

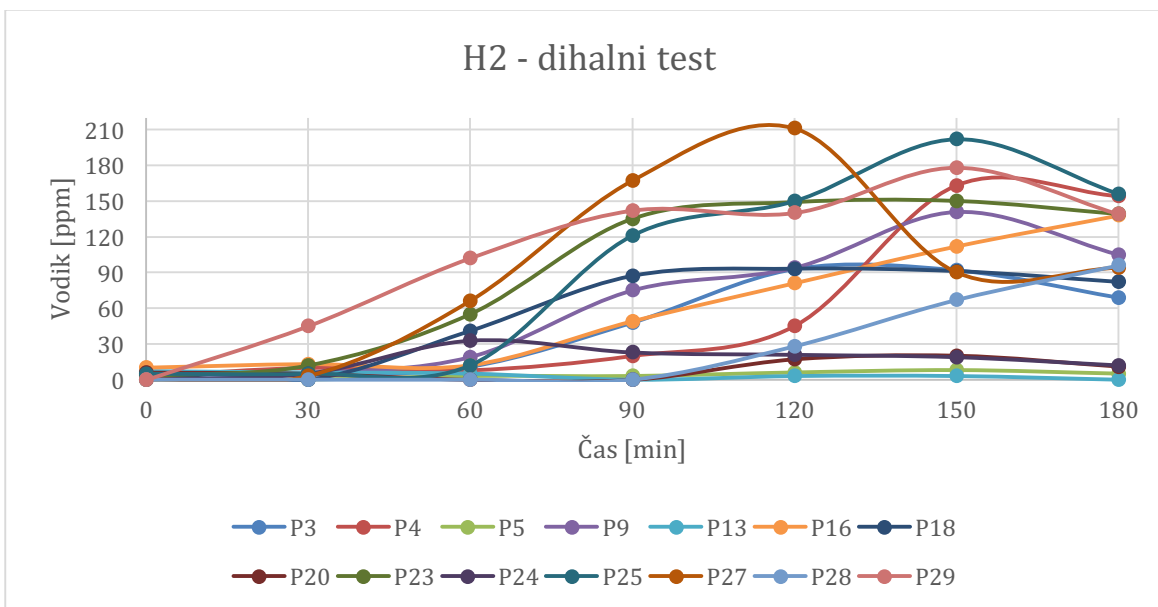
Št. pacienta (št. P)	Pozitivni rezultat		
	Laktoz. tolerančni test	H ₂ - dihalni test	¹³ C- dihalni test
3	+	+	
4	+	+	
9	+	+	+
10	+		+
11	+		+
13	+		+
16	+	+	
18	+	+	
23	+	+	
24		+	+
25	+	+	+
27	+	+	
28		+	+
29	+	+	

4.1.1 H₂ - dihalni test

Pri izvedbi vodikovega dihalnega testa smo od 29 sodelujočih preiskovancev uporabili rezultate testa 14 bolnikov, ki so bili primerni za analizo in obravnavo (Preglednica VII) in jih grafično predstavili (Graf 3).

Preglednica VII: Vsebnost vodika (H₂) v izdihanem zraku, izmerjena v različnih časovnih intervalih pri 14 preiskovancih s pozitivnim/negativnim rezultatom testa.

Čas [min]	Vodik [ppm]													
	P3	P4	P5	P9	P13	P16	P18	P20	P23	P24	P25	P27	P28	P29
0	5	3	0	7	7	10	5	6	3	0	5	0	0	0
30	4	10	0	6	6	13	0	5	12	5	5	3	0	45
60	11	8	3	19	5	12	41	0	55	33	12	66	0	102
90	48	20	3	75	0	49	87	0	135	23	121	167	0	142
120	93	45	6	94	3	81	93	17	149	21	150	211	28	140
150	92	163	8	141	3	112	91	20	150	19	202	90	67	178
180	69	154	5	105	0	138	82	11	139	12	156	94	96	139



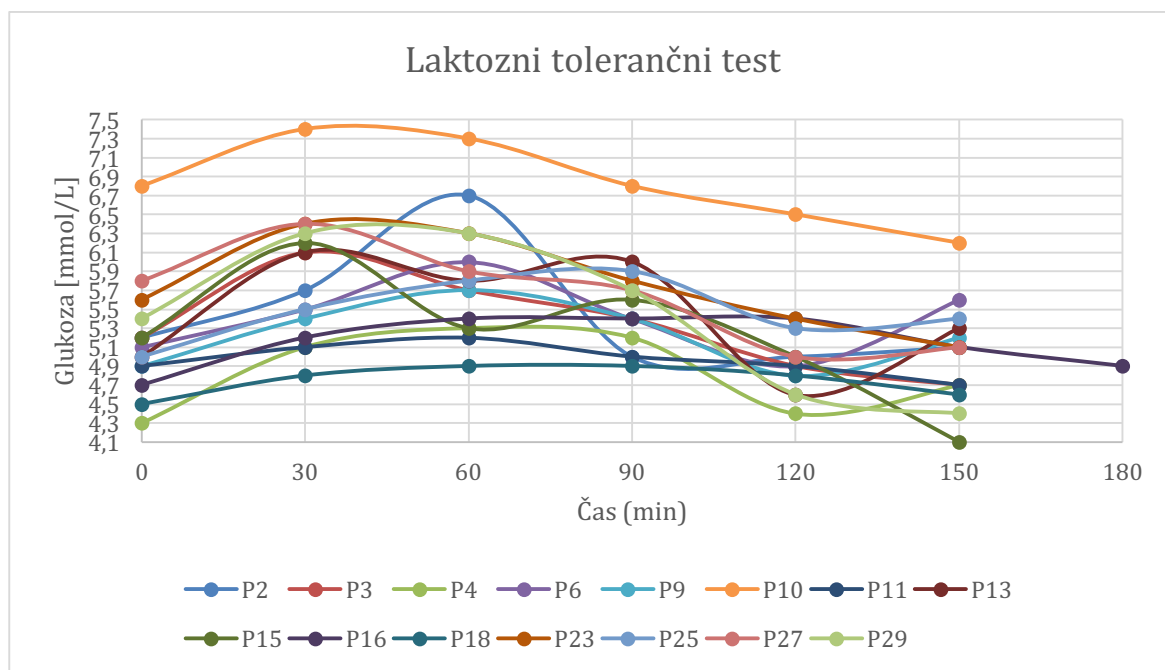
Graf 3: Vsebnost vodika [ppm] v odvisnosti od časa [min] pri posameznem preiskovancu (P).

4.1.2 Laktozni tolerančni test (LTT)

Pri izvedbi oralnega laktoznega tolerančnega testa (OLTT) smo od 29 testiranih bolnikov v grafičnem prikazu (Graf 4) uporabili rezultate testa 15 bolnikov, ki so bili primerni za analizo in obravnavo, saj je bil njihov rezultat pozitiven (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Koncentracija glukoze v krvi, izmerjene v različnih časovnih intervalih, pri preiskovancih s pozitivnim rezultatom testa.

Glukoza [mmol/L]	
Čas [min]	P2 P3 P4 P6 P9 P10 P11 P13 P15 P16 P18 P23 P25 P27 P29
0	5,2 5,2 4,3 5,1 4,9 6,8 4,9 5 5,2 4,7 4,5 5,6 5 5,8 5,4
30	5,7 6,1 5,1 5,5 5,4 7,4 5,1 6,1 6,2 5,2 4,8 6,4 5,5 6,4 6,3
60	6,7 5,7 5,3 6 5,7 7,3 5,2 5,8 5,3 5,4 4,9 6,3 5,8 5,9 6,3
90	5 5,4 5,2 5,4 5,4 6,8 5 6 5,6 5,4 4,9 5,8 5,9 5,7 5,7
120	5 4,9 4,4 4,9 4,8 6,5 4,9 4,6 5 5,4 4,8 5,4 5,3 5 4,6
150	5,1 4,7 4,7 5,6 5,2 6,2 4,7 5,3 4,1 5,1 4,6 5,1 5,4 5,1 4,4
180	



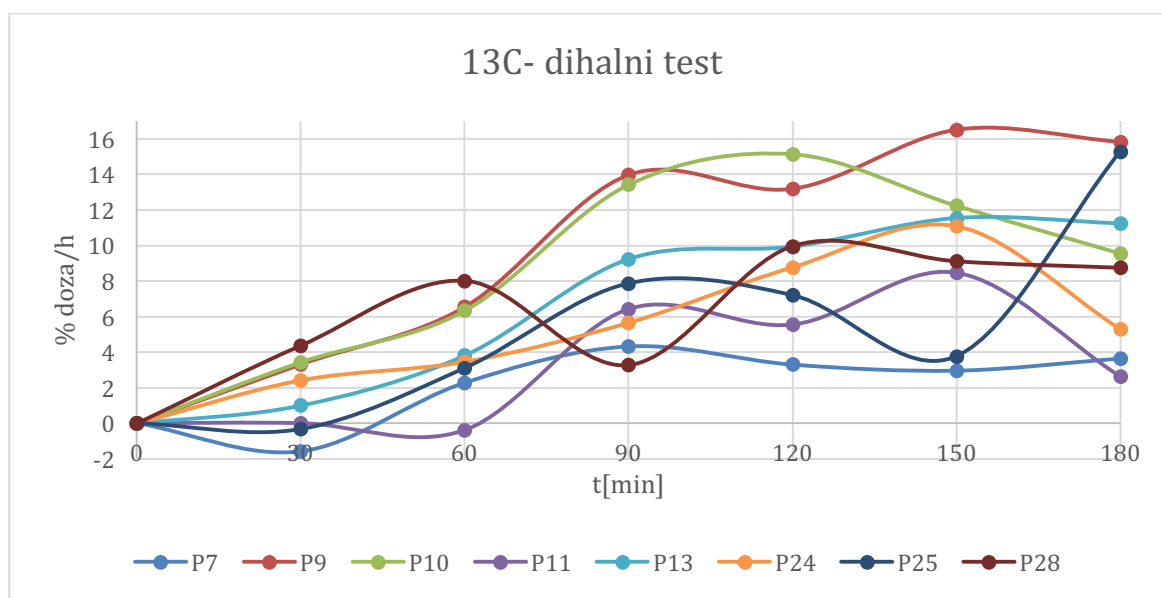
Graf 4: Koncentracija glukoze [mmol/L] v odvisnosti od časa [min] pri posameznem bolniku (pacientu).

