

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA TIŠLER ŠTUFLEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA TIŠLER ŠTUFLEK

**PERMEABILNOSTNI INDEKS KOT POKAZATELJ PRIZADETOSTI
TANKEGA ČREVESA PRI CELIAKIJI**

**PERMEABILITY INDEX AS INDICATOR OF SMALL INTESTINE
PERMEABILITY CHANGES IN PATIENTS WITH COELIAC
DISEASE**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo v Kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. ter somentorstvom asist. dr. Draga Janše, dr. med. Spektroskopske meritve smo opravili v Laboratoriju za encimsko analitiko na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo v Kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za napotke in strokovno pomoč pri pisanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se asist. dr. Dragu Janši, dr. med., ter Gregorju Novaku, dr. med., za pomoč pri zbiranju preiskovancev. Zahvaljujem se dr. Alenki Sešek Briški, mag. farm., spec. med. biokem., za nesebično pomoč in potrpežljivost tekom izvajanja analiz vzorcev. Zahvaljujem se tudi ostalim zaposlenim v laboratoriju za pomoč in dobro voljo.

Največja zahvala gre vsem mojim, ker ste tekom mojega študija verjeli vame, me podpirali in mi omogočali lep in nepozaben čas študentskih let.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Predsednica komisije za zagovor: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

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

Somentor: asist. dr. Rado Janša, dr. med.

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

POVZETEK

Primarna funkcija tankega črevesa je prebava črevesne vsebine, absorpcija hranil in elektrolitov ter vzdrževanje homeostaze vode. Pozornejši pregled anatomske zgradbe in funkcije tankega črevesa pa prikaže izjemno pomembno funkcijo tankega črevesa kot pregrade med človeškim organizmom in okoljem. Mehanizem delovanja bariere omogoča selektivno prepustnost tankega črevesa za nekatere makromolekule.

Permeabilnostni indeks je predlog nove metode, ki temelji na prepustnosti tankega črevesa za dve molekuli različnih velikosti: manjše molekule manitola in večje molekule laktuloze. Preiskovancem po zaužitju raztopine laktuloze in manitola izmerimo njune koncentracije v urinu, ki so ga zbirali pet ur po zaužitju raztopine. Vrednost permeabilnostnega indeksa izračunamo kot razmerje med koncentracijo laktuloze (mmol/mol kreatinina) in manitola (mmol/mol kreatinina), ki ju izmerimo v urinu. S permeabilnostnim indeksom vrednotimo stopnjo prepustnosti tankega črevesa.

Nekatera obolenja pomembno vplivajo na integriteto tankega črevesa. V naši nalogi smo obravnavali bolnike s celiakijo. Celiakija je bolezen, ki se pojavi pri genetsko predisponiranih osebah hkrati ob uživanju beljakovine glutena. Prepustnost tankega črevesa je pri bolnikih s celiakijo značilno spremenjena glede na zdrave osebe. Zaradi izravnane črevesne sluznice in razrahljanih tesnih stikov med enterociti, kot posledice vnetnega procesa, imajo bolniki s celiakijo značilno povišane vrednosti permeabilnostnega indeksa v urinu. Povišane vrednosti so posledica povečane absorpcije laktuloze skozi razrahljane tesne stike med enterociti ter zmanjšane absorpcije manitola zaradi izravnanja sluznice tankega črevesa.

V študijo smo zajeli 10 prostovoljcev (tj. **zdravi**) ter 10 bolnikov s celiakijo (tj. **bolni**).

Princip detekcije laktuloze in manitola v urinu je bil absorpcijska spektroskopija.

V naši študiji smo ugotovili, da so vrednosti permeabilnostnega indeksa v skupini bolnikov s celiakijo značilno različne od vrednosti v skupini zdravih prostovoljcev. Specifičnost naše metode je bila 100%, občutljivost pa 60%.

S testom smo dokazali, da je permeabilnostni indeks ustrezen marker integritete tankega črevesa pri bolnikih s celiakijo. Izkazal se je kot ustrezen potencialni dodatni diagnostični test pri diagnosticiranju celiakije.

ABSTRACT

The primary function of the small intestine is the digestion of the intestinal contents, the absorption of nutrients and electrolytes and water homeostasis maintenance. However, a detailed overview of the small intestine anatomy and its function showed that the small intestine has a very important role as a barrier between the human organism and the external environment. The mechanism of the barrier enables selective permeability for some macromolecules.

The permeability index is a suggestion for a new method, based on small intestine's permeability for the two molecules of different sizes: the smaller molecule mannitol and the larger molecule lactulose. The subjects of the study were measured the concentration of the sugars in the five-hour urine samples after drinking the solution containing lactulose and mannitol. The permeability index is the quotient of the lactulose (mmol/l) and mannitol (mmol/l) concentrations and has no units.

Some diseases have an important influence on small intestine's integrity. In our study we studied people with Coeliac disease. Coeliac disease is a genetic disease and is clinically expressed when people eat food containing gluten. The small intestine's integrity differs when comparing healthy people and people with Coeliac disease. Due to the intestinal mucosa balance and loose tight junctions among enterocytes as a result of the inflammation, the people with Coeliac disease express typically higher values of the permeability index in the urine. The higher values are the result of the intensively absorbed lactulose through loose tight junctions among enterocytes and a weak absorption of mannitol due to the balance of mucosa.

We studied 10 healthy volunteers (**healthy**) and 10 people with Coeliac disease (**ill**). The principle of the detection of lactulose and mannitol in the urine was absorption spectroscopy.

The study shows that the values of the permeability index significantly differ between the two groups of the people. The specificity of the method was 100% and the sensitivity 60%.

The study proves that the permeability index is an appropriate marker of the small intestine's permeability when it comes to people with Coeliac disease. Despite the small samples of the study and many technical problems it can be concluded that the permeability index is an important potential diagnostic test when it comes to people with Coeliac disease.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	TANKO ČREVO	1
1.1.1	Zgradba tankega črevesa.....	1
1.1.2	Epitelij tankega črevesa in njegove celice	5
1.1.3	Transport snovi skozi steno tankega črevesa.....	6
1.1.4	Tesni stiki.....	7
1.2	CELIAKIJA	8
1.2.1	Uvod	8
1.2.2	Gluten.....	9
1.2.3	Etiopatogeneza	9
1.2.4	Klinična slika.....	13
1.2.5	Diagnostika in zdravljenje.....	14
1.3	TEST ABSORBCIJE SLADKORJEV	14
1.3.1	Uvod	14
1.3.2	Laktuloza in manitol.....	16
1.3.3	Pomen testa permeabilnostni indeks	17
1.3.4	Princip testa permeabilnostni indeks	18
1.3.5	Permeabilnostni indeks pri celiakiji	21
1.3.6	Pomen osmolarnosti raztopine sladkorjev	21
2	NAMEN DELA	23
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	24
3.1	OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV	24
3.2	OPIS ZBIRANJA VZORCEV.....	24
3.3	METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE KREATININA	25
3.3.1	Princip določanja kreatinina v urinu	25
3.3.2	Opis metode, instrumentov, materialov, reagentov	26
3.4	METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE LAKTULOZE IN MANITOLA	27

3.4.1	Opis metode, instrumentov in materialov	27
3.4.2	Reagenti, standardi, kontrole.....	29
3.4.3	Delovni postopek	29
3.5	KALIBRACIJA	31
3.6	KONTROLA KAKOVOSTI	32
3.7	POTEK ANALIZE	33
3.8	IZRAČUN IN PODAJANJE REZULTATOV.....	34
3.9	OMEJITVE PRI METODI	35
4	REZULTATI.....	36
4.1	MERITVE IN IZRAČUNI.....	36
4.2	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV.....	37
5	RAZPRAVA.....	46
6	SKLEP	53
7	SEZNAM VIROV	54

KAZALO SLIK

Slika 1-1: Črevesna resica (9).....	3
Slika 1-2: Zgradba tankega črevesa (13).....	4
Slika 1-3: Shematski prikaz petih vrst epitelijskih celic tankega črevesa (14)	6
Slika 1-4: Načini prehoda skozi epitelij tankega črevesa (16)	7
Slika 1-5: Tesni stik med dvema enterocitoma (24)	8
Slika 1-6: Proces imunskega mehanizma pri celiakiji (32).....	11
Slika 1-7: Histološka slika normalne črevesne sluznice (levo) in za celiakijo značilne sluznice (desno) (39)	13
Slika 3-1: Analizator Roche Hitachi 917	26
Slika 3-2: Kemijski analizator Olympus AU 400	28
Slika 4-1: Prikaz razlik med vrednostmi PI znotraj skupin bolnikov in zdravih.....	40
Slika 4-2: Graf specifičnosti in občutljivosti metode.....	45

KAZALO TABEL

Tabela I: Zunajčrevesni znaki celiakije (1).....	13
Tabela II: Vpliv vnetnih citokinov na prepustnost tesnih stikov med epitelijskimi celicami (42, 53, 54, 55).	20
Tabela III: Rezultati meritev z analizatorjem Olympus AU 400	36
Tabela IV: Preračunane vrednosti laktuloze in manitola na mol kreatinina ter vrednosti PI.....	37
Tabela V: Prikaz odstopanja parametrov laktuloze, manitola in PI znotraj skupine zdravih in bolnih.....	37
Tabela VI: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk ter test normalnosti porazdelitve v skupini zdravih za parameter PI.....	38
Tabela VII: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk ter test normalnosti porazdelitve v skupini bolnikov s celiakijo za parameter PI	39
Tabela VIII: F-test enakosti varianc za parameter PI v skupini zdravih in v skupini bolnikov s celiakijo	41
Tabela IX: F-test enakosti varianc za parameter PI (logaritmirane vrednosti) v skupini zdravih in v skupini bolnikov s celiakijo	41
Tabela X: T-test dveh neodvisnih vzorcev (skupina zdravih in skupina bolnih) za parameter PI	42
Tabela XI: Število pozitivnih in negativnih testov glede na diagnozo.....	42
Tabela XII: Prikaz izračuna AUC pod ROC krivuljo	44

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC IN SIMBOLOV

AGA	antigliadinska protitelesa
anti-tTg	protitelesa proti tkivni transglutaminazi
APC	antigen predstavitvena celica
ARA	antiretikulinska protitelesa
AUC	površina pod krivuljo (angl.: Area under Curve)
CD 4 ⁺	membranski glikoprotein na celicah pomagalkah (limfocitih T)
CD 8 ⁺	membranski glikoprotein na citotoksičnih limfocitih T
DQ	vrsta alela, s katerim je zapisan HLA antigen
EMA	antiendomizijska protitelesa
GC	plinska kromatografija (angl.: Gas Chromatography)
HLA	humani levkocitni antigeni (angl.: Human Leukocyte Antigen)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)
IEL	intraepitelijski limfociti
IFN- γ	interferon γ
IgA/IgG	imunoglobulini A / imunoglobulini G
IL	interlevkin
KREAT	kreatinin
LC/MS	tekočinska kromatografija z masnim spektrometrom (angl.: Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)
LLOZA	laktuloza
MANIT	manitol
PI	permeabilnostni indeks
R	reagent
ROC	krivulja, ki prikazuje razmerje med deležem resnično pozitivnih in lažno pozitivnih rezultatov (angl.: Receiver Operating Characteristics)
SAT	test absorpcije sladkorjev (angl.: Sugar Absorption Test)
TNF- α	tumor nekrozirajoči faktor α (angl.: Tumor Necrosis Factor α)
tTG	tkivna transglutaminaza
UV-VIS	ultravijolična-vidna spektroskopija
ZO	zonula occludens

1 UVOD

V današnjem času so bolezni prebavnega sistema precej razširjene. Povečana črevesna prepustnost je nevarna, saj omogoča absorpcijo organizmu škodljivim snovem v večji meri. Povečano črevesno prepustnost je potrebno pravočasno in ustrezno diagnosticirati. Klinična diagnostika funkcije integritete tankega črevesa zajema metode, ki so sicer zanesljive, vendar imajo žal številne pomanjkljivosti: so invazivne, boleče, drage, pogosto je potrebna sedacija pacienta. Gre za metode endoskopije, biopsije tankega črevesa, določanje s tehniko z žarki X in druge.

Preizkus permeabilnosti tankega črevesa z metodo absorpcije dveh sladkorjev - permeabilnostni indeks je predlog nove metode preizkušanja integritete stene tankega črevesa. Glavna prednost metode je neinvazivnost, varnost ter enostavna diagnostika. Gre za merjenje prisotnosti dveh sladkorjev različnih molekulskih mas v urinskih vzorcih.

1.1 TANKO ČREVO

Tanko črevo predstavlja približno tri četrtine dolžine človeškega gastrointestinalnega trakta. Je najdaljši del prebavnega sistema. Pri človeku meri v dolžino od šest do sedem metrov. V tankem črevesu se hrana dokončno prebavi, tu poteka absorpcija hranilnih snovi, sekrecija, tvorba neurotransmiterjev, encimov ter hormonov in obramba pred različnimi bakterijami, endotoksini in antigeni. (1, 2, 3)

Tanko črevo je tudi pomembna bariera med zunanjim okoljem in organizmom. Črevesna sluznica je v stalnem kontaktu z vsebino črevesnega lumna, zato ima pomembno vlogo v obrambi telesa pred patogenimi bakterijami in antigeni, preprečuje tudi translokacijo bakterij iz črevesa. Tej funkciji tankega črevesa pravimo črevesna bariera. (1, 2, 3)

1.1.1 Zgradba tankega črevesa

Tanko črevo je sestavljeno iz treh segmentov, ki tvorijo prehod iz želodca v debelo črevo:

- duodenum (dvanajstnik) ima obliko podkve. Predstavlja prvih 30 cm dolžine tankega črevesa. Sem pritekajo sokovi iz trebušne slinavke in žolč iz jeter. (4, 5)

- jejunum (zgornje tanko črevo) predstavlja proksimalni del tankega črevesa in v dolžino meri okoli 2,5 m. (4, 5)
- ileum (spodnje tanko črevo) je končni del tankega črevesa - distalni del, v dolžino meri 3,5 m. (4, 5)

Morfološko gledano je stena tankega črevesa sestavljena iz *sluznice* (mukoza in submukoza), *gladko-mišičnega sloja* (muscularis externa) ter *seroze*. (4, 5)

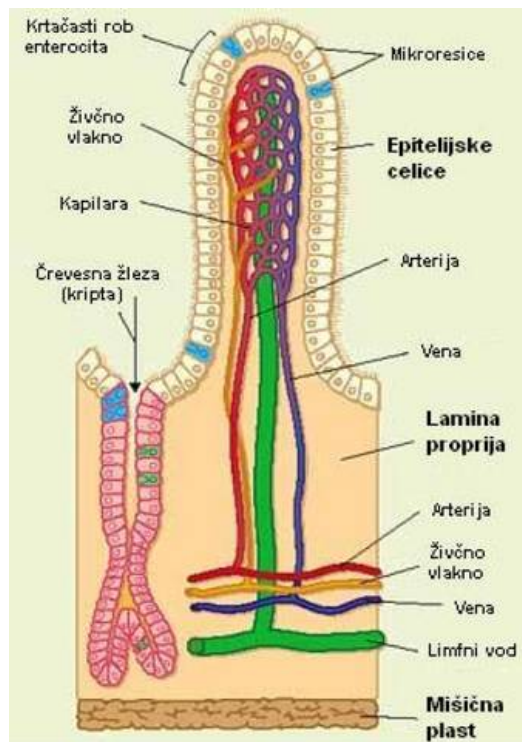
Sluznica tankega črevesa (Slika 1-2) je sestavljena iz treh slojev: epitelni sloj, rahlo vezivno tkivo (lamina propria) in mišična plast sluznice (muscularis mucosae). (1, 2, 4, 5)

Epitelni sloj pokriva debeli sloj mukusa. Mukus sestavljajo glikoproteini, defenzini, imunoglobulini in še nekatere druge spojine. Sestavine mukusa izločajo enterociti, limfociti, Gobletove celice in Panethove celice. Poleg epiteljskega sloja s tesnimi stiki mukus predstavlja pomembno bariero pred vdorom škodljivih snovi v organizem. (4, 5, 6) Epitelijska plast sluznice je sestavljena iz enoskladnega visokoprizmatskega epitelija. Lamina propria sestavljajo številne celice, ki sodelujejo pri imunskem odzivu in so del črevesnega imunskega sistema. To so limfociti, makrofagi, plazmatke, eozinofilci in tkivni bazofilci. Jamice med resicami imenujemo Lieberkuhnove kripte, ki potekajo skozi lamino proprio do mišične plasti sluznice. Žleze v sluznici tankega črevesa so zelo pogoste in izločajo črevesni sok v črevo. (4, 5, 7, 8)

Tri značilne tvorbe sluznice omogočajo zelo veliko absorptivno površino sluznice:

- *Kerckringove gube* (*plicae circulares*) so krožne ali spiralaste gube in potekajo prečno glede na luminalno površino tankega črevesa. Začenjajo se v dvanajstniku, najbolj izrazite so v jejunumu, zmanjšujejo se proti ileumu in do terminalnega ileuma izginejo. Absorptivno površino povečajo 3-krat, hkrati tudi mešajo zaužito hrano s pomočjo peristaltike; (1, 2)
- *resice ali vili* (*vili intestinales*) (Slika 1-1) so številne sluznične strukture, ki segajo daleč v lumen črevesa, prekrite so z epitelnimi celicami (enoskladen visokoprizmatski epitelij). Visoke so od 0,5 do 1,5 mm, absorptivno površino sluznice povečajo do 10-krat. Najgosteje so locirane v dvanajstniku in jejunumu, v ileumu so krajše in redkejšje. Epitelij resic sestavljajo pretežno absorptivne celice – enterociti, med njimi pa so razsejane posamezne čašaste celice, Panethove celice,

matične celice, enteroendokrine celice in intraepitelijski limfociti (IEL). V sredini resic se nahajajo prepleti krvnih žilic, limfnih kapilar, gladka mišičnina in rahlo vezivo z limfociti. V prostorih med in pod črevesnimi resicami segajo v lamino propio enostavne ali razvejane cevaste črevesne žleze – Lieberkuhnove kripte (glandulae intestinales). V predelih resic se zadržujejo koristne bakterije, ki skrbijo za ustrezno razgradnjo hranil, ki jih telo potrebuje, ter za premik nekoristnih in škodljivih substanc naprej v debelo črevo. (1, 2)



Slika 1-1: Črevesna resica (9)

