

# Zastosowanie testów oddechowych w ocenie czynności wątroby

## Application of breath tests to assess liver function

Wojciech Jańczyk<sup>1</sup>, Piotr Socha<sup>1,2</sup>, Joanna Pawłowska<sup>1</sup>, Jerzy Socha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

<sup>2</sup> Uniwersytet Rzeszowski, Instytut Pielęgniarstwa, Rzeszów

**Summary:** Conventional liver tests used as diagnostic standard in medicine often lack quantitative estimation of hepatic metabolic capacity. On the contrary to these static methods, dynamic carbon-labeled breath tests are able to assess the functional liver capacity being also safe and non-invasive. A variety of breath tests investigates different metabolic pathways (microsomal, cytosolic and mitochondrial) using many exogenous compounds metabolized in liver and then analyzing concentration of exhaled  $^{14}\text{C}$ .

Breath tests became useful in management of liver diseases (as cirrhosis, chronic hepatitis, steatosis, alcoholic liver disease, acute rejection after liver transplantation etc.) not only for diagnosis but also providing information about prognosis complementary to other conventional tests. Although breath tests' results are valuable and promising in assessing liver function, their reliability has been never proved in large clinical trials and they have never been widely introduced into medical practice.

The aim of this review was to highlight current facts concerning application of breath tests to assess liver function.

**Słowa kluczowe:** test oddechowy • czynność wątroby • metabolizm • marskość wątroby • przewlekła choroba wątroby

**Key words:** breath test • liver function • metabolism • liver cirrhosis • chronic liver disease

**Adres do korespondencji:** Wojciech Jańczyk, Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa, Polska, e-mail: w.janczyk@czd.pl

### Wprowadzenie

Diagnostyka hepatologiczna nierzadko wymaga przeprowadzenia wielu obciążających i kosztownych testów oceniających czynność wątroby. Najczęściej do tego celu służą badania laboratoryjne, obrazowe oraz mikroskopowe. W zdecydowanej większości są to jednak testy statyczne, które nie zapewniają istotnych informacji o rezerwach czynnościowych wątroby. Ogranicza to ich użyteczność na etapie diagnostyki, rokowania i monitorowania przebiegu leczenia pacjentów z chorobami wątroby.

Z uwagi na różnorodność funkcji wątroby i złożoność jej patofizjologii niemożliwym wydaje się opracowanie pojedynczego testu, który dostarczyłby pełnych, wiarygodnych danych na temat globalnej czynności tego narządu. Za wartościowe i pomocne narzędzia diagnostyczne oceniające funkcję wątroby można z pewnością uznać testy dynamiczne.

Testy dynamiczne pozwalają oszacować zdolność wątroby do metabolizowania lub eliminacji podanej substancji – tzw. masę czynnościową wątroby (hepatic functional mass). Substratem testów dynamicznych jest substancja egzogenna o znanej farmakokinetyce, podlegająca metabolizmowi w wątrobie a analizie podlega stężenie produktu przemiany w surowicy lub wydychanym powietrzu. Zasadniczym analizowanym parametrem jest klirens wątrobowy (C) będący wprost proporcjonalny do wskaźnika wątrobowej ekstrakcji (E, % substancji metabolizowanej przez wątrobę) oraz przepływu wątrobowego (Q). W zależności od wartości wskaźnika ekstrakcji testy dynamiczne dzieli się na oceniające przepływ wątrobowy (flow-limited breath test,  $E > 0,7$ ) oraz pojemność (zdolność) metaboliczną wątroby (enzyme-limited breath test,  $E < 0,3$ ). Znajomość cyklu przemian, któ-

rym podlega substrat w wątrobie pozwala wnioskować na temat aktywności zdefiniowanego szlaku metabolicznego oraz określenie krytycznego miejsca determinującego tempo procesu metabolicznego na poziomie enzymatycznym (rate-limiting step) [1].

Mimo, że pojedynczy test dynamiczny nie zapewnia informacji o globalnej funkcji wątroby, to jednak długotrwała ocena czynności metabolicznej wątroby za ich pomocą wydaje się być cenna w określeniu ciężkości schorzenia, rokowaniu oraz monitorowaniu stanu wątroby w toku leczenia [2].

Kilkudziesięcioletnie doświadczenia z wątrobowymi testami dynamicznymi obejmowały wykorzystanie jako substratów m.in. zieleni indocyjaninowej, sulfobromoftaleiny, galaktozy, sorbitolu, kofeiny, antypiryny itp. Aktualnie, grupą testów dynamicznych, która skupia szersze zainteresowanie są testy oddechowe (BT, breath tests) wykorzystujące izotopy węgla  $^{13}\text{C}$  i  $^{14}\text{C}$ .

W testach oddechowych pacjenci otrzymują doustnie (rzadziej dożylnie) substancję, w której atom węgla  $^{12}\text{C}$  zastąpiono radioaktywnym izotopem  $^{14}\text{C}$  lub stabilnym izotopem  $^{13}\text{C}$ . Przechodzi ona cykl metabolicznych przemian w wątrobie a końcowym produktem jest znakowany  $^*\text{CO}_2$ , którego stężenie oznacza się w wydychanym powietrzu zwykle przy użyciu izotopowej spektrometrii masowej ( $^{13}\text{C}$ ) [3].

Analizę wyników przeprowadza się w oparciu o kształt krzywej zmiany stężenia znakowanego  $^*\text{CO}_2$ . Na wykresie dynamikę procesu metabolizmu odzwierciedla procent dawki substratu ulegającej metabolizmowi w czasie (%  $^*\text{C}$  dose/h), natomiast parametrem opisującym czynnościowe rezerwy wątroby jest tzw. procent skumulowanej dawki (%  $^*\text{C}$  cumulated dose) [4].

Podkreślaną zaletą testów oddechowych jest ich ograniczona inwazyjność i stosunkowo niski koszt wykonania. Obecnie w praktyce klinicznej najchętniej wykorzystuje się testy z użyciem stabilnego izotopu  $^{13}\text{C}$ . Powszechne zastosowanie substratów zawierających izotop  $^{14}\text{C}$  jest ograniczone ze względu na potencjalne zagrożenia wynikające z ekspozycji na związki radioaktywne, szczególnie u kobiet w ciąży i dzieci [3].

W blisko trzydziestoletniej historii testów oddechowych podejmowano próby użycia szerokiego spektrum substratów do oceny funkcji wątroby. W zależności od charakterystyki metabolizmu zastosowanej substancji uzyskujemy informację o badanej funkcji wątroby (cytozomalnej, mikrosomalnej lub mitochondrialnej) (Tabela 1). Najwięcej danych dostarczają nam testy mikrosomalne, podczas gdy wartość testów cytozomalnych i mitochondrialnych jest jeszcze ograniczona [5].

### Testy mikrosomalne

Celem testów mikrosomalnych jest ocena funkcji enzymatycznej cytochromu P450. Aktywność tego układu jest zmniejszona przy upośledzonej czynności wątroby m.in. w przewlekłych chorobach wątroby, gdzie dochodzi do hamowania ekspresji genów cytochromu P450 przez interferony, TNF lub inne cytokiny. Testy mikrosomalne stanowią pomocne narzędzie diagnostyczne w rozpoznawaniu tych schorzeń poprzez identyfikację dysfunkcjonalnego szlaku metabolicznego a dzięki ilościowemu określeniu czynnościowej masy wątroby pozwalają na precyzyjne ustalenie rokowania.