4.1.3 ^{13}C - dihalni test

Pri ^{13}C - dihalnem testu so bili za nadaljnjo analizo uporabni rezultati le osem od 29 sodelujočih preiskovancev (št. pacienta 7, 9, 10, 11, 13, 24, 25, 28), ki smo jih analizirali (Preglednica IX) in grafično prikazali (Graf 5).

Preglednica IX: Vsebnost izotopa ^{13}C v izdihanem zraku, izmerjena v različnih časovnih intervalih.

% doza/h									
t [min]	P7	P9	P10	P11	P13	P24	P25	P28	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	-1,593914	3,3221753	3,4380549	0	1,0027998	2,4248288	-0,332302	4,3702816	
60	2,277012	6,5466156	6,3388946	-0,389418	3,8106275	3,4640376	3,1014747	8,0121563	
90	4,3263142	13,972509	13,429763	6,4253391	9,2256744	5,6579162	7,8644162	3,2777145	
120	3,3016642	13,190842	15,148746	5,5491621	9,9276202	8,7755171	7,1998224	9,9544795	
150	2,9601137	16,512918	12,247959	8,4697454	11,532064	11,084839	3,766074	9,1047139	
180	3,6432144	15,828963	9,5620295	2,6285592	11,231231	5,3115149	15,285653	8,7405283	



Graf 5: Hitrost razgradnje označenega substrata v odvisnosti od časa [min].

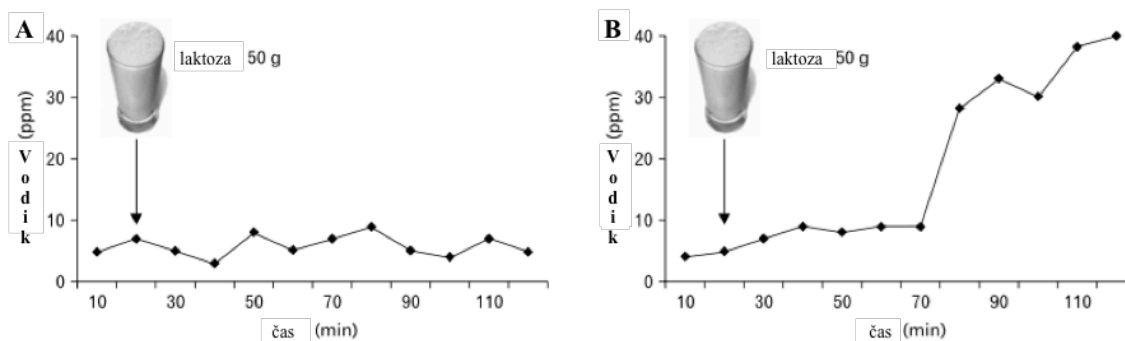
5 RAZPRAVA

5.1 Interpretacija rezultatov H₂ - dihalnega testa z laktozo

Pri zdravih ljudeh, ki so tešči in v mirovanju, ne prihaja do proizvodnje vodika v organizmu. Ustvarja se samo pri anaerobni presnovi, ki se pojavi na primer med bakterijsko fermentacijo. Anaerobne bakterije presnavljajo molekule sladkorja, ki proizvajajo CO₂, kratkoverižne maščobne kisline in vodik. Če ima telo težave z razgrajevanjem in absorpcijo laktoze, se nivo z zrakom izdihanega vodika poveša. Vodikov dihalni test z laktozo ima dobro občutljivost (srednja vrednost 77,5 %) in odlično specifičnost (srednja vrednost 97,6 %) za laktozno intoleranco pri bolnikih, pri katerih so simptomi prosojni ali ne.

Količino vodika v vzorcih izdihanega zraka smo merili s plinskim kromatografom. Če bazalna vrednost vodika v izdihanem zraku (vrednost pred zaužitjem testnega odmerka laktoze) presega 16 ppm (delci na milijon) se ocenjuje, da gre za visoko začetno vrednost in pri takih vrednostih substrata ne smemo uporabiti. V takem primeru lahko testiranje ponovimo z ustrežno ponovno pripravo preiskovanca.

Povišanje vsebnosti vodika v izdihanem zraku čez 20 ppm nad bazalno vrednostjo po zaužitju laktoze se smatra kot pozitivni vodikov dihalni test, če vrednost vodika ne preseže 20 ppm je test negativen (Slika 9A). Pozitiven test pri porastu H₂ za več kot 20 ppm glede na izhodno vrednost (Slika 9B) se največkrat pojavi po 60. minuti po zaužitju testnega odmerka laktoze. Če pride do porasta H₂ prej, je lahko vzrok za to hiter prehod skozi tanko črevo ali pa sum na razrast bakterij. Največkrat so pozitivnemu vodikovemu testu pridruženi tudi značilni simptomi.



Slika 9: Primer interpretacije negativnega/normalnega H₂- dihalnega testa (A) in primer interpretacije pozitivnega/patološkega H₂- dihalnega testa (B). (12)

Pri treh od 29 bolnikov (št. pacienta 6, 10, 11) vodikov dihalni test ni bil izvedljiv, ker po 1 uri začetna vrednost ni padla pod 10 ppm.

Pri sedmih od 29 bolnikov (št. pacienta 1, 7, 12, 14, 17, 19, 21) je bil rezultat testa v vseh časovnih intervalih 0, kar pomeni, da v njihovem vzorcu izdihanega zraka nismo zaznali prisotnosti vodika. Razlog za to je lahko tudi ta, da nekateri posamezniki pri metabolizmu ogljikovih hidratov (v našem primeru laktoze) ne proizvajajo vodika. Organizem določenih posameznikov (približno 15-30 % celotne populacije), pri katerih je prisotna bakterija *Methanobrevibacter smithii*, namesto vodika proizvaja metan. Omenjena bakterija deluje tako, da dve molekuli vodika pretvori v molekulo metana in tako pri teh posameznikih aparatura v izdihanem zraku izmeri prisotnost metana, ne pa vodika.

Pri petih od 29 bolnikov (št. pacienta 2, 8, 15, 22, 26) je bila izmerjena vrednost skoraj v vseh intervalih 0, le po določenem času je pri kakšni meritvi aparatura zaznala zelo nizko vrednost vodika. Le-ta je zanemarljiva in tako tudi teh bolnikov nismo vključili v grafično predstavitev, saj posledično niso pomembni za naše končne ugotovitve.

Glede na opravljene meritve in dobljene rezultate smo v grafičnem prikazu zajeli štirinajst od 29 bolnikov (št. pacienta 3, 4, 5, 9, 13, 16, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 29), pri nekaterih od teh je dihalni test po zaužitju testnega odmerka zaznal občutno povišane vrednosti vodika, kar je zanesljiv pokazatelj, da organizem pri metabolizmu ogljikovih hidratov (v našem primeru laktoze) proizvaja večje količine vodika. To je pokazatelj, da organizem ni sposoben prebaviti disaharida laktoze na monosaharidne enote. Glede na dobljene pozitivne rezultate lahko sklepamo, da omenjeni posamezniki niso sposobni popolne prebave laktoze, rezultat česar je vodik v izdihanem zraku. Kjer so vrednosti izdihanega vodika nizke, le-ta nastaja iz omejenih količin neabsorbiranih ogljikovih hidratov, ki pridejo v debelo črevo. Malabsorpcija ogljikovih hidratov v tankem črevesu povzroči, da večja količina sladkorjev doseže debelo črevo, kjer pride do bakterijske fermentacije. Posledica tega je nastanek plinov, med drugim tudi vodika. Posledica malabsorpcije laktoze v tankem črevesu je večja količina vodika v izdihanem zraku, kar zaznamo s plinskim kromatogramom. Vodik, ki ga proizvedejo bakterije, se absorbira skozi stene tankega ali debelega črevesa ali obeh. Kri, v kateri je prisoten vodik, potuje do pljuč, kjer se vodik sprosti in se izloči z izdihanim zrakom. Na tak način smo ga lahko pri bolnikih izmerili.