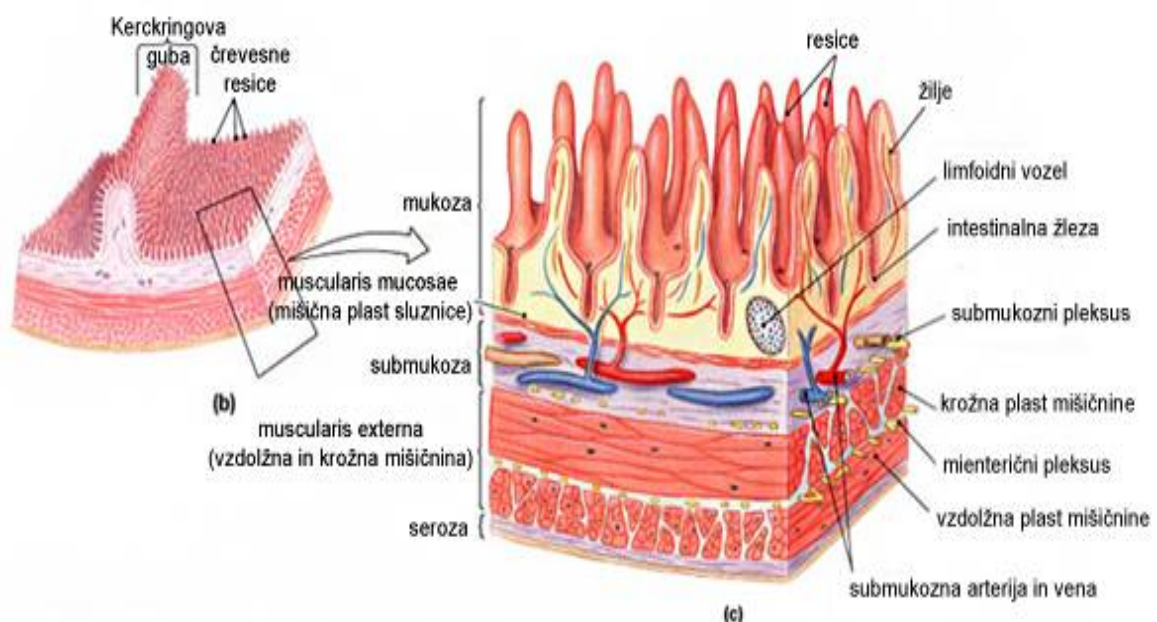
- *mikroresice ali mikrovili* (Slika 1-1) prekrivajo epitelijske celice oz. diferencirane enterocite na apikalni strani membrane. Dolge so približno 1 μm , njihov premer je 0,1 μm . Vsaka celica vsebuje od 3000 do 7000 mikroresic, ki dajejo celicam krtačast izgled (brush border). Mikroresice prekriva visoko specializirana plazemska membrana, sestavljena iz zunajceličnega polisaharidnega plašča, ki vsebuje pglavitne sluznične prebavne encime, kot so disaharidaze, aminopeptidaze, lipaze, alkalna fosfataza. Mikroresice povečajo absorptivno površino tankega črevesa do 20-krat. (1, 2)

Vse tri omenjene strukture povečajo absorptivno površino tankega črevesa do 600-krat. (1, 2)

Submukoza (Slika 1-2) sestavljajo rahlo vezivno tkivo, krvne in limfne žile, živci in živčni vozliji ter včasih maščobne celice. V submucozi dvanajstnika se nahajajo Brunnerjeve žleze, ki izločajo alkalno in viskozno tekočino. Tekočina služi za nevtralizacijo želodčne kisline. (1, 2)

Mišični sloj (Slika 1-2) je sestavljen iz zunanega vzdolžnega in notranjega krožnega sloja gladkih mišic. Kadar poteka proces prebave, se te mišiče ritmično krčijo – pravimo, da je črevo takrat peristaltično aktivno. *Krožna mišičnina* s svojimi kontrakcijami povzroči mešanje črevesne vsebine s prebavnimi sokovi ter stik s sluznico. *Vzdolžna mišičnina* izvaja peristaltično krčenje in potiska vsebino črevesa naprej proti debelemu črevesu. Med obema slojema leži mienterični Auerbachov pletež. (2, 4)

Seroza (Slika 1-2) se nahaja na vseh delih tankega črevesa, razen v spodnji tretjini duodenuma, ki ga pokriva adventicija. Sestavljena je iz enoskladnega ploščatega epitelija na zunanji strani tankega črevesa. (2)



Slika 1-2: Zgradba tankega črevesa (13)

1.1.2 Epitelij tankega črevesa in njegove celice

Ena izmed pglavitnih lastnosti črevesnega epitelija je njegova obnovljivost. V enem tednu se epitelij obnovi in zamenja. Obnovljivost je zapleten proces, odvisen od večih dejavnikov: rastnih faktorjev, hormonov, citokinov ter interakcij med celicami. Matične celice, ki se nahajajo v globini Lieberkuhnovih kript, so osnova vsem epitelijskim celicam. Pomembna vloga matičnih celic je regeneracija poškodovanega tkiva. (8, 10)

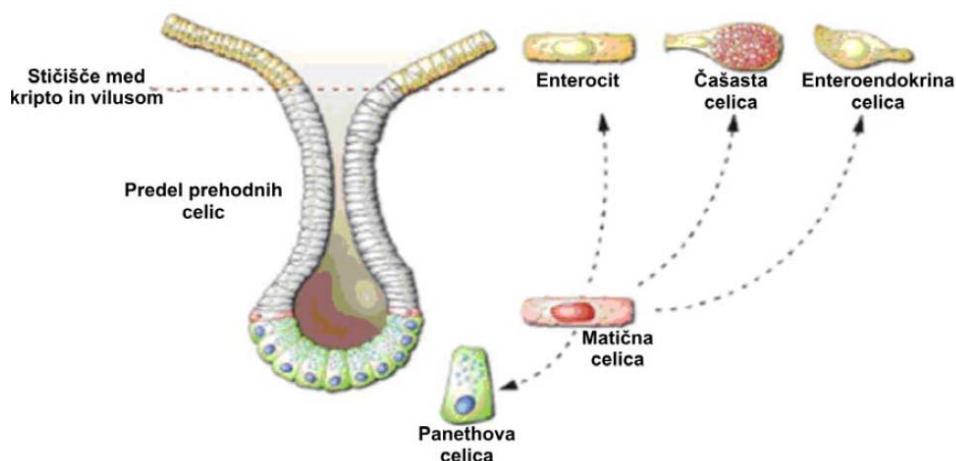
Enterociti (Slika 1-3) predstavljajo okoli 95% vseh celic epitelija tankega črevesa. Gre za visokoprizmatske celice z bazalno ležečimi, ovalnimi jedri. Značilna oblika enterocitov je stebričasta. Višina je približno trikrat večja od širine. Funkcije enterocitov so končna prebava črevesne vsebine, absorbcija vode in hranilnih snovi, povečanje površine za absorbcijo ter esterifikacija mono-, digliceridov ter maščobnih kislin do hilomikronov, ki se nato lažje absorbirajo. (1, 11, 12)

Izvirne celice (matične celice) (Slika 1-3) se nahajajo na dnu Lieberkuhnovih kript. Izvirne celice so nediferencirane in so osnova vseh ostalih epiteljskih celic. Izvirne celice se neprestano delijo, kar omogoča zelo hitro obnovljivost epitelija tankega črevesa (3 do 6 dni). (10)

Čašaste celice (Slika 1-3) izločajo sluz, bogato z glikoproteini na apikalno stran celice. Naloga sluzi je ustvarjanje zaščitne pregrade na črevesni površini ter preprečitev encimske razgradnje črevesne stene. (11)

Enteroendokrine celice (Slika 1-3) se najpogosteje nahajajo v nižjih plasteh kript. Njihova naloga je izočanje različnih hormonov npr. holecistokinina, sekretina, gastričnega inhibitornega peptida, ki skrbijo za normalen potek prebave. (2, 3)

Panethove celice (Slika 1-3) so na dnu Lieberkuhnovih kript. Izločajo številne molekule z antimikrobnim delovanjem (lizocimi, defenzini, fosfolipaza A2) v svetlino kripte. Na ta način vzdržujejo črevesno-intestinalno pregrado. Prav tako fagocitirajo nekatere bakterije ter skrbijo za regulacijo črevesne mikrobiote. Njihova naloga je tudi zaščita izvornih celic. (2, 3)



Slika 1-3: Shematski prikaz petih vrst epitelijskih celic tankega črevesa (14)

1.1.3 Transport snovi skozi steno tankega črevesa

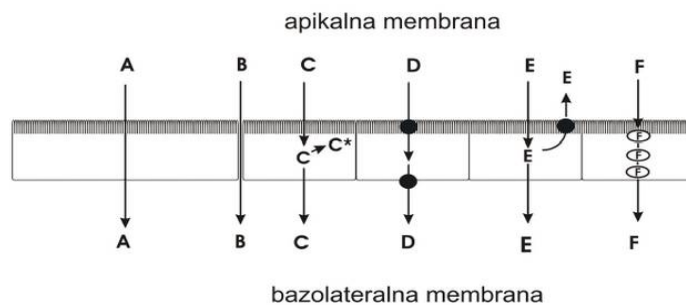
Epitelijska plast celic tankega črevesa je visoko selektivna mehanska bariera, ki omogoča prehod pomembnim hranilom in preprečuje absorpcijo toksinov iz luminalne mikroflore. Pravila selektivnosti absorpcije še niso povsem razjasnjena. Dokazano je, da molekulska velikost in fizikalno-kemijske lastnosti molekul vplivajo na način in obseg absorpcije. Za prehod skozi epitelijsko plast celic sta možna dva načina absorpcije: transcelularna pot (skozi celice) in paracelularna pot (med celicami). Integriteta tankega črevesa je torej odvisna od zdravih, nepoškodovanih epitelijskih celic ter funkcionalno ustrezne paracelularne poti med celicami. (15)

TRANSCELULARNI TRANSPORT

Transcelularni transport spojin poteka skozi epitelijsko celico. (Slika 1-4) Dve lipofilni membrani, apikalna in bazolateralna, sta veliki oviri predvsem hidrofilnim molekulam za prehod v kri. Transcelularni transport lahko poteka pasivno ali aktivno s pomočjo prenašalcev. Pasivno prehaja transcelularno le okoli 15% snovi. Vsi ostali načini transcelularnega transporta potekajo s pomočjo prenašalnih molekul oz. drugih snovi. (16) Lipofilne snovi preko apikalne membrane pretežno prehajajo s pasivno difuzijo, medtem ko je hidrofilnim snovem prehod preko membrane omogočen s pomočjo olajšane difuzije ali aktivnim transportom s specifičnim transportnim sistemom.

PARACELULARNI TRANSPORT

Glavnino pasivnega transporta (Slika 1-4) skozi epitelij tankega črevesa predstavlja paracelularni transport. Kar 85% vsega pasivnega transporta predstavlja paracelularna pot. Tesni stiki z uravnavanjem obsega paracelularne poti predstavljajo ključni regulacijski mehanizem za absorpcijo makromolekul, npr. endotoksinov in bakterijskih produktov. (15)



Slika 1-4: Načini prehoda skozi epitelij tankega črevesa (16)

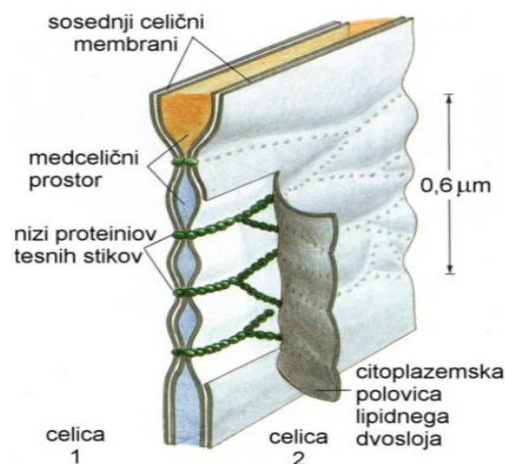
- A - paracelularna difuzija*
- B - paracelularna difuzija skozi tesne stike*
- C - transcelularna pasivna difuzija*
- C* - intracelularni metabolizem*
- D - transcelularni prenos s prenašalci*
- E - transcelularna difuzija z efluksnimi prenašalci*
- F - transcelularna transcitoza*

1.1.4 Tesni stiki

Paracelularno pot omejujejo tesni stiki med sosednjimi enterociti. Tesni stiki so dinamične strukture, ki v fizioloških pogojih regulirajo prehod hranil, molekul srednje velikosti in tekočin. Dolgo časa je veljalo dejstvo, da so tesni stiki statične strukture. Danes vemo, da gre za dinamične strukture, odvisne od številnih dejavnikov. Tesni stiki vsebujejo hidrofilne povezave med enterociti. Transport preko te poti je možen, ampak je precej počasen in omejen z majhno površino. Tesni stiki predstavljajo le 0,1 % površine, ki je namenjena absorpciji. V smeri od dvanajstnika proti kolonu postajajo tesni stiki vse manj prepustni, zato je permeabilnost polarnih substanc proti kolonu vse manjša. Skozi tesne stike lahko prehajajo majhne in srednje velike molekule, večje molekule (> 400 g/mol) pa prehajajo težje, saj jim tesni stiki predstavljajo mehansko transportno oviro. Tudi fleksibilnost molekul vpliva na njihovo prehodnost skozi tesne stike. (17, 18, 19, 20)

Po nekaterih raziskavah so vloge tesnih stikov še veliko obsežnejše: pregradna funkcija tesnih stikov preprečuje mešanje snovi, ki so na bazolateralni membrani, s snovmi na apikalni membrani. Odgovorni so tudi za prenos signalov iz celične površine v jedro. (17, 20)

Tesni stiki so strukture, organizirane v nize z več podenotami multiproteinskih kompleksov. (Slika 1-5) Nizi se med seboj prepletajo. Mreža, ki jo tvorijo, v celoti obkroža celice. Stične točke niza okoli ene celice z nizom okoli druge celice imenujemo "kissing points". (21) Za vzdrževanje ustrezne funkcije tesnih stikov so pomembne številne transmembranske in citosolne beljakovine. V splošnem velja, da več kot je vrst transmembranskih beljakovin v tesnem stiku, bolj je le-ta tesen. Dokazali so, da z aritmetričnim naraščanjem števila vrst transmembranskih beljakovin tesnost stika narašča z logaritmsko funkcijo vrednosti. (12, 22, 23)



Slika 1-5: Tesni stik med dvema enterocitoma (24)

1.2 CELIAKIJA

1.2.1 Uvod

Celiakija, z drugim imenom glutenska enteropatija, je imunsko pogojeno vnetje tankega črevesa. Ponavadi prizadene jejunum, redkeje tudi ileum. Nastanek bolezni povzroča genetsko pogojena preobčutljivost na gluten. Celiakija je ena najpogostejših kroničnih bolezni prebavnega trakta. Pogostost bolezni v Evropi in ZDA je kar 1:100 prebivalcev.

Človek lahko za celiakijo zboli v katerikoli starosti. V kasnejši starosti so v večji meri prisotni zunajčrevesni znaki ter možnosti resnejših zapletov. (1)

Celiakija je bolezen, ki se pojavi pri genetsko predisponiranih osebah ob pogoju, da uživajo hrano, ki vsebuje pšenico, rž, ječmen ali oves. Izvor nastanka bolezni je prisotnost glutena v omenjenih žitaricah. (1)

Za celiakijo obolevajo predvsem pripadniki bele rase. To je posledica genetske nagnjenosti, prisotnosti žitaric v prehrani ter ostalih dejavnikov okolja. (1)

1.2.2 Gluten

Gluten človek v organizem vnaša z zaužitjem nekaterih žitaric (pšenica, rž, oves, ječmen) Gluten uvrščamo med prolamine. Najpomembnejši izvor glutena je pšenična moka. Gluten je v vodi netopen. V 70% etanolu ločimo gluten na topne gliadine in netopne glutenine. Gliadini so zmes enostavnih polipeptidnih verig in imajo visoko vsebnost aminokislin glutamina (35%) in prolina (15%). Toksični deli gliadinov so kompleksni proteini. Kratki peptidi znotraj teh kompleksov pa so krivci za nastanek celiakije. Ti kratki peptidi morajo vsebovati vsaj 10 – 15 aminokislin, da jih lahko prepoznajo T-limfociti. Gliadine s pomočjo elektroforezne metode ločimo na α , β , γ in ω gliadine. Imunski odgovor sprožijo v največji meri α -gliadini. (25, 26, 27, 28)

Glutenini so polimeri visoke molekulske mase, sestavljeni iz manjših enot in najverjetneje niso vpleteni v patogenezo celiakije. (25)

Občutljivost na gluten ni prisotna le pri bolnikih s celiakijo, ampak gre za širši pojem. Vendar gre pri vseh bolnikih, občutljivih na gluten, za dedno zasnovano ter prisotnost T-limfocitov, senzibiliziranih na gluten. (25, 26, 27, 28)

1.2.3 Etiopatogeneza

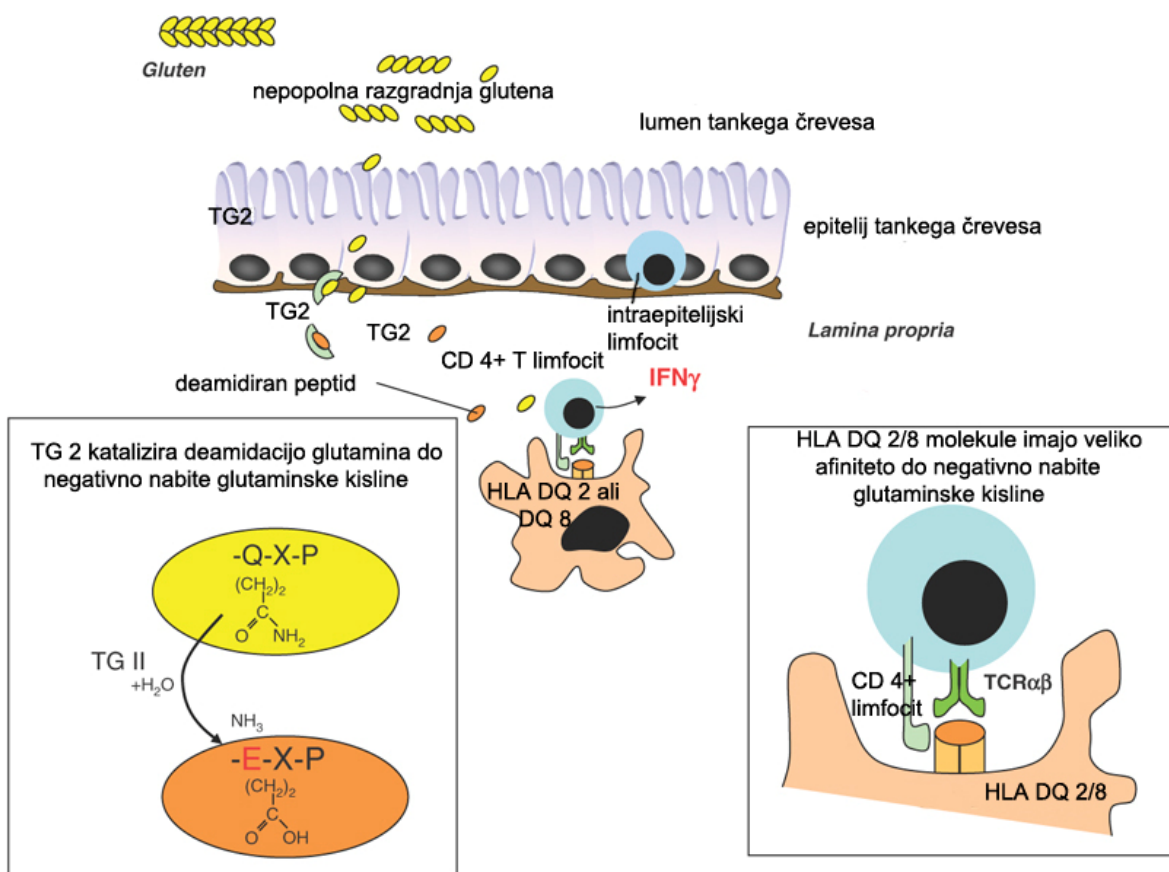
DEDNOST

Dednost je pri nastanku celiakije temeljnega pomena. Dejavniki okolja ne pojasnijo v celoti nastanka bolezni, zato velja, da so genetski dejavniki tisti, ki imajo pri nastanku celiakije najpomembnejšo vlogo (27, 28, 29).