**Tabela 1.** Podział testów oddechowych oceniających funkcję wątroby (wg A. Armuzzi i wsp. [5] w modyfikacji własnej).

Nazwa substratu	Szlak enzymatyczny	Funkcja wątroby
Aminopiryna	P450 (CYP1A, CYP2C, CYP3A)	Mikrosomalna
Kofeina	CYP1A2	
Metacetyna	CYP1A2	
Erytromycyna	CYP3A	
Fenacetyna	CYP1A2	
Diazepam	CYP2C19	
Fenylalanina	Hydroksylaza fenyloalaniny	Cytozolowa
Galaktoza	Galaktokinaza	
Kwas ketoizokapronowy	Dehydrogenaza $\alpha$ -ketokwasu	Mitochondrialna
Metionina	Cykl Krebsa	
Kwas oktanowy	$\beta$ -oksydacja kw. tłuszczowych	

Ze względu na czynnik ograniczający tempo metabolizmu substratów wyróżnia się dwa rodzaje testów mikrosomalnych. Pierwszą grupę stanowią testy oparte na substratach o metabolicznie zależnym niemal wyłącznie od aktywności układu cytochromów P450 i niezależnym od przepływu krwi przez wątrobę (aminopiryna, kofeina, diazepam). W drugiej grupie znajdują się substancje o wysokim wskaźniku ekstrakcji wątrobowej, których metabolizm jest zależny od wątrobowej perfuzji (metacetyna, fenacetyna, erytromycyna).

### Aminopiryna

Test z aminopiryną (ABT) został zastosowany jako pierwszy test oddechowy w diagnostyce chorób wątroby [6] i nadal jest jednym z najczęściej używanych testów do oceny mikrosomalnej aktywności cytochromu P450.

Dimetylaminoantypiryna znakowana  $^*\text{C}$  ulega dwustopniowej N-demetylacji w wątrobie za pośrednictwem systemu mikrosomów związanych z układem monoksygenazy P450. Efektem tych przemian jest aminoantypiryna i formaldehyd, który w wyniku dalszych przemian zostaje ostatecznie utleniony do  $^*\text{CO}_2$ . Proces N-demetylacji aminopiryny, występujący prawie wyłącznie w wątrobie, jest reakcją ograniczającą tempo metabolizmu aminopiryny (rate-limiting step). Na tej podstawie uznaje się, że ABT pozwala na globalną ocenę aktywności kompleksu P450-monoksygenazy.

Dotychczas przeprowadzono wiele badań z zastosowaniem ABT w diagnostyce chorób wątroby. ABT okazał się wiarygodną metodą m.in. w rozpoznawaniu i w ocenie rokowania marskości wątroby. Heppner [6] wykazał zależność między niskimi wynikami ABT i złym wczesnym rokowaniem u badanych pacjentów. W wykrywaniu marskości wątroby na tle zakażenia HCV test z aminopiryną odznaczał się stosunkowo wysoką czułością (73,4–82,8%) oraz specyficznością (63,2–68,4%), podobną do wskaźników laboratoryjnych i duplex Doppler, natomiast nie pozwolił na różnicowanie stopnia włóknienia [7]. Inni badacze wskazują ponadto na pozytywną korelację ABT z klasyfikacją Child-Pugh'a na różnych etapach progresji marskości wątroby a nierzadko tak-



że z wynikami badań konwencjonalnych [8,9]. Degree wykonywał ABT dużej grupie pacjentów (137) z marskością wątroby oczekujących na przeszczep. Późniejsze obserwacje i analiza danych wykazały, że ABT był tak samo dobrym lub nawet lepszym parametrem w prognozowaniu przeżycia pacjentów po przeszczepie wątroby niż skala MELD i Child-Pugh'a [10]. Do podobnych konkluzji prowadzą badania Merkela, które sugerują, że w połączeniu z klinicznymi i biochemicznymi danymi punktacji Child-Pugh'a ABT może pełnić rolę czulego predyktora przeżycia w niewydolności wątroby [11,12].

Znacząco obniżone wyniki ABT uzyskano u pacjentów z przewlekłym aktywnym zapaleniem wątroby w porównaniu do osób z przewlekłym przetrwałym zapaleniem wątroby i zdrowych [13]. W kolejnych badaniach u osób z przewlekłym HBV lub HCV wartości ABT dobrze odzwierciedlały nasilenie zapalenia oraz włóknienia wątroby w badaniu histopatologicznym, jak również były zgodne z punktacją Child-Pugh'a [14,15].

ABT wykorzystano także w diagnostyce alkoholowej choroby wątroby oraz monitorowaniu abstynencji alkoholowej. Test był podobnie czułą metodą jak standardowe badania funkcji wątroby w identyfikacji alkoholowej marskości i w przewidywaniu krótkotrwałego przeżycia pacjentów z alkoholową marskością wątroby. Dodatkowo ABT najlepiej obrazował różnice funkcji wątroby w czasie pomiędzy grupą abstynentów i spożywających alkohol, podczas gdy pozostałe testy statyczne i skala Child-Pugh'a tego nie wykazały [16].

ABT znalazł również zastosowanie w kwalifikacji do zabiegu przetok (shuntów) portokawalnych u osób z marskością wątroby. Horsmans porównywał wyniki ABT tych pacjentów przed i po zabiegu. Wartości przedoperacyjne były znacząco wyższe u przeżywających co najmniej 1 rok, dlatego też autorzy zaproponowali ABT jako dodatkowy test przedoperacyjny umożliwiający lepszą selekcję pacjentów do zabiegu przetok portokawalnych [17].

Wartość prognostyczną ABT wykazano w wykrywaniu wczesnych powikłań po ortotopowym przeszczepieniu wątroby. W jednym z badań [18], we wczesnym okresie potransplantacyjnym czynność wątroby monitorowano za pomocą ABT. Wartości testu progresywnie wzrastały do 7–10 dni, natomiast obserwowano ich spadek w przypadku upośledzenia funkcji przeszczepu. Rezultaty innego badania sugerują, że skuteczność ABT w przewidywaniu ostrego odrzucania w nieodległym okresie po przeszczepieniu wątroby była porównywalna z badaniami konwencjonalnymi [19].

W zatruciu acetaminofenem ABT poprawnie różnicował ciężkość i ewolucję uszkodzenia wątroby [20].

Ze stosowaniem aminopiryny wiąże się potencjalne ryzyko agranulocytozy do 1:10000 przypadków [21]. Dotyczy to jednak wyłącznie osób przyjmujących przewlekle wysokie dawki leku, natomiast nigdy nie obserwowano takich powikłań przy dawkach stosowanych w testach oddechowych.

Trudności w ocenie ABT i podobnych testów mikrosomalnych może powodować wiele czynników endo- i egzogennych, które indukują lub hamują aktywność cytochromu P450. Spadek aktywności wątrobowej N-demetylasy następuje wraz z wiekiem [7]. Najwięcej niejasności stwarzają jed-

nakże interakcje lekowe. Do środków wywołujących wzrost demetylacji zalicza się m.in. fenobarbital, glikokortykosteroidy, spironolakton, difenylhydantoinę a spadek – cymetydynę, cytotatyki, interferon, disulfiram itp.