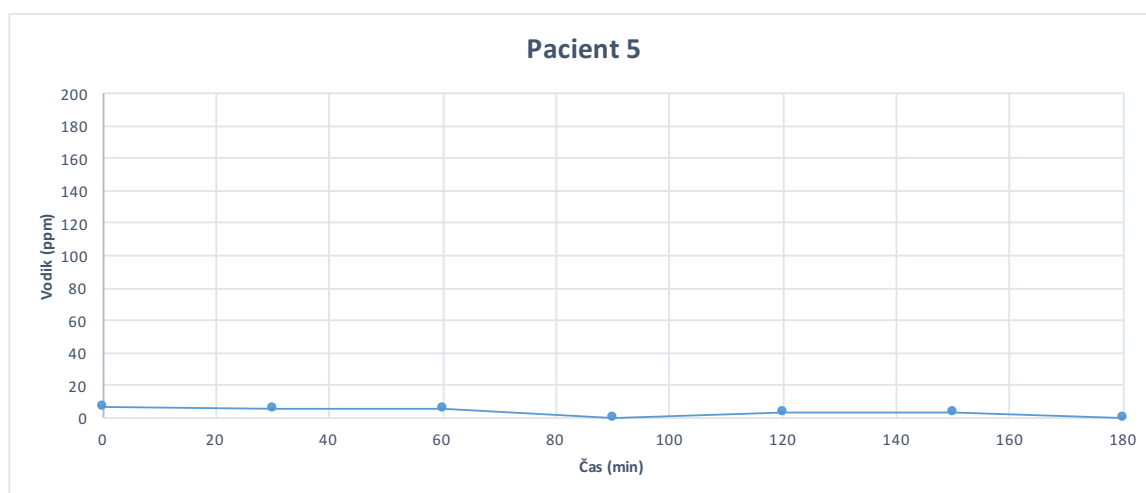
Pri nobenem od bolnikov, ki smo jih zajeli v grafičnem prikazu, povprečna izmerjena bazalna vrednost vodika ni presegala 16 ppm, tako da smo lahko test normalno izpeljali in

so vsi udeleženci lahko zaužili testni odmerek laktoze (50 g laktoze). V nasprotnem primeru se peroralna obremenitev z laktozo odsvetuje.

Interpretacija rezultatov H₂- dihalnega testa temelji na treh ključnih dejavnikih: ravni (koncentraciji) izdihanega vodika, pojavu simptomov ter časovno odvisnih spremembah teh dveh dejavnikov med testnim obdobjem.

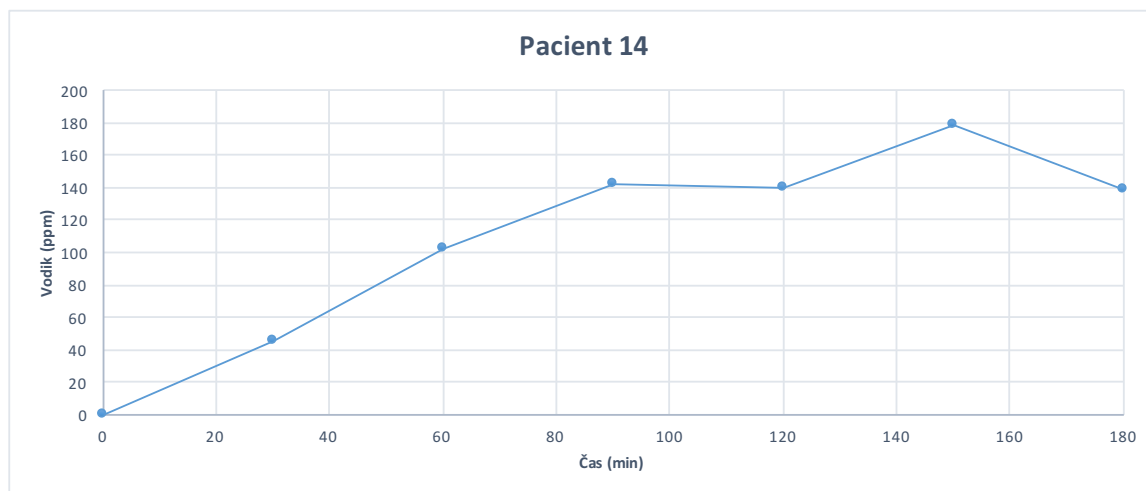
Če ne pride do malabsorpcije testne snovi, tudi ni pomembno povišane ravni vodika v izdihanem zraku (razlika za manj kot 5 ppm nad ali pod bazalno vrednostjo) prav tako pa ni pojava simptomov (Graf 6). Testni obrok preiskovanec zaužije ob času 0 in približno 60 minut po zaužitju se pričakuje dvig koncentracije H₂ čez 20 ppm. Če sta oba kriterija (pomanjkanje povečanja ravni vodika in pomanjkanje simptomov) izpolnjena, je rezultat testa negativen. V našem primeru je bil test negativen pri dveh in mejno pozitiven pri enem od 14 preiskovancev.

Če se pojavijo značilni simptomi, ki pa jih ne spremlja povišana vsebnost vodika, je treba pomisliti na dejstvo, da nekateri posamezniki pri metabolizmu ogljikovih hidratov (v našem primeru laktoze) ne proizvajajo vodika. Da bi lahko potrdili to hipotezo, je potrebno narediti test z laktulozo. Laktuloza je sintezni disaharid, sestavljen iz fruktoze in galaktoze. Laktuloza se pri ljudeh ne more absorbirati in zato pride pri njenem metabolizmu vedno do fermentacije z bakterijami v debelem črevesu, kar povzroči nastanek H₂. Če obremenitev z laktulozo ne povzroči povišane ravni vodika, je preiskovanec najverjetneje 'ne-H₂ proizvajalec'.



Graf 6: Primer negativnega H₂- dihalnega testa. Ni povišane količine H₂ in ni pojava značilnih simptomov. Razlaga: normalne ugotovitve.

Vodikov dihalni test za laktozo je pozitiven, če količina vodika v izdihanem zraku preseže bazalno vrednost za več kot 20 ppm. V tem primeru gre torej za signifikantno povišanje količine vodika v izdihanem zraku.



Graf 7: Primer pozitivnega H₂- dihalnega testa. Povišana količina H₂ ob prisotnosti simptomov po zaužitju testnega odmerka laktoze. Razlaga: intoleranca črevesa za testno snov.

Če se povišanje koncentracije vodika pojavi približno 60 minut po začetku preizkusa in ga spremljajo značilni simptomi, se smatra, da gre za intoleranco na testno snov (Graf 7). V primeru, da se pojavi signifikantno povišanje koncentracije vodika, ki pa ga ne spremljajo simptomi, gre za malabsorpcijo testne snovi.

Takšen rezultat smo dobili pri enajstih bolnikih (št. pacienta 3, 4, 9, 16, 18, 23, 24, 25, 27, 28, 29). Pri določenih bolnikih so izmerjene vrednosti vodika krepko presegle bazalno vrednost. Najvišja vrednost količine izmerjenega vodika pri bolniku je bila 211 ppm, izmerjena 120 minut po začetku izvajanja testa oz. po peroralni obremenitvi s testnim odmerkom laktoze (50 g laktoze).

Če vrednosti narastejo za več kot 10 in manj kot 20 ppm nad bazalno vrednost, obravnavamo rezultate kot 'mejno pozitivne' (primer: pacient- P20).

5.2 Interpretacija rezultatov laktoznega tolerančnega testa (LTT)

Pri zdravih ljudeh je koncentracija glukoze po vnosu laktoze (c_2) za več kot 1,1 mmol/L večja od koncentracije pred vnosom (c_1). Če se koncentracija glukoze v krvi po obremenitvi z laktozo ne dvigne, to pomeni, da telo laktoze ne prebavi in ne absorbira. Ob koncu obremenilnega testa z laktozo je imelo 15 bolnikov pozitiven in 14 bolnikov negativen rezultat. Normalna vrednost glukoze v krvi na tešče je pri zdravih ljudeh 3,5- 5,6 mmol/L.

Petim od 29 testirancev (št. pacienta 1, 5, 10, 17, 27) smo izmerili povišano koncentracijo glukoze v krvi na tešče, še pred samim zaužitjem testnega obroka (50 g laktoze). Nobeden od 29 udeležencev testiranja ni imel bazalne vrednosti glukoze v krvi enake ali višje kot 7 mmol/L. V takem primeru bi pri takih posameznikih test morali zaključiti, saj bi bila obremenitev z laktozo preveč tvegana.

Pri večini bolnikov s pozitivnim rezultatom LTT je vrednost glukoze po vnosu testnega odmerka laktoze (50 g laktoze) naraščala do 60. minute, nato pa so vrednosti začele upadati z izjemo določenih posameznikov. Po 90. minuti so vrednosti vseh bolnikov s pozitivnim rezultatom začele upadati.

5.3 Interpretacija rezultatov ^{13}C – dihalnega testa z laktozo

Pri večini preiskovancev razen pri osmih, rezultata nismo mogli izračunati, ker se je koncentracija v vzorcih izdihanega zraka ob koncu testiranja (180 minut) še vedno povečevala. ^{13}C - dihalni test je uspešen, če v času izvajanja dosežemo maksimum. Povsod tam, kjer smo to dosegli, je bil možen izračun, pri vseh ostalih pa test ni bil uspešen, ker ni prišlo do sprostitve celotne koncentracije zaužite laktoze oz. ni prišlo do maksimalnega izločanja. Test bi bilo zato potrebno optimizirati tudi za te primere. V teh primerih bi bilo potrebno odvzeti dodatne vzorce, kar pa bi pomenilo še dodatno podaljšanje testa.

Za analizo vzorcev izdihanega zraka smo uporabili masni spektrometer visoke ločljivosti, ki je sposoben izmeriti zelo majhno razliko v razmerju $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Natančnost masnih spektrofotometrov visoke ločljivosti je zelo visoka, kar omogoča odkrivanje zelo nizkih izotopskih količin. Prednost tega je uporaba majhnih količin vzorcev izdihanega zraka.