Ne glede na različnost pojavnih oblik bolezni, je skupna značilnost vseh bolnikov dednost. 10-20 % ožjih sorodnikov bolnikov razvije celiakijo. Pri enojajčnih dvojčkih oba zbolita v 70 %, pri dvojajčnih dvojčkih pa v 90 %. Natančna genetska zasnova za razvoj bolezni še ni popolnoma raziskana. V predispozicijo za razvoj bolezni je vpletenih več genov iz različnih kromosomov. Najbolj raziskana je povezava nastanka bolezni s HLA antigeni. Gre za povezavo z nekaterimi aleli HLA (humani levkocitni antigeni) razreda I in II. Geni HLA razreda I in II se nahajajo na kratkem kraku kromosoma 6. Izraženi so na antigen predstavitvenih celicah (makrofagi, dendritične celice, limfociti B). Osnovna naloga HLA molekul je vezava peptidnih fragmentov in predstavitev le-teh T-celicam. T-celice se aktivirajo, ko prepoznajo kompleks antigen-HLA molekulo. Posledično se prične aktivacija citokinov. Glede na zgradbo so molekule HLA membranski glikoproteini z regijo, kamor se vežejo antigeni. Vezava antigena na molekulo HLA je precej nespecifična, a zelo močna. Vezava HLA molekule z membrano je stabilnejša, kadar je na HLA molekulo vezan antigen. Za aktivacijo imunskega sistema je nujen kompleks HLA-antigen, ki mora biti izpostavljen na površini celice. (29)

Bolezen je pogojena z navzočnostjo haplotipa HLA DQ-2 (90-95 % bolnikov), redkeje z haplotipom HLA DQ-8 (5-10 % bolnikov). Kar četrtina prebivalstva ima v genetskem zapisu HLA DQ-2 heterodimer, ter kar 90 % bolnikov s celiakijo. Bolniki s celiakijo brez zapisa za HLA DQ-2 imajo zelo verjetno pozitiven HLA DQ-8 protein. Bolniki brez enega ali drugega gena (HLA DQ-2 ali HLA DQ-8) so izjemno redki. Beljakovinski produkti HLA DQ-2 in HLA DQ-8 genotipov imajo večjo afiniteto vezave na negativno nabite ostanke glutaminske kisline, kar pomeni imunski odgovor v večji meri. (29, 30, 31)

Dovzetnost za nastanek celiakije ni pogojena samo s HLA DQ-2 in HLA DQ-8 geni, čeprav so osebe s temi geni za bolezen predisponirane. Raziskave so pokazale, da je v nastanek bolezni vpletenih tudi več genov na ne-HLA lokusih. (1, 2, 3)



Slika 1-6: Proces imunskega mehanizma pri celiakiji (32)

IMUNOLOŠKI DEJAVNIKI

Vpletenost celičnih in humoralnih mehanizmov v nastanek celiakije v zadnjih letih vedno bolj raziskujejo. Frakcija glutena, α -gliadin, je v največji meri povzročitelj prekomernega imunskega odziva. Spremenjena sestava imunskih celic lamine proprie ter morfološko spremenjene epiteljske celice so posledica imunskega odziva. (33, 34, 35)

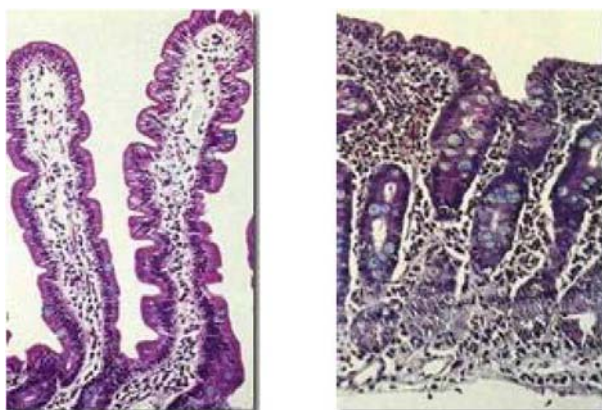
Prebava glutena v črevesu ni popolna, saj so peptidi glutena odpornejši na delovanje želodčnih in pankreasnih encimov ter encimov resaste površine enterocitov zaradi visoke vsebnosti prolina.

Nepopolno razgrajeni peptidi glutena preko interakcij s površinskimi receptorji epiteljskih celic povzročijo povečano sproščanje zonulina in s tem okvaro črevesne sluznice in njene prepustnosti. Zaradi povečane paracelularne prepustnosti je absorpcija toksičnih komponent še dodatno povečana. (36, 37) Zonulin ob vezavi na svoj receptor na površini celice inducira protein kinazo C. Posledično pride do reorganizacije aktinskih filamentov znotraj celice, ki imajo povezavo s transmembranskimi proteini tesnih stikov. (33, 34, 35).

Nerazgrajeni glutenski peptidi pospešijo nastanek škodljivih oksidativnih procesov (zmanjšana vsebnost glutationa in proteinskih –SH skupin, povečana lipidna peroksidacija). (36, 37)

Nepopolno razgrajene glutenske ostanke v lamini proprii deamidira encim tkivna transglutaminaza 2 (tTG-2) do aniona glutaminske kisline. Epitopi z negativno nabitimi skupinami se z veliko afiniteto vežejo na humane levkocitne antigenske receptorje (HLA DQ-2 in HLA DQ-8) antigen predstavitevni celic (APC). Vezavna mesta na APC celicah (makrofagih, limfocitih B, dendritskih celicah) so pozitivno nabita. APC celice predstavijo vezane deamidirane glutenske ostanke limfocitom T (CD 4⁺), ki se začno v lamini proprii pomnoževati in aktivirati. (Slika 1-6) Posledično pride do celičnega imunskega odgovora ter tvorbe vnetnih citokinov (IFN- γ , TNF- α , interleukinov). (1, 33, 34) Poleg celičnega imunskega odgovora se sproži tudi humoralni odziv. Sproščeni citokini aktivirajo limfocite B ter njihov razrast in zorenje do plazmatk. Plazmatke začno proizvajati IgA in IgG specifična protitelesa proti endomiziju (EMA), retikulinu (ARA), gliadinu (AGA) in tkivni transglutaminazi (anti-tTG). (1, 33, 34, 35)

Imunski odziv v epiteliju privede do značilnega izravnjanja sluznice tankega črevesa ter izgube njene funkcionalnosti. (Slika 1-7) Posledično je absorpcijska površina zmanjšana, kar se kaže kot malabsorbcija pomembnih hranil iz hrane. Hranila se v večji meri izločajo z blatom. Propadanje enterocitov je povečano in s tem posledično zmanjšana njihova funkcija – znižane so aktivnosti različnih encimov (disaharidaz, peptidaz idr.), kar vodi v malabsorbcijo. Zaradi večjega števila intraepitelijskih limfocitov so v epitelijskih celicah vnetni infiltrati, kar vodi v zmanjšano zmožnost presnove. Pri hujši obliki bolezni pride do nastanka atrofije sluznice z značilnimi zadebelitvami, kar lahko privede do popolne izgube funkcije nagubanega epitelija. (1, 35) Spremembe nastajajo tudi na samih epitelijskih celicah in med njimi znotraj tesnih stikov. Glikokaliks na epitelijskih celicah je pomembna mehanska zaščita in filter, saj nase veže nekatere proteine, protitelesa ter encime, ki razgrajujejo hranila. Njegova sestava je pri bolnikih s celiakijo spremenjena, ali pa ga celo ni. Mikrovilusi so nepravilnih oblik, posejani so redkeje. Znotraj enterocitov najdemo več ribosomov, lizosomov, granuliran endoplazmatski retikulum, spremenjene mitohondrije ter pri hujših oblikah maščobne kapljice. Tesni stiki med celicami so razrahljani. Prostor med enterociti je širši, kar je lahko posledica edema. (38)



Slika 1-7: Histološka slika normalne črevesne sluznice (levo) in za celiakijo značilne sluznice (desno) (39)

1.2.4 Klinična slika

Klinična slika pri celiakiji je različna med bolniki. (Tabela I) Starost bolnika, trajanje bolezni in obseg prizadetosti stene tankega črevesa vplivajo na klinično sliko bolezni. (1)

Tipični znaki celiakije so gastrointestinalni: diareja (svetlo, obilno, penasto blato, ki zaudarja), napet trebuh, slabost in bruhanje, zmanjšanje telesne teže, zaprtje, krči in bolečine v trebuhu. Predvsem pri odraslih pa so precej pogosti tudi zunajčrevesni simptomi. (1)

Sekundarna laktozna intoleranca se pojavi pri večini bolnikov. Pri otrocih se pogosto razvije tipičen malabsorpcijski sindrom (diareja, hujšanje, meteorizem, steatoreja in posledično pomanjkanje vitaminov, mineralov in beljakovin). (1, 38)

Tabela I: Zunajčrevesni znaki celiakije (1)

HEMATOLOŠKI	anemija zaradi malabsorpcije železa, folne kisline in vit. B12, pomanjkanje vitamina K, levkopenija, trombocitopenija
KOSTNI	osteoporoza/osteopenija (malabsorpcija kalcija in vitamina D), artritis, rahitis, hiperplazija zobne sklenine
KOŽNI	herpetiformni dermatitis Dühring, vaskulitis, alopecija, aftozni stomatitis
MIŠIČNI	mišična atrofija, krči
REPRODUKTIVNI	zapoznela puberteta, neplodnost, neredne menstruacije, pogostejši splavi, rojeni otroci z nižjo porodno težo
NEVROLOŠKI	miopatija, epilepsija, cerebralna ataksija, demenca, anksioznost, depresija
MALIGNI	maligni limfom tankega črevesa
OSTALI	okvare jeter (povišani jetrni encimi), nizka rast, utrujenost, nočna slepota, edemi, sekundarna laktozna intoleranca, malabsorpcijski sindrom

1.2.5 Diagnostika in zdravljenje

Osnovna diagnostična metoda ugotavljanja celiakije je biopsija sluznice jejunuma ali distalnega dela dvanajstnika. Ta metoda temelji na dokazovanju morfoloških sprememb sluznice tankega črevesa. (35)

V zadnjih letih se je razširila uporaba seroloških označevalcev. Največja prednost določanja seroloških označevalcev je neinvazivnost metode za bolnike. Pomembna prednost seroloških testov je v tem, da z njihovo pomočjo diagnosticiramo celiakijo tudi pri atipičnih oblikah bolezni. Diagnozo celiakije dokazujejo antigliadinska protitelesa (AGA) razredov IgG in IgA, antiendomizijska protitelesa (EMA) razreda IgA ter protitelesa proti tkivni transglutaminazi (t-TG) razreda IgA in IgG. (35)

Dodatni testi, ki so diagnostiki v pomoč, so krvne analize, analize blata, testi črevesne permeabilnosti ter dihalni testi (35).

V zadnjih letih se je diagnostika celiakije razširila tudi na genetske preiskave, kjer določajo prisotnost zapisa za HLA DQ-2 in HLA DQ-8. Ti testi imajo visoko negativno napovedno vrednost. (40)

Cilj zdravljenja celiakije je obnova atrofične sluznice ter zmanjšanje tveganja hujših posledičnih zapletov. Bolnik s celiakijo se mora doživljenjsko držati brezglutenske diete. Zaradi pogosto pridružene laktozne intolerance se mora bolnik izogibati tudi prehrani z laktozo. Bolniku ponavadi predpišejo dodatno zauživanje vitaminskih pripravkov ter železa. Po enem letu stroge brezglutenske diete se sluznica tankega črevesa normalizira. Ob neupoštevanju brezglutenske diete preti nevarnost nastanka limfoma, raka žrela in požiralnika. (1, 41)

1.3 TEST ABSORPCIJE SLADKORJEV

1.3.1 Uvod

Povečana intestinalna permeabilnost je posledica različnih intestinalnih enteropatij. Zlati standard ugotavljanja patofizioloških stanj sluznice tankega črevesa je biopsija. Biopsija pomeni histološki pregled biopta črevesne sluznice. Biopsijo izvedejo pri bolnikih, pri katerih obstaja sum na malabsorpcijo ali deficit posameznih hranilnih snovi. Biopsija tankega črevesa je sicer zanesljiv, a boleč in izredno naporen postopek za pacienta. Zato so

že v preteklosti iskali možnosti in načine, s katerimi bi lahko moteno intestinalno permeabilnost preiskovali tudi s pomočjo manj invazivnih metod. (42, 43, 44)

Razvoj neinvazivnih metod, ki odražajo funkcijo tankega črevesa, se je pričel v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so preizkušali ne-metabolizirajoče oligosaharide kot testne substance. Razviti so želeli metodo s testnimi molekulami, ki se v tankem črevesu ne bi metabolizirale, temveč bi se v nespremenjeni obliki izločile v urin. Idealne testne molekule naj bi imele različne molekulske mase, saj je permeabilnost tankega črevesa različna za različno velike molekule. Raziskovalec Menzies je leta 1974 prvič predstavil oligosaharide kot testne substance za neinvazivno metodo preizkušanja permeabilnosti tankega črevesa. Predstavil je princip merjenja peroralno zaužitih substanc v urinu. (42, 43, 44)

Idealna testna substanca naj bi ustrezala naslednjim kriterijem: topna je v vodi, je netoksična, nerazgradljiva, se ne metabolizira pred, med ali po prehajanju stene tankega črevesa. Substanca se skozi steno tankega črevesa ne absorbira aktivno. Substanca ne sme biti fiziološko prisotna v urinu. Meritve substanc v urinu morajo biti enostavne, točne, zanesljive in občutljive. (44) Testirali so permeabilnost različnih oligosaharidov (laktuloza, melobioza, rafinoza, celobioza), monosaharidov (L-ramnoza in manitol), polimerov etilenglikola ter CrEDTA. (44) Zaradi radioaktivnosti CrEDTA danes to metodo v klinični praksi vse pogosteje nadomeščajo z različnimi ogljikovimi hidrati. Večinoma testi potekajo z dvema sladkorjema različnih molekulskih mas. Test absorpcije le enega sladkorja ima nemalo pomanjkljivosti: številni pre- in postmukozni faktorji (gastronintestinalna motilnost in praznenje, bakterijska razgradnja, renalni očistek) lahko vplivajo na absorpcijo in izločanje sladkorja. Kadar v test vključimo dva različna sladkorja, faktorji na oba vplivajo v enaki meri in zato se vpliv faktorjev izniči, rezultati so relevantnejši in bolj realno odražajo dejansko patološko stanje. Test z dvema sladkorjema je bolj specifičen in bolj občutljiv kot test z le enim sladkorjem. Prednosti metode z dvema sladkorjema so vodile k vpeljavi specifičnega indeksa intestinalne permeabilnosti. (44, 45)

Razlikovalni test absorpcije dveh sladkorjev vsebuje di- ali oligosaharid in monosaharid oz. alditol, ki ju pacient zaužije peroralno, analiza pa temelji na merjenju koncentracije obeh sladkorjev v urinu. Permeabilnostni indeks (v nadaljevanju PI) je kvocient koncentracij večjega in manjšega sladkorja v urinu. V diplomski nalogi bomo za

preučevanje prepustnosti stene tankega črevesa uporabili sladkorja laktulozo in manitol: (42, 43, 44, 45)

[Enačba 1]

$$PERMEABILNOSTNI\ INDEKS = \frac{konc.\ laktuloze\ v\ urinu\ [mmol/mol\ kreat.]}{konc.\ manitola\ v\ urinu\ [mmol/mol\ kreat.]}$$

Kljub omenjenim prednostim podajanja rezultatov v obliki razmerja obeh sladkorjev, pa so za klinično sliko, kot bomo kasneje videli, pomembne tudi vrednosti posameznih sladkorjev v urinu. Spremenjene vrednosti enega ali drugega sladkorja v urinu lahko pokažejo značilno klinično sliko nekaterih patofizioloških stanj v steni tankega črevesa. (46)

1.3.2 Laktuloza in manitol

V naši raziskavi bomo za ugotavljanje merjenja črevesne prepustnosti uporabili disaharid laktulozo ter monosaharid (alditol) manitol.