Należy podkreślić, że choć powyższe dane przemawiają za użytecznością ABT w diagnostyce hepatologicznej to dotychczas nie przeprowadzono większych badań klinicznych analizujących jego skuteczność i test ten nie został nigdy w pełni włączony w standardy postępowania klinicznego.

## Kofeina

Kofeina podana w postaci doustnego preparatu doskonale wchłania się z przewodu pokarmowego a w wątrobie ulega N-demetylacji poprzez system oksydaz stanowiący część kompleksu cytochromu 450 1A2. Związek ten, podobnie jak aminopiryna, posiada niski wskaźnik ekstrakcji ( $E < 0,3$ ), zatem stopień jego eliminacji w głównej mierze zależy od zdolności metabolicznej wątroby (czynnościowej masy wątroby). Kofeina jest metabolizowana niemal wyłącznie przez wątrobę a pośrednimi produktami przemian są paraksantyna, teobromina lub teofilina.

Renner zastosował test oddechowy z kofeiną (CBT) w grupie pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. Funkcja metaboliczna wątroby określana za pomocą CBT była znacznie upośledzona w porównaniu ze zdrowymi osobnikami. CBT dobrze różnicował stadium zaawansowania choroby, jakkolwiek prognostycznej wartości wyników nie odniesiono do testów konwencjonalnych [22].

Park udowodnił, że CBT jest dobrym wskaźnikiem klirensu kofeiny w surowicy oraz, że wyniki testu dobrze korelują ze stopniem dysfunkcji wątroby, poziomem albumin, płytek krwi, wskaźnikiem protrombinowym w surowicy i nieznacznie z poziomem aminotransferaz. Ponadto CBT umożliwił prognozowanie marskości wątroby u pacjentów bez odchyżeń w badaniach laboratoryjnych oraz udało się ustalić korelację między rezultatem CBT a skalą Child-Pugh'a [23]. Ostatnie badanie tego samego autora sugeruje, że test pozwala na różnicowanie stopnia włóknienia wątroby u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B. Dodatkowo CBT okazał się czułym wskaźnikiem poprawy funkcji wątroby w trakcie leczenia lamiwudyną [24].

W odróżnieniu od ABT, CBT jest testem całkowicie bezpiecznym, pozbawionym działań niepożądanych a dodatkowo tani i łatwo dostępnym. Poleca się wykorzystywanie go w populacji dziecięcej. Wiek i płeć badanych nie mają wpływu na metabolizm kofeiny. Palenie tytoniu jest jednym z nielicznych egzogennych czynników powodujących wzrost N-demetylacji kofeiny poprzez indukcję cytochromu 1A.

CBT może być uzupełniającym testem w diagnostyce chorób wątroby, szczególnie ze względu na bardzo dobre cechy farmakokinetyczne kofeiny jako substratu do testów oddechowych, ale wymaga to potwierdzenia w większych, zaplanowanych badaniach klinicznych.

## Metacetyna

Metacetyna (N-4-metoksyfenylacetamid) będąca pochodną fenacetyny ulega O-demetylacji przy udziale wątrobowego systemu oksydaz cytochromu P450 1A2 do acetaminofenu

i CO<sub>2</sub>. Jako związek o dużej ekstrakcji wątrobowej (E>0,8), metacetyna jest objęta w znacznym stopniu efektem pierwszego przejścia przez wątrobę. Posiada bardzo szybki metabolizm wątrobowy przy równoczesnym braku toksyczności.

Zaproponowany jako bezpieczna alternatywa wobec ABT, test oddechowy z metacetyną (MBT) wykorzystuje przede wszystkim znakowany stabilny izotop <sup>13</sup>C. Aktualnie jest jednym z szerzej rozpowszechnionych testów mikrosomalnych w diagnostyce chorób wątroby.

W badaniach Klatta i wsp. [25] oceniono, że MBT można traktować jako bardzo dobry marker marskości wątroby – test wykrywa ją z czułością 93,5% oraz specyficznością 95%. Dodatkowo wyniki MBT istotnie korelowały z klasyfikacją Child-Pugh'a, lepiej niż w teście z monoetylglicylosylidem oraz zielenią indocyaninową. Podobny ścisły związek między MBT a marskością wątroby i klasyfikacją Child-Pugh'a obserwował m.in. Pffafenbach, który do pomiarów <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> użył niedispersyjnej selektywnej spektrometrii podczerwonej [26]. Potwierdzenie poprzednich spostrzeżeń zawierają ostatnie badania, którym poddano pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby, marskością A-C w punktacji Child-Pugh'a oraz zdrowych. <sup>13</sup>C-MBT poprawnie różnicował między wszystkimi badanymi grupami [27].

Przydatność <sup>13</sup>C-MBT udowodniono także w diagnostyce przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby. Matsumoto przeprowadził MBT u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby oraz marskością wątroby (w różnych stadiach zaawansowania). Wykazano obniżenie wyników MBT u osób z przewlekłym aktywnym zapaleniem wątroby oraz marskością wątroby odpowiadające ciężkości choroby (potwierdzonej w badaniu histopatologicznym) wobec zdrowej grupy kontrolnej oraz w porównaniu z pacjentami z przewlekłym przetrwałym zapaleniem wątroby. W badaniu nie stwierdzono wpływu przetok wątrobowych oraz palenia tytoniu na metabolizm metacetyny [28].

W innym badaniu [29], Festi wykonał MBT dużej grupie (140) pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C oraz pacjentom z marskością wątroby. Wyniki testu oddechowego odpowiadały wykładnikom laboratoryjnym funkcji wątroby i różniły się statystycznie pomiędzy obu badanymi grupami. Natomiast jedynie u pacjentów z marskością MBT różnicował ciężkość choroby i pozostawał w korelacji ze skalą Child-Pugh'a. Test oddechowy z fenylalaniną przeprowadzony na tej samej grupie miał mniejszą wartość diagnostyczną niż MBT.

Podobnie Braden nie dowiódł użyteczności MBT do różnicowania w początkowych stadiach włóknienia wątroby u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C bez marskości. MBT umożliwiło jedynie selekcję pacjentów we wczesnej fazie marskości wątroby (Child A) [30].

Obiecujących danych dostarcza zastosowanie MBT w diagnostyce niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD). <sup>13</sup>C-MBT dobrze odzwierciedla stopień nasilenia stłuszczenia, jak również może pełnić funkcję prognostyczną dla potencjalnego rozwoju zapalenia (NASH) i marskości wątroby [31,32]. Portincasa i wsp. objęli <sup>13</sup>C-MBT grupę 39 pacjentów z histopatologicznie potwierdzonym stłuszczeniem wątroby o różnej ciężkości (od prostego stłuszczenia do NASH z cechami włóknienia). Test umożliwił rozróżnienie pacjentów

względem 0–1, 2–4 stopnia zaawansowania NASH i zdrowej grupy kontrolnej. Tym samym pacjentom wykonano również mitochondrialny test oddechowy z kwasem ketoizokapronowym, który był nieznacznie czulszym markerem stłuszczenia (54% vs 64%). Przy zastosowaniu obu uzupełniających się testów uzyskano czułość 87% [33].