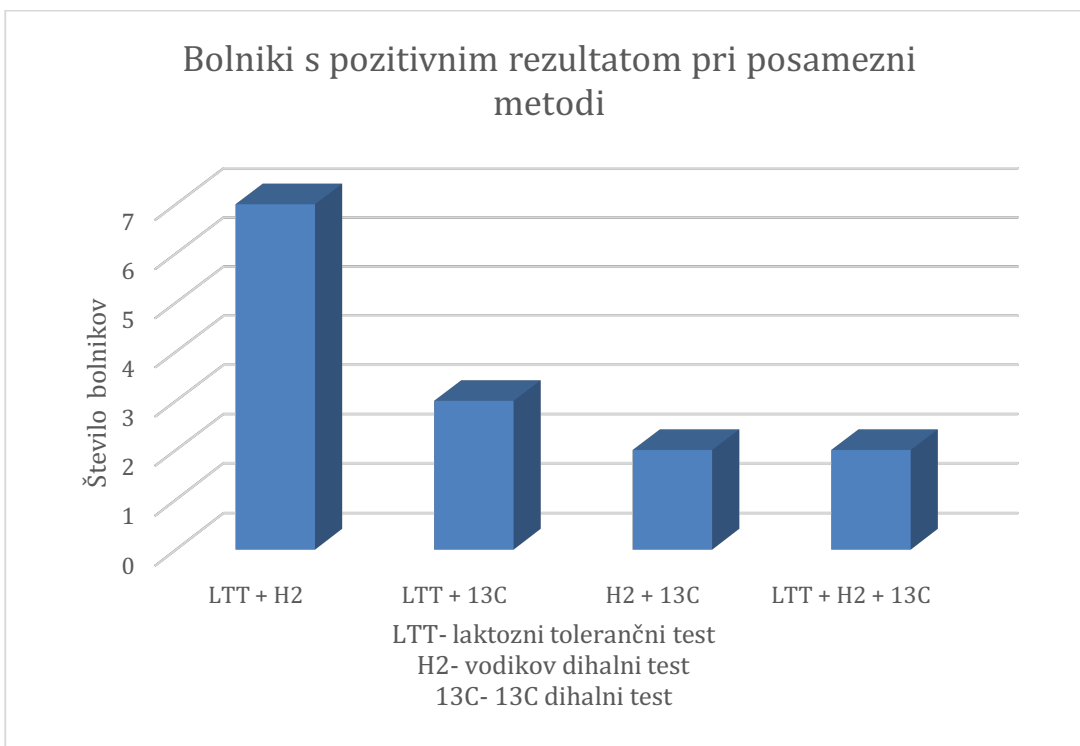
Iz osnovnih osebnih podatkov vsakega preiskovanca (telesna teža v kg in telesna višina v cm) smo izračunali potrebne parametre (telesno površino in volumen izdihanega ogljikovega dioksida) za nadaljnjo obravnavo podatkov. Nato smo izračunali hitrost razgradnje označenega substrata glede na zaužito količino in čas ter jo grafično prikazali. Rezultate ^{13}C - dihalnega testa smo podali kot odstotek kumulativne količine izločenega ^{13}C v merjenem času (odstotki izdihanega ^{13}C).

Najprej smo rezultate meritev izrazili z vrednostjo delta (δ), ki predstavlja relativno izotopsko sestavo preiskovanega vzorca glede na izbrani standard in je izražena v promilih. Nato smo izračunali delež $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku za vsak vzorec ob vseh časih meritve. Kot končni rezultat smo izračunali kumulativno količino izločenega ^{13}C , ki je definirana kot celotna količina izotopa ^{13}C , ki se izloči v izdihanem zraku ob določenem času, glede na količino s substratom vnešenega ^{13}C . Kot je vidno tudi iz rezultatov, kumulativna količina izločenega ^{13}C nikoli ne doseže 100 %, saj se določen delež ^{13}C zadrži v telesu v obliki bikarbonata, določena količina pa se ga vključi v druge metabolne cikle. Tako služi ^{13}C - dihalni test v analizi kot delno kvantitativno diagnostično orodje.

Na podlagi izračunanih parametrov smo izrisali grafični prikaz za posameznega bolnika in sklepali, kakšna je učinkovitost testa za uporabo v klinični praksi.

Spodnji graf (Graf 8) prikazuje, koliko preiskovancev je imelo pozitiven rezultat pri koliko izvajanih metodah. Sedem od 29 sodelujočih je imelo pozitiven rezultat pri laktoznem tolerančnem testu in hkrati pri H_2 - dihalnem testu. Trije od 29 sodelujočih so imeli pozitiven rezultat tako pri laktoznem tolerančnem testu kot pri ^{13}C - dihalnem testu. Dva od 29 sodelujočih sta imela pozitiven rezultat pri obeh izvajanih dihalnih testih (H_2 in ^{13}C). Dva od 29 sodelujočih sta imela pozitiven rezultat pri vseh treh izvajanih testih (LTT, H_2 in ^{13}C).

Štirje od 29 preiskovancev so imeli pozitivni rezultat samo pri enem izmed treh izvajanih testov. Ta podatek nam pove, da so metode v našem primeru slabo primerljive in niso ustrezne za uporabo v vsakdanji klinični praksi, saj ne dajejo dovolj zanesljivih in enotnih rezultatov. Na podlagi tega je diagnosticiranje težko izvedljivo, sploh če bi pri preiskovancu izvajali samo enega od testov. Da bi lahko te metode uporabljali v praksi, bi bila potrebna standardizacija.



Graf 8: Število bolnikov s pozitivnim rezultatom pri dveh ali več uporabljenih metodah.

Dihalni testi kot diagnostično orodje predstavljajo alternativno metodo za ugotavljanje, odkrivanje in spremljanje posameznih motenj in bolezni pri človeku. Prav zaradi tega je opravljenih veliko raziskav in objavljenih kar nekaj študij (20, 21), ki skušajo prikazati pomen in uporabo dihalnih testov z uporabo različnih substratov, ki jih prilagodimo namenu preiskave določene motnje oz. bolezni. Cilj večine raziskav je, vpeljati dihalne teste v rutinsko uporabo, da bi postali del klinične prakse in bi jih čim bolj učinkovito vključili v klinično rutino. Primernost dihalnih testov ocenjujemo s pomočjo testiranj in preiskav na bolnikih z znanimi motnjami ali boleznimi in na podlagi ustreznosti/neustreznosti določenih kriterijev, jih potem vključijo/ne vključijo v uporabo v klinični praksi. Sami testi imajo veliko prednosti tako za izvajalca kot za preiskovanca, hkrati pa se pojavlja še nekaj težav, zaradi katerih določeni dihalni testi še niso enakovredni drugim kliničnim metodam.

PREDNOSTI uporabe dihalnih testov v diagnosticiranju motenj in bolezni:

- preprosta izvedba (aparature, pripomočki)

- neinvazivnost (neinvazivno diagnostično orodje)
- uporaba v znanstvenih in kliničnih preiskavah številnih fizioloških in patofizioloških procesov

V prihodnosti bodo dihalni testi zaradi številnih prednosti postali nepogrešljivo orodje v kliničnih raziskavah in diagnostiki. Veliko potenciala imajo predvsem pri prehanskih preiskavah, diagnostiki motenj metabolizma ter diagnostiki gastrointestinalnih bolezni. Iz leta v leto narašča število novih substratov in tako različnih vrst dihalnih testov za odkrivanje posameznih motenj oz. bolezni.

Dihalni testi se pogosto uporabljajo kot orodje za preiskavo metabolnih procesov in nalezljivih bolezni, vendar pa kljub njihovi široki uporabi večina od njih ni oz. še ni postala del klinične prakse.

Pomanjkljivost in hkrati ključna težava vseh dihalnih testov, ne samo tistih s ^{13}C označenim substratom, je predvsem v standardizaciji, zaradi česar pride do različnih rezultatov preiskav med posameznimi laboratoriji. Interpretacija le-teh pa je odvisna od posamezne ustanove, ki preiskavo izvaja.

POMANJKLJIVOSTI uporabe dihalnih testov v diagnosticiranju motenj in bolezni:

- uporaba različnih količin in vrste hrane (testni obrok) ter različnih izotopov med posameznimi laboratoriji. Posledica tega so razlike med rezultati preiskav, zaradi česar je njihova interpretacija odvisna od ustanove, ki preiskavo izvaja.
- pri različnih boleznih ter pri prirojenih napakah metabolizma je potrebno predvidevati in upoštevati spremembe v samem metabolizmu organizma. V takih primerih imajo izračuni na podlagi dihalnih testov majhno napovedno moč. Prav zaradi tega je za postavitve pravilne diagnoze potrebno uporabiti invazivne metode. Potrebno so podatki o bazalnem metabolizmu in o dejanskem endogeno proizvedenem CO_2 oz. H_2 pri preiskovancu, kar v večini primerov ni znano. Prav tako je npr. stabilno endogeno količino proizvedenega CO_2 težko vzdrževati, sploh pri mlajših otrocih, ki so težko pri miru.
- težava pri odvzemu vzorcev izdihanega zraka pri novorojenčkih in majhnih otrocih.

Vse te naštetje omejitve so vzrok, zakaj dihalni testi še niso (razen nekaterih izjem) vključeni v rutinsko klinično uporabo.

Za rešitev zgoraj omenjenih težav pri uvedbi dihalnih testov v vsakdanjo klinično uporabo je potrebna standardizacija postopkov dihalnih testov. Potrebno bi bilo oblikovati in uporabljati enotna merila za diagnosticiranje različnih motenj z uporabo dihalnih testov.

