

TEORETIČNE OSNOVE ^{13}C DIHALNIH TESTOV

THEORETICAL BASICS ^{13}C BREATH TEST

AVTOR / AUTHOR:

Suhadolc K, Sešek Briški A in
Osredkar J

*Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo,
Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: josko.osredkar@kclj.si

1 UVOD

Dihalni testi se v medicini uporabljajo za preiskovanje hlapnih organskih in anorganskih spojin v izdihanem zraku za oceno encimske oziroma metabolne funkcije, določitev diagnoze bolezni, spremljanje napredovanja bolezni in učinkovitosti terapije (1). Prvotno so testi temeljili na merjenju radioaktivnega ogljikovega izotopa 14, ki ima razpolovno dobo 5730 let in je bil strogo prepovedan za uporabo pri nosečnicah in otrocih. Danes pa se uporablja neradioaktivni ogljikov izotop 13 (^{13}C), ki je povsem neškodljiv, stabilen in je primeren za uporabo tudi pri otrocih, nosečnicah in doječih materah (2).

POVZETEK

Dihalni test z uporabo stabilnega ogljikovega izotopa 13 (^{13}C) je neinvazivno diagnostično orodje, ki se uporablja v znanstvenih in kliničnih preiskavah številnih fizioloških in patofizioloških procesov. Temelji na merjenju obogatitve ogljika v izdihanem zraku ogljikovega dioksida po zaužitju testnega obroka, ki vsebuje označen ^{13}C v specifični funkcionalni skupini molekule. ^{13}C se v izdihanem zraku lahko meri z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov in z nedisperzivno infrardečo spektrometrijo.

V članku sta predstavljena matematična modela, ki napovedujeta dinamiko razgradnje označenega substrata in s pomočjo katerih se nato izračuna polovični čas izločanja $^{13}\text{CO}_2$ in čas maksimalnega izločanja ogljikovega izotopa 13 ter koeficient praznjenja želodca.

Pomanjkljivost dihalnih testov je predvsem v standardizaciji obrokov in izotopov med posameznimi laboratoriji, zato so rezultati preiskav različni in njihova interpretacija je odvisna od posamezne ustanove, ki preiskavo izvaja. Z naraščanjem vrednosti v klinični uporabi, s standardizacijo metod, razvijanjem novih senzorjev in detekcijskih sistemov bodo v naslednjih letih dobili dihalni testi še širšo uporabnost.

ABSTRACT

Breath test using a stable isotope of carbon 13 (^{13}C) is a noninvasive diagnostic tool for applications in scientific and clinical research in many physiological and pathophysiological processes. The test is based on measuring the enrichment of carbon in carbon dioxide in exhaled air after ingestion of a test meal, which contains a labeled ^{13}C in one or more specific functional groups of the molecule. ^{13}C in exhaled air can be measured with the Isotope ratio mass spectrometry and Non-dispersive infrared spectrometry.

This paper presents two mathematical models that predict the degradation dynamics of the labeled substrate and from which is then calculated $^{13}\text{CO}_2$ half excretion time, the time of the maximal $^{13}\text{CO}_2$ excretion rate and the gastric emptying coefficient.

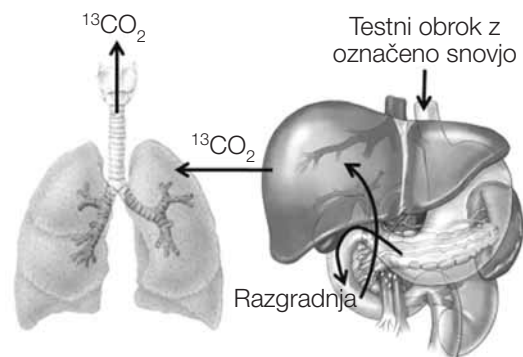
The problem with breath tests is that different laboratories use different dosages and types of ^{13}C sub-



strates as well as different isotopes. Therefore, research results vary between laboratories and their interpretation depends on institution that conducted the investigation. With the increasing value in clinical use, standardization of the methods and by developing new sensor and detection systems in the coming years, a breath test will become even widely applicable.

Princip dihalnih testov temelji na zaužitju tekočega ali trdnega testnega obroka v katerega je vmešana snov, ki je označena z ogljikovim izotopom 13. Sestavine testnega obroka spodbudijo izločanje želenega preiskovanega encima, upočasnijo praznjenje želodca in podaljšajo kontaktni čas označene snovi z encimom. V črevesju se snov označena s ^{13}C razgradi v odvisnosti od količine aktivnega encima do različnih presnovkov in ^{13}C označenega ogljikovega dioksida ($^{13}\text{CO}_2$) (slika 1). Sproščen ogljikov dioksid se ne izloči direktno iz organizma z izdihanim zrakom, temveč najprej difundira v krvne žile iz preiskovanega organa in se prenese kot bikarbonat ($\text{H}^{12}\text{CO}_3^-/\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$) v pljuča, kjer se sprosti le 40-70% celotnega $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku (3, 4). Preostali ^{13}C se vgradi v metabolne produkte (npr. ketonska telesca, aminokisline), zadrži v bikarbonatnih bazenih (pools), nekaj pa se ga ireverzibilno izgubi preko nerespiratornih poti (< 5% z blatom, ~1% transkutano, 1-3% z urinom) (5). Povečano razmerje med $^{13}\text{CO}_2$ in $^{12}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku kaže na: (1) prisotnost encimske aktivnosti, (2) in količino prisotnega aktivnega encima v telesu ter (3) lahko odraža stopnjo fiziološkega procesa ali pa kaže na prisotnost tujka (npr. bakterije, encima...) (6).