Laktuloza je sintetično pridobljen, neprebavljiv sladkor. Je disaharid, sestavljen iz monosaharidov fruktoze in galaktoze. Komercialno ga pridobivajo z izomerizacijo laktoze. Molska masa laktuloze je 342,296 g/mol, velikost molekule pa 0,54 nm. V farmaciji laktulozo kot zdravilno učinkovino uporabljajo za zdravljenje kroničnega zaprtja in jetrne encefalopatije. Velika prednost določanja laktuloze v urinu je, da črevesni encimi (laktaze) laktuloze ne morejo razgraditi. (42, 47, 48)

Manitol je polihidroksi alkohol. Uvrščamo ga med poliole. Pridobivajo ga z derivatizacijo sladkorjev z redukcijo. Molska masa manitola je 182,17 g/mol, velikost molekule pa 0,4 nm. Je dober osmozni diuretik in renalni vazodilatator. Pomanjkljivost določanja manitola v urinu je možnost njegove fiziološke prisotnosti v urinu, čeprav so te vrednosti ponavadi majhne. (42, 48, 49)

Najpomembnejša lastnost laktuloze in manitola je, da v prebavnem sistemu do prihoda v tanko črevo ostaneta nespremenjena. Obe molekuli se izločata preko ledvic, njun očistek je enak očistku kreatinina. Količina izločenega manitola in laktuloze v urinu je direktno proporcionalna količini, ki preide steno tankega črevesa. (47, 49, 50)

1.3.3 Pomen testa permeabilnostni indeks

Študije s testom PI pojasnijo vlogo intestinalne permeabilnosti pri patofizioloških stanjih tankega črevesa. Določanje PI je uporabno kot pomoč pri diagnostiki Chronove bolezni, ulcerativnega kolitisa, celiakije, nutritivne alergije ter diabetesa tipa I. Test je dober dodatni diagnostični pokazatelj večine enteropatij tankega črevesa. Izračun PI je dober pokazatelj učinkovitosti terapevtskih intervencij pri omenjenih boleznih. (48) Test je prav tako pomemben pokazatelj stopnje poškodbe tankega črevesa pri pacientih s sepsa (funkcija intestinalne bariere ima glavno vlogo pri razvoju sepse), cistično fibrozo, artritisom, avtoimunskimi boleznimi in srčnimi operacijami. Na vrednost PI lahko vpliva več kemičnih in fizioloških dejavnikov: hude telesne obremenitve (pretirano športno udejstvovanje), dolgotrajno stradanje, uživanje nekaterih zdravil, npr. nesteroidnih antirevmatikov, in alkohol. (48, 50, 51)

Žal se test zaenkrat še ni izkazal kot primeren za rutinsko uporabo. Omejitve so predvsem nepraktično nekajurno zbiranje urina ter kompleksnost analitskih metod (HPLC, LC/MS, encimske metode, redkeje tankoplastna kromatografija). Te metode žal zahtevajo veliko časa, zaradi česar ne morejo naenkrat analizirati velikega števila vzorcev v rutinskih analizah (izjema je GC, ki se je izkazala kot hitra metoda z možnostjo analize velikega števila vzorcev in z dobro ločljivostjo). Zaenkrat še ni na voljo uveljavljenih referenčnih vrednosti oz. rezultatov, slaba pa je tudi ponovljivost testa in samega postopka. Problem testa je tudi v tem, da ponavadi identificira le napredovane stopnje poškodb stene tankega črevesa. Test se je izkazal kot premalo občutljiv za diagnostiko zgodnjih faz poškodb sluznice. (48, 50, 51)

Možnosti uporabe testa PI so različne. Študije so pokazale, da bi test lahko bil dobra dodatna potrditvena metoda pri diagnozi patoloških stanj stene tankega črevesa, kot presejalni test ter dober napovedni test za vrsto kliničnega poteka bolezni. (44) Največ poudarka dajejo predvsem dolgoročnim študijam bolnikov s pomočjo testa PI. Primer dolgoročne študije je npr. spremljanje bolnika s celiakijo od začetka (ni bilo brezglutenske diete) do takrat, ko bolnik že dolgo upošteva brezglutensko dieto. Ves ta čas izvajamo teste PI in opazujemo spremembe vrednosti parametrov testa ter posledično zdravstvenega stanja bolnika. Vrednosti parametrov testa PI v teh primerih vrednotimo glede na predhodne rezultate. (50)

Test absorpcije dveh sladkorjev – laktuloze in manitola je enostaven, neinvaziven, varen, neboleč, ponovljiv, zanesljiv in poceni. Zaradi neinvazivnosti ga lahko uporabimo tudi pri otrocih. (44, 50)

1.3.4 Princip testa permeabilnostni indeks

Princip določanja sladkorjev laktuloze in manitola v urinu temelji na različnih mehanizmih transportov laktuloze in manitola skozi mukozo tankega črevesa. Pri pogojih, ko je sluznica tankega črevesa zdrava, se absorbira cca. 14 – 18% zaužitega manitola ter manj kot 1% zaužite laktuloze (0,4% do 0,7%). Razmerje laktuloza/manitol v urinu (tj. permeabilnostni indeks) je pri zdravih osebah manj kot 0,1. (48)

Obstajata dve teoriji, ki razlagata različne mehanizme transporta manitola in laktuloze skozi steno tankega črevesa:

TRANSCELULARNA TEORIJA OZ. TEORIJA POR

Epitelijska membrana stene tankega črevesa je lipofilna struktura, zato v splošnem čez to membrano lahko prehajajo le lipofilne molekule. Vodne pore znotraj strukture membrane pa omogočajo transcelularen prehod tudi nekaterim vodotopnim molekulam. (52, 53, 54)

Teorija por definira epitelij stene tankega črevesa kot membrano s številnimi vodnimi porami. Pore so različnih velikosti in ležijo v membranah enterocitov. Po večini prevladujejo manjše pore, ki omogočajo prehod manjšim vodotopnim molekulam. Velikost vodnih por je kriterij, ki določa, kako velike vodotopne molekule lahko prehajajo čez membrano. Vodotopne molekule, ki prehajajo čez membrano, ne morejo biti večje od velikosti por. Po tej teoriji transcelularno (skozi vodne pore v enterocitih) lahko prehajajo manjše vodotopne molekule, med katere sodijo npr. manitol, L-ramnoza (velikost do 0,4 nm). Pore manjših velikosti se nahajajo v predelu resic. (52) Zelo malo je por v membrani resic, ki bi bile tako velike, da bi omogočale transcelularen prehod večjim molekulam, v našem primeru laktulozi. Večje pore (velikost do 5 nm) se po tej teoriji nahajajo med celicami kript znotraj tesnih stikov, zaradi česar laktuloza prehaja paracelularno. (52) Paracelularni prehod laktuloze skozi pore je zelo počasen zaradi prisotnosti različnih struktur znotraj tesnih stikov. Število por med celicami je bistveno manjše od števila por

znotraj celic, zato se v normalnih fizioloških pogojih absorbira bistveno več manitola (skozi celice) kot laktuloze (med celicami). (52, 53, 54)

PARACELULARNA TEORIJA

Po tej teoriji naj bi se vse snovi skozi steno tankega črevesa v kri absorbirale paracelularno skozi tesne stike med epiteljskimi celicami. Teorijo je razvil D. Hollander. (55) Tesnost stikov se razlikuje glede na to ali se stiki nahajajo v resicah ali v kriptah. Stiki v resicah so zelo tesni in naj bi dopuščali prehod zelo majhnim molekulam, v našem primeru manitola. Stiki v kriptah pa so "rahlješi" in omogočajo prehod tako majhnim kot večjim molekulam (v našem primeru manitola in laktuloze). Kljub večji prepustnosti stikov v kriptah pa je absorpcija laktuloze vseeno relativno majhna. Razlaga tiči v tem, da so kripte relativno nedostopne tekočini iz lumna tankega črevesa in da imajo snovi v lumnu tankega črevesa manjšo možnost absorpcije na nivoju kript v primerjavi z resicami. (44) Resice kot izrastki "dosežejo" večje število molekul za absorpcijo in zato je absorpcija manitola bistveno večja kot absorpcija laktuloze. (44, 55)

Bolezenska stanja stene tankega črevesa vplivajo po tej teoriji na absorpcijo na dva načina:

- razrahljajo tesne stike v kriptah, zato je absorpcija laktuloze povečana, kar poveča vrednost razmerja laktuloza/manitol v urinu. Dokazali so, da je povečana absorpcija laktuloze premosorazmerna z volumnom kript, kar sovпада s paracelularno teorijo absorpcije laktuloze; (55)
- poškodujejo resice, kar poslabša absorpcijo snovi med tesnimi stiki v resicah. Posledično je absorpcija manitola zmanjšana, vrednost razmerja laktuloza/manitol v urinu se poveča. (53, 56)

Teorijo potrjujejo rezultati številnih raziskav permeabilnosti tankega črevesa. Pri bolnikih s celiakijo, kjer pride do vilusne atrofije, so rezultati raziskav PI pokazali zmanjšano absorpcijo manitola, saj je zaradi zmanjšane vilusne površine na voljo bistveno manj tesnih stikov v resicah, skozi katere naj bi se manitol po tej teoriji absorbiral. Pri bolnikih s celiakijo je ravno tako spremenjena absorpcija laktuloze, ki se kot posledica vnetnih procesov, ki razrahljajo tesne stike v kriptah, poveča. Pri nekaterih drugih obolenjih npr. alergiji na hrano, pankreatični insuficienci absorpcija manitola ostaja nespremenjena. Pri teh obolenjih se poveča absorpcija laktuloze, kar je v skladu z naravo teh obolenj (vnetni

procesi, ki razrahljajo tesne stike). Pri teh obolenjih vilusi niso prizadeti, prizadeti so tesni stiki v kriptah, kar ima za posledico povečano absorpcijo laktuloze in višje vrednosti PI. (35, 53, 54, 55)

Katera teorija je pravilna, do sedaj žal še niso uspeli dognati oz. dokazati. Večina raziskovalcev dopušča možnost kombinacije obeh teorij. (55) V večini do sedaj izvedenih raziskav povzemajo, da manitol kot majhna molekula prehaja transcelularno skozi vodne pore v membrani enterocitov (pretežno v predelih resic), laktuloza pa zaradi svoje velikosti skozi steno tankega črevesa prehaja paracelularno (med celicami) skozi tesne stike v kriptah (53, 54, 55). Tej teoriji ustreza tudi večina izsledkov raziskav merjenja sladkorjev v urinu pri različnih mehanizmih obolenj. Kadarkoli je v tankem črevesu prisoten vnetni proces (ki nastane pri različnih vrstah enteropatij), kjer vnetne molekule (citokini: IFN γ , IL-4, TNF α) dokazano razrahljajo tesne stike, je absorpcija laktuloze povečana. (Tabela II) Prav tako na večjo prepustnost tesnih stikov vplivajo tudi nevtrofilci s svojo migracijo pri nastanku vnetnega procesa. (42)

Tabela II: Vpliv vnetnih citokinov na prepustnost tesnih stikov med epitelijskimi celicami (42, 53, 54, 55)

IME	MESTO NASTANKA	DELOVANJE	VPLIV NA PERMEAB.	MEHANIZEM DELOVANJA
IL-4	nastane z aktivacijo limfocitov Th-2	pospešuje proliferacijo in dozorevanje limfocitov B ter IgE produkcijo	poveča	aktivira tirozin kinazo.
TNF α	nastane v mononuklearnih celicah	vpliva na fiziološko delovanje, rast ter diferenciacijo nekaterih tkiv	poveča	sproži apoptozo, depolimerizacijo F-aktinskih filamentov, premik JAM molekul stran od tesnih stikov in aktivira tirozin kinazo in protein kinazo A
IF γ	nastane v aktiviranih limfocitih Th1 in naravnih ubijalkah	aktivira makrofage, ki predstavljajo antigen in uničijo znotrajcelične mikrobo	poveča	sproži premik okcludina, JAM molekul, ZO-1 in ZO-2 stran od tesnih stikov. Sproži kolaps strukture aktinskega citoskeleta.

Pri obolenjih, kjer pride do vilusne atrofije, pa je prizadeta (zmanjšana) tudi absorpcija manitola. Manjša površina vilusov pomeni manjše število celic (zmanjšano število vodnih por), skozi katere bi se manitol lahko absorbiral. Absorpcija večjih molekul (laktuloza) v nasprotju z absorpcijo manjših molekul (manitol) ni nujno povezana z izgubo nagubanosti stene tankega črevesa, saj se laktuloza pretežno absorbira na nivoju kript (42, 54, 55)

1.3.5 Permeabilnostni indeks pri celiakiji

Pri pacientih s celiakijo so ugotovili, da je predhodno poškodovana stena tankega črevesa pomemben predispozicijski faktor za razvoj bolezni. Kadar je črevesna stena poškodovana, se gliadin lažje in v večji meri absorbira in posledično močnejše aktivira imunski odgovor. Raziskave so pokazale, da imajo pacienti s celiakijo tudi po brezglutenski dieti še vedno povečano prepustnost stene tankega črevesa. Gliadin, toksična komponenta glutena, v fizioloških pogojih dodatno povzroči povečano ekspresijo zonulina, kar posledično privede do še večje prepustnosti tesnih stikov. Absorpcija laktuloze je pri bolnikih s celiakijo značilno povečana. (57)

Izguba nagubanosti stene tankega črevesa in posledično njene funkcionalnosti se značilno odraža pri rezultatih absorpcije manitola. Raziskave so pokazale, da se absorpcija manitola pri nezdravljenih bolnikih zmanjša za cca. 35% zaradi atrofije resic. Spremembe prepustnosti pri celiakiji so posledica tako vilusne atrofije kot disfunkcije tesnih stikov zaradi učinka gliadina. (44, 57, 58)

1.3.6 Pomen osmolarnosti raztopine sladkorjev

Številni faktorji lahko vplivajo na ustreznost rezultatov testa PI. Mednje prištevamo razmerje zaužitih sladkorjev, človekova višina in površina telesa, čas trajanja zbiranja urina ter osmolarnost raztopine sladkorjev. Osmolarnost raztopine sladkorjev, ki jih pacient peroralno zaužije, je pomemben podatek, ki prispeva k ustreznosti rezultatov. Predhodno izvedene študije so pokazale, da hiperosmolarna SAT raztopina (vsebuje laktulozo in manitol kot testni molekuli, ter sukrozo, ki prispeva k večji osmolarnosti) omogoča boljšo diskriminacijo rezultatov kontrolnih skupin in bolnikov s celiakijo. Najprimernejša osmolarnost testne raztopine naj bi bila okoli 1560 mmol/l. Paracelularna pot absorpcije, ki je pomembna za absorpcijo laktuloze, je izboljšana v resicah, ko pacient zaužije hiperosmolarno raztopino. Dobra paracelularna absorpcija laktuloze poteka v kriptah, medtem so tesni stiki v resicah zelo malo prepustni za absorpcijo laktuloze. Rezultati študije so pokazali, da je absorpcija laktuloze ob zaužitju hiperosmolarne raztopine izboljšana tako pri kontrolnih pacientih kot pri bolnikih s spremenjeno strukturo črevesne stene. Izboljšana absorpcija laktuloze je večja zaradi boljše propustnosti tesnih stikov za laktulozo v resicah. Smisel zaužitja hiperosmolarne raztopine je torej v tem, da so razlike v koncentraciji laktuloze v urinu izrazitejše pri zdravih ter bolnikih s celiakijo. (46, 59)

Vpliv osmolarnosti raztopine na absorpcijo manitola je nepomemben. Študije so pokazale, da osmolarnost raztopine do vrednosti 3600 mOsm/L na absorpcijo manitola praktično nima vpliva. Nekatere študije opozarjajo na pomen manitola, kadar pacient zaužije izoosmolarno raztopino. Manitol naj bi v tem primeru zmanjševal absorpcijo disaharidov, kar ima za posledico nesignifikatne razlike v koncentraciji disaharidov v urinu pri zdravih ter bolnih. (45, 46, 59)

Žal ima zaužitje hiperosmolarne raztopine lahko tudi negativne posledice. Predvsem pri otrocih, ki imajo poškodovano črevesno steno, lahko pride do osmozne diareje, zato ponekod zaužitje hiperosmolarnih raztopin pri otrocih odsvetujejo. (46, 59)

2 NAMEN DELA

Namen naše raziskave je opredelitev testa permeabilnostni indeks. Test permeabilnostni indeks je novejša predlagana metoda preizkušanja prepustnosti stene tankega črevesa. Neinvazivnost metode in enostavno testiranje pacientov sta nekatere protagoniste privedla do predloga, da bi test v prihodnosti postal del rutinske analize preizkušanja permeabilnosti tankega črevesa. Raziskava Permeabilnostni indeks bo prva tovrstna raziskava pri nas. Do sedaj že obstajajo nekatera priporočila glede permeabilnostnega indeksa kot pomembnega diagnostičnega faktorja, vendar je treba klinično pomembnost testa permeabilnostni indeks še raziskovati in potrjevati.

V diplomski nalogi se bomo osredotočili na bolnike s celiakijo, sama raziskava Permeabilnostni indeks pa bo v prihodnosti zajemala še nekatere druge bolnike (bolnike s Chronovo boleznijo, bolnike z nutritivno alergijo, bolnike z diabetesom tipa I) ter predvsem večje skupine bolnikov znotraj posameznih skupin.

Cilj diplomske naloge je ovrednotiti vpliv bolezenskega procesa pri bolnikih s celiakijo na vrednost permeabilnostnega indeksa. V nalogi bomo:

- določili koncentracije dveh sladkorjev (manitola in laktuloze) v urinu zdravih preiskovancev ter pacientov s celiakijo,
- iz dobljenih koncentracij sladkorjev izračunali vrednosti permeabilnostnega indeksa,
- ugotavljali, ali so vrednosti permeabilnostnega indeksa značilno različne pri bolnikih s celiakijo glede na zdrave preiskovance ter rezultate skušali primerjati z rezultati preteklih raziskav v tujini.

Pomemben vidik diplomske naloge bo tudi seznanitev s postopki za določanje permeabilnostnega indeksa z absorpcijsko spektroskopijo, s katero bomo pridobili rezultate testa.

Rezultate meritev bomo statistično ovrednotili z namenom ugotoviti, ali je permeabilnostni indeks klinično pomemben parameter pri določanju prepustnosti stene tankega črevesa pri bolnikih s celiakijo.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV

V študijo smo zajeli dve skupini ljudi. Prvo skupino so sestavljali zdravi prostovoljci (10 ljudi), v drugi skupini pa so bili pacienti s celiakijo (10 ljudi), ki so se zdravili na Gastroenterološki kliniki, Japljeva 2, v Ljubljani. Vsi so v raziskavi sodelovali prostovoljno. Udeležence v raziskavi smo kontaktirali po telefonu, jim predstavili raziskavo in jih povabili k sodelovanju.

V raziskavi je sodelovalo 15 žensk in 5 moških. V skupini bolnikov s celiakijo je bilo 9 žensk in 1 moški. V skupini zdravih je bilo 6 žensk in 4 moški. Povprečna starost vseh preiskovancev je bila 38,3 leta. Povprečna starost preiskovancev v skupini bolnikov je bila 40,4 leta, v skupini zdravih pa 36,2 leti.

3.2 OPIS ZBIRANJA VZORCEV

Pacienti oz. zdravi prostovoljci so pred samim pričetkom testa oddali kri, kjer so jim preverili krvno sliko z biokemijsko preiskavo. Biokemijske preiskave krvi so pomembne kot pomoč pri postavitvi diagnoze, za izključitev drugih bolezni, za spremljanje poteka bolezni ter učinkovitosti zdravljenja. Sodelujoči so oddali tudi blato, v katerem smo določali kalprotektin. Kalprotektin je pomemben označevalec kroničnih vnetnih črevesnih bolezni.