MBT zastosowano również do monitorowania funkcji wątroby u 38 pacjentów z marskością przygotowywanych do ortotopowej transplantacji narządu oraz w pierwszych tygodniach po przeszczepie. Test dobrze odzwierciedlał poprawę funkcji wątroby w okresie pozabiegowym [34].

Opierając się na przytoczonych badaniach MBT okazuje się wiarygodnym, nieinwazyjnym i bezpiecznym testem do oceny funkcji wątroby. Z pewnością może zostać uznany jako test komplementarny względem badań statycznych w rozpoznawaniu i monitorowaniu przebiegu przewlekłych chorób wątroby. Wyjaśnienia wymaga jedynie określenie potencjalnego wpływu zmienionego przepływu krwi przez wątrobę na farmakokinetkę metacetyny.

## Erytromycyna

Erytromycyna jest metabolizowana w wątrobie poprzez kompleks cytochromu P450 3A (N-demetylacja), który jest jednym z podstawowych układów mikrosomalnych wątroby. Grupa cytochromów 3A (CYP 3A) uczestniczy w metabolizmie wielu toksyn i leków m.in. immunosupresyjnych, glikokortykosteroidów, antyhistaminowych, makrolidów, cytostatyków etc. Aktywność katalityczna CYP 3A różni się natomiast zasadniczo (do 20 razy) u poszczególnych osobników w populacji [35].

Test oddechowy z erytromycyną (ERMBT) nie znalazł większego zastosowania w diagnostyce chorób wątroby. W analizie ERMBT u pacjentów kwalifikowanych do przeszczepienia wątroby obserwowano korelację między wynikami testu a poziomem CYP 3A, ale nie odzwierciedlały one zaawansowania choroby ani rezultatów badań statycznych [36].

ERMBT jest natomiast podstawowym narzędziem diagnostycznym w nieinwazyjnej, ilościowej ocenie aktywności wątrobowego CYP 3A *in vivo* i w tej dziedzinie uznaje się go za złoty standard [37]. Celem unikięcia jelitowego metabolizmu CYP 3A, erytromycyna zawierająca znakowany izotop <sup>14</sup>C jest podawana pacjentom dożylnie. Wzrost wyników ERMBT obserwuje się po zastosowaniu deksametazonu i rifampicyny (środki indukujące CYP 3A) natomiast spadek – po triacetyloleandomycynie (inhibitor CYP 3A) [38].

Jak wspomniano, do związków podlegających metabolizmowi poprzez CYP 3A w wątrobie należą leki immunosupresyjne m.in. cyklosporyna A i takrolimus (FK 506). W serii badań wykazano, że ERMBT pozwala na właściwe prognozowanie stężenia tych leków w surowicy oraz, że jest przydatną metodą w ustalaniu lub modyfikacji ich dawek. W teście oddechowym z erytromycyną wykonanym pacjentom 1 rok po przeszczepieniu wątroby poziomy cyklosporyny oraz FK 506 pozostawały w ścisłym związku ze stosunkiem dawek tych leków do wyników ERMBT [38,39].

Czynnikami ograniczającymi rozpowszechnienie ERMBT na większą skalę są dożylna droga podaży substratu, stosowanie radioaktywnego <sup>14</sup>C oraz problemy interpretacyjne wynikające z dużej osobniczej zmienności aktywności CYP 3A.





## Fenacetyna

Fenacetyna ulega O-deetylacji przy udziale oksydaz cytochromu P450 1A2 do acetaldehydu lub etanolu. W wyniku dalszej oksydacji powstaje dwutlenek węgla. Podobnie jak metacetyna i erytromycyna fenacetyna jest substancją o wysokim wskaźniku ekstrakcji wątrobowej ( $E > 0.8$ ) podlegającą efektowi pierwszego przejścia przez wątrobę.

Doniesienia dotyczące zastosowania testu z fenacetyną (PBT) w chorobach wątroby są bardzo ograniczone, często kontrowersyjne. W porównaniu PBT i ABT u pacjentów z patologią wątroby nie uzyskano wiarygodnej zbieżności wyników [40]. Wykazano, że O-deetylacja nie jest etapem ograniczającym tempo metabolizmu fenacetyny (rate-limiting step). Interpretację PBT utrudnia dodatkowo niewyjaśniony fakt wpływu palenia tytoniu i diety na wyniki testu. W związku z powyższym stosowanie PBT w praktyce klinicznej wydaje się aktualnie nieuzasadnione.

## Diazepam

Diazepam podlega N-demetylacji w wątrobie za pośrednictwem układu oksydaz cytochromu P450 2C19, jest substancją o niskim wskaźniku ekstrakcji wątrobowej ( $E < 0,3$ ).

Test oddechowy z diazepamem (DBT) nie znalazł dotychczas zastosowania w diagnostyce chorób wątroby. Podyktowane jest to dużym genetycznym polimorfizmem cytochromu P450 2C19 i osobniczą zmiennością aktywności tego układu enzymatycznego [1].

W przeprowadzonych do tej pory, nielicznych badaniach udało się wskazać na korelację między wynikami DBT a czasem półtrwania diazepamem w surowicy. Wykazano podwyższone wyniki DBT u pacjentów przyjmujących leki przeciwdrgawkowe, zmniejszone u osób z chorobami wątroby i dróg żółciowych [41].

## Testy cytozolowe

Cytoplazmatyczne testy oddechowe nieinwazyjnie oceniają czynnościową masę wątroby poprzez pomiar aktywności enzymów zlokalizowanych w cytoplazmie komórek wątrobowych. Podkreślaną zaletą tych testów, w przeciwieństwie do testów mikrosomalnych, jest ich niezależność od enzymatycznych wpływów wywieranych przez interakcje lekowe. Jako substraty wykorzystuje się aminokwasy aromatyczne (fenyloalaninę lub tyrozynę) lub galaktozę, dla których wątroba jest głównym miejscem metabolizmu.

## Fenyloalanina

Głównym szlakiem przemian fenyloalaniny w wątrobie jest hydroksylacja do tyrozyny poprzez enzym - hydroksylazę fenyloalaninową stanowiącą zarazem etap ograniczający tempo jej metabolizmu. Z kolei reakcją limitującą tempo przemian tyrozyny jest transaminacja do kwasu *p*-hydroksyfenylopirogonowego. Test oddechowy z fenyloalaniną (PheBT) może zatem być traktowany jako wykładnik wątrobowej hydroksylacji fenyloalaniny a test z tyrozyną (TyrBT) – transaminacji tyrozyny.

Metabolizm fenyloalaniny i tyrozyny jest zmniejszony w przewlekłych chorobach wątroby. Stwierdza się wówczas zwiększe-

nie ich stężenia w surowicy przy jednoczesnych patologicznych wynikach Phe/Tyr-BT. W kilku badaniach stwierdzono, że u pacjentów z marskością lub ostrym/przewlekłym zapaleniem wątroby uzyskiwane rezultaty PheBT dobrze korelują z laboratoryjnymi testami wątrobowymi oraz z punktacją Child-Pugh'a [42–44]. Z kolei obserwacje Barouque wskazują, że PheBT oraz MBT mają bardzo dobrą czułość w rozpoznawaniu przewlekłego zapalenia wątroby i marskości wątroby, ale słabą specyficzność i nie są też w stanie ocenić stopnia włóknienia narządu. W bezpośrednim porównaniu obu testów, PheBT wykazuje się nieznacznie gorszą skutecznością diagnostyczną związaną prawdopodobnie z wolniejszym tempem metabolizmu fenyloalaniny [27].