Izdihan zrak pri odraslem človeku povprečno vsebuje 2-4% CO_2 z izotopskim razmerjem ^{12}C proti ^{13}C 99:1, vendar se dejanska koncentracija CO_2 povečuje glede na magnitudo izdihanega zraka (1, 8). Izotop ^{13}C vsebujejo vsa živila v različnih koncentracijah, zato je dejanska količina ^{13}C v izdihanem zraku odvisna od vrste in količine zaužite hrane.



Slika 1: Princip ^{13}C dihalnega testa. Test temelji na merjenju obogatitve ogljika v ogljikovem dioksidu v izdihanem zraku po zaužitju testnega obroka, ki vsebuje snov označeno s ^{13}C v eni ali več funkcionalnih skupin v molekuli (7).

Figure 1: Principle of the ^{13}C -labelled breath test. The test is based on measuring the enrichment of carbon in carbon dioxide in exhaled air after ingestion of a test meal, which contains a labeled ^{13}C in one or more specific functional groups of the molecule (7).

Povprečni dnevni vnos ^{13}C znaša med 2 in 3 grame, kar je veliko več, kot ga pacient zaužije pri preiskavi, saj ta odmerik znaša okrog 200 mg in je zato je le malo verjetno, da bi povzročil kakršnekoli neželene učinke pri preiskovanju (2). Količina $^{13}\text{CO}_2$, ki se sprosti iz označene testne snovi predstavlja le majhen delež naravno prisotnega $^{13}\text{CO}_2$, ki se ga lahko izmeri z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry) ali z nedisperzivno infrardečo spektrometrijo (NDIRS - Nondispersive infrared spectrometry). Slednja ima manjšo analitično natančnost kot masni spektrometer, vendar je cenejša in enostavnejša za uporabo (8, 12).

Dihalni testi z uporabo stabilnega izotopa ^{13}C so preprosta, varna in neinvazivna metoda, ki se uporabljajo pri znanstvenih in kliničnih preiskavah številnih fizioloških in patofizioloških procesov (3, 9). Dihalne teste se lahko uporabi za diagnostiko številnih bolezni (preglednica 1), vendar le

Preglednica 1: Aplikacije ^{13}C dihalnih testov v raziskavah in diagnostiki (10, 12).

^{13}C označen substrat	Aplikacije
Monosaharidi	Absorbcija, mikrosomalna biotransformacija
Oligo in polisaharidi	Hidroliza oligo in polisaharidov, funkcija pankreasa, cistična fibroza
Amino kisline	Razgradnja aminokislin, ocena hitrosti praznjenja želodca, delovanje jeter
Proteini	Razgradnja in resorpcija proteinov
Karboksilne kisline	Ocena hitrosti praznjenja želodca, miokardne metabolne preiskave, hepatična steatoza
Lipidi	Presnova maščob, malabsorpcija maščob
Ogljikova kislina	Okužba s <i>Helicobacter pylori</i>

redko pridejo v rutinsko klinično uporabo predvsem zaradi doseganja slabše občutljivosti in specifičnosti (8, 10). Izmed vseh dihalnih testov, ki so na tržišču je Ameriški urad za zdravila (angl. FDA-Food and Drug Administration) do danes odobril za klinično uporabo le dihalni test s ^{13}C označeno sečnino za diagnostiko okužbe s *Helicobacter pylori* v prebavnem traktu (11).

Dihalni testi so lahko kvalitativni ali kvantitativni. Kvalitativni pokažejo ali je pri bolniku prisotna bolezen, medtem ko kvantitativni test poda informacijo o njeni resnosti (1). Med seboj se razlikujejo tudi glede na čas izvedbe, število odvzetih vzorcev izdihanega zraka, čas ki poteče med vzetimi zaporednimi vzorci in metodo merjenja izotopske sestave (13).

2 POSTOPEK IZVEDBE DIHALNIH TESTOV

Pred izvedbo dihalnega testa mora biti preiskovanec tešč 12 ur, najbolje preko noči, med samim testom mora mirovati in ne sme kaditi, s čimer se izognemo hiperventilaciji, ki bi lahko vodila do napačne interpretacije rezultatov testa. Pije lahko le negazirano vodo, saj bi lahko raztopljen CO_2 vodil do sprememb v količini izdihanega ogljikovega dioksida in s tem do napačnih rezultatov testa. Najmanj teden dni pred izvedbo testa mora preiskovanec prenehati z jemanjem zdravil, ki bi lahko imela vpliv na rezultate testa. Če bi bilo potrebno test iz kakršnih razlogov ponoviti, ga lahko izvedemo šele naslednji dan. Vsa navedena navodila je potrebno natančno upoštevati, saj lahko vsaka nedoslednost pri izvedbi testa vodi do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov (2).

Prvi vzorec izdihanega zraka se odvzame pred zaužitim testnim obrokom (čas 0 min) in je namenjen določitvi os-

novne bazalne linije, ki predstavlja naravno prisoten $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku. Pri odvzemu vzorca preiskovanec počasi in enakomerno pihne skozi slamico v epruveto toliko zraka, da se le-ta orosi in jo takoj zamaši (slika 2A). Preiskovanec nato zaužije standardizirani tekoči ali trdni testni obrok odvisno od želene preiskave (slika 2B). Nato poteka nadaljni odzem vzorcev po enakem postopku, največkrat v časovnem razmaku 15 oz. 30 min (slika 2C). Število vzorcev izdihanega zraka je odvisno od posamezne preiskave (12).