Prvi dan prihoda na Polikliniko, ko je preiskovanec oddal kri, je hkrati prejel tudi vsebnik za zbiranje urina, navodila za izvedbo testa PI ter vsebnik za zbiranje vzorca blata. Test PI je preiskovanec opravil doma ter naslednji dan v laboratorij prinesel zbran urin ter vzorec blata.

Preiskovanec je moral biti pred pričetkom izvedbe testa PI tešč (vsaj 10 ur). Preden je popil raztopino z laktulozo in manitolom (SAT raztopino), je šel na stranišče ter takoj zatem popil SAT raztopino v čim krajšem času. Nato je nadaljnjih pet ur zbiral urin v vsebnik, ki je vseboval konzervans klorheksidin (0,5 ml klorheksidina, 20% raztopina). Prvi dve uri zbiranja urina pacient ni smel jesti in piti, nato je lahko zaužil vse, razen slaščic, žvečilnega gumija, peperminta in sladil. Po preteku petih ur je lahko normalno jedel in pil. Naslednji dan je vsebnik z zbranim urinom prinesel v laboratorij. (60)

SAT raztopine so bile pripravljene v lekarni Kliničnega centra po naslednjem postopku:

- 75 ml deionizirane/destilirane vode nalijemo v stekleničko,
- dodamo 5 g laktuloze (proizvajalec Duphalac, Solvay Pharma BV, Weesp),
- dodamo 2 g manitola (proizvajalec J.T. Baker, Deventer),
- dodamo 40 g sukroze (proizvajalec Suikerunie, Breda),
- dopolnimo z deionizirano/destilirano vodo do 100 ml (osmolarnost pripravljene raztopine je cca. 1650 mosm/l). (61)

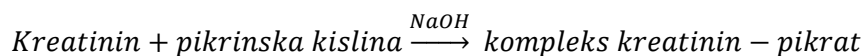
V laboratoriju smo potem, ko je pacient prinesel vsebnik z urinom, izmerili volumen urina ter ga razdelili na alikvot za določitev kreatinina in alikvot za določitev sladkorjev. Alikvot 1 ml urina je bil namenjen določitvi koncentracije kreatinina, ki smo jo določili takoj. Alikvot 10 ml, namenjen analizi sladkorjev, smo shranili na -20°C do analize.

3.3 METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE KREATININA

3.3.1 Princip določanja kreatinina v urinu

Kreatinin smo v urinu določali po principu t.i. Jaffejeve metode v bazičnem mediju. Šlo je za modificirano obliko Jaffejeve reakcije s kinetično metodo. Kreatinin v reakciji z Na-pikratom reagira do nastanka kompleksa kreatinin-pikrat. Kompleks je rdeče-oranžno obarvan. Izmerjena absorbanca kompleksa pri 505 nm je sorazmerna koncentraciji kreatinina v vzorcu urina. (62, 63)

[Enačba 2]



Jaffejeva metoda je nespecifična. Številne endogene snovi lahko reagirajo z Na-pikratom, npr. glukoza, proteini, askorbinska kislina, aceton, sečna kislina, α -ketokislina idr. Skupno ime za te snovi je psevdokreatinini. Psevdokreatinini lahko dajo do 20% lažno zvišano koncentracijo kreatinina. Bilirubin pa daje lažno negativno reakcijo. (62, 63)

Kinetična Jaffejeva metoda je modificirana Jaffejeva metoda in je zasnovana na principu merjenja absorbance znotraj določenega časovnega intervala. Absorbance kompleksa kreatinin-pikrat izmerimo v intervalu 20–80 sekund. V času 20–80 sekund absorbira le kreatinin, s čimer se izognemo motnjam zaradi absorbanc psevdokreatininov. (62, 63)

3.3.2 Opis metode, instrumentov, materialov, reagentov

Vzorčenje, dodajanje reagentov, mešanje, detekcijo ter izpis rezultatov je samodejno izvršil aparat *Roche/Hitachi 917*. (Slika 3-1) *Roche/Hitachi 917* je avtomatiziran kemični analizator in se uporablja za *in vitro* kvanti- in kvalitativno določanje metabolitov v urinu, krvi ter drugih telesnih tekočinah. Poleg kreatinina s to aparaturo določamo še holesterol, bilirubin, železo idr. Meritve rezultatov izvajamo spektrofotometrično (merimo porast absorbance). Analizator sestavljata nadzorna in analizna enota. Deli nadzorne enote so računalnik, barvni zaslon na dotik, tipkovnica in tiskalnik. Dela analizne enote sta fotometrični merilni sistem in ionoselektivna elektroda. (64)



Slika 3-1: Analizator Roche Hitachi 917

Aparatura in pribor

- analizator Roche/Hitachi 917 (Roche Diagnostics)
- centrifuga Beckman Coulter Alegra ® 6 KR (Beckman Coulter)
- plastične epruvete
- Pasteurjeve pipete

Reagent (kat. št.: 11.875.418.216) (Roche)

- R1 (NaOH 0,20 mmol/l)
- R2 (pikrinska kislina 25 mmol/l)

Kalibrator:

- C.f.a.s (kat. št.:10.759.350.190) (Roche)

Kontrole:

- Precinorm albumin (kat. št.: 11.205.846.122) (Roche)
- Precipath albumin (kat. št.: 11.205.838.122) (Roche)
- Precinorm PUC (kat. št.: 03.121.313.122) (Roche)
- Precipath PUC (kat. št.: 03.121.291.122) (Roche)

Fiziološka raztopina: (UKC Ljubljana-lekarna)

- 0,9% NaCl (1000 ml vsebuje 154 mmol Na⁺ in 154 mmol Cl⁻, pH = 4,5-7,0)

Reagente, kalibratorje in kontrole moramo shranjevati in pripraviti po navodilih proizvajalca. (64)

Za analizo 100 µl vzorca smo dodali 1 ml R1 + R2.

Absorbanco vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 505 nm.

Aparatura avtomatsko poda izmerjene koncentracije kreatinina v mmol/l. (64)

3.4 METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE LAKTULOZE IN MANITOLA

3.4.1 Opis metode, instrumentov in materialov

Metoda:

Koncentracijo laktuloze in manitola smo določevali s pomočjo absorpcijske UV-VIS spektroskopije. Absorbanco naših vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 340 nm.

Instrumenti in materiali:

- *Kemijski analizator Olympus AU 400* proizvajalca Olympus Diagnostics (Slika 3-2) v Laboratoriju za encimsko analitiko na Polikliniki uporabljajo predvsem za rutinsko analizo vzorcev urina, seruma, likvorja in drugih tekočin. Analizator Olympus opravlja meritve širokega spektra 99-ih različnih analitov (metaboliti: kreatinin, sečnina, sečna kislina; encimi, peptidi, proteini, lipidi, elektroliti, zdravilne učinkovine, droge...) ter tudi sladkorjev laktuloze in manitola. Analizator je popolnoma avtomatiziran. Vsi postopki analize – pipetiranje vzorca, pipetiranje

standardov in kontrol ter pipetiranje reagentov, se opravijo samodejno. V eni uri analizator opravi do 400 meritev in je namenjen predvsem manjšim do srednje velikim laboratorijem z rutinskimi analizami večjih količin vzorcev. Hkrati lahko meri absorbanco do 80-im vzorcem.



Slika 3-2: Kemijski analizator Olympus AU 400

Analizator je sestavljen iz analizne enote in nadzorne enote. Deli *analizne enote* so prostor za vsebnike z reagenti, prostor, kamor vstavimo sete z epruветami ter prostor, kjer aparat izvede analizo vzorca. Premikajoča se merilna sonda aparata se potopi v vsebino epruvete, ter izvede analizo. Spektrofotometer Shimadzu UV – 1601 izmeri absorbanco vzorca v kvarčni kiveti. Aparat lahko meri absorbanco mono- in bikromatske svetlobe pri 13-ih valovnih dolžinah od 340 do 800 nm. *Nadzorno enoto* sestavljajo zaslon, računalnik, barvni zaslon na dotik in tiskalnik. (65)

Naše meritve smo izvajali pri temperaturi 37 °C in valovni dolžini 340 nm.

- Stojala za vstavitev epruвет z vsebino za aparat. Stojala so namenjena setu desetih epruвет. Rumeno stojalo je kalibratorsko – za izvedbo kalibracije pri standardnih vzorcih. Zeleno stojalo je namenjeno kontrolnim vzorcem. Rdeče stojalo smo v našem primeru uporabili za epruветe z vzorci.
- Plastični vsebniki za reagente, potrebne za analizo.
- Nastavki za pipete različnih velikosti
- Pipete različnih velikosti
- Epruветe in stojala za epruветe

3.4.2 Reagenti, standardi, kontrole

Komercialno pripravljene kompleti proizvajalca Instruchemie za določanje laktuloze in manitola v urinu vsebujejo: (66)

SET REAGENTOV ZA LAKTULOZO (5–25 testov) (Instruchemie, Delfzijl, Netherlands):

- puferni laktulozni reagent (3×4 ml), (2846)
- laktulozni encimski reagent (1×170 µl), (2846-A)
- laktulozno puferno topilo (1×15 ml), (2846-B)
- začetni reagent (1×2000 µl), (2847)
- reagent z galaktozidazo (1×200 µl), (2848)
- disociacijski reagent (1×5 ml), (2849)
- laktulozna standardna raztopina, konc. 5 mmol/l (1×3 ml), (2850)
- kontrolna raztopina z laktulozo in manitolom (konc. laktuloze je 1 mmol/l, konc. manitola je 15 mmol/l); (2857)

SET REAGENTOV ZA MANITOL (12–60 testov) (Instruchemie, Delfzijl, Netherlands):

- manitolna puferna raztopina (1×15 ml), (2851-A)
- NAD puferni reagent v prahu (2×), (2851-B)
- začetni reagent (1×1300 µl), (2852)
- raztopina za redčenje začetnega reagenta (1×5ml), (3035)
- manitolna standardna raztopina, konc. 20 mmol/l (1×3 ml), (2853)
- kontrolna raztopina z laktulozo in manitolom (konc. laktuloze je 1 mmol/l, konc. manitola je 15 mmol/l). (2857)

3.4.3 Delovni postopek

3.4.3.1 Laktuloza

PREDPRIPRAVA REAGENTOV, STANDARDOV, KONTROL

Priprava reagenta 1 (R1 LLOZA): pufernemu laktuloznemu reagentu, ki je v prahu (2846) smo dodali 4 ml laktuloznega pufernega topila (2846-B). Nato smo dodali še 50 µl

laktuloznega encimskega reagenta (2846-A) ter dobro premešali. Pripravljen reagent smo do uporabe shranili v hladilniku na 2–6 °C. (66)

Priprava reagenta 2 (R2 LLOZA): začetnemu reagentu za laktulozo (2847), ki je bil v liofilizirani obliki smo dodali 1900 µl redestilirane vode, dobro premešali ter shranili v hladilniku na 2–6 °C do uporabe. (66)

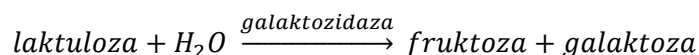
Galaktozidazni reagent (2858), encimski reagent (2846-A) ter laktulozno puferno topilo (2846-B) je ustrezno pripravil že proizvajalec. (66)

Standardno raztopino za laktulozo (2850) ter kontrolno raztopino z laktulozo in manitolom (2857) je ustrezno pripravil že proizvajalec. (66)

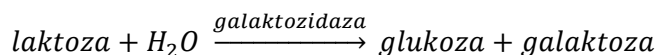
IZRAČUN KONCENTRACIJE LAKTULOZE

Laktuloza se v več stopnjah pretvori v glukonat-6-fosfat in NADPH. Prikaz postopka reakcij: (66)

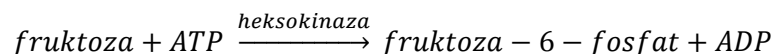
[Enačba 6]



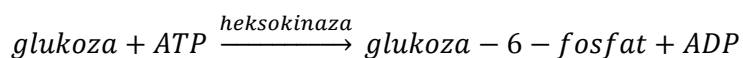
[Enačba 7]



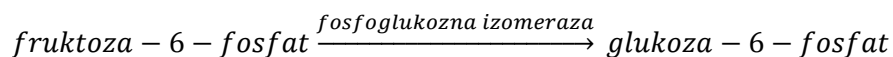
[Enačba 8]



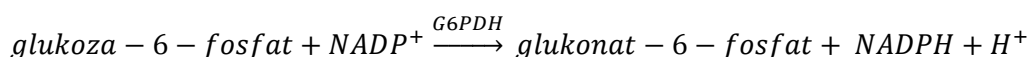
[Enačba 9]



[Enačba 10]



[Enačba 11]



Koncentracija NADPH narašča sorazmerno s porastom absorbance NADPH pri valovni dolžini 340 nm. Aparat poda vrednosti koncentracije laktuloze v mmol/l. (66)

3.4.3.2 Manitol

PREDPRIPRAVA REAGENTOV, STANDARDOV, KONTROL

Priprava reagenta 1 (R1 MANIT): NAD pufernemu reagentu (v prahu) (2851-B) smo dodali 4,0 ml manitolne puferne raztopine (2851-A). Raztopino smo dobro premešali ter zamrzili do uporabe, saj je v hladilniku stabilna le en dan. (66)

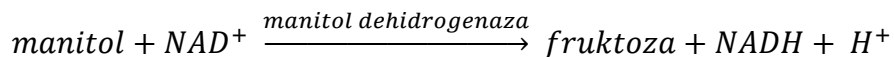
Priprava reagenta 2 (R2 MANIT): začetnemu reagentu smo dodali 1800 µl destilirane (deionizirane) vode ter dobro premešali. Nato smo raztopino do uporabe shranili v hladilniku. (66)

Manitolno standardno raztopino (2853) ter kontrolno raztopino z laktulozo in manitolom (2857) je ustrezno pripravil že proizvajalec. (66)

IZRAČUN KONCENTRACIJE MANITOLA

Manitol se v eni stopnji pretvori v NADH in fruktozo: (66)

[Enačba 12]



Koncentracija NADH narašča sorazmerno s porastom absorbance NADH pri 340 nm. Koncentracijo manitola aparat poda v mmol/l. (66)

3.5 KALIBRACIJA

Kalibracija je primerjava odziva instrumenta s standardom. S kalibracijo preverjamo točnost meritve inštrumenta. Namen kalibracije je zmanjševanje sistemskih napak.

Kalibracijo moramo izvesti kadar:

- uporabimo nov komplet reagentov,
- uvedemo nove parametre za detekcijo,
- sta od prejšnje kalibracije minila dva tedna,
- so servisirali analizator,
- so kontrolne vrednosti kalibratorjev izven dovoljenega območja,

- je bila prejšnja kalibracija neuspešna,
- se spremeni temperatura prostora za več kot 5 °C.

Kalibracijska krivulja podaja odvisnost absorbance od izmerjene koncentracije standarda. Proizvajalec za kalibracijo postopka določanja manitola in laktuloze predpisuje štiri točke merjenja absorbance pri valovni dolžini 340 nm v odvisnosti od koncentracije. Pri postopku kalibracije uporabimo standardno raztopino laktuloze, konc. 5 mmol/l ter standardno raztopino manitola, konc. 20 mmol/l. (66)

Kalibracija za določanje laktuloze:

- volumen standardne raztopine laktuloze s konc. 5 mmol/l (2850) = 5.0 µl
- volumen reagenta R1 LLOZA = 200 µl
- volumen reagenta R2 LLOZA = 50 µl

Kalibracija za določanje manitola:

- volumen standardne raztopine manitola s konc. 20 mmol/l (2853) = 3.0 µl
- volumen reagenta R1 MANIT = 200 µl
- volumen reagenta R2 MANIT = 75 µl

Čas kalibracije za vsako vrsto meritev (laktuloza, manitol) je 700 sekund. (66)

3.6 KONTROLA KAKOVOSTI

Kadar želimo preveriti delovanje sistema, moramo izvesti kontrolo kakovosti. Kontrolo izvajamo enkrat v času 24 ur pred analizo vzorcev ter po kalibraciji. S kontrolnimi vzorci znanih vrednosti ugotavljamo ustreznost delovanja aparata za našo metodo. Kadar so rezultati kontrole izven zahtevanega območja, moramo ponovno izvesti kalibracijo ter preveriti, zakaj je temu tako. Rezultati analize kontrolnega materiala morajo biti v mejah dovoljenega odstopanja, ki jih proizvajalec predpisuje. Dovoljene vrednosti odstopanj kontrolnih vzorcev so predpisane v specifikacijah proizvajalca aparature. Za aparat Olympus AU 400 morajo kontrolni vzorci ustrezati naslednjim predpisom: (67)

- meritev vrednosti kontrolnega vzorca ustreza vrednostim znotraj ± 1 SD,
- meritev vrednosti kontrolnega vzorca ustreza vrednostim med ± 1 SD in ± 2 SD.

Če so odstopanja večja, moramo ponovno izvesti kalibracijo. (65)

Koncentracije kontrolnih vzorcev smo po kalibraciji izmerili po dvakrat:

Kontrolni vzorci po kalibraciji:

- K1 LLOZA: 1,1 mmol/l, K2 LLOZA: 1,0 mmol/l
- K1 MANIT: 16 mmol/l, K2 MANIT: 14 mmol/l

3.7 POTEK ANALIZE

Začetna priprava:

Sprva smo se lotili priprave tistih reagentov za manitol in laktulozo, ki jih je bilo potrebno zmešati. Hkrati smo iz zamrzovalnika vzeli vzorce z urinom, da bi se odtalili do pričetka izvajanja disociacije. Po poteku pol ure smo vse reagente, ki jih nismo potrebovali za delo, shranili v hladilnik na temperaturi 2 - 6°C.

Priprava vzorcev za disociacijo:

Pri določanju koncentracije laktuloze v urinu moramo v izračunu upoštevati disocirane in nedisocirane vrednosti laktuloze. Za pripravo vzorcev za disociacijo smo v čiste epruvete odpipetirali po 50 µl urina. K 50 µl urina smo dodali 50 µl laktuloznega disociacijskega reagenta (2849) ter 5 µl galaktozidaznega reagenta (2848). Epruvete smo označili, zamašili z zamaški ter jih čez noč inkubirali na vodni kopeli pri 37 °C. Naslednje jutro smo jih pet minut centrifugirali pri 2000 rpm.

Analiza:

- ***izvedba kontrolnih meritev***

Pred vsako serijo analiz (določevanje koncentracije disocirane laktuloze, določevanje koncentracije nedisocirane laktuloze, določevanje koncentracije manitola) smo opravili tudi meritve kontrolnih vzorcev.