Interesujących spostrzeżeń dokonał Ishii, który zastosował PheBT u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem typu C aby określić zaburzenia czynności wątroby związane z nasilającym się procesem włóknienia. Stwierdzono korelację między wynikami PheBT a stopniem włóknienia wątroby w skali METAVIR [45].

Kobayashi z powodzeniem wykorzystał PheBT do oceny czynnościowej rezerwy wątroby oraz w przewidywaniu pozabiegowych powikłań u pacjentów po częściowej hepatektomii [46].

Przed laty Lehmann przedstawił interesującą propozycję użycia  $^{13}\text{C}$ -PheBT jako testu do selekcji pacjentów z fenyloketonurią bez cech uszkodzenia wątroby [47].  $^{13}\text{C}$ -PheBT identyfikuje zarówno heterozygoty jak i homozygoty tego defektu metabolicznego względem osób zdrowych ze skutecznością porównywalną do powszechnie uznanej metody oceniającej stosunek stężeń fenyloalaniny do tyrozyny w surowicy.

## Galaktoza

Galaktoza jest związkiem wysokim wskaźniku ekstrakcji ( $E > 0,8$ ) metabolizowanym w wątrobie a punktem ograniczającym tempo jej metabolizmu jest enzym – kinaza galaktozy uczestnicząca w procesie fosforylacji galaktozy, zlokalizowana w cytoplazmie hepatocytów.

Test oddechowy z galaktozą zastąpił używany w przeszłości test zdolności eliminacyjnej galaktozy (GEC), który był traktowany jako użyteczna, ilościowa metoda oceny funkcji wątroby. GBT posiada zalety poprzedniego testu przy ograniczonej inwazyjności dzięki zastosowaniu doustnego substratu ze stabilnym izotopem  $^{13}\text{C}$ .

W wielu dotychczasowych badaniach potwierdzono przydatność  $^{13}\text{C}$ -GBT w identyfikowaniu marskości wątroby oraz różnicowaniu między punktacją A, B, C skali Child-Pugh'a [48]. Pozwala to traktować GBT jako kolejny, wiarygodny test prognostyczny przeżycia pacjentów z marskością wątroby.

Holtmeier przeprowadził GBT oraz MBT u 19 pacjentów we wczesnym stadium pierwotnej żółciowej marskości wątroby bez zmian histopatologicznych. Celem badania było określenie czułości obu testów w wykrywaniu upośledzonej funkcji wątroby. Zarówno MBT jak i GBT wykazały się porównywalną, bardzo dobrą czułością (MBT 84,2%, GBT 95%) oraz specyficznością (po 95%). Rezultat GBT korelował ponadto z nasileniem zmian w badaniu histopatologicznym [49].

W innym badaniu GBT okazała się równie czułą metodą jak ABT w rozpoznawaniu marskości wątroby wśród grupy pacjen-

tów z przewlekłymi chorobami wątroby, podczas gdy najlepsze wyniki uzyskano przy wykorzystaniu obu testów [50].

Wartościowych danych na temat zastosowania GBT dostarczyły badania Miona [51], który wykonał  $^{13}\text{C}$ -GBT u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Uzyskano obniżone wyniki, które były ponadto istotnie związane ze stopniem zwłóknienia wątroby określonym w skali METAVIR. GBT można zatem uważać za interesującą metodą prognostyczną w monitorowaniu pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C.

Berry zaproponował wykorzystanie GBT jako metody identyfikacji pacjentów z galaktozemią [52]. Wyniki jego badań przekonują, że na podstawie GBT można odróżnić genotypy urydylotransferazy galaktozo-1-fosforanowej (UDPG), której defekt jest istotą galaktozemii. Ilościowa ocena skali zaburzeń metabolizmu galaktozy w powiązaniu z analizą mutacji UDPG może być użyteczna w prognozowaniu manifestacji objawów klinicznych.

Wyjaśnienia wymaga wpływ spożywania alkoholu oraz zaburzeń gospodarki węglowodanowej na analizę wyników GBT. Jednak pomimo obiecującej skuteczności m.in. w diagnostyce przewlekłych patologii wątroby i wszystkich zalet testu cytozomalnego, GBT nie zdobył popularności prawdopodobnie również ze względu na wysoki koszt substratu.

### Testy mitochondrialne

Większość chorób wątroby powoduje dysfunkcję mitochondrialnych układów enzymatycznych, zatem ilościowe określenie czynności mitochondrialnej wątroby wydaje się mieć podstawowe znaczenie w dalszej analizie ich patofizjologii. Oprócz tego mitochondria narażone są na toksyczny wpływ ksenobiotyków i leków.

W przewlekłych chorobach wątroby dochodzi do zmian strukturalnych oraz czynnościowych mitochondriów. Następstwem dysfunkcji łańcucha oddechowego oraz zaburzeń syntezy ATP jest upośledzenie metabolizmu oksydacyjnego oraz zachwianie równowagi energetycznej w wątrobie.

W celu ilościowej oceny czynności mitochondriów stosuje się nieinwazyjne testy oddechowe z substancjami znakowanymi  $^{13}\text{C}$  metabolizowanymi w wątrobie. Zalicza się do nich kwas ketoizokapronowy, metioninę oraz kwas oktanowy.

### Kwas ketoizokapronowy

Kwas ketoizokapronowy (KICA) ulega oksydacyjnej dekarboksylacji przez złożony kompleks dehydrogenazy  $\alpha$ -ketokwasu występujący wyłącznie w wątrobowych mitochondriach. Alternatywnym procesem jest transaminacja kwasu ketoizokapronowego w leucynę. Dlatego też, aby ocenić dekarboksylację KICA w teście oddechowym z kwasem ketoizokapronowym (KICA-BT) jako poboczny substrat stosuje się leucynę w dawce wystarczającej do zahamowania procesu transaminacji.

KICA-BT był wykorzystywany do oceny wpływu substancji toksycznych na czynność mitochondrialną wątroby. Wykazano między innymi zmniejszenie dekarboksylacji KICA po spożyciu alkoholu, w alkoholowej chorobie wątroby a jej wzrost u osób przyjmujących kwas acetylosalicylowy (ASA) [53].

Ostatnio Zocco i wsp. przy użyciu KICA-BT wykazali poprawę mitochondrialnej funkcji wątroby u pacjentów w ostrej fazie wirusowego zapalenia wątroby typu C poddawanym dializie albuminowej (MARS). KICA-BT stanowiło również wiarygodną metodę w monitorowaniu poprawy funkcji wątroby jak wskaźniki laboratoryjne [54].

W pojedynczym, kontrowersyjnym badaniu KICA-BT okazał się pomocny w diagnostyce stłuszczenia wątroby różniąc między stłuszczeniem alkoholowym a niealkoholowym. Jedynie pacjenci z alkoholowym stłuszczeniem wątroby demonstrowali zmniejszenie dekarboksylacji w oparciu o KICA-BT [55].