3 IZRAČUN REZULTATOV DIHALNIH TESTOV

Rezultati ^{13}C dihalnih testov so ponavadi podani kot odstotek izločenega ^{13}C v izdihanem zraku glede na čas (% $^{13}\text{C}/\text{h}$) in kot odstotek kumulativne količine izločenega ^{13}C v merjenem času (% izdihanega ^{13}C) (13, 14, 15). Izračun omenjenih parametrov si bomo natančneje pogledali v nadaljevanju.

Meritve absolutnih vrednosti in izračunana absolutna razmerja so, zaradi številnih možnih napak pri merjenju, pogosto nenatančni ($\pm 0,5\%$). Le z relativnimi meritvami proti standardu se lahko doseže zahtevano natančnost okrog $\pm 0,1\%$. Take meritve omogočajo IRMS in NIDRS, ki imajo vgrajen dvojni uvajalni sistem, s katerim se izmenoma meri vzorec in standard (16). Rezultat meritev je relativna vrednost izotopske sestave izražena z vrednostjo delta (δ), ki predstavlja relativno razliko (presežek) izotopske sestave preiskovanega vzorca glede na izbrani standard in je izražena v promilih ‰ (enačba 1). Delta vrednost (δ) vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0‰. Pozitivne vrednosti δ pomenijo višje izotopsko razmerje R v vzorcu v primerjavi s standardom, negativne vrednosti pa nižje izotopsko razmerje v primerjavi s standardom.



Slika 2: Postopek izvedbe ^{13}C dihalnih testov
Figure 2: Procedure of the ^{13}C breath test

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{vz}} = \frac{R_{\text{vz}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}} \cdot 1000 \text{ [‰]} \quad (1)$$

V enačbi 1 vrednost R_{vz} predstavlja razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v preiskovanem vzorcu, R_{st} pa razmerje med izotopoma ^{13}C in ^{12}C v izbranem standardu (12, 17, 18).

Standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine. Izbrani so tako, da so izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (20). Mednarodne standarde določata Mednarodna agencija za jedrsko energijo na Dunaju (IAEA - International Atomic Energy Agency) in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST - National Institute of Standards and Technology). Za ogljik je bil privzet karbonatni standard fosila *Belemnite americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini (PDB - Pee Dee Belemnite) z vrednostjo R , ki znaša 0,0112372 PDB (12, 19, 20). Zaradi premajhne količine PDB v naravi so izdelali umetni karbonat z enako izotopsko sestavo in ga poimenovali Vienna PeeDee Belemnite (VPDB), zato se vsi rezultati podajajo glede na to vrednost (18). Izotopsko razmerje se ob prisotnosti aktivnega encima po zaužitju testnega obroka znatno poveča, pri zmanjšani aktivnosti encima je povečanje manjše in v primeru neaktivnega oz. odsotnega encima ostane razmerje nespremenjeno v primerjavi z izmerjenim razmerjem pred zaužitjem testnega obroka. Delež ^{13}C v izdihanem zraku se za vsak vzorčen čas izračuna po naslednji enačbi:

$$\%^{13}\text{C}_{t_i} = \frac{\frac{\delta^{13}\text{C}_{t_i}}{1000} + 1}{\frac{1}{0,0112372} + \frac{\delta^{13}\text{C}_{t_i}}{1000}} \cdot 100 \quad (2)$$

V enačbi 2 $\delta^{13}\text{C}_t$ predstavlja relativno razliko izotopske sestave preiskovanega vzorca glede na izbrani standard (izračuna po enačbi 1) in 0,0112372 predstavlja razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v karbonatnem standardu za ogljik v fosilu *Belemnite americana* iz kredne formacije PeeDee (12, 17).

Pri izračunu deleža ^{13}C v izdihanem zraku je potrebno upoštevati tudi meritev bazalne linije pred zaužitjem testnega obroka, ki odstrani vpliv endogeno prisotnega $^{13}\text{CO}_2$. Delež izotopa v izdihanem zraku z upoštevanjem meritve bazalne linije se izračuna po enačbi 3.

$$\%^{13}\text{C}_t = \%^{13}\text{C}_{t_i} - \%^{13}\text{C}_{t_0} \quad (3)$$

V enačbi 3 $\%^{13}\text{C}_{t_i}$ predstavlja delež izotopa v izdihanem zraku ob času t_i in $\%^{13}\text{C}_{t_0}$ delež izotopa v izdihanem zraku ob meritvi bazalne linije (t_0) pred zaužitim testnim obrokom (12, 15, 17).

Hitrost razgradnje označenega substrata glede na zaužito količino in čas, se izračuna po naslednji enačbi:

$$\%^{13}\text{C} / h = \frac{\frac{\%^{13}\text{C}_t}{100} \cdot V_{\text{CO}_2}}{\frac{\%^{13}\text{C}_{\text{sub}} - \%^{13}\text{C}_{t_0}}{100} \cdot \frac{m_{\text{sub}}}{M_{\text{sub}}}} \cdot 100\% \quad (4)$$

V enačbi 4 $\%^{13}\text{C}_t$ predstavlja delež izotopa ^{13}C v izdihanem zraku v času t po zaužitju testnega obroka, $\%^{13}\text{C}_{\text{sub}}$ delež izotopa ^{13}C v zaužitem substratu, ki je ponavadi 99 %, $\%^{13}\text{C}_{t_0}$ pa delež izotopa ^{13}C v izdihanem zraku ob meritvi bazalne linije ob času t_0 pred zaužitim testnim obrokom, V_{CO_2} volumen izdihanega ogljikovega dioksida izražen v mmol/h/m², m_{sub} maso zaužitega testnega substrata izraženo v mg in M_{sub} molsko maso označenega substrata izraženo v g/mol (15, 17, 21).