Standardizirati bi bilo potrebno naslednje postopke in parametre:

- količino zaužitega označenega substrata
- količino in sestavo testnega obroka
- čas izvedbe testa
- pogostost zbiranja vzorcev izdihanega zraka
- metodo zbiranja vzorcev
- metodo merjenja izotopskega razmerja $\frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$ pri ^{13}C - dihalnih testih.

Uvedba standardnih protokolov bo omogočila boljšo oz. bolj natančno primerjavo rezultatov dihalnih testov med različnimi raziskovalnimi laboratoriji. Prav tako bo omogočena tudi lažja interpretacija za postavitev klinične diagnoze ter za spremljanje poteka zdravljenja.

Glede standardizacije količine substrata v testnem obroku je v sedanjem protokolu predlagan odmerek 50 gramov laktoze, kakršnega smo pri testiranju uporabili tudi mi. Po mnenjih nekaterih raziskovalcev naj bi bil takšen odmerek previsok, saj naj ne bi ustrezal fiziološkim količinam. To lahko vodi v previsoko pojavnost laktozne malabsorpcije, ki velikokrat naj ne bi bila tudi klinično pomembna (alarmantna) (12).

Kot smo omenili, je postavitev diagnoze laktozne intolerance običajno osnovana na podlagi pozitivnega rezultata vodikovega dihalnega testa s peroralnim vnosom 50 g laktoze. Na podlagi rezultatov je potem predpisana dieta brez laktoze tudi pri bolnikih, ki ne opažajo pojavnosti trebušnih simptomov. Takšen pristop k zdravljenju je vreden razmisleka, saj se s postavitvijo diete zmanjša vnos kalcija pod priporočeno dnevno vrednost. Velikokrat je takšna stroga omejitev vnosa mleka in mlečnih izdelkov popolnoma nepotrebna (17).

Študija, ki so jo izvajali na univerzi v Rimu, je bila namenjena ocenjevanju, ali je zmanjšanje dnevnega vnosa mleka in hrane, ki vsebuje laktozo, res nujno potrebno pri

osebah z laktozno malabsorpcijo, dokazano s standardnim vodikovim (H₂) dihalnim testom (odmerek: 25 g laktoze). (17)

V ta namen so izvedli raziskavo, ki je primerjala vodikova dihalna testa z različnima peroralnima odmerkoma laktoze, in sicer 25 g in 12,5 g (Preglednica X). Študijo si izvedli na bolnikih, katerim so s pomočjo vodikovega dihalnega testa z uporabljenim odmerkom 25g dokazali laktozno malabsorpcijo. Primerjali so pozitivne rezultate testa ter pojav in vrsto simptomov med tema dvema testoma. (17)

Preglednica X: Primerjava H₂ dihalnih testov z dvema različnima odmerkoma laktoze (17).

H ₂ dihalni test- odmerek laktoze:	Preverjali so:
25 g laktoze	Vrhovi produkcije vodika (H ₂)
12,5 g laktoze	Površina pod krivuljo (AUC)
	Pojav značilnih simptomov

V raziskavo je bilo vključenih 90 bolnikov, od teh jih je 65 imelo dokazano laktozno intoleranco in 25 laktozno malabsorpcijo. 16 bolnikov je imelo pozitiven rezultat pri obeh testih, pri tistem z večjim (25 g) in pri tistem z manjšim (12,5 g) odmerkom laktoze. Trinajst bolnikov je imelo simptome (17).

Rezultati: pozitivni H₂- dihalni test brez simptomov kaže na laktozno malabsorpcijo. Če so pozitivnemu rezultatu testa pridruženi še značilni simptomi (slabost, napihnjenost, bolečine v trebuhu, bruhanje, diareja) pa gre za laktozno intoleranco (17).

Glede na majhno število bolnikov, ki so imeli pozitiven rezultat pri testu z odmerkom 12,5 g, pozitiven rezultat pri testu z odmerkom 25 g ne pomaga predvideti pozitivnega rezultata pri nižjem odmerku. Pozitivna napovedna vrednost je 0,17 (17).

Pojav kateregakoli simptoma pri testu z odmerkom 25 g izkazuje le malo boljše pozitivno napovedno vrednost za pozitiven rezultat pri testu z odmerkom 12,5 g. Pozitivna napovedna vrednost v tem primeru je 0,41 (17).

Primer: prisotnost trebušne bolečine pri testu z odmerkom 25g ima pozitivno napovedno vrednost 0,06, medtem ko ima odsotnost trebušnih simptomov pri testu z odmerkom 25g negativno napovedno vrednost 0,84 (17)!

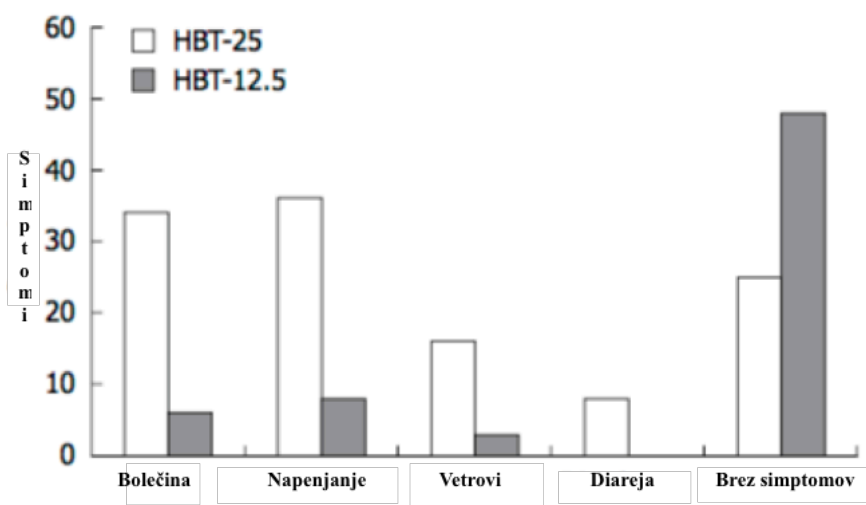
Večina bolnikov, ki imajo pozitiven rezultat testa pri odmerku 25 g, lahko normalno absorbira nižje odmerke laktoze, tako da stroga prepoved laktoze za njih ni nujno potrebna. Pri postavljanju diagnoze laktozne intolerance bi tako odmerek 25 g laktoze najbrž lahko nadomestili z nižjim odmerkom (12,5 g) (17).

V našem primeru smo pri testiranju uporabili priporočen odmerek po protokolu, kar je 50 g laktoze. Vsekakor je to visok odmerek v primerjavi z odmerkoma v omenjeni študiji (25 in 12,5 g). Glede na dejstvo, da smo pri izvajanju testiranja na koncu dobili le 18 od 29 bolnikov s pozitivnim rezultatom pri eni ali več izvajanih metod in smo pri tem uporabili priporočen odmerek 50 g laktoze, lahko trdimo, da bi pri uporabi manjšega odmerka (25 g ali celo 12,5 g) dobili še slabše rezultate. Kot smo omenili, bi bilo potrebno standardizirati količino testnega obroka oz. testnega odmerka in tako bi bile same študije bolj primerljive med sabo. Ne moremo pa predvidevati, kako bi bilo s pojavnostjo spremljajočih simptomov pri uporabi nižjega odmerka, saj jih pri našem testiranju nismo posebej beležili oz. jim nismo posvečali pozornosti. Vsi bolniki, ki so sodelovali pri našem testiranju, so že imeli diagnosticirano laktozno intoleranco, torej so pri postavitvi diagnoze simptomi bili prisotni.

Preglednica XI: Pojav simptomov pri obremenitvi z odmerkom 12,5 g laktoze (pozitivni ali negativni rezultat testa) glede na izid testa z odmerkom 25 g laktoze. (povzeto po 17)

	LI (HBT25) 65 bolnikov		LM (HBT25) 25 bolnikov	
	simptomi +	simptomi -	simptomi +	simptomi -
HBT 12,5 +	5	7	0	4
HBT 12,5 -	8	45	0	21

V študiji, ki so jo izvajali na univerzi v Rimu, so poleg razlike v testnih odmerkih, spremljali tudi razliko v pojavnosti simptomov v odvisnosti od jakosti odmerka. Potrdili so hipotezo, da se z znižanjem testnega odmerka laktoze zmanjšata tudi pojavnost in intenziteta simptomov (*Preglednica XI in Slika 10*). (17)



Slika 10: pojav simptomov med izvajanjem H_2 dihalnega testa z odmerkom 25 g laktoze (HBT-25) in z odmerkom 12,5 g laktoze (HBT-12,5). (17)

Kot smo predstavili in zapisali že v Uvodu, obstajajo za diagnosticiranje laktozne malabsorpcije in intolerance različne metode, ki so bolj ali manj primerne za uporabo. Ena od teh je testiranje laktazne aktivnosti z biopsijo sluznice dvanajstnika. Le-ta lahko predstavlja referenčni standard in ima to prednost, da lahko izključi druge pogoje, ki vodijo v pojav sekundarne laktozne malabsorpcije (npr. celiakija). Njena glavna slabost je, da gre za invazivno metodo, ki je v tem primeru manj prijetna za preiskovanca. Prav zaradi invazivnosti metode, smo se le-tej izognili in poskusili najti alternativno metodo, ki bi dala dovolj zanesljive rezultate.