Jak wcześniej wspomniano [33], Portincasa ocenił skuteczność  $^{13}\text{C}$ -KICA-BT i  $^{13}\text{C}$ -MBT w diagnostyce niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Pacjenci z NASH wyższego stopnia (2–4) wykazywali istotne zmniejszenie dekarboksylacji KICA, które korelowało z poziomem kwasu hialuronowego – pośredniego markera włóknienia wątroby. KICA-BT pozwalał na różnicowanie stadium NASH głównie dzięki związkowi ze stopniem włóknienia. Test okazał się nieznacznie czulszy i bardziej specyficzny w identyfikacji NAFLD niż MBT, zwłaszcza w zaawansowanym stłuszczeniu wątroby.

### Metionina

Adenozylotransferaza metioniny jest mitochondrialnym enzymem wątrobowym przekształcającym metioninę w homocysteinę. Proces ten jest główną drogą metabolizmu metioniny w wątrobie.

W testach oddechowych najczęściej korzysta się z metioniny znakowanej izotopami  $^{13}/^{14}\text{C}$  przy 1,3. lub 4. atomie węgla oraz metyl- $^{14}\text{C}$ -metioniny. Pozwala to określić czynność mitochondrialną wątroby na różnych szlakach metabolicznych.

Test z metioniną (MeBT) okazał się użyteczny m.in. w ocenie wpływu leków i związków subtoksycznych na funkcję mitochondrialną wątroby.

Milazzo i wsp. [56] za pomocą MeBT badali potencjalny efekt upośledzenia czynności mitochondrialnej wątroby podczas leczenia inhibitorami odwrotnej transkryptazy nukleozydu (NRTI) u pacjentów z HIV. Otrzymujący terapię antyretrowirusową a w szczególności ci z hiperlaktatemią uzyskali patologiczne wyniki testu przy braku odchyłań w grupie kontrolnej. W podobnym badaniu u pacjentów z HIV w wyniku terapii antyretrowirusowej doszło do pogorszenia funkcji mitochondriów ocenianym na podstawie MeBT i stężenia mitochondrialnego DNA [57].

MeBT wykorzystano również w diagnostyce niealkoholowego wielokropłowego stłuszczenia wątroby i marskości o różnej etiologii. Wyniki były obniżone w obu grupach pacjentów, natomiast w drugiej dodatkowo korelowały z wynikami testu z aminopiryną oraz skalą Child-Pugh'a. W ostrym małopłowym stłuszczeniu wywołanym kwasem walproinowym parametry MeBT poprawiały się wraz z ustąpieniem cech niewydolności wątroby, co potwierdziło jego wartość w dynamicznej ocenie dysfunkcji mitochondrialnej [58].

Ostatnio podjęto próbę prognozowania żywotności przeszczepu wątroby we wczesnym okresie potransplantacyjnym na podstawie ABT i MeBT. U wszystkich pacjentów obserwo-



wano poprawę czynności mikrosomalnej i mitochondrialnej wątroby w czasie. Przy pierwotnym zaburzeniu funkcji przeszczepu wyniki obu testów pozostały patologicznie niskie. Badanie to sugeruje użyteczność ABT i MeBT w ocenie rokowania we wczesnej fazie potransplantacyjnej [59].

Jednak w związku z niewielką liczbą przeprowadzonych doświadczeń z użyciem MeBT nie można jednoznacznie ocenić wartości diagnostycznej tego testu.

### Kwas oktanowy

Kwas oktanowy bardzo dobrze wchłania się ze światła przewodu pokarmowego a w mitochondriach wątroby ulega  $\beta$ -oksydacji do acetylo-CoA a następnie do CO<sub>2</sub>.

Dotychczas test oddechowy z kwasem oktanowym (OBT) potwierdził swoją użyteczność w gastroenterologii przy ocenie opróżniania żołądka z pokarmów o stałej konsystencji [60]. Zainteresowanie tym substratem zaowocowało kilkoma badaniami, które mogą przemawiać za jego przydatnością w analizie procesu mitochondrialnej  $\beta$ -oksydacji.

Między innymi Miele [61] ocenił  $\beta$ -oksydację u pacjentów z NASH stwierdzając istotnie podwyższone wyniki OBT w porównaniu z grupą kontrolną. Nie znalazło to natomiast potwierdzenia w badaniu ostatnio wykonanym przez Schneidera, który nie wykazał różnic między obiema grupami [62].

### Podsumowanie

Testy oddechowe wprowadzono do diagnostyki hepatologicznej przeszło 30 lat temu. Dzięki dynamicznej, ilościowej ocenie czynności wątroby pozwalają one m.in. na różnicowanie chorób wątroby, monitorowanie ich przebiegu, ustalenie rokowania i porównywanie skuteczności leczenia *in vivo*. Takich informacji nie dostarczają konwencjonalne testy statyczne, które z reguły określają jedynie stopień uszkodzenia wątroby. Założenia i metodyka testów oddechowych są czytelne, opierają się na patofizjologii wątroby i farmakokinetyce metabolizowanych przez nią substratów. Ocena funkcji wątroby za pomocą testów oddechowych jest nieinwazyjna i bezpieczna. Doustna droga podażi preparatów i pomiar stężenia znakowanego <sup>13</sup>C z użyciem spektrometru masowego nie narażają pacjentów na powikłania związane z iniekcjami, koniecznością seryjnych pobrań krwi lub dawką promieniowania. Zastosowanie związków zawierających stabilny izotop <sup>13</sup>C eliminuje potencjalne ryzyko ekspozycji na działanie radioaktywne i stwarza szerokie możliwości wprowadzenia do diagnostyki również w pediatrii.

Dzięki różnorodnemu biochemicznemu profilowi substratów, aktualnie testy oddechowe mogą kompleksowo oceniać funkcję wątroby na poziomie mikrosomalnym, mitochondrialnym jak i cytozolowym (Tabela 1). Niniejszy przegląd piśmiennictwa ukazuje przydatność testów oddechowych w diagnostyce przewlekłych chorób wątroby (Tabela 2).

Duża grupa badań wykazała skuteczność testów oddechowych w rozpoznawaniu, różnicowaniu ciężkości oraz rokowaniu marskości wątroby. W tym zakresie wyniki nierzadko ściśle korelują z testami statycznymi i są istotnym uzupełnieniem klasyfikacji Child-Pugh'a. Testy oddechowe okazały się ciałym predyktorem funkcjonowania przeszczepu wątroby

**Tabela 2.** Ważniejsze zastosowania <sup>13</sup>C testów oddechowych w rozpoznawaniu i monitorowaniu chorób wątroby.

Zastosowanie diagnostyczne	Test oddechowy
Marskość wątroby	ABT, MBT, PheBT, GBT, KICA-BT
Przewlekłe zapalenie	ABT, MBT, PheBT, GBT
Włóknienie	PheBT, GBT, KICA-BT
Stłuszczenie	MBT, KICA-BT, MeBT
Wczesne powikłania po przeszczepieniu wątroby	ABT, MBT, MeBT
Efekty toksyczne ksenobiotyków	ERMBT, KICA-BT, MeBT

we wczesnym okresie potransplantacyjnym, dostarczały istotnych danych rokowniczych, pozwalały ustalić właściwą dawkę i prognozować stężenie leków immunosupresyjnych. Były pomocne przy kwalifikowaniu pacjentów do zabiegu wytworzenia przetok wątrobowych, w rozpoznawaniu oraz ocenie stopnia zapalenia i włóknienia w przewlekłych zapaleniach wątroby. Znalazły także zastosowanie w rozpoznawaniu stłuszczenia wątroby, monitorowaniu przebiegu alkoholowej choroby wątroby, ustaleniu skali uszkodzenia wątroby w zatruciu acetaminofenem oraz w ocenie toksyczności substancji egzogennych lub leków na wątrobę. Używano ich do diagnostyki galaktozemii oraz fenyloketonurii. Ostatnio duże nadzieje wiąże się m.in. z wykorzystywaniem kwasu oktanowego do oceny  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. Podkreślenia wymaga fakt, że czułość i specyficzność testów oddechowych w wielu z wymienionych badań okazała się porównywalna lub lepsza niż badań konwencjonalnych a zastosowanie równoległe kilku testów oceniających różne szlaki metaboliczne poprawiało jeszcze te wyniki.