Za izračun hitrosti razgradnje označenega substrata je potrebno poznati volumen izdihanega ogljikovega dioksida (V_{CO_2}), saj se oksidiran $^{13}\text{CO}_2$ iz zaužitega substrata razredči z endogenim CO_2 iz metabolizma. Preiskovanci morajo med izvedbo testa mirovati, da ne pride do povečanega izločanja CO_2 , kar bi vodilo do zmanjšane koncentracije ^{13}C v izdihanem zraku in tako tudi do napačne interpretacije rezultatov (21).

Volumen izdihanega ogljikovega dioksida je pri odraslem človeku v mirovanju, ocenjen s 5 mmol/min/površino telesa (m²) in se ga izračuna po enačbi 5 (13, 17). Pri izračunu volumna ogljikovega dioksida pa je potrebno upoštevati tudi telesno površino (BSA - Body Surface Area), ki se jo izračuna iz podatkov o telesni teži izraženo v kilogramih in telesni višini izraženo v centimetrih po enačbi 6 (13, 17). Volumen izdihanega CO_2 se lahko izračuna tudi iz bazalnega metabolizma (BMR-Basal Metabolic Rate) in iz frekvence srčnega utripa ali pa se ga določi s pomočjo indirektna kalorimetrije (21).

$$V_{\text{CO}_2} = \text{BSA}(\text{m}^2) \cdot 5 \text{ mmol} / \text{min} / \text{m}^2 \cdot 60 \text{ min} / h \quad (5)$$

V enačbi 5 V_{CO_2} pomeni volumen izdihanega ogljikovega dioksida in BSA telesno površino, ki se jo izračuna po enačbi 6.

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

V enačbi 6 parameter m predstavlja telesno maso izraženo v kilogramih in h telesno višino izraženo v centimetrih (13).

Kumulativna količina izločenega ^{13}C izražena v odstotkih se izračuna po enačbi 7 in je definirana kot celotna količina ^{13}C , ki se izloči v izdihanem zraku v določenem času, glede na količino vnesenega ^{13}C s testnim obrokom.

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

V enačbi 7 oznaka $\%^{13}\text{C}/h (t_i)$ predstavlja delež izotopa ^{13}C v izdihanem zraku v času t_i in $\%^{13}\text{C}/h (t_{i-1})$ delež izotopa ^{13}C v izdihanem zraku v času t_{i-1} po zaužitju testnega obroka, ki se ju izračuna po enačbi 4. t_i in t_{i-1} predstavlja čas izražen v urah pri katerem se izloči delež izotopa ^{13}C v izdihanem času (22).

Izločen kumulativni ^{13}C nikoli ne doseže 100%, ker se določen delež ^{13}C zadrži v telesu v obliki bikarbonata ali pa se vključi v druge metabolne cikle kot je cikel trikarboksilnih kislin (9).

4 KINETIKA PRESNOVE TESTNEGA SUBSTRATA

Kinetika presnove substrata oz. stopnja praznjenja želodca je opisana s polovičnim časom izločanja ^{13}C ($t_{1/2}$), s časom maksimalnega izločanja ^{13}C ($t_{\max}$) in s koeficientom praznjenja želodca (GEC) (14, 15). Omenjene parametre se lahko izračuna z uporabo dveh različnih matematičnih modelov, ki napovedujeta dinamiko razgradnje označenega substrata in jih je prvi opisal Ghooos leta 1993 (13, 22). Koeficient praznjenja želodca in čas maksimalnega izločanja se izračuna iz krivulje, ki opisuje delež izdihanega ^{13}C v odvisnosti od časa in polovični čas izločanja pa iz krivulje, ki opisuje kumulativno količino izločenega ^{13}C z izdihanim zrakom (5, 14).

Pri obeh modelih gre za simulacijo eksperimentalnih podatkov z ustreznim matematičnim modelom. Eksperimen-

talne podatke opišemo z matematično enačbo v obliki $Y = f(x)$, kjer je X neodvisna spremenljivka, Y odvisna spremenljivka in f funkcija, ki vključuje enega ali več parametrov za opis podatkov.

Prvi matematični model izhaja iz χ^2 porazdelitve (enačba 8) in opiše krivuljo izdihanega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa ($\%^{13}\text{CO}_2/h$).

$$y(t) = a \cdot t^b \cdot e^{-ct} \quad (8)$$

V enačbi 8 t predstavlja čas merjen v urah; a , b in c pa so parametri, ki se jih pridobi z nelinearno regresijsko analizo (13, 14, 15).

Stopnjo praznjenja želodca (GEC- angl. gastric emptying coefficient) se izračuna po enačbi 9. Večja kot je stopnja praznjenja želodca, hitreje je praznjenje vsebine želodca (13, 14, 15).

$$GEC = \ln a \quad (9)$$

V enačbi 9 parameter a predstavlja konstanto, ki se jo izračuna z nelinearno regresijsko analizo.