Nedavna javna razprava pri bolnikih s samoocenjeno intoleranco na mlečne izdelke poroča o tem, da je komercialni laktazni test lahko bolj točno napovedal izboljšanje simptomov po uvedbi brezlaktozne diete kot pa H_2 - dihalni test (98 % proti 81 %) (3).

Prebavo laktoze lahko prav tako ugotovljamo s pomočjo laktoznega tolerančnega testa in z omenjenim vodikovim (H_2) dihalnim testom. Oba vključujeta oralno obremenitev organizma s standardnim odmerkom laktoze (običajno 20-50 g laktoze, kar ustreza vsebnosti laktoze v približno 400-1000 ml kravjega mleka). Laktozni tolerančni test se ozira (navezuje) na povišanje koncentracije glukoze v krvi, dihalni test pa zaznava (detektira) količino vodika (H_2) v izdihanem zraku, ki ga proizvedejo črevesne bakterije.

Laktozni tolerančni test lahko zmotijo nihanja postprandialnega krvnega sladkorja pri bolnikih z moteno toleranco za glukozo ali pri tistih s sladkorno boleznijo. Rezultati H₂-dihalnega testa so lahko lažno pozitivni zaradi prekomerne prisotnosti črevesnih bakterij (bakterijsko zaraščanje/razraščanje) v tankem črevesu. Lažno negativne rezultate H₂-dihalnih testov je mogoče pričakovati pri pacientih, ki ne proizvajajo vodika, to je 2-43% posameznikov (v večini študij manj kot 10 % posameznikov), katerih črevesna flora ne proizvaja vodika (3). Pri teh bolnikih lahko občutljivost testa izboljšamo s hkratnim merjenjem prisotnosti metana (CH₄). Vzrok, ki je lahko povezan z lažno negativnimi rezultati pri nekaterih posameznikih je lahko tudi popolna prilagoditev debelega črevesa na zaužitje laktoze. Pri tem ponavljajoč vnos laktoze selektivno spodbuja rast črevesne flore, ki laktozo hitro fermentira, brez da bi prišlo do proizvodnje vodika. Zadnje čase se tako genetski testi (pri belcih) kot tudi H₂-dihalni test oz. test izdihanega vodika pogosto uporabljajo v klinični praksi (3).

Ker smo se v naši nalogi ukvarjali z metodo dihalnega testa s ¹³C označenim substratom, smo raziskali, kako je z uporabo le-tega in kakšne možnosti ima za vključitev v vsakdanjo klinično uporabo. Kot smo že zgoraj v besedilu omenili, lahko pri izvajanju ¹³C- dihalnega testa uporabimo različne substrate, glede na to, katero motnjo ali bolezen pri posamezniku diagnosticiramo (Preglednica XII). Tako laboratoriji pri izvajanju testiranj uporabljajo enake substrate in predpisane standarde.

Preglednica XII: Tipi substratov, ki jih uporabljamo pri ¹³C- dihalnem testu in njihove diagnostične presnovne posledice (21).

¹³ C- substrat	Posledice na presnovo
Monosaharidi	Absorpcija in uporaba; jetrne mikrosomske pretvorbe.
Oligo- in polisaharidi	Hidroliza oligo- in polisaharidov; pankreatična funkcija; cistična fibroza.
Aminokisliline	Katabolizem aminokislin; fenilketonurija terapija (levcin); čas praznjenja želodca (glicin); jetrna funkcija (fenilalanin).

Proteini	Prebava in resorpcija proteinov.
Karboksilne kisline	Čas praznjenja želodca (acetat, oktanojska kislina); miokardne študije o presnovi; jetrna steatoza.
Lipidi	Metabolizem maščob, še posebej malabsorpcija maščob.
Ogljikova kislina in njeni derivati	Dokaz infekcije s <i>Helicobacter pylori</i> .
Ostalo (metacetin, aminopirin, kofein,...)	Jetrne mikrosomske pretvorbe.

Z namenom, da bi spodbudili uvedbo več različnih dihalnih testov v klinično rutinsko uporabo, so raziskovalci preverili in ovrednotili ¹³C- dihalne teste, označene z različnimi substrati za uporabo pri diagnosticiranju posameznih motenj in bolezni (21).

Za vrednotenje in ocenjevanje dihalnih testov z različnimi substrati so uporabili naslednja merila oz. kategorije, s pomočjo katerih so ocenjevali, kako primerni/neprimerni za uporabo v ¹³C- dihalnih testih so različni substrati:

1. številčnost/ pogostost pojavljanja ter pomen presnovne motnje ali okužbe, ki jo je potrebno raziskati
2. želja po uvedbi alternative drugim metodam v klinično rutinsko uporabo
3. občutljivost in specifičnost
4. odpornost (same metode)
5. cena uporabljenega substrata
6. število vzorcev, ki jih je potrebno zbrati in analizirati
7. aktualnost (21).

Posamezen uporabljen substrat so ocenili v vsaki izmed sedmih kategorij z vrednostmi 2= ugodno, 1= zadovoljivo ali 0= neugodno. Na koncu so vrednosti iz vseh sedmih kategorij sešteli in glede na skupno število prejetih točk razvrstili dihalne teste od tistega z največ prejetimi točkami do tistega z najmanj prejetimi točkami (21).

Raziskovalci so ovrednotili 10 od približno 50 testov s skupno vsoto deset ali več točk, za katere se zdi, da imajo še posebej velik potencial za uspešen vstop v klinično prakso (21).

Preglednica XIII: Rezultati ocenjevanja ¹³C- dihalnih testov po padajoči skupni vrednosti (10 substratov, ki so pokazali največ potenciala za uvrstitev v vsakdanjo klinično prakso) (21).

Substrat	Pomembnost	Izdatki	Natančnost	Skupna vrednost
Urea (sečnina)	5	2	6	13
Aminopirin	6	2	5	13
Galaktoza	6	2	5	13
Aceat	5	2	5	12
Oktanojska kislina	6	1	4	11
Kofein	5	2	4	11
Fenilalanin	4	2	5	11
Trioktanoin	5	1	4	10
Glukoza	5	2	3	10
Laktoza	6	2	2	10

Deset substratov, ki je zbralo največ točk v skupnem seštevku, so ocenili kot najbolj primerne za uvajanje v klinično prakso (Preglednica XIII). Dihalni testi s temi substrati so pokazali največ potenciala za uvrstitev v vsakdanjo klinično uporabo. Od teh je ¹³C- dihalni test z ureo oz. sečnino že potrjen za uporabo v klinični praksi. Med najbolj obetavnimi je bil tudi ¹³C- dihalni test z laktozo (21).

V našem primeru se je dihalni test s ¹³C označenim substratom izkazal za manj primerno metodo za diagnosticiranje motenj presnove disaharida laktoze, saj smo dobili le malo uporabnih rezultatov glede na število testirancev. Verjetno bi bili rezultati nekoliko bolj uporabni, če bi podaljšali čas testiranja. Tako pa ni prišlo do maksimalnega izločanja substrata in je bil test pri veliki večini neuspešen.

V mnogih študijah je tudi veliko govora o simptomih, ki spremljajo laktozno intoleranco. Prisotnost laktozne malabsorpcije je potreben, vendar ne tudi zadosten pogoj, da bi lahko vnos laktoze opredelili kot vzrok bolnikovih simptomov. Laktozna intoleranca je opredeljena s pojavom značilnih simptomov (slabost, napihnjenost, diareja, bolečine v trebuhu), ki se pojavijo med postopkom izvajanja vodikovega (H₂) dihalnega testa, vendar pa se lahko razlaga poročil pacientov zaplete zaradi pojava placebo odziva. Populacijske študije govorijo o velikem deležu skupnosti (stopnja frekvence, ki sega od 9,5 do 25 %), ki samoporoča o težavah s toleranco na hrano. Ti odstotki so še nekoliko višji pri bolnikih z boleznimi GIT, zlasti pri tistih s sindromom razdražljivega črevesa. Pri

izpostavljenosti omenjenih bolnikov nadzorovanemu in slepemu testiranju se je pojavila reakcija na problematično hrano le pri 25-40 %.

V študiji je preizkus z 240 ml odmerkom mleka povzročil simptome pri 59 % bolnikov z laktozno malabsorpcijo, vendar pa ni povzročil omembe vrednih posledic v placebo-kontroliranem preizkusu pri osebah s samooklicano laktozno intoleranco (dejansko pri 9 od 30 bolnikov H₂-dihalni test ni pokazal na laktozno malabsorpcijo). Te ugotovitve kažejo na visoko pogostost placebo odziva na laktozo pri bolnikih, ki se sklicujejo na preiskavo zaradi prebavnih simptomov. Nadalje je bilo ugotovljeno, da ima lahko testiranje večkratnih odmerkov v kontrolirani slepi študiji dodatne prednosti. Jasni dokazi o odzivu na odmerek lahko odpravijo dvome glede vzroka in posledice in takšen pristop lahko opredeli posamezne prage laktozne intolerance za nadaljnje prehransko upravljanje. Bolniki namreč pogosto podcenjujejo količino laktoze, ki bi jo lahko popolnoma varno zaužili (3).

Nedavno je bila izvedena dvojno slepa naključna primerjava laktozne tolerance, testirana pri 10, 20 in 40 g laktoze. Vključeni so bili bolniki s sindromom razdražljivega črevesa, pri katerih je od simptomov prevladovala diareja ter kontrolna skupina kitajske populacije z zmanjšano aktivnostjo laktaze (3).