- ***analiza disociiranih in nedisociiranih vzorcev***

Reagente (R1 LLOZA, R2 LLOZA, R1 MANIT, R2 MANIT) smo prelili v plastične vsebnike, namenjene za uporabo na aparatu.

Laktuloza: za analizo 2,5 µl vsakega vzorca smo porabili 100 µl reagenta R1 LLOZA in 25 µl reagenta R2 LLOZA.

Manitol: za analizo 3 µl vsakega vzorca smo porabili 200 µl reagenta R1 MANIT in 75 µl reagenta R2 MANIT.

Za izvedbo analize disociranih vzorcev je bilo potrebno vsebino iz epruвет prestaviti v manjše vsebnike, t.i. tipse. Imeli smo namreč izredno majhne količine vzorcev z reagenti (105 µl). Tako majhnih količin na dnu velikih epruвет sonda aparata ne bi zaznala. Tipsi so bili manjše velikosti, ki smo jih vstavili v večje epruвете in tako »pretentali« aparat. Kljub temu je aparat sprva neuspešno izvedel analizo, saj je bilo kljub uporabi tipsov v njih premalo vsebine, in je sonda aparata nabodla dno tipsa. Zato smo morali uvesti ukrep, in sicer smo vsebino tipsov dvakrat redčili ter vanjo dodali kroglico za povečanje volumna. V aparat smo vnesli informacijo o redčitvi, da je to upošteval pri izpisu rezultatov.

Analizo nedisociranih vzorcev smo opravili v epruветah, v katerih smo hranili urin.

Tiskalnik aparata je rezultate natisnil, rezultati so bili podani v enotah mmol/l.

3.8 IZRAČUN IN PODOJANJE REZULTATOV

Vrednosti laktuloze in manitola podajamo glede na mol kreatinina. Vrednosti kreatinina so merilo koncentriranosti urina in so pri različnih osebah različni. Zato so rezultati primerljivi glede na 1 mol kreatinina.

Permeabilnostni indeks je razmerje koncentracije laktuloze in manitola v urinu.

[Enačba 13]

$$PERMEABILNOSTNI INDEKS = \frac{\text{konc. laktuloze v urinu [mmol/mol kreat.]} }{\text{konc. manitola v urinu [mmol/mol kreat.]} }$$

Referenčne vrednosti:

Permeabilnostni indeks: < 0,1000

Laktuloza/kreatinin: 3,4–25,2 mmol/mol

Manitol/kreatinin: 443–1264 mmol/mol

Izračun koncentracije laktuloze: aparat izmeri absorbance ter avtomatsko poda koncentracije laktuloze v vzorcu v mmol/l. Izmeriti moramo koncentracijo laktuloze v predinkubiranih vzorcih ter v vzorcih brez predinkubacije. Izmerjene koncentracije laktuloze v vzorcih brez predinkubacije so napaka, ki jo moramo odšteti od vrednosti koncentracije laktuloze v predinkubiranih vzorcih. Brez dodatka galaktozidaznega reagenta laktuloza ne more zreagirati do galaktoze ter sodelovati v nadaljnjih reakcijah, kjer merimo porast absorbance NADPH. Porast absorbance NADPH v vzorcih brez predinkubacije je torej posledica motečih dejavnikov.

[Enačba 14]

$$\text{Koncentracija laktuloze } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right) = (\text{koncentracija laktuloze v predinkubiranem vzorcu} \times 2,1 *) - (\text{koncentracija laktuloze v vzorcu brez predinkubacije})$$

*2,1 = faktor redčenja, ki ga moramo upoštevati zaradi dodatka 55 µl reagentov za predinkubacijo

Izračun koncentracije manitola: aparat izmeri koncentracijo, ki je premo sorazmerna porastu absorbance NADH pri reakciji manitola do fruktoze. Vrednosti koncentracije manitola so podane v mmol/l.

3.9 OMEJITVE PRI METODI

- reagenti, ki jim je potekel rok uporabe, se ne smejo uporabljati,
- analize vzorcev, ki so bili zamrznjeni več kot šest mesecev, lahko pokažejo nezanesljive rezultate,
- sledenje navodilu proizvajalca in usposobljen operater Olympus sistema sta potrebna za pridobitev zanesljivih rezultatov,
- bakterijska kontaminacija in delovanje toplote na vzorec lahko vplivata na rezultate,
- večkratno odtajevanje in ponovno zamrzovanje urina (za predinkubacijo ter naslednji dan za analizo) lahko vpliva na končni rezultat koncentracije laktuloze in manitola v urinu,
- izredno majhni volumni vzorcev ter reagentov lahko otežijo rokovanje z metodo in vplivajo na natančnost metode.

4 REZULTATI

4.1 MERITVE IN IZRAČUNI

Koncentracijo kreatinina v urinu smo izmerili takoj po prejemu urina v laboratoriju. Prvih deset vzorcev urina so vzorci bolnikov s celiakijo, naslednjih deset vzorcev pa so vzorci zdravih prostovoljcev. Koncentracije laktuloze in manitola smo izmerili hkrati vsem prejetim vzorcem po odmrznitvi. Analizator Olympus izpiše rezultate koncentracij v mmol/l. Dobili smo vrednosti koncentracij laktuloze v disociranih vzorcih ter v nedisociranih vzorcih in vrednosti koncentracij manitola v vzorcih urina. (Tabela III)

Tabela III: Rezultati meritev z analizatorjem Olympus AU 400

Št.vzorca	Kreatinin (mmol/l)	Disoc. Iloza (mmol/l) × 2,1	Lloza (mmol/)	Disoc. Iloza - Iloza (mmol/l)	Manit. (mmol/l)
1 (C)	13,244	1,05	0,6	0,45	10,4
2 (C)	6,483	1,26	0,8	0,46	2,4
3 (C)	4,311	1,05	0,9	0,15	1,4
4 (C)	4,003	1,05	0,8	0,25	1,5
5 (C)	7,821	1,47	1,12	0,35	5,2
6 (C)	7,923	1,47	1,3	0,17	3,0
7 (C)	7,571	1,05	0,7	0,35	4,6
8 (C)	5,561	0,84	0,6	0,24	2,3
9 (C)	2,000	0,42	0,3	0,12	0,8
10 (C)	6,483	1,26	1,0	0,26	2,4
11	4,450	0,42	0,3	0,12	4,9
12	6,473	0,21	0,1	0,11	4,4
13	7,350	0,42	0,3	0,12	5,9
14	6,473	0,21	0,1	0,11	4,9
15	4,485	0,63	0,5	0,13	2,7
16	5,845	0,21	0,1	0,11	3,9
17	2,991	0,21	0,2	0,01	4,5
18	10,000	0,42	0,2	0,22	6,4
19	7,322	0,42	0,3	0,12	5,5
20	10,401	0,21	0,1	0,11	12,4

Vrednosti, podane v mmol/l, smo glede na izmerjene koncentracije kreatinina preračunali na mol kreatinina ter izračunali vrednosti PI. (Tabela IV)

Povprečne vrednosti pri bolnikih s celiakijo:

- koncentracija laktuloze: 45,8 mmol/mol kreatinina,
- koncentracija manitola: 431,5 mmol/mol kreatinina,

- permeabilnostni indeks (PI): 0,1072.

Povprečne vrednosti pri zdravih preiskovancih:

- koncentracija laktuloze: 17,6 mmol/mol kreatinina,
- koncentracija manitola: 862,1 mmol/mol kreatinina,
- permeabilnostni indeks (PI): 0,0256.

Tabela IV: Preračunane vrednosti laktuloze in manitola na mol kreatinina ter vrednosti PI

Št. vzorca	Lloza (mmol/l)	Manit (mmol/l)	Kreat (mmol/l)	Lloza/kreat (mmol/mol)	Manit/kreat (mmol/mol)	PI (lloza./manit.)
1 (C)	0,45	10,4	13,244	33,9	785,3	0,0432
2 (C)	0,46	2,4	6,483	70,9	370,2	0,1917
3 (C)	0,15	1,4	4,311	34,8	324,8	0,1072
4 (C)	0,25	1,5	4,003	62,5	374,7	0,1667
5 (C)	0,35	5,2	7,821	44,8	664,9	0,0673
6 (C)	0,17	3,0	7,923	21,5	378,6	0,0567
7 (C)	0,35	4,6	7,571	46,2	607,7	0,0761
8 (C)	0,24	2,3	5,561	43,2	413,7	0,1043
9 (C)	0,12	0,8	2,000	60,0	400,0	0,1500
10 (C)	0,26	2,4	6,483	40,1	370,2	0,1083
11	0,12	4,9	4,450	26,9	1101,1	0,0245
12	0,11	4,4	6,473	16,9	679,7	0,0250
13	0,12	5,9	7,350	16,3	802,7	0,0203
14	0,11	4,4	6,473	16,9	679,7	0,0250
15	0,13	2,7	4,485	28,9	602,0	0,0481
16	0,11	3,9	5,845	18,8	667,2	0,0282
17	0,01	4,5	2,991	3,3	1505,0	0,0022
18	0,22	6,4	10,000	20,8	640,0	0,0326
19	0,12	5,5	7,322	16,4	751,2	0,0218
20	0,11	12,4	10,401	10,6	1192,3	0,0088

4.2 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Sprva smo iz rezultatov izračunali delež oseb znotraj posameznih skupin z vrednostmi parametrov laktuloze (L), manitola (M) in permeabilnostnega indeksa (PI), ki so odstopale iz mej referenčnih vrednosti. (Tabela V)

Tabela V: Prikaz odstopanja parametrov laktuloze, manitola in PI znotraj skupine zdravih in bolnih

	L (znotraj ref.vr.)	L (izven ref.vr.)	% poviš. L	M (znotraj ref.vr.)	M (izven ref.vr.)	% niž. M	PI (znotraj ref.vr.)	PI (izven ref.vr.)	% poviš.PI
BOLNI	1	9	90%	3	7	70%	4	6	60%
ZDRAVI	8	2	20%	10	0	0%	10	0	0%

V skupini bolnih jih je 90 % imelo vrednosti laktuloze izven referenčnih vrednosti. 70 % bolnikov je imelo vrednosti manitola izven referenčnih vrednosti. 60 % bolnikov je imelo vrednosti PI izven referenčnih vrednosti.

20 % zdravih prostovoljcev je imelo vrednosti laktuloze izven referenčnih vrednosti. Nihče izmed zdravih prostovoljcev ni imel vrednosti manitola izven referenčnih vrednosti, prav tako ne vrednosti PI.

Z računalniškim programom MedCalc for Windows® smo nato statistično obdelali rezultate in opredelili postavljene hipoteze glede na dobljene in izračunane rezultate.

Razlike smo opredelili kot statistično značilne na ravni $P < 0,05$.

Sprva smo opravili osnovno statistično analizo za parameter PI znotraj skupine zdravih in bolnih preiskovancev. Dobili smo podatke o vrednostih aritmetične sredine, mediane, variance, standardne deviacije ter relativne standardne deviacije. Opravili smo tudi Kolmogorov-Smirnov test, s katerim preverimo normalnost porazdelitve vrednosti PI znotraj posameznih skupin ter postavimo ničelno in alternativno hipotezo. (Tabela VI), (Tabela VII)

Najprej preverimo normalnost porazdelitve vrednosti PI v skupini zdravih. (Tabela VI)

Tabela VI: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk ter test normalnosti porazdelitve v skupini zdravih za parameter PI

Spremenljivka	PI_Z
Število preiskovancev	10
Najnižja vrednost	0,008800
Najvišja vrednost	0,04810
Aritmetična sredina	0,02563
95% interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	0,01847 do 0,03279
Mediana	0,02475
95% interval zaupanja glede na vrednost mediane	0,02101 do 0,03051
Varianca	0,0001002
Standardna deviacija	0,01001
Relativna standardna deviacija	0,3905 (39,05%)
Standardna napaka aritmetične sredine	0,003165
Koeficient asimetrije	0,9247 (P=0,1722)
Koeficient pogostnosti	3,0270 (P=0,0619)
Kolmogorov-Smirnov test	normalnost sprejeta (P=0,6328)

Ničelna hipoteza (H0): Vrednosti PI znotraj skupine zdravih se normalno porazdeljujejo.

Alternativna hipoteza (Ha): Vrednosti PI znotraj skupine zdravih se ne porazdeljujejo normalno.

Vrednosti PI v skupini zdravih preiskovancev se porazdeljujejo normalno. P vrednost znaša 0,6328, kar je večje od vrednosti 0,05, zato ničelno hipotezo o normalnosti porazdelitve sprejmemo.

Tudi pri skupini bolnikov postavimo ničelno in alternativno hipotezo, ki ju testiramo s Kolmogorov-Smirnovim testom. (Tabela VII)

Ničelna hipoteza (H0): Vrednosti PI se znotraj skupine bolnikov normalno porazdeljujejo.

Alternativna hipoteza (Ha): Vrednosti PI znotraj skupine bolnikov se ne porazdeljujejo normalno.

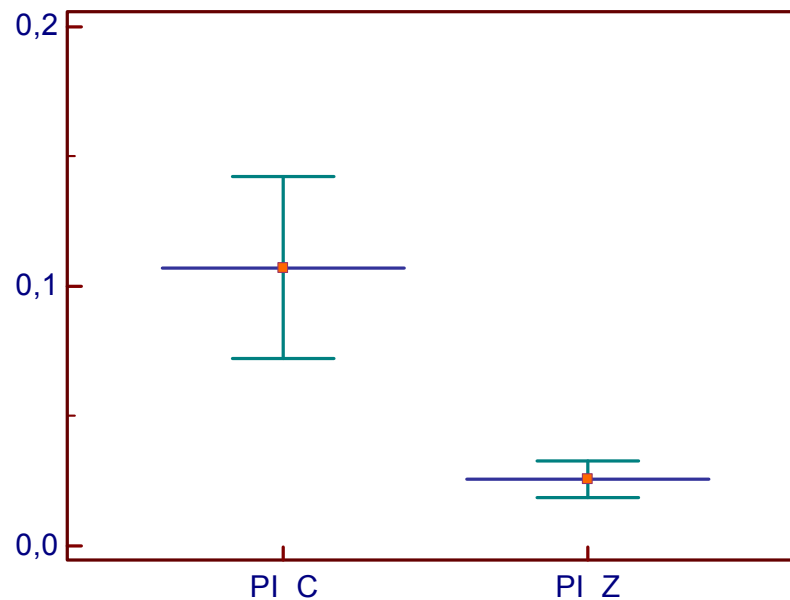
Tabela VII: Prikaz vrednosti osnovnih statističnih spremenljivk ter test normalnosti porazdelitve v skupini bolnikov s celiakijo za parameter PI

Spremenljivka	PI_C
Število preiskovancev	10
Najnižja vrednost	0,04320
Najvišja vrednost	0,1917
Aritmetična sredina	0,1072
95% interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	0,07200 do 0,1423
Mediana	0,1058
95% interval zaupanja glede na vrednost mediane	0,06173 do 0,1588
Varianca	0,002414
Standardna deviacija	0,04913
Relativna standardna deviacija	0,4586 (45,86%)
Standardna napaka aritmetične sredine	0,01554
Koeficient asimetrije	0,4814 (P=0,4703)
Koeficient pogostnosti	-0,8302 (P=0,5728)
Kolmogorov-Smirnov test	normalnost sprejeta (P=0,8186)

Vrednosti PI znotraj skupine bolnih pacientov se porazdeljujejo normalno, kar lahko dokažemo z opravljenim Kolmogorov-Smirnovim testom. P vrednost je 0,8186 (pri stopnji tveganja $\alpha=0,05$), zato sprejmemo ničelno hipotezo o normalnosti porazdelitve.

Diagram na sliki spodaj prikazuje primerjavo rezultatov vrednosti PI znotraj skupine bolnikov in zdravih. (Slika 4-1) Srednja vodoravna črta prikazuje vrednost aritmetične sredine parametra PI znotraj vsake skupine. Zgornja in spodnja črta sta vrednosti 95% intervala zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine. Pri zdravih je vrednost

aritmetične sredine parametra PI 0,02563, zgornji in spodnji vrednosti 95% intervala zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine pa 0,01847 in 0,03279. Pri bolnih je vrednost aritmetične sredine parametra PI 0,1072, zgornji in spodnji vrednosti 95% intervala zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine pa 0,07200 in 0,14230.



Slika 4-1: Prikaz razlik med vrednostmi PI znotraj skupin bolnikov in zdravih

Ker so vrednosti PI znotraj obeh skupin porazdeljene normalno, lahko opravimo t-test dveh neodvisnih vzorcev za proučevanje razlik med vrednostmi PI med skupinama bolnih in zdravih.

Kadar gre za majhne vzorce, t-test dveh neodvisnih vzorcev temelji na predpostavki o enakosti varianc. Pred t-testom zato opravimo F-test homogenosti varianc, da se prepričamo, če so standardni odkloni varianc znotraj skupin zdravih in bolnih enaki. (Tabela VIII) Enakost varianc je nujni pogoj, da lahko opravimo t-test dveh neodvisnih vzorcev. Zopet postavimo ničelno in alternativno hipotezo:

Ničelna hipoteza (H₀): standardni odkloni varianc so znotraj skupin zdravih in bolnih enaki.

Alternativna hipoteza (H_a): standardni odkloni varianc znotraj skupin zdravih in bolnih niso enaki.

Tabela VIII: F-test enakosti varianc za parameter PI v skupini zdravih in v skupini bolnikov s celiakijo

Skupina 1		
Spremenljivka	PI_C	
Skupina 2		
Spremenljivka	PI_Z	
	Vzorec 1	Vzorec 2
Velikost vzorca	10	10
Aritmetična sredina	0,1072	0,02563
95% interval zaupanja glede na vrednost aritmetične sredine	0,07200 do 0,1423	0,01847 do 0,03279
Varianca	0,002414	0,0001002
Standardna deviacija	0,04913	0,01001
Standardna napaka aritmetične sredine	0,01554	0,003165
F-test enakosti varianc		
Razmerje varianc	24,0971	
Sig.	P < 0,001	

Vidimo, da je P vrednost manj kot 0,05 ($P < 0,001$), kar pomeni, da ničelno hipotezo o enakosti varianc zavrnemo in da so standardni odkloni varianc znotraj skupine zdravih v primerjavi s standardnimi odkloni varianc znotraj skupine bolnih različni. V tem primeru t-testa dveh neodvisnih vzorcev ne moremo opraviti, zato opravimo t-test z logaritmiranimi vrednostmi PI znotraj skupine zdravih in znotraj skupine bolnih. Vrednosti PI logaritmiramo in zopet opravimo F-test homogenosti varianc z enako ničelno in alternativno hipotezo. (Tabela IX)

Tabela IX: F-test enakosti varianc za parameter PI (logaritmirane vrednosti) v skupini zdravih in v skupini bolnikov s celiakijo

Skupina 1		
Spremenljivka	PI_C	
Skupina 2		
Spremenljivka	PI_Z	
	Skupina 1	Skupina 2
Velikost vzorca	10	10
Geometrična sredina	0,09688	0,02379
95% interval zaupanja glede na geometrično sredino	0,06852 do 0,1370	0,01750 do 0,03234
Varianci logaritmiranih vrednosti	0,04421	0,03474
F-test enakosti varianc		
	P = 0,725	

P vrednost je $> 0,05$ (0,725), kar pomeni, da v tem primeru ničelno hipotezo sprejmemo, tj. standardni odkloni varianc so znotraj skupine zdravih in bolnih enaki.