Polovični čas izločanja ($t_{1/2}$) in čas maksimalnega izločanja ($t_{\max}$) ^{13}C v izdihanem zraku se izračunata po enačbi 10 in 11 (15). Polovični čas izločanja ^{13}C , je čas izražen v minutah, ko se presnovi polovica količine označenega substrata, kar je grafično prikazano na sliki 3 (14, 15).

$$t_{1/2} = \Gamma^{-1}(0,5; b+1; 1/c) \quad (10)$$

V enačbi 10 Γ^{-1} predstavlja inverzno gama funkcijo ter b in c konstanti, ki se ju izračuna z nelinearno regresijsko analizo.

Čas maksimalnega izločanja ^{13}C ($t_{\max}$) ponazarja stanje pretoka v želodcu in je grafično prikazan na sliki 3. Ko je izločanje $^{13}\text{CO}_2$ maksimalno, zapusti želodec več kot 80% želodčne vsebine (14, 15).

$$t_{\max} = \frac{b}{c} [\text{min}] \quad (11)$$

Drugi matematični model pa izhaja iz Siegelove funkcije, ki posnema retenzijsko scintigrafsko krivuljo modificirano za korekcijski faktor m (enačba 12). Model opiše kumulativno količino ^{13}C v izdihanem zraku, ki je definirana kot celotna količina ^{13}C , ki se izloči v izdihanem zraku v določenem času, glede na količino vnesenega ^{13}C s substratom.



$$z(t) = m(1 - e^{-kt})^\beta \quad (12)$$

V enačbi 12 z predstavlja kumulativno količino izdihanega ¹³CO₂ v določenem času, t je čas merjen v urah, m celotno kumulativno količino ¹³CO₂ v izdihanem zraku, ko je čas neskončen, parametri m, k in β so ocenjene regresijske konstante (13, 14, 23).

Parametre m, k in β ter a, b in c se pridobi z nelinearno iterativno metodo najmanjših kvadratov s pomočjo Excelovega programa Reševalec (Solver). Reševalec je matematično orodje, ki poizkuša med eksperimentalnimi in teoretičnimi podatki zmanjšati razliko kvadratov na minimum, pri tem pa spreminja parametre funkcije. Pri vsakem koraku izračuna nove vrednosti za matematično funkcijo in primerja razliko kvadratov s prejšnjo vrednostjo. Postopek se ponavlja dokler ne doseže minimuma. Reševanja se loti s posplošeno reducirano metodo gradientov (GRG - Generalized Reduced Gradient method). Naloga Reševalca je torej, da najde vrednosti vhodnih spremenljivk, ki dajo najboljšo vrednost ciljne funkcije. To pomeni najboljše rešitev modela (24, 25).

Pri obeh matematičnih modelih je potek reševanja podoben. Natančneje pa bomo opisali postopek za drugi model. Najprej je potrebno izračunati odvod funkcije (enačba 13), ki teoretično opiše krivuljo izločanja ¹³C z izdihanim zrakom v odvisnosti od časa.

$$z'(t) = mk\beta e^{-kt} (1 - e^{-kt})^{\beta-1} \quad (13)$$

V enačbi 13 parametri m, k in β predstavljajo regresijske konstante in t čas merjen v urah (13, 14, 23, 24).

Nato z oceno začetnih vrednosti parametrov m, k in β na podlagi predhodnih izkušenj ali pa na smiselnem ugibanju, ki temelji na poznavanju uporabljene funkcije za opis po-

datkov, pridobi krivuljo, ki se čim bolj prilega rezultatom dihalnega testa. Z metodo najmanjših kvadratov se izračuna napako med eksperimentalno dobljeno količino ¹³C v izdihanem zraku, ki se jo izračuna po enačbi 4 (%¹³C/h) in teoretično pridobljeno količino ¹³C v izdihanem zraku, ki se jo izračuna po enačbi 13 (%¹³C/h). Z nelinearno regresijo se s programom Reševalec izračuna natančnejše vrednosti konstant m, k in β, tako da je napaka med eksperimentalnimi in teoretičnimi rezultati čim manjša. Te vrednosti se vstavi v enačbo 12 in se izračuna teoretični delež kumulativnega ¹³C v izdihanem zraku. S pomočjo programa Reševalec se določi nove vrednosti konstant m, k in β v enačbi 12, tako da je napaka med teoretičnimi in eksperimentalnimi deleži kumulativnega ¹³C v izdihanem zraku čim manjša, kar pomeni da se krivulja, ki opisuje kumulativno količino ¹³C v izdihanem zraku čim bolj prilega eksperimentalno dobljenim podatkom. Na novo pridobljene vrednosti konstant k in β lahko sedaj uporabimo za izračun polovičnega časa praznjenja želodca (t_{1/2}) po enačbi 14 (13, 14, 23, 24) in maksimalnega časa izločanja ¹³C (t_{max}) po enačbi 15 (14, 23, 24), ki sta tudi grafično prikazana na sliki 3. Oba parametra sta določena z obliko krivulje in tako neodvisna od endogeno proizvedenega CO₂ (24).

$$t_{1/2} = -\frac{[\ln(1 - 2^{-1/\beta})]}{k} \quad (14)$$

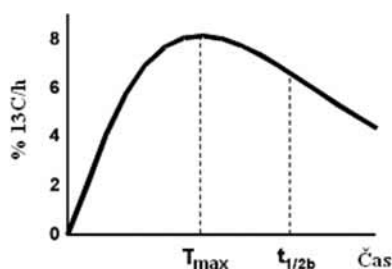
$$t_{\max} = \frac{\ln \beta}{k} \quad (15)$$

Krajši t_{max} ali t_{1/2} pomeni hitrejšo praznjenje želodca. Vrednosti parametra β, ki so večje od 1, označujejo zakasnjeno praznjenje želodca (počasnejša rast krivulje), vrednosti manjše od 1 pa pomenijo hitro praznjenje želodca (hitrejša rast krivulje) (14, 26). Večje vrednosti parametra k pomenijo hitrejšo rast kumulativne krivulje, medtem ko manjše vrednosti pomenijo bolj postopno rast krivulje (23, 26).