Ugotovitve nedavnega slepega testiranja večkratnih odmerkov so potrdile, da se simptomi laktozne intolerance po zaužitju nizkih odmerkov laktoze (10 g laktoze) pri zdravih osebah zelo redko pojavijo (Preglednica XIV). Prav tako je bil pojav simptomov le občasen celo pri bolnikih s sindromom razdražljivega črevesa, ki imajo zmanjšano aktivnost laktaze. S takšnim testiranjem z večkratnimi odmerki (odmerek pod normalnim pragom pojava simptomov – 10 g; odmerek, ki odraža normalen vnos pri enem obroku – 20 g; pozitivna kontrola – 40 g) zagotovimo celovite informacije, ki pojasnijo vzroke simptomov in pomagajo usmerjati klinično postopanje pri danem bolniku. Glede na te ugotovitve, bi bilo smiselno izvajati testiranje z večkratnimi odmerki, kar bi sicer zahtevalo nekoliko več dela, časa in bi bilo cenovno dražje. Bi pa dobili nekoliko bolj natančno sliko o pojavu simptomov in bi lahko dieto ustrezneje prilagodili posamezniku (3).

Preglednica XIV: Slepo testiranje laktozne tolerance z večkratnim odmerkom (3).

Odmerek	Testna skupina	10g laktoze	20g laktoze	40g laktoze
% posameznikov s pozitivnim rezultatom H ₂ -dihalnega testa (>20ppm)	kontrolna skupina	35	87	93
	bolniki s sindromom razdražljivega črevesja	42	80	92
% posameznikov s tipičnimi simptomi	kontrolna skupina	3	22	73
	bolniki s sindromom razdražljivega črevesja	18	47	85

V dosedANJI praksi se izvaja testiranje laktozne tolerance sočasno s postopkom H₂-dihalnega testa. Če je negativna napovedana vrednost teh testov visoka in ni prisotnih simptomov po 40-50 g obremenitvi z laktozo, je laktozna intoleranca izključena. V nasprotju s tem, če pa se simptomi pojavijo, ne smemo zanemariti tudi placebo odziva, predvsem pri bolnikih brez laktozne malabsorpcije, pri tistih s funkcionalnimi boleznimi GIT, in tudi pri takih s samoocenjeno preobčutljivostjo na hrano ali z alergijami. Trenutno se placebo kontrolirana testiranja in testiranja večkratnih odmerkov izvajajo samo v raziskovalne namene in bi jih bilo težko izvajati v klinični praksi. Ena izmed rešitev praktičnega vprašanja bi bila, da bi po laboratorijski potrditvi zmanjšane laktazne aktivnosti, bolniki izvajali slepo testiranje večkratnih odmerkov v domačem okolju. Takšen pristop bi olajšal uvajanje ustrezne prehrane, ne pa absolutno (popolnoma) izključil vnosa laktoze.

6 SKLEP

Kar se tiče razumevanja laktozne malabsorpcije in intolerance je bil dosežen napredek. Prav tako so na voljo občutljivi in specifični testi za ugotavljanje zmanjšane aktivnosti laktaze. Manj dokončna pa je sama diagnoza laktozne intolerance, saj ta zahteva hkratno oceno prebave laktoze in trebušnih simptomov. Zaradi pogostosti samoporočanja posameznikov o intoleranci na mlečne izdelke in glede na dejstvo, da tudi bolniki z dokazanim pomanjkanjem encima laktaze lahko tolerirajo vnos do 20 g laktoze, je te preizkuse najbolj smiselno izvajati kot niz slepih testov pri večkratnih odmerkih. Takšen pristop zagotovi informacije, ki lahko vodijo v racionalen način prehranjevanja. Kljub temu praktično izvajanje takšnega testiranja še vedno predstavlja težavo.

V okviru diplomske naloge z naslovom "Primerjava različnih testov v diagnostiki laktozne intolerance in možnost njihove uporabe v klinični praksi" je bil glavni namen ugotoviti, ali tri različne metode, ki smo jih uporabili pri testiranju preiskovancev s težavami pri presnovi laktoze, služijo svojemu namenu, kako dobro prikažejo (ponazorijo) prisotnost motnje metabolizma in posledično ali so uporabne v vsakdanji klinični uporabi. Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- ✓ **laktozni tolerančni test**- meri porast krvnega sladkorja po izzivu obremenitve z laktozo. Lažno pozitivne rezultate lahko povzroči hiter GI- prehod, oslABLJENA toleranca glukoze, lažno negativne rezultate pa nihanje krvnega sladkorja. Slaba stran te metode je tudi, da ne moremo izključiti sekundarnih vzrokov. Omogoča ocenitev značilnih simptomov. V klinične namene se izvaja redko, zaradi slabše občutljivosti in specifičnosti. Izvedba te metode je cenovno najbolj ugodna. Je primerna metoda za diagnosticiranje motenj v prebavi laktoze, vendar pa ni primerna za metodo izbire za diagnosticiranje laktozne intolerance.

V našem primeru se je laktozni tolerančni test izkazal za najučinkovitejšega kar se tiče rezultatov, saj je imelo pozitiven rezultat petnajst od 29 preiskovancev, kar je 51,7 odstotkov. Pri testu dejansko izmerimo koncentracijo glukoze v krvi, ki pa je odvisna od številnih drugih dejavnikov in procesov v organizmu. Zaradi slabše občutljivosti in specifičnosti metoda ni zanesljiva za diagnosticiranje laktozne intolerance. Lahko pa služi kot dodatna kontrola drugim testom. Ponavadi jo

izvajajo vzporedno z vodikovim dihalnim testom.

✓ **H₂- dihalni test-** meri porast vodika v izdihanem zraku po izzivu obremenitve z laktozo. Lažno pozitivni rezultati so lahko posledica hitrega GI- prehoda ali bakterijskega razrasta v tankem črevesu. Lažno negativne rezultate pa lahko dobimo, če gre pri bolniku za popolno prilagoditev debelega črevesa ali če posameznik ne proizvaja vodika. V tem primeru je priporočljivo sočasno merjenje koncentracije metana v izdihanem zraku. Tudi tukaj je pomanjkljivost metode, da ne moremo izključiti sekundarnih vzrokov. Mogoča je ocena simptomov, cena samega testiranja je nizka. Test je bolj občutljiv in specifičen kot laktozni tolerančni test, saj zdravi ljudje, ki so tešči in v mirovanju, ne proizvajajo vodika. Vodik v telesu nastaja samo pri anaerobni presnovi, ki se pojavi na primer med bakterijsko fermentacijo. Če ima telo težave z razgrajevanjem in absorpcijo laktoze, se nivo z zrakom izdihanega vodika poveša. H₂- dihalni test tako predstavlja metodo izbire za oceno laktozne malabsorpcije in tolerance. V naši raziskavi se je izkazal kot primerna metoda za diagnosticiranje laktozne malabsorpcije in intolerance, saj smo dobili zadovoljive rezultate, ki so delno sovpadali z rezultati laktoznega tolerančnega testa (obe metodi ponavadi izvajamo sočasno). Pozitiven rezultat je imelo enajst od 29 preiskovancev, kar je 37,9 odstotkov. Od 14 preiskovancev jih je 7 imelo pozitiven tako vodikov kot laktozni tolerančni test, kar je polovica. Od vseh treh testov je kombinacija laktoznega tolerančnega testa in vodikovega dihalnega testa najbolj uporabna, čeprav v našem primeru nista dovolj dober diagnostični pokazatelj za uporabo v vsakdanji klinični praksi. Pri treh od 29 preiskovancev test ni bil izvedljiv, ker po 1 uri začetna vrednost ni padla pod 10 ppm.

✓ **¹³C- dihalni test-** poda kumulativno količino izločenega ¹³C v merjenem času (odstotki izdihanega ¹³C).

Glede na to, da je bilo uporabnih rezultatov testiranja le osem od 29 preiskovancev, v našem primeru ta metoda ni dala najbolj vzpodbudnih rezultatov. Sicer je sama metoda zelo občutljiva in specifična, je pa tudi nekoliko zahtevnejša za izpeljavo. Zbrani vzorci izdihanega zraka s ¹³C, ki se hranijo v ustrezni cevi so bolj stabilni kot vzorci izdihanega zraka z vodikom, saj je ¹³C stabilen izotop. Je pa potrebna

standardizacija, saj le tako lahko primerjamo rezultate testiranja med različnimi laboratoriji. V raziskavi, v kateri so ocenjevali ^{13}C - dihalne teste z različnimi označenimi substrati, je laktozni ^{13}C - dihalni test dobil zelo visoko skupno oceno in se je uvrstil med deseterico, ki bi bila najbolj primerna za diagnosticiranje posameznih motenj in bolezni pri presnovi mlečnega sladkorja.

V naši raziskavi se test ni izkazal kot najbolj učinkovit, saj tekom testiranja ni prišlo do maksimalnega izločanja in tako rezultati pri veliki večini preiskovancev žal niso bili uporabni za nadaljnjo obdelavo. Če bi odvzeli nekaj dodatnih vzorcev, bi mogoče dobili drugačne končne rezultate. Slaba stran tega je, da bi s tem znatno podaljšali čas testiranja, kar bi bilo neprijetno za sodelujoče bolnike.