Należy również pamiętać, iż aktywność metaboliczna wielu substancji jest programowana genetycznie i dlatego testy oparte na wydolności metabolicznej wątroby są odzwierciedleniem nie tylko stopnia wydolności narządu ale osobniczej aktywności odpowiednich enzymów. Stąd tak często podkreślana przydatność testów oddechowych do oceny postępu choroby wątroby w powtarzanych badaniach u pojedynczego pacjenta.

Mimo przedstawionych i udokumentowanych korzyści wynikających z zastosowania testów oddechowych nie zdobyły one jednak jak dotychczas szerszego uznania i popularności w praktyce klinicznej. Wydaje się, że wpływ na to może mieć brak zaplanowanych prospektywnych badań potwierdzających ich skuteczność diagnostyczną na większej populacji. Nie bez znaczenia są trudności interpretacyjne powodowane niewyjaśnionym w pełni wpływem czynników egzogennych np. palenia tytoniu, diety, interakcji lekowych oraz ograniczony dostęp do specjalistycznej aparatury. Mimo zastosowania wielu substancji oceniających różne szlaki metaboliczne w wątrobie nie udało się dotychczas znaleźć idealnego substratu odpowiadającego założeniom farmakokinetycznym i klinicznym. Dlatego wymagana jest kontynuacja badań nad nowymi sposobami zastosowania testów oddechowych i ich udoskonaleniem.

Tym niemniej należy podkreślić, że aktualny stan wiedzy upoważnia do traktowania testów oddechowych jako co najmniej wartościowe uzupełnienie konwencjonalnych testów oceniających funkcję wątroby.



1. Brockmoller J, Roots I: Assessment of liver metabolic function. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 1994; 27(3): 216–48
2. Bircher J: Quantitative assessment of deranged hepatic function: a missed opportunity? *Semin Liver Dis*, 1983; 3(4): 275–84
3. Schoeller DA, Schneider JF, Solomons NW i wsp: Clinical diagnosis with the stable isotope <sup>13</sup>C in CO<sub>2</sub> breath tests: methodology and fundamental considerations. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 1977; 90(3): 412–21
4. Schoeller DA, Baker AL, Monroe PS i wsp: Comparison of different methods expressing results of the aminopyrine breath test. *Hepatology*, 1982; 2(4): 455–62
5. Armuzzi A, Candelli M, Zocco A i wsp: Breath testing for human liver function: review article. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002; 16: 1977–96
6. Hepner GW, Vesell ES: Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of (<sup>14</sup>C)aminopyrine. *Ann Intern Med*, 1975; 83(5): 632–38
7. Schneider AR, Teuber G, Paul K i wsp: Patient age is a strong independent predictor of <sup>13</sup>C-aminopyrine breath test results: a comparative study with histology, duplex-Doppler and a laboratory index in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2006; 33(4): 300–4
8. Herold C, Heinz R, Radespiel-Tröger M i wsp: Quantitative testing of liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C to assess disease severity. *Liver*, 2001; 21(1): 26–30
9. Beuers U, Jager F, Wahllander A i wsp: Prognostic value of the intravenous <sup>14</sup>C-aminopyrine breath test compared to the Child-Pugh score and serum bile acids in 84 cirrhotic patients. *Digestion*, 1991; 50(3–4): 212–18
10. Degre D, Bourgeois N, Boon N i wsp: Aminopyrine breath test compared to the MELD and Child-Pugh scores for predicting mortality among cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplant International*, 2004; 17(1): 31–38
11. Merkel C, Bolognesi M, Bellon S i wsp: Aminopyrine breath test in the prognostic evaluation of patients with cirrhosis. *Gut*, 1992; 33(6): 836–42
12. Merkel C, Morabito A, Sacerdoti D i wsp: Updating prognosis of cirrhosis by Cox's regression model using Child-Pugh score and aminopyrine breath test as time-dependent covariates. *Italian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 1998; 30(3): 276–82
13. Monroe PS, Baker AL, Schneider J i wsp: The aminopyrine breath test and serum bile acids reflect histologic severity in chronic hepatitis. *Hepatology*, 1982; (3): 317–22
14. Herold C, Heinz R, Niedobitek G i wsp: Quantitative testing of liver function in relation to fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. *Liver*, 2001; 21(4): 260–65
15. Giannini E, Fasoli A, Chiarbonello B i wsp: <sup>13</sup>C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002; 16(4): 717–25
16. Lotterer E, Hogel J, Gaus W i wsp: Quantitative liver function tests as surrogate markers for end-points in controlled clinical trials: a retrospective feasibility study. *Hepatology*, 1997; 26(6): 1426–33
17. Horsmans Y, Lejeune D, Geubel AP i wsp: Hepatic [<sup>14</sup>C]aminopyrine demethylation capacity after portocaval shunting. Comparative study in patients with and without arterialization of portal vein. *Digestive Diseases & Sciences*, 1993; 38(12): 2177–82
18. Mion F, Rousseau M, Queneau PE red: Reprise precoce de fonction du greffon après transplantation hepatique: interpretation du test respiratoire a l'aminopyrine <sup>13</sup>C. W: Goldstein S, Louvet P. *Les Isotopes Stables: Applications-Productions*. Lyon, CEA Editions, 1993; 239–46
19. Heidecke CD, Martin WG, Muller DF i wsp: Acute liver allograft rejection and liver function: quantitative evaluation using the [<sup>14</sup>C]aminopyrine breath test. *Transplant Proc*, 1993; 25(4): 2640–41
20. Saunders JB, Wright N, Lewis KO: Predicting outcome of paracetamol poisoning by use <sup>14</sup>C-aminopyrine breath test. *BMJ*, 1980; 280(6210): 279–80
21. Boersma JW: Prevention of agranulocytosis during treatment with pyrazolone derivatives, especially with aminophenazone (Pyramidon). *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1973; 117(10): 376–83
22. Renner E, Wietholz H, Huguenin P i wsp: Caffeine: a model compound for measuring liver function. *Hepatology*, 1984; 4(1): 38–46
23. Park GJ, Katelaris PH, Jones DB i wsp: Validity of the <sup>13</sup>C-caffeine breath test as a noninvasive, quantitative test of liver function. *Hepatology*, 2003; 38(5): 1227–36
24. Park GJ, Katelaris PH, Jones DB i wsp: The C-caffeine breath test distinguishes significant fibrosis in chronic hepatitis B and reflects response to lamivudine therapy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 22(5): 395–403
25. Klatt S, Taut C, Mayer D i wsp: Evaluation of the <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative liver function testing. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 1997; 35(8): 609–14
26. Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski C i wsp: The <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative noninvasive liver function analysis with an isotope-specific nondispersive infrared spectrometer in liver cirrhosis. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1998; 123(49): 1467–71
27. Lara Baraque S, Razquin M, Jimenez I i wsp: <sup>13</sup>C-phenylalanine and <sup>13</sup>C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Digestive & Liver Disease*, 2000; 32(3): 226–32
28. Matsumoto K, Suehiro M i wsp: [<sup>13</sup>C]methacetin breath test for evaluation of liver damage. *Digestive Diseases & Sciences*, 1987; 32(4): 344–48
29. Festi D, Capodicasa S, Sandri L i wsp: Measurement of hepatic functional mass by means of <sup>13</sup>C-methacetin and <sup>13</sup>C-phenylalanine breath tests in chronic liver disease: comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. *World J Gastroenterol*, 2005; 11(1): 142–48
30. Braden B, Faust D, Sarrazin U i wsp: C. <sup>13</sup>C-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21(2): 179–85
31. Wagner G: <sup>13</sup>C-Methacetin breath test to assess hepatic function and disease severity in NASH-ASH liver disease. *Wagner Analysen Technik GmbH, Bremen/Germany. Company Publication*
- 32) Miele L, Grieco A, Armuzzi A i wsp: <sup>13</sup>C-Methacetin breath test in patients with nonalcoholic steatohepatitis after hypocaloric diet therapy. Abstract of the 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18–22, 2001, Prague, Czech Republic, 2001; 198, index 599
33. Portincasa P, Grattagliano I, Lauterburg BH i wsp: Liver breath tests non-invasively predict higher stages of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Sci*, 2006; 111(2): 135–43
34. Petrolati A, Festi D, De Berardinis G i wsp: <sup>13</sup>C-methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 18(8): 785–90
35. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M i wsp: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1994; 270(1): 414–23
36. Lown K, Kolars J, Turgeon K et al: The erythromycin breath test selectively measures P450IIIa in patients with severe liver disease. *Clin Pharmacol Ther*, 1992; 51(3): 229–38
37. Chiou WL, Jeong HY, Wu TC, Ma C: Use of the erythromycin breath test for *in vivo* assessments of cytochrome P4503A activity and dosage individualization. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70(4): 305–10
38. Watkins PB, Hamilton TA, Annesley T i wsp: The erythromycin breath test as a predictor of cyclosporine blood levels. *Clin Pharmacol Ther*, 1990; 48(2): 120–29
39. Cakaloglu Y, Tredger JM, Devlin J, Williams R: Importance of cytochrome P-450IIIa activity in determining dosage and blood levels of FK 506 and cyclosporine in liver transplant recipients. *Hepatology*, 1994; 20(2): 309–16
40. Schoeller DA, Kotake AN, Lambert GH i wsp: Comparison of the phenacetin and aminopyrine breath tests: effect of liver disease, inducers and cobaltous chloride. *Hepatology*, 1985; 5(2): 276–81
41. Hepner GW, Vesell ES, Lipton A i wsp: Disposition of aminopyrine, antipyrine, diazepam, and indocyanine green in patients with liver disease or on anticonvulsant drug therapy: diazepam breath test and correlations in drug elimination. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 1977; 90(3): 440–56
42. Burke PA, Stack JA, Wagner D i wsp: L-[1-<sup>13</sup>C] Phenylalanine oxidation as a measure of hepatocyte functional capacity in end-stage liver disease. *American Journal of Surgery*, 1997; 173(4): 270–74