Tabela 1: Prikazuje čas praznjenja želodca za tekoče in trdne substrate (27).

Table 1: Shows the ¹³CO₂ half excretion time and the time of maximal ¹³CO₂ excretion rate for liquid and solid meal (27).

Čas praznjenja želodca	Zmanjšano	Normalno	Zakasnjeno	Zelo zakasnjeno
Tekoči substrat				
t _{max} [min]	< 25	22-25	55-80	> 80
t _{1/2} [min]	< 35	35-80	80-120	> 120
Trdni substrat				
t _{max} [min]	< 50	50-100	100-150	> 150
t _{1/2} [min]	< 75	75-135	135-200	> 200



Slika 3: Prikazuje polovični čas izločanja in čas maksimalnega izločanja ^{13}C (24).

Figure 3: Shows the $^{13}\text{CO}_2$ half excretion time and the time of maximal $^{13}\text{CO}_2$ excretion rate (24).

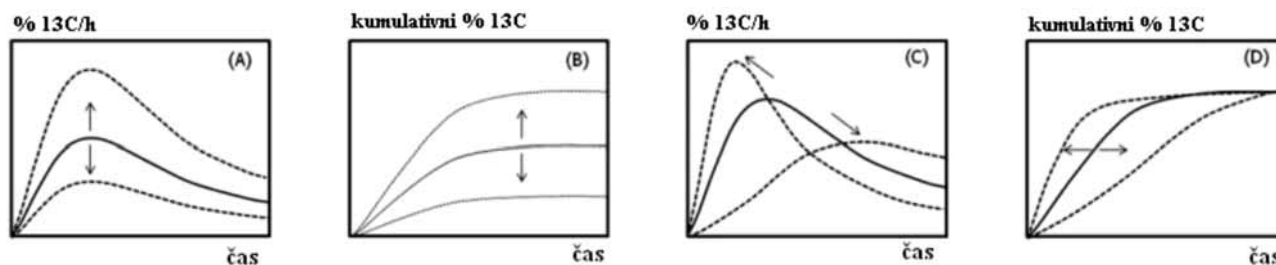
5 INTERPRETACIJA PARAMETROV DIHALNIH TESTOV

V matematičnem modelu konstanti a in m določata višino krivulje, ki opisuje delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa (slika A in B) oz. predstavljata količino izločenega $^{13}\text{CO}_2$ z izdihanim zrakom. Konstante k , β , b in c pa določajo obliko krivulje, ki opisuje delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa (slika C in D) oz. predstavljajo hitrost izločenega $^{13}\text{CO}_2$ z izdihanim zrakom. Na količino oz. hitrost izločenega $^{13}\text{CO}_2$ z izdihanim zrakom vpliva tako izguba kot tudi zadrževanje $^{13}\text{CO}_2$ v telesu (14).

Kadar je praznjenje označenega substrata iz želodca pospešeno se poveča tako količina (slika 4A in 4B) kot tudi hitrost izločanja $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zrakom (slika 4C in 4D). Ko se količina izločenega $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zrakom poveča, se krivulji ki opisujeta delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa zvišata, pri tem pa oblika kri-

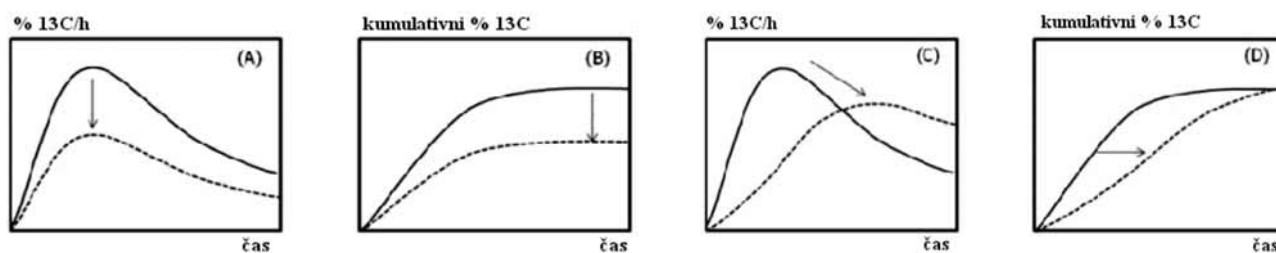
vilje ostane nespremenjena, kar je prikazano na sliki 4A in 4B. Če pa se poveča hitrost praznjenja želodca, potem krivulja ki opisuje delež izdihanega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa postane bolj strma, površina pod njo pa ostane nespremenjena (slika 4C). Krivulja, ki opisuje delež kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zraku v odvisnosti od časa, se bo premaknila na desno, končna količina $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zraku pa ostane nespremenjena. Kadar je praznjenje želodca konstantno, izguba in zadrževanje $^{13}\text{CO}_2$ v telesu, vplivata na količino in hitrost izločanja z izdihanim zrakom in s tem na rezultate dihalnih testov (14).