Izmed vseh treh uporabljenih metod, se je v naši raziskavi kot najučinkovitejša metoda izkazal laktozni tolerančni test, ki se ga v praksi tudi največkrat izvaja, čeprav je dokazano manj občutljiv in specifičen kot H_2 in ^{13}C - dihalni test. Vodikov dihalni test je dal manj zanesljive rezultate, pri ^{13}C - dihalnem testu pa bi za bolj zanesljive rezultate morali podaljšati čas testiranja. Zaradi velikih odstopanj rezultatov pri posamezni metodi, ne moremo oceniti primerljivosti metod za uporabo v diagnostiki laktozne intolerance oz. v našem primeru gre za slabo primerljivost. Na podlagi teh ugotovitev, nobena od treh posameznih metod ni dovolj zanesljiva za diagnosticiranje laktozne intolerance in vključitev v vsakdanjo klinično prakso.

7 LITERATURA

1. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M.: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta, Ljubljana, 2011: 563-574, 727.
2. Petrović D., Zorc M.: Histologija- učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, 1. ponatis, Univerza v Ljubljani, 2010: 89-92.
3. Misselwitz B., Pohl D., Frühauf H., Fried M., Vavricka S. R.: Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis, treatment. United European Gastroenterology Journal 2013; 1(3): 151- 159.
4. Neale G.:Dissacharidase deficiencies. J. clin. Path. 1971, 24. Supp, 5: 22-28.
5. He T., Venema K., Priebe M. G., Welling G. W., Brummer R.-J. M., Von R. J.: The role of colonic metabolism in lactose intolerance. European Journal of Clinical Investigation 2008, vol. 38: 541-545.
6. Gibson P. R., Shepherd S. J.:Evidence- based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2010, vol. 25: 252-258.
7. Labayen I., Forga L., Gonzualdez A., Lenoir- Wijnkoop I., Nutr R., Martinez J. A.: Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. Blackwell Science Ltd 2001, vol. 15: 543-549.
8. Protocols- ¹³C Breath Tests- Stomach, Campro Scientific GmbH
9. Suhadolc K., Sešek Briški A., Osredkar J.: Teoretične osnove ¹³C dihalnih testov. Farmacevtski vestnik 2013, letnik 64, številka 3: 227-235.

10. Lock J. F., Taheri P., Bauer S., Holzhütter H.-G., Malinowski M., Neuhaus P., Stockmann M.: Interpretation of non- invasive breath tests using ¹³C- labeled substrates- A preliminary report with ¹³C- methacetin. *European Journal of Medical Research* 2009, 14: 547-550.
11. Roda A., Mirasoli M., Guardigli M., Simoni P., Festi D., Afonin B., Vasilyeva G.: Non- invasive panel tests for gastrointestinal motility monitoring within the MARS- 500 Project. *World Journal of Gastroenterology* 2013, 19 (14): 2208-2216.
12. Ghoshal U. C.: How to Interpret Hydrogen Breath Tests. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2011, Vol. 17, No.3: 312-317.
13. Eisenmann A., Amann A., Said M., Datta B., Ledochowski M.: Implementation and interpretation of hydrogen breath tests. *Journal of Breath Research* 2008, Vol.2
14. Pimentel M., Mayer A. G., Park S., Chow E. J., Hasan A., Kong Y.: Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Digestive Diseases and sciences* 2003, Vol. 48, No. 1: 86-92.
15. Usai Satta P., Anania C., Astegiano M., Miceli E., Montalto M., et Trsi A.: H₂- breath testing for carbohydrate malabsorption. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2009, Vol. 29: 1-49.
16. Paschke K. M., Mashir A., Dweik R. A.: Clinical application of breath testing. *Medicine Reports* 2010, 2:56.
17. Argnani F., Di Camillo M., Marinaro V., Foglietta T., Avallone V., Cannella C., Vernia P.: Hydrogen breath test for the diagnosis of lactose intolerance, is the routine sugar load the best one. *World Journal of Gastroenterology* 2008, 14(40): 6204-6207.
18. Montalto M., Gallo A., Santoro L., D'Onofrio F., Curigliano V., Covino M., Cammarota G., Grieco A., Gasbarrini A. et Gasbarrini G.: Low- dose lactose in

- drugs neither increases breath hydrogen excretion nor causes gastrointestinal symptoms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2008, Vol. 28: 1003-1012.
19. Beyerlein L., Pohl D., Delco F., Stutz B., Fried M. Et Tutuian R.: Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2008, Vol. 27: 659-665.
20. Klein D. Peter: ^{13}C Breath Tests: Visions and Realities, *The Journal of Nutrition* 2001, 0022-3166/01: 1637-1642.
21. Fischer H., Wetzel K.: The future of ^{13}C - breath tests. *Food and Nutrition Bulletin* 2002, vol. 23, no. 3: 53-60.

8 PRILOGA

Pacient	Test	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
1. 1956 (57 let, Ž) 77 kg; 158 cm	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,9	7,7	5,9	5,7	4,6	4,9	/
2. 1976 (37 let, Ž)	H ₂ – dihalni [ppm]	4	5	0	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,2	5,7	6,7	5,0	5,0	5,1	/
3. 1996 (17 let, Ž) 68 kg; 177 cm	H ₂ – dihalni [ppm]	5	4	11	48	93	92	69
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,2	6,1	5,7	5,4	4,9	4,7	/
4. 1973 (40 let, Ž)	H ₂ – dihalni [ppm]	3	10	8	20	45	163	154
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,3	5,1	5,3	5,2	4,4	4,7	/
5. 1936 (77 let, Ž)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	3	3	6	8	5
	Glukoza – krvni [mmol/L]	6,3	7,4	7,6	7,3	7,4	6,9	/
6. 1973 (40 let, M)	**H ₂ – dihalni [ppm]	/	/	/	/	/	/	/
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,1	5,5	6,0	5,4	4,9	5,6	/
7. 1980 (33 let, M) 70 kg, 180 cm	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,3	7,7	5,7	5,2	4,3	4,6	/
8. 1973 (40 let, M) 68 kg; 180 cm	H ₂ – dihalni [ppm]	0	3	3	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,9	8,1	7,9	6,7	6,2	6,9	/
9. 1989 (24 let, Ž) 58 kg; 160 cm	H ₂ – dihalni [ppm]	7	6	19	75	94	141	105
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,9	5,4	5,7	5,4	4,8	5,2	/
10. 1947 (66 let, M) 68 kg; 165 cm	**H ₂ – dihalni [ppm]	/	/	/	/	/	/	/
	Glukoza – krvni [mmol/L]	6,8	7,4	7,3	6,8	6,5	6,2	/
11. 1992 (21 let, Ž, 55 kg; 167,5 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	/	/	/	/	/	/	/
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,9	5,1	5,2	5,0	4,9	4,7	/
12. 1981 (32 let, Ž, 55 kg; 165 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,7	6,6	5,9	4,9	5,0	4,6	/
13. 1993 (20 let, Ž, 56,5 kg; 173 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	7	6	5	0	3	3	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	5,0	6,1	5,8	6,0	4,6	5,3	/
14. 1983 (30 let, Ž, 63 kg; 171 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza – krvni [mmol/L]	4,8	6,9	6,8	5,6	5,4	4,4	/

15. 1987 (26 let, M, 74 kg; 184,5 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	4	5	0	0	0	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,2	6,2	5,3	5,6	5,0	4,1	/
16. 1969 (44 let, Ž, 86 kg; 169 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	10	13	12	49	81	112	138
	Glukoza –krvni [mmol/L]	4,7	5,2	5,4	5,4	5,4	5,1	4,9
17. 1939 (74 let, M, 92 kg; 171 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	6,8	8,4	9,6	8,8	8,5	6,7	/
18. 1970 (43 let, M, 72 kg; 188 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	5	0	41	87	93	91	82
	Glukoza –krvni [mmol/L]	4,5	4,8	4,9	4,9	4,8	4,6	/
19. 1988 (25 let, Ž, 49 kg; 159 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	4,7	6,6	5,3	4,8	4,7	5,1	/
20. 1987 (26 let, M 95 kg; 184,5 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	6	5	0	0	17	20	11
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,0	6,7	4,9	5,2	5,1	4,3	/
21. 1978 (35 let, M, 91 kg; 181 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	0	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	4,6	7,0	5,4	4,9	5,1	4,5	/
22. 1965 (48 let, Ž, 56 kg; 159 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	3	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,1	6,4	6,7	5,1	6,3	5,7	/
23. 1982 (31 let, M, 63 kg; 173 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	3	12	55	135	149	150	139
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,6	6,4	6,3	5,8	5,4	5,1	/
24. 1978 (35 let, Ž, 80 kg; 162 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	5	33	23	21	19	12
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,4	8,2	6,5	6,8	6,4	5,2	/
25. 1992 (21 let, Ž, 67 kg; 178 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	5	5	12	121	150	202	156
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,0	5,5	5,8	5,9	5,3	5,4	/
26. 1977 (36 let, M, 73 kg; 170 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	3	3	0	0	0	0	0
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,0	8,6	7,2	6,3	4,7	5,3	/
27. 1988 (25 let, M, 83 kg; 187 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	3	66	167	211	90	94
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,8	6,4	5,9	5,7	5,0	5,1	/
28. 1983 (30 let, M, 75 kg; 191 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	0	0	0	28	67	96
	Glukoza –krvni [mmol/L]	4,5	5,9	5,4	4,1	5,2	5,2	/
29. 1985 (28 let, M, 63 kg; 172 cm)	H ₂ – dihalni [ppm]	0	45	102	142	140	178	139
	Glukoza –krvni [mmol/L]	5,4	6,3	6,3	5,7	4,6	4,4	/

**** Test ni bil izvedljiv, ker po 1 uri začetna vrednost ni padla pod 10 ppm.**