43. Ishii Y, Suzuki S, Kohno T i wsp: Patients with severe liver cirrhosis followed up by L-[1-(13C)] phenylalanine breath test. *J Gastroenterol*, 2003; 38(11): 1086–90
44. Koeda N, Iwai M, Kato A, Suzuki K: Validity of 13C-phenylalanine breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in patients with liver cirrhosis and acute hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21(7): 851–59
45. Ishii Y, Suzuki S, Kohno T i wsp: L-[1-13C] phenylalanine breath test reflects histological changes in the liver. *J Surg Res*, 2003; 114(2): 120–25
46. Kobayashi T, Imamura H, Takayama T, Makuuchi M: The role of preoperative phenylalanine breath test in hepatectomy. *Hepato-Gastroenterology*, 2003; 50(52): 1124–27
47. Lehmann WD, Fischer R, Heinrich HC i wsp: Metabolic conversion of L-[U-14C]phenylalanine to respiratory 14CO<sub>2</sub> in healthy subjects, phenylketonuria heterozygotes and classic phenylketonurics. *Clinica Chimica Acta*, 1986; 157(3): 253–66
48. Saadeh S, Behrens PW, Parsi MA i wsp: The utility of the 13C-galactose breath test as a measure of liver function. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 18(10): 995–1002
49. Holtmeier J, Leuschner M, Schneider A i wsp: 13C-methacetin and 13C-galactose breath tests can assess restricted liver function even in early stages of primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*, 2006; 41(11): 1336–41
50. Giannini EG, Fasoli A, Borro P i wsp: 13C-galactose breath test and 13C-aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005; 3(3): 279–85
51. Mion F, Rousseau M, Scoazec JY i wsp: [13C]-Galactose breath test: correlation with liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Eur J Clin Invest*, 1999; 29(7): 624–29
52. Berry GT, Singh RH, Mazur AT i wsp: Galactose breath testing distinguishes variant and severe galactose-1-phosphate uridylyltransferase genotypes. *Pediatric Research*, 2000; 48(3): 323–28
53. Lauterburg BH, Grattagliano I, Gmur R i wsp: Noninvasive assessment of the effect of xenobiotics on mitochondrial function in human beings: studies with acetylsalicylic acid and ethanol with the use of the carbon 13-labeled ketoisocaproate breath test. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 1995; 125(3): 378–83
54. Zocco MA, Di Campli C, Gaspari R i wsp: Improvement of mitochondrial function evaluated by ketoisocaproic acid breath test in patients with HCV infection undergoing albumin dialysis. *Transplantation Proceedings*, 2005; 37(6): 2554–56
55. Mion F, Rousseau M, Brazier JL, Minaire Y: Human hepatic macrovesicular steatosis: a noninvasive study of mitochondrial ketoisocaproic acid decarboxylation. *Metabolism: Clinical & Experimental*, 1995; 44(6): 699–700
56. Milazzo L, Menzaghi B, Massetto B i wsp: 13C-methionine breath test detects drug-related hepatic mitochondrial dysfunction in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006; 41(2): 252–53
57. Banasch M, Goetze O, Hollborn I i wsp: 13C-methionine breath test detects distinct hepatic mitochondrial dysfunction in HIV-infected patients with normal serum lactate. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005; 40(2): 149–54
58. Spahr L, Negro F, Leandro G i wsp: Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit*, 2003; 9(1): CR6–11
59. Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A i wsp: Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2003; 15(7): 727–32
60. Ghoos YF, Maes BD, Geypens BJ i wsp: Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology*, 1993; 104(6): 1640–47
61. Miele L, Grieco A, Armuzzi A i wsp: Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98(10): 2335–36
62. Schneider AR, Kraut C, Lindenthal B i wsp: Total body metabolism of 13C-octanoic acid is preserved in patients with non-alcoholic steatohepatitis, but differs between women and men. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2005; 17(11): 1181–84