T-test dveh neodvisnih vzorcev torej opravimo z logaritmiranimi vrednostmi PI. (Tabela X) T-test dveh neodvisnih vzorcev proučuje statistično značilne razlike med vrednostmi parametra med dvema neodvisnima skupinama. V našem primeru bomo preverili, ali se vrednosti PI v skupini bolnikov statistično značilno razlikujejo od vrednosti PI v skupini zdravih prostovoljcev. Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo:

Ničelna hipoteza (H0): Med zdravimi in bolnimi ni statistično značilnih razlik v vrednostih PI.

Alternativna hipoteza (H1): Med zdravimi in bolnimi so statistično značilne razlike v vrednostih PI

Tabela X: T-test dveh neodvisnih vzorcev (skupina zdravih in skupina bolnih) za parameter PI

Testna statistika t	-6,864
Stopnje prostosti	18
Sig.	P < 0,0001
Razmerje geometričnih sredin	0,2455
95% interval zaupanja glede na vrednosti geometričnih sredin	0,1598 do 0,3774

Vrednost P je manjša od 0,05; $P < 0,0001$, zato ničelno hipotezo ovržemo in sprejmemo alternativno hipotezo (H_a): med zdravimi in bolnimi so statistično značilne razlike v vrednostih PI. Ničelno domnevo, ki pravi, da ne obstaja razlika med povprečjema dveh neodvisnih vzorcev, smo zavrnilo z največ 5% tveganja (0,05).

Na koncu smo preverili še specifičnost in občutljivost naše metode. (Tabela XI) Na osnovi referenčnih vrednosti PI ($< 0,1000$) smo rezultate razvrstili na resnično pozitivne, resnično negativne, lažno pozitivne in lažno negativne.

Tabela XI: Število pozitivnih in negativnih testov glede na diagnozo

	Povišana vrednost PI	Normalna vrednost PI
Število bolnikov s celiakijo	RP = 6	LN = 4
Število ljudi brez celiakije	LP = 0	RN = 10

RP - pravilno spremenjene vrednosti PI pri bolnikih s celiakijo

RN - pravilno razvrščene vrednosti PI znotraj referenčnih vrednosti pri zdravih preiskovancih

LP - lažno povišane vrednosti PI pri zdravih preiskovancih,

LN - lažno razvrščene vrednosti PI znotraj referenčnih vrednosti pri bolnikih s celiakijo.

Diagnostična občutljivost predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven oz. v našem primeru izven referenčnih vrednosti. Izražamo jo v

odstotkih, predstavlja pa verjetnost pozitivnega izida pri osebah z diagnozo bolezni. Večja kot je, manjše je število lažno negativnih rezultatov.

Izračuna se po naslednji formuli:

[Enačba 15]

$$Se = \frac{RP}{(RP + LN)} \times 100$$

Se = diagnostična občutljivost (sensitivity)

RP = resnično pozitivni (bolni pacienti, ki jih test prepozna kot bolne)

LN = lažno negativni (bolni pacienti, ki jih test lažno prepozna kot zdrave)

Izračun občutljivosti testa PI:

Diagnostična občutljivost: $6 / (6+4) = 0,6 \times 100 = 60\%$

Pri štirih bolnikih s celiakijo test ni pokazal povišanih vrednosti PI (izven meja referenčnih vrednosti).

Diagnostična specifičnost predstavlja delež oseb, ki nimajo preiskovane bolezni in pri katerih je rezultat testa negativen oz. v našem primeru znotraj referenčnih vrednosti. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov (resnično negativni bolniki). Če dobimo s testom pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja kot je diagnostična specifičnost, manj je lažno pozitivnih rezultatov. Če ni nobenega lažno pozitivnega vzorca, je diagnostična specifičnost 1 (100%).

Izračuna se po naslednji formuli:

[Enačba 16]

$$Sp = \frac{RN}{(RN + LP)} \times 100$$

Sp = diagnostična specifičnost (specifity)

RN = resnično negativni (zdravi ljudje, ki jih test pravilno prepozna kot zdrave)

LP = lažno pozitivni (zdravi ljudje, ki jih test napačno prepozna kot bolne)

Izračun specifičnosti testa PI:

Diagnostična specifičnost: $10 / (10+0) = 1 \times 100 = 100\%$

Pri vseh zdravih bolnikih je test prikazal vrednosti PI znotraj referenčnega območja. Lažno pozitivnih vrednosti nismo imeli.

Na koncu smo izvedli še analizo površine pod ROC krivuljo. (Tabela XII) ROC krivulja podaja odnos med specifičnostjo in občutljivostjo posameznega testa oz. metode. Na y osi se nahaja parameter občutljivost (resnično pozitivni rezultati), na x osi pa parameter 1-specifičnost (lažno pozitivni rezultati). Pri testih z dobro diagnostično točnostjo se krivulja približa levemu zgornjemu kotu (veliko število resnično pozitivnih rezultatov in majhno število lažno pozitivnih rezultatov).

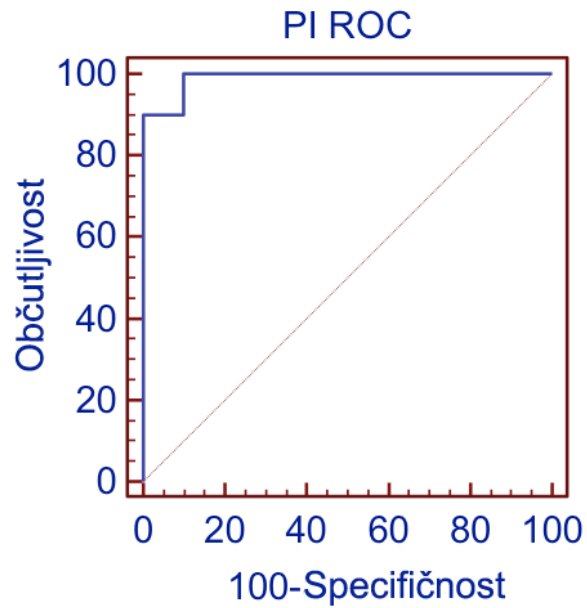
Površina pod ROC krivuljo (AUC) je verjetnost, da bo aparat pravilno ločil pozitivne od negativnih primerov, v našem primeru bolnike in zdrave. Področje pod krivuljo je enako verjetnosti, da bo imel pacient s celiakijo višje vrednosti PI kot zdrav preiskovanec. Površina pod ROC krivuljo torej predstavlja verjetnost, da bo aparat pripisal višje vrednosti PI naključno izbranemu bolniku s celiakijo kot naključno izbrani zdravi osebi. Površino AUC pod ROC krivuljo torej povezujemo z natančnostjo aparature za detekcijo.

Ničelna hipoteza (H₀): AUC pod ROC krivuljo je 0,5 (pacient s celiakijo ima 50% verjetnost, da bo imel višje vrednosti PI od zdravega preiskovanca).

Alternativna hipoteza (H_a): AUC pod ROC krivuljo je statistično značilno različna od 0,5.

Tabela XII: Prikaz izračuna AUC pod ROC krivuljo

Spremenljivka	PI_ROC PI ROC
Klasifikacijska spremenljivka	DIAGNOZA
Velikost skupine	20
Skupina bolnih: DIAGNOZA = 1	10
Skupina zdravih : DIAGNOZA = 0	10
Površina pod ROC krivuljo (AUC)	0,99
Standardna napaka	0,0141
95% interval zaupanja	0,814 do 1,000
Z test	34,648
Sig. (Površina=0.5)	<0,0001



Slika 4-2: Graf specifičnosti in občutljivosti metode

Na podlagi visoke AUC vrednosti (0,990) (Slika 4-2) lahko zaključimo, da večje vrednosti PI glede na zdrave preiskovance predstavljajo večjo verjetnost za prisotnost celiakije. P vrednost je manjša od vrednosti 0,05 ($< 0,0001$), kar pomeni, da lahko sprejmemo alternativno hipotezo, ki trdi, da je AUC pod ROC krivuljo statistično različna od vrednosti 0,5.

5 RAZPRAVA

Raziskava Permeabilnostni indeks je nov predlog preizkušanja integritete tankega črevesa v Sloveniji. Bolezni prebavnega trakta so v današnjem času precej razširjene. Na integriteto tankega črevesa vplivajo bolezenski procesi, ki imajo izvor nastanka v tankem črevesu (celiakija, Chronova bolezen) kot tudi obolenja, ki imajo svoj izvor drugje, a zaradi nastanka sistemskih vnetnih procesov vplivajo tudi na prepustnost tankega črevesa (diabetes tip I, sepsa, ciroza jeter). Natančno sliko stanja črevesne sluznice lahko pokaže biopsija (histološki pregled tkiva), ki pa je izredno boleča in za pacienta neprijetna metoda.

Test PI je, v nasprotju z biopsijo, neinvaziven test. Princip testa temelji na merjenju dveh sladkorjev različnih velikosti, laktuloze in manitola, v urinu. Preiskovanec popije raztopino omenjenih sladkorjev in nato nadaljnjih pet ur zbira urin v za to namenjen vsebnik. Vrednosti PI izračunamo glede na izmerjene vrednosti laktuloze in manitola v urinu, ki jih podajamo v mmol/mol kreatinina. Vrednost PI je kvocient koncentracije laktuloze in manitola v urinu in je brez enot. Test PI v Evropi in po svetu še ni uveljavljen. Izsledki do sedaj izvedenih raziskav so skromni in neenotni. Metode detekcije so različne, izmerjeni rezultati pa žal precej variirajo znotraj različnih opravljenih laboratorijskih analiz po svetu.

V naši raziskavi smo se odločili test PI preizkusiti pri bolnikih s celiakijo. Prvoten namen je bil vključiti še nekatere druge bolnike (bolnike s Chronovo boleznijo, diabetike tipa I), vendar je sam proces zbiranja bolnikov dolgotrajen, zato smo se pri moji nalogi omejili na bolnike s celiakijo.

Prepustnost tankega črevesa je pri bolnikih s celiakijo spremenjena zaradi več vzrokov. Izravnane sluznice tankega črevesa, ki je prisotna pri teh bolnikih, povzroči slabšo absorpcijo manjših molekul, ki se sicer pretežno absorbirajo skozi celice na področju resic (manitol v primeru našega testa). Drugi razlog, ki je krivec za spremenjeno prepustnost tankega črevesa, pa so razrahljani tesni stiki med celicami kript. Nepopolno razgrajeni glutenski peptidi povzročijo povečano sproščanje zonulina, ki je najpomembnejši vratar, odgovoren za prepuščanje poti snovem, ki skozi steno tankega črevesa prehajajo skozi tesne stike med celicami. Razrahljani tesni stiki omogočajo prehod laktuloze v večji meri. Le-ta se absorbira skozi tanko črevo v kri povečini na področju kript skozi tesne stike.

Vrednosti PI (razmerje koncentracije laktuloze in manitola v urinu) so zato pri bolnikih s celiakijo značilno povišane.

Princip merjenja manitola in laktuloze v urinu je bil v našem laboratoriju absorpcijska spektroskopija.

Paciente in zdrave prostovoljce smo pridobivali od marca 2012 do septembra 2012. Pridobivanje zdravih prostovoljcev je potekalo precej hitro, zbrali smo jih v dveh mesecih. V raziskavo smo povabili znance, sodelavce, prijatelje. Pacienti s celiakijo so bili precej bolj negotovi in nezaupljivi. Zajeli smo paciente, ki so bili na zdravljenju na Gastroenterološki kliniki v Ljubljani. Po telefonu smo jih povabili na raziskavo ter jim pojasnili princip in namen metode. Izvedba testa ni prinesla koristi le nam v raziskovalne namene, temveč je bila dobrodošla informacija tudi za paciente, katerim je zdravnik glede na dobljene rezultate študije PI svetoval napotke za nadaljnje zdravljenje oz. upoštevanje brezglutenske diete. Test PI je za preiskovanca v praktičnem smislu lahko problematičen. Preiskovanec mora na Polikliniko priti dvakrat: prvič, da odda kri ter prejme vsebnik za urin ter naslednji dan, ko prinese vsebnik z urinom. Nekaj preiskovancev ni bilo iz Ljubljane, kar jim je predstavljalo manjši problem. Če bo študija postala obširnejša, bo nabor preiskovancev mnogo večji, postopek zbiranja vzorcev urina pa precej dolgotrajen.

Pri rokovanju z metodo v laboratoriju so se pojavljale številne težave, v največji meri zaradi dejstva, da pri nas metode niso še nikoli izvajali in je metoda še tako rekoč v povojih. Prvi večji problem se je pojavil ob dobavi reagentov, saj smo prejeli set reagentov za laktulozo in manitol za različne velikosti serij vzorcev. Set reagentov za analizo laktuloze je bil namenjen za 5 – 25 vzorcev, set reagentov za analizo manitola pa za 12 – 60 vzorcev (izboljšana, novejša serija). Protokol za pripravo reagentnih mešanic ter izvedbo testa na aparatu Olympus pa je vseboval enotna navodila. Problem smo rešili s preračunavanjem količin reagentov, ki smo jih zmešali ter dali v reagenčne vsebnike.

Velik problem je bil tudi v količinah vzorcev, ki smo jih dali v aparat za detekcijo. Mrtvi volumen aparata je 200 μ l, kar pomeni, da bi morali za detekcijo imeti minimalno 200 μ l vzorca. Predinkubirani vzorci so bili skupaj z dodanimi reagenti v količinah 105 μ l, saj je tako predpisoval protokol za izvedbo testa. Aparat je s senzorjem pri detekciji nabodel dno tipsa vzorcev in meritve ni opravil, zato smo v tipse dodali majhne plastične kroglice, ki so navidezno povečale volumen in »pretentale« aparat, da je sploh lahko opravil analizo. Z

vzorci brez predinkubacije ni bilo problema, saj smo jih v aparat vstavili kar v epruvetah, v katerih smo hranili urin. V prihodnje bi morali torej predvsem povečati količine predinkubiranih vzorcev z namenom lažje izvedbe analize ter lažje priprave vzorcev za predinkubacijo (težko rokovanje s tako majhnimi količinami).

Rezultati, ki smo jih dobili z eksperimentalnim delom, so izpolnili naša pričakovanja, saj so bile vrednosti PI pri bolnikih s celiakijo značilno višje od vrednosti PI pri zdravih preiskovancih. Povprečna izmerjena vrednost PI v skupini zdravih je bila 0,0256, v skupini bolnikov s celiakijo pa 0,1072, kar je 4,5-krat več kot v skupini zdravih prostovoljcev. Razlikovale so se tudi povprečne vrednosti laktuloze in manitola glede na obe skupini. Povprečna vrednost laktuloze v urinu zdravih preiskovancev je znašala 17,6 mmol/mol kreatinina, v urinu bolnih pa 45,8 mmol/mol kreatinina. Povprečna vrednost manitola v urinu zdravih je bila 862,1 mmol/mol kreatinina, v urinu bolnih pa 431,5 mmol/mol kreatinina. Izračunali smo tudi, koliko bolnih je imelo vrednosti PI izven referenčnih vrednosti ($< 0,1000$), in sicer je bilo to 60%. Delež pacientov s celiakijo, ki so imeli povišane vrednosti laktuloze glede na referenčne vrednosti v urinu, je 90%. Delež pacientov, ki so imeli znižane vrednosti manitola glede na referenčne vrednosti v urinu, je 70%.

Pri interpretaciji rezultatov moramo biti pozorni na različne dejavnike, ki lahko vplivajo na rezultate meritev. Na vrednosti PI lahko vplivajo individualni dejavniki: stres, nekatera zdravila (predvsem nesteroidni antirevmatiki), alkohol, pretirana športna aktivnost, stradanje. Preiskovancem smo sicer priložili navodila za izvedbo testa (10-urni post pred testom, ne-hranjenje prvi dve uri zbiranja urina itd.), vendar ne moremo zagotovo vedeti, če so se vsi preiskovanci striktno držali omenjenih pravil, saj so test izvajali samostojno doma. Pri treh bolnikih so npr. vrednosti manitola znotraj referenčnih vrednosti, čeprav bi zaradi izravnane sluznice pri bolnikih s celiakijo morale biti vrednosti manitola v urinu znižane. Vzrok temu bi lahko bil uživanje slaščic, peperminta ali sladil (žvečilni gumi, Natren) med izvedbo testa. Pomembni pa so tudi drugi dejavniki. Rokovanje z vzorci urina, ustrezno shranjevanje in stabilizacija vzorcev (dodatek 0,5 ml 20% klorheksidina, s katerim zagotavljamo stabilnost laktuloze in manitola v urinu) je izrednega pomena za ustreznost rezultatov. Dobljeni rezultati so odvisni tudi od občutljivosti metode. Za metodo pravimo, da je dobro **občutljiva**, kadar pokaže pozitiven rezultat in vzorec resnično vsebuje omenjeni analit. V našem primeru pomeni, da je metoda 100% občutljiva, če

pokaže vrednosti PI izven referenčnih meja (povišane vrednosti PI) pri vseh bolnikih s celiakijo. Izračunali smo občutljivost metode za vrednosti PI, ki znaša 60%.

Na slabšo občutljivost metode bi v našem primeru lahko vplivalo večkratno odmrzovanje urina in ponovno zamrzovanje. Urin smo morali odmrzniti dvakrat: prvi dan, da smo lahko pripravili vzorce za predinkubacijo. Do naslednjega dne smo ga ponovno zamrznili in čez 24 ur odtajili. Problem je bil tudi v tem, ker je protokol za pripravo vzorcev za predinkubacijo predpisoval izredno majhne količine vzorcev (105 μ l). Delo s tako majhnimi vzorci v primeru, da ni avtomatizirano (z njimi operira oseba), lahko hitro privede do napak. Vsebnost 105 μ l smo iz epruвет prenašali v manjše tipse, da je aparat sploh lahko izvedel detekcijo, pri tem pa bi lahko prišlo tudi do izgub vzorca in posledično napačnih rezultatov. Rešitev za v prihodnje bi bila redčitev vzorcev za predinkubacijo z redestilirano vodo. Sami smo redčitev izvedli kasneje, ko smo vzorce z reagenti že prenesli v tipse, da je aparat analizo lahko izvedel. Če bi vzorce z reagenti redčili že prej (preden jih iz epruвет prenesemo v tipse), bi bile izgube vzorcev manjše zaradi lažjega operiranja z večjimi količinami (prenos iz epruвет v tipse).