Kot je bilo že omenjeno, povečanje količine $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zraku glede na izhodiščno koncentracijo, odraža preiskovano funkcijo. Vendar pa je izmerjen le končni produkt $^{13}\text{CO}_2$, ki ne pove nobene informacije o zalogi in tokovih označenega substrata in njegovih presnovkov. Vsaj pri prirojenih napakah metabolizma, verjetno pa pri katerikoli bolezni, je potrebno predvidevati, da so ti rezervoarji in tokovi bistveno spremenjeni. Tako tudi izguba in zadrževanje $^{13}\text{CO}_2$ v telesu vplivata na kinetiko metabolizma in tako na parametre dihalnega testa kot so GEC, $t_{\max}$ in $t_{1/2}$. In sicer, če se količina izgubljenega $^{13}\text{CO}_2$ poveča, npr. z vezavo na druge presnovke v telesu, se količina le tega v izdihanim zraku zmanjša, kar je prikazano na sliki 5A in 5B z znižanjem krivulj, ki opisujeta delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa. Oblika obeh krivulj ostane enaka, kar pomeni da se hitrost izločanja $^{13}\text{CO}_2$ pri tem ne spreminja. Pri tem se GEC zmanjša, čeprav $t_{\max}$ in $t_{1/2}$ ostaneta enaka. Zaradi vezave $^{13}\text{CO}_2$ na druge presnovke v telesu se ga v izdihanim zraku izloči kar za 50% manj. Po drugi strani pa, če se čas zadrževanja $^{13}\text{CO}_2$ v bikarbonatnem rezervoarju v telesu podaljša, postaneta krivulji, ki opisujeta delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa, bolj ploščati, kar pomeni da se hitrost izločanja ^{13}C upočasni pri tem pa površina pod krivuljama



Slika 4: Vpliv količine in hitrosti $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanim zraku na višino in obliko krivulje, ki opisuje delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa (3).

Figure 4: Influence of the amount and velocity of $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled air on the height and shape of percent dose recovery and cumulative recovery curves (3).



Slika 5: Vpliv izgube in zadrževanja $^{13}\text{CO}_2$ v telesu na kinetiko izločanja (14).

Figure 5: Effects of the loss and the retention of $^{13}\text{CO}_2$ on the breath test results (14).

ostane nespremenjena (slika 5C in 5D). Kot posledica zadrževanja se krivulji, ki opisujeta delež izdihanega in kumulativnega $^{13}\text{CO}_2$ v odvisnosti od časa, pomakneta nižje v desno stran kot je prikazano na sliki 5C in 5D. Ob podaljšanjem zadrževanju $^{13}\text{CO}_2$ v telesu se zmanjša tudi GEC, $t_{1/2}$ in $t_{\max}$ pa se podaljšata (5, 14).

Zanesljivost izračunanih parametrov dihalnih testov je odvisno od tega, kako dobro se eksperimentalni podatki $^{13}\text{CO}_2$ prilegajo posamznemu matematičnemu modelu. To nam pokaže koeficient korelacije, ki mora biti večji od 0,9 drugače se test zavrne. Na dobro prileganje krivulje eksperimentalnim podatkom, zelo vpliva tudi čas dihalnega testa in sicer krajši kot je čas testa, slabše je prileganje krivulje (14).

Meje dihalnih testov s katerimi se določi normalna ali patološka aktivnost preiskovanega organa, ponavadi določi vsak laboratorij zase, glede na rezultate analiziranih kontrolnih skupin. Na podlagi teh rezultatov se nato izračuna spodnjo in zgornjo mejo intervala zaupanja (po navadi se določi 95%) in pomeni interval v katerem se z dano gotovostjo nahaja ocenjevani parameter.

6 ZAKLJUČEK

Problem dihalnih testov je, da pri njihovi izvedbi različni laboratoriji uporabljajo različne količine in vrste hrane kot tudi različne izotope. Zato se rezultati preiskav med seboj razlikujejo in je njihova interpretacija odvisna od ustanove, ki preiskavo izvaja. Potrebno bi bilo standardizirati postopke glede količine zaužitega označenega ^{13}C substrata, količine in sestave testnega obroka, časa izvedbe testa, pogostosti jemanja vzorcev izdihanega zraka, metode zbiranja vzorcev in metode merjenja izotopskega razmerja

$^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ (laser, infrardeča in masna spektroskopija). Standardni protokoli bodo omogočali primerjavo rezultatov ^{13}C dihalnih testov med različnimi raziskovalnimi laboratoriji in omogočili lažjo interpretacijo za klinično diagnozo ali za spremljanje poteka zdravljenja.

Pri prirojenih napakah metabolizma, verjetno pa pri katerikoli bolezni, je potrebno predvidevati, da so rezervoarji in tokovi $^{13}\text{CO}_2$ bistveno spremenjeni. V takih primerih imajo izračuni majhno napovedno moč, zato je za postavitve pravilne diagnoze potrebno uporabiti invazivne metode. Za natančen izračun parametrov dihalnih testov je prav tako potreben izračun bazalnega metabolizma (BMR-angl. basal metabolic rate) in dejanski endogeno proizveden CO_2 pri preiskovancu, kar v večini primerov ni znano. Težko je vzdrževati stabilno endogeno količino proizvedenega CO_2 , še posebno pri mlajših otrocih, ki so težko pri miru ali pri novorojenčkih in majhnih otrocih, ki se bodo upirali odvzemu vzorcev izdihanega zraka. Te omejitve so vzrok, zakaj dihalni testi še niso dosegli rutinske klinične uporabe, še posebno pri diagnostiki motenj delovanja jeter ali prirojenih napakah metabolizma.