Metoda je **specifična**, kadar ne pokaže pozitivnih rezultatov pri tistih, ki jih v resnici nimajo. V našem primeru smo ugotavljali specifičnost metode za parameter PI. Pri vseh zdravih sodelujočih je metoda pokazala vrednosti PI znotraj referenčnih vrednosti, kar pomeni, da je metoda 100% specifična. Vrednosti manitola so pri vseh zdravih znotraj referenčnih vrednosti, medtem ko so vrednosti laktuloze pri dveh zdravih prostovoljcih rahlo povišane. Vzrok bi lahko bil pridružena kakšna druga bolezen, za katero oseba morda sploh ne ve, npr. nutritivna alergija, pri kateri zaradi razrahljanih tesnih stikov prav tako pride do povišane absorpcije laktuloze.

Rezultate, ki smo jih pridobili z analizo urinskih vzorcev, smo statistično obdelali. Vrednosti PI so se znotraj obeh skupin porazdeljevale normalno, zato smo nadaljevali s t-testom dveh neodvisnih vzorcev. Ugotavljali smo, ali se vrednosti PI v skupini zdravih in v skupini bolnikov značilno razlikujejo. Privzeli smo stopnjo tveganja 0,05 (5%). Rezultat testa je pokazal, da se vrednosti PI med skupinama značilno razlikujejo, saj je dobljena p vrednost manjša kot 0,001. Sprejeli smo torej alternativno hipotezo (H_a), ki pravi, da so razlike v vrednostih PI med skupinama zdravih in bolnih statistično signifikantne.

Pomemben podatek pri uvedbi nove metode je tudi statistični test »Analiza površine pod ROC krivuljo«. Površina pod ROC krivuljo je pomemben podatek, ki nam pove, kolikšna je verjetnost, da bo metoda pokazala značilno različne vrednosti določenega parametra pri skupini bolnih glede na skupino zdravih. V našem primeru to pomeni, s kolikšno verjetnostjo bo metoda pri bolnikih s celiakijo pokazala višje vrednosti PI. Visoka vrednost površine pod krivuljo (0,990) nam pove, da metoda dobro loči med zdravimi in bolnimi, in da pri slednjih pokaže značilno povišane PI vrednosti.

Raziskovalec Van Elburg s sodelavci, 1993, je izvedel podoben test PI v bolnišnici v Gröningenu na Nizozemskem. (67) Test je napravilo 9 bolnikov s celiakijo; 8 od njih jih je imelo značilno povišane vrednosti PI. Vrednosti PI pri bolnikih s celiakijo v tej raziskavi so višje kot izsledki naše raziskave. Povprečna vrednost PI znotraj skupine bolnikov znaša 0,243, naši rezultati pa so znotraj skupine bolnih pokazale povprečno vrednost 0,1072. Povprečna vrednost koncentracije laktuloze v skupini bolnikov je v njihovi raziskavi prav tako višja (138,6 mmol/mol kreatinina; pri nas 45,8 mmol/mol kreatinina). Najbolj zanimivo je dejstvo, da raziskovalci na Nizozemskem niso zaznali značilno znižanih vrednosti koncentracij manitola v urinu v skupini bolnikov, pri naši raziskavi pa so vrednosti koncentracij manitola v urinu bolnikov značilno znižane (povprečna vrednost pri zdravih: 862,1 mmol/mol kreatinina, povprečna vrednost pri bolnih: 431,5 mmol/mol kreatinina), kar sovpada s teorijo o zmanjšani absorpciji manitola zaradi izravnane stene tankega črevesa pri bolnikih s celiakijo.

Proučevali so tudi, kakšne vrednosti PI so imeli ožji sorodniki bolnikov s celiakijo. Izkazalo se je, da ima večina teh preiskovancev povišane vrednosti PI nad referenčnimi vrednostmi (7 od 10 proučevanih), čeprav vrednosti niso tako visoke, kot pri bolnikih s celiakijo. Ta ugotovitev je izrednega pomena, saj kaže na to, da je prepustnost tankega črevesa pri ljudeh, ki so za bolezen predisponirani (ožji sorodniki), spremenjena kljub temu, da diagnoze celiakije ti ljudje (še) nimajo. V prihodnosti bi bila proučitev ožjih sorodnikov bolnikov s celiakijo (test PI) zelo dobra raziskava tudi pri nas in bi razširila možnosti presejanja in diagnostike te bolezni.

V neki drugi študiji so isti raziskovalci še enkrat izvajali test PI v bolnišnici v Gröningenu. (48) V študijo so vključili 14 bolnikov s celiakijo ter 26 zdravih prostovoljcev. 93% bolnikov s celiakijo je imelo vrednosti PI izven referenčnih vrednosti (pri nas 60%).

Povprečna vrednost PI pri zdravih je bila 0,046 (pri nas 0,0256), pri bolnih pa 0,276 (pri nas 0,1072). Tudi v tej študiji so bile koncentracije laktuloze višje kot v naši študiji, tako pri bolnih – povprečna vrednost je bila 138 mmol/mol kreatinina, kot pri zdravih – povprečna vrednost je bila 29 mmol/mol kreatinina. Pri nas so bile povprečne vrednosti laktuloze 45, 8 mmol/mol kreatinina pri bolnih in 17,6 mmol/mol kreatinina pri zdravih. Zanimivo je, da je vrednost 29 mmol/mol kreatinina po naših merilih že vrednost koncentracije laktuloze, ki je izven referenčnih vrednosti. Koncentracije manitola v urinu so se prav tako nekoliko razlikovale glede na naše izmerjene koncentracije. Povprečna koncentracija pri zdravih je bila 625 mmol/mol kreatinina (pri nas 862,1 mmol/mol kreatinina), pri bolnih pa 557 mmol/mol kreatinina (pri nas 431, 5 mmol/mol kreatinina).

Različne dobljene vrednosti laktuloze, manitola ter PI znotraj različnih raziskav kažejo na nujno potrebno poenotenje principa metode PI (poenotenje postopka analize, načina detekcije, referenčnih vrednosti). Le na tak način bomo v prihodnosti lahko vrednosti PI med seboj relevantno primerjali ter razmišljali o uvedbi testa PI kot rutinske metode.

Temeljni namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali test PI pri bolnikih s celiakijo pokaže značilno različne vrednosti glede na zdrave preiskovance. Kljub temu, da smo test PI v Sloveniji izvajali prvič in kljub relativno majhnemu številu preiskovancev (10 zdravih, 10 bolnih s celiakijo), pa je test dobro pokazal značilne razlike med skupinama in tako utemeljil svoj namen. Dokazali smo, da je PI klinično pomemben parameter pri ugotavljanju prepustnosti stene tankega črevesa pri bolnikih s celiakijo.

Raziskava PI bo pri nas v prihodnje zajemala več pacientov in predvsem paciente z različnimi diagnozami (poleg bolnikov s celiakijo tudi bolnike s Chronovo boleznijo, bolnike z nutritivno alergijo, bolnike z diabetesom tipa I). V primeru, da bi bili rezultati obširnejše raziskave dobri, bi test PI lahko služil več različnim namenom. Lahko bi postal dober informativni test pri ljudeh s črevesnimi in drugimi težavami, ki bi nakazal spremembe v steni tankega črevesa in bi bil v pomoč zdravniku kot pacientu pri nadaljnjem postopku zdravljenja različnih obolenj. Pri pacientih, katerih simptomi nakazujejo na možnost celiakije, bi lahko bil v pomoč pri postavitvi diagnoze. S testom bi lahko odkrivali prepustnost tankega črevesa ožjih sorodnikov bolnikov, ki imajo dedne bolezni, povezane s spremenjeno prepustnostjo tankega črevesa (sorodniki Chronovih bolnikov, sorodniki bolnikov s celiakijo, sorodniki bolnikov z diabetesom tipa I). Test verjetno nikoli ne bo

dovolj zanesljivo nadomestilo biopsije kot metode, s katero postavijo diagnozo številnim obolenjem tankega črevesa. Vemo pa, da biopsija v nekaterih primerih sluzničnih sprememb ne pokaže (npr. atipična oblika celiakije, začetne faze nekaterih bolezni). Če bi kombinirali test PI z biopsijo, bi preiskovanci imeli več možnosti za pravilno postavitev diagnoze. Vendar bi v tem primeru morali narediti tudi predhodno raziskavo, kakšne rezultate daje test PI v najzgodnejših fazah obolenj. S testom PI bi lahko spremljali bolnike od pričetka bolezni, skozi obdobje zdravljenja, ozdravitve ali ponovne remisije. V določenih časovnih intervalih bi bolniki opravljali test, na podlagi katerega bi lahko spremljali potek bolezni.

6 SKLEP

Permeabilnostni indeks je na podlagi izsledkov naše raziskave klinično pomemben parameter za diagnostiko celiakije.

Za odločanje na osnovi PI o diagnozi bolezni celiakije bi bilo potrebno izvesti raziskavo na širšem naboru bolnikov. Potrebno bi bilo izvesti test PI pri bolnikih v različnih fazah bolezni (začetna faza, napredujoča faza, faza po brezglutenski dieti, faza remisije).

PI ne more biti popolno nadomestilo biopsije, lahko pa bi bil dober dodaten diagnostični test v primeru:

- da so vrednosti PI pri bolnikih visoke (značilno povišane),
- po obširni predhodni raziskavi in potrditvi PI kot ustreznega diagnostičnega parametra.

7 SEZNAM VIROV

- [1] Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3.izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-496
- [2] Petrovič D, Zorc M: Histologija - učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2005: 173-178
- [3] Zorc Pleskovič R, Gošnak Dahmane R, Milutinović Živin A: Histologija, 1. izdaja, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, Ljubljana, 2006: 45-47
- [4] Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija za medicinske šole, DZS Ljubljana, 1997: 97-98, 107-117
- [5] http://si.wikipedia.org/wiki/tanko_črevo (12.3.2012)
- [6] Sewel WG, Marks DJB, Segal AW: The imunopathogenesis of Chron's disease: a three stage model. Current Opinion in Immunology 2009; 21/5, 506-513
- [7] Fraile Ovejero A, Negril M: Fiziologija človeka, Založba mladinska knjiga, Ljubljana, 1993: 34-38
- [8] Perreault N, Beaulieu JF: Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. Experimental Cell Research 1998; 245, 34-42
- [9] The biology of digestive tract
http://www.apbi.org.uk/publications/publication_details/target (16.4.2012)
- [10] Potten CS: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Philosophical Transaction of The Royal Society B Biological Sciences 1998; 353, 821-830
- [11] <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterocyte> (12.3.2012)
- [12] Fasano A, Shea-Donohue T: Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. Gastroenterology and Hepatology 2005; 2(9): 416-422
- [13] www.austincc.edu (12.3.2012)
- [14] Barker N, Van de Wetering M, Clevers H: The intestinal stem cell, Review. Gens and Development by Cold Spring Harbor Laboratory Press 2008; 22: 1856-1864

- [15] Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A: Intestinal barrier: an interface between health and disease: review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18; 479-497
- [16] Madara LJ: Loosening tight junctions: lessons from the intestine. *The Journal of Clinical Investigation* 1989; 83; 1089-1094
- [17] Salama NN, Eddington N, Fasano A: Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 15-28
- [18] He YL, Murby S, Wahrhrust G et al: Species differences in size discrimination in the paracellular pathway reflected by oral bioavailability of poly(ethylene)glycol and D-peptides. *Journal of Pharmacological Sciences* 1998; 87(5): 626-633
- [19] Rouge N, Buri P, Doelker E: Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage-forms for site-specific delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 1996; 136: 117-139 □□□□□
- [20] Wild G, Madsen K, Thomson ABR: Intestinal tight junctions and their importance in health and disease: role of dietary lipids. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1997; 8: 2-12
- [21] Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nova P, Jaramillo BE: Tight junction proteins. *Progress of Biophysics and Molecular Biology* 2003; 81 (1): 1-44
- [22] http://en.wikipedia.org/wiki/Tight_junction (12.3.2012)
- [23] Madara LJ: Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *American Journal of Pathology* 1990; 137: 1273-1281
- [24] <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/lect07.htm> (15.9.2012)
- [25] Koch V: Gluten - sestavina živil in industrijskih proizvodov. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji. Maribor, maj 2002. Slovensko društvo za celiakijo 2002: 70-73
- [26] Ciclitira PJ, Ellis HJ: Investigation of cereal toxicity in coeliac disease. *Postgraduate Medical Journal* 1987; 63: 767-775
- [27] Rosenberg WMC, Mantzaris GJ, Jewel DP: The immunology of coeliac disease. *Springer Seminars in Immunopathology* 1990; 12: 219-229
- [28] Kagnoff MF: Overview and pathogenesis of coeliac disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 10-18
- [29] Sollid ML, Lie AB: Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005; 3 (9): 843-851

- [30] Babič M, Colarič D, Eder K, Elbl T, Kompolšek T, Murko A, Špilak M.: Izzivi družinske medicine; učno gradivo - zbornik seminarjev študentov Medicinske fakultete Univerze v Mariboru, 4. letnik, 2007/2008; Maribor 2007; 53-61
- [31] Walsh SV, Hopkins AM in Nusrat A: Modulation of tight junction structure and function by citokines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 41 (3): 303-313
- [32] http://www.nature.com/mi/journal/v2/n1/fig_tab/mi200875f1.html (15.9.2012)
- [33] Mearin ML: Coeliac disease among children and adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2007; 37: 86-105
- [34] Rodrigo L: Celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12 (41): 6585-6593
- [35] Helms SND: Coeliac disease and gluten-associated diseases. *Alternative Medicine Review* 2005; 10 (3): 172-186
- [36] Silano M, De Vincenzi M: In vitro screening of food peptides toxic for coeliac and other gluten-sensitive patients: a review. *Toxicology* 1999; 132: 99-110
- [37] Elli L, Dolfini E, Bardella MT: Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicology Letters* 2003; 146: 1-8
- [38] Williamson D, Marsh MN: Celiac disease. *Molecular Biotechnology* 2002; 22 (3): 293-299
- [39] <http://www.drustvo-celiakija.si/indeks.php?id=39> (20.5.2012)
- [40] Dolinšek D, Urlep-Žižej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75 (2): 89-97
- [41] Walker-Smith JA GS, Schmerling DM, Visakorpi JK: Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Archives of Disease in Childhood* 1990; 65: 909-911
- [42] Vilela EG, Torres HOG, Ferrari MLA, Lima AS, Cunha AS: Gut permeability to lactulose and mannitol differs in treated Crohn's disease and Celiac disease patients and healthy subjects. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41 (12): 1105-1109
- [43] Emmrich J, Liebe S, Stange EF: Innovative concepts in inflammatory bowel disease; Berlin: Springer-Verlag 1999: 111-119
- [44] Bjamason I, Macpherson A, Hollander D: Intestinal permeability: an overview, *Gastroenterology* 1995; 108: 1566-1581

- [45] Sukkar GS, Schenone E, Foppiani L, Nobile MT: Experimental assessment of chemotherapy-induced-early intestinal damage in colon cancer. *Tumori* 2004; 90: 461-463
- [46] Juby LD, Dixon MF, Axon AT: Abnormal intestinal permeability and jejunal morphometry. *Journal of Clinical Pathology* 1987; 40(7): 714-718
- [47] <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactulose> (12.3.2012)
- [48] Van Elburg RM, Uil JJ, Kokke FTM et al.: The sugar absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1995; 20: 184-88
- [49] <http://en.wikipedia.org/wiki/Mannitol> (12.3.2012)
- [50] Natharitharana KA, Lloyd DR, Raafat F, Brown GA, McNeish AS: Urinary mannitol:lactulose excretion ratios and jejunal mucosal structure. *Archives of Disease in Childhood* 1988, 63: 1054-1059
- [51] Martinez-Augustin O, Boza JJ, Romera MJ, Angel G: A rapid gas-liquid chromatography method for the determination of lactulose and mannitol in urine: clinical application in studies of intestinal permeability, *Clinical Biochemistry* 1995; 28: 4 401-405
- [52] Klein P, Moracova J, Klemsila T, Volek Z, Skrivanova V: Assessment of intestinal permeability in preruminant calves by lactulose/mannitol test. *Journal of Animals and Feed Sciences* 2007; 16: 43-52
- [53] Bijlsma PB, Peeters Roger A, Groot AJ: Differential in vitro and in vivo intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: A hypothesis. *Gastroenterology* 1995; 108: 687-696
- [54] Welcker K, Martin A, Kollé P, Siebeck M, Gross M: Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *European Journal of Medical Research* 2004; 9: 456-460
- [55] Van Elburg RM, Van Overbeek FM, Uil JJ et. al.: Clinical implications of the sugar absorption test: intestinal permeability test to assess mucosal barrier function. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1997; 223: 70-78
- [56] DeMeo MT, Muthe AE, Keshavarzian A, Tobin MC: Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2002; 34(4): 385-396

- [57] Kagnoff MF: Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 41-49
- [58] Groschwitz KR, Hogan SP: Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Clinical reviews in allergy and immunology. Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124 (1): 3-16
- [59] Uil JJ, Van Elburg RM, Janssens PMW, Mulder CJJ, Heymans HSA: Sensitivity of a hiperosmolar or “low” osmolar test solution for sugar absorption in recognizing small intestinal damage in celiac disease; *Digestive and Liver Disease* 2000; 32: 195-200
- [60] Sugar absorption test; directives for a sugar absorption test (patient information). *Delzjil* 2001
- [61] Interna navodila za pripravo SAT raztopine, Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2012
- [62] Marc J, Černe D: Zapiski predavanj iz Klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 5. letnik, 2010/2011
- [63] Vaishya R, Arora S, Singh B, Mallika V: Modification of Jaffe's kinetic method increases bilirubin interference. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2010; 25: 64-66
- [64] Interna navodila za uporabo analizatorja Roche Hitachi, Roche Diagnostics, 2009
- [65] Specifikacije za analizator Olympus AU 400, Ljubljana 2010
- [66] Sugar absorption test: determination of lactulose and mannitol in urine – protocol. *Delfzjil* 2009
- [67] Van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJJ, Heymans HSA: Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut* 1993; 34: 354-357