Glede na njihovo preprosto izvedbo in neinvazivnost bodo ^{13}C dihalni testi v prihodnosti postali nepogrešljivo orodje v kliničnih raziskavah in diagnostiki, predvsem pri prehranskih preiskavah, diagnostiki gastrointestinalnih bolezni in motnjah v metabolizmu. Število substratov in s tem različnih vrst testov iz leta v leto narašča.

7 REFERENCE

1. Rubin T, von Haimberger T, Helmke A, Heyne K. Quantitative determination of metabolism dynamics by a real-time $^{13}\text{CO}_2$

- breath test. *J Breath Res.* 2011; 5(2):027102. Epub 2011 Apr 19.
2. Malferheiner P. Expert report on the clinical documentation for the product Pylori 13, Medical Instruments Corporation; PartIC3
 3. Lock JF, Taheri P, Bauer S, Holzhütter HG, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Interpretation of Non-Invasive Breath Tests Using ¹³C-labeled Substrates - A Preliminary Report With superset ¹³C-Methacetin. *Eur J Med Res.* 2009; 14(12):547-50.
 4. Jackson SJ, Bluck LJ. Measurement of gastric emptying by octanoate metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8(5):538-44.
 5. Sanaka M, Yamamoto T, Kuyama Y. Retention, fixation and loss of the ¹³C label: a review for the understanding of gastric emptying breath tests. *Dig Dis Sci.* 2008; 53(7):1747-56. Epub 2008 Feb 29.
 6. Klein PD. ¹³C breath tests: visions and realities. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 1637S-1642S.
 7. Domínguez-Muñoz JE. Pancreatic exocrine insufficiency: diagnosis and treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 2:12-6.
 8. Vogt JA, Wachter U, Mehning J, Radermacher P, Georgieff M, Fischer H, Hölscher U, Moede M, Fabinski W. Adaptation of the NDIR technology to ¹³CO₂ breath tests under increased inspiratory O₂ concentrations. *J Appl Physiol.* 2009;107(1):302-7. Epub 2009 May 14.
 9. Berthold HK, Giesen TA, Gouni-Berthold I. The stable isotope ketoisocaproic acid breath test as a measure of hepatic decarboxylation capacity: a quantitative analysis in normal subjects after oral and intravenous administration. *Ioanna Gouni-Berthold*, 2009; 29 (9): 1356–1364.
 10. Fischer H, Wetzel K. The future of ¹³C breath tests. *Food Nutr Bull.* 2002;23(3 Suppl):53-6.
 11. Paschke KM, Mashir A, Dweik RA. Clinical applications of breath testing. *F1000 Med Rep.* 2010; 22:2:56.
 12. Recent Results of the Development and Application of ¹³C–Breath Tests. 1st edition 1999, Fischer ANALYSEN Instrumente GmbH (FAN), Leipzig.
http://www.fan-gmbh.de/docs/13c_recent_results.pdf
 14. Wetzel K, Fischer H, ¹³C–Breath Tests in Medical Research and Clinical Diagnosis 2005. 4th – Edition, Fischer ANALYSEN Instrumente GmbH (FAN), Leipzig.
http://www.fan-gmbh.de/docs/13c_recent_results.pdf
 15. Sanaka M, Nakada K. Stable isotope breath tests for assessing gastric emptying: A comprehensive review. *J Smooth Muscle Res.* 2010;46(6):267-80.
 16. Kasicka JA, Kamińska M, Jonderko K, Setera O, Błońska FB. Short- and medium-term reproducibility of gastric emptying of a solid meal determined by a low dose of ¹³C-octanoic acid and nondispersive isotope-selective infrared spectrometry. *World J Gastroenterol.* 2006 Feb 28;12(8):1243-8.
 17. Pezdíč J. Izotopi in geokemijski procesi. Univerzitetni učbenik, Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za geologijo. 1999, str. 11, Ljubljana
http://www.geo.ntf.uni-lj.si/jpezdic/Izotopi_1.del.pdf
 18. Gastric motility breath test. Site Manual. Version 3.0 January 15, 2008. Metabolic Solutions Inc.
http://www.stableisotopeanalysis.com/docs/GMBT_Site_Manual_Version_2008.pdf
 19. Werner RA, Brand WA. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2001;15(7):501-19.
 20. Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1957: 12(1-2), 133-149.
 21. Engel MH, Macko SA. Organic geochemistry: Principles and applications. 1993 New York, London, Plenum Press: 861 str.
 22. Slater C, Preston T, Weaver LT. Improving the specificity of the [¹³C]mixed triacylglycerol breath test by estimating carbon dioxide production from heart rate. *Eur. J. Clin Nutr*, 2006, 60(11):1245-52. Epub 2006 May 31.
 23. Ghos YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, Vantrappen G. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology*, 1993, 104(6):1640-7.
 24. Berthold HK, Giesen TA, Gouni-Berthold I. The stable isotope ketoisocaproic acid breath test as a measure of hepatic decarboxylation capacity: a quantitative analysis in normal subjects after oral and intravenous administration. *Liver Int.* 2009; 29(9):1356-64.
 25. Perri F, Pastore MR, Annese V. ¹³C-octanoic acid breath test for measuring gastric emptying of solids. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2005; 9(Suppl 1): 3-8.
 26. Brown AM. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. *Comput Methods Programs Biomed.* 2001 Jun;65(3):191-200.
 27. Siegel JA, Urbain JL, Adler LP et al. Biphasic nature of gastric emptying. *Gut* 1988; 29: 85–9.
 28. ¹³C-Gastric emptying breath tests. Wagner Analysen Technik GmbH
www.wagner-bremen.de/Seite32.pdf

