

Testy oddechowe w diagnostyce hepatologicznej

Breath tests in hepatology

Karolina Piwczyńska, Marek Woynarowski

Klinika Gastroenterologii Hepatologii i Immunologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa, Polska

Summary: Breath tests with ^{13}C marked compounds metabolized in the liver are modern tests for diagnosis of the liver function. The measurement of ^{13}C labeled CO_2 in the exhaled air allows to evaluate the selected metabolic tracks. There are several substances that can be used in the breath test in hepatology. They are metabolized in microsomes (aminopyrine, phenacetine, methacetine, caffeine, diazepam and erythromycine), liver cell cytoplasm (galactose, phenylalanine) or mitochondria (α -ketoisocaproic acid, methionine and octoanate acid). The paper describes the clinical experience with breath tests in hepatology. They are promising however up to now breath test did not replace the standard methods of liver function testing.

Słowa kluczowe: testy oddechowe • diagnostyka • hepatologia

Key words: breath tests • diagnostics • hepatology

Adres do korespondencji: Karolina Piwczyńska, Klinika Gastroenterologii Hepatologii i Immunologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa, Polska, e-mail. karolinaju@wp.pl

Wstęp

Testy oddechowe wykorzystujące stabilne izotopy to nowoczesne narzędzia diagnostyczne pozwalające na ocenę aktywności metabolicznej enzymów i funkcji narządów *in vivo*. Ich historia sięga 3–4 dekady wstecz, kiedy rozpoczęto badania z zastosowaniem radioaktywnego izotopu ^{14}C w celu oceny wydzielania egzokrynnej trzustki, wchłaniania jelitowego i czynności wątroby [1]. Izotop ^{14}C jest pierwiastkiem promieniotwórczym, a jego zastosowanie może być niebezpieczne, dlatego szybko zrezygnowano z jego stosowania i zastąpiono go bezpiecznym stabilnym izotopem ^{13}C . Aktualnie badania z bezpiecznym ^{13}C wyparły prawie całkowicie radioaktywny izotop ^{14}C , dzięki temu badania mogą być bez ryzyka wykonywane u dzieci, kobiet w ciąży a także mogą być wielokrotnie powtarzane u osób dorosłych. Obecnie dostępnych jest wiele izotopowych testów oddechowych. Wykorzystuje się je w diagnostyce czynności trzustki, wątroby, wykrywaniu przerostu bakteryjnego w jelicie, zaburzeń wchłaniania cukrów, określaniu szybkości opróżniania żołądka i czasu tranzytu jelitowego oraz diagnostyce zakażenia *Helicobacter pylori* [1,2].

Testy oddechowe stosowane w hepatologii polegają na podaniu substratu znakowanego izotopem węgla ^{13}C . Substrat powinien szybko wchłaniać się z przewodu pokarmowego i drogą krążenia wrotnego trafiać do wątroby. Tam metabolizowany jest z uwolnieniem $^{13}\text{CO}_2$. Następnie dwutlenek węgla zawierający izotop ^{13}C jest eliminowany z powietrzem

wydechowym. W trakcie badania w określonych interwałach czasowych pobierane są próbki powietrza wydychanego a następnie poddawane analizie za pomocą spektrometru masowego. Ocena szybkości i/lub ilości wydalania $^{13}\text{CO}_2$ pozwala na pośrednią ocenę drogi metabolicznej poddawanej badaniu [3]. Substancja znakowana powinna mieć prostą znaną farmakokinetykę i podlegać przemianom wyłącznie w wątrobie. Musi również być bezpieczna, dostępna i tania.

Ideą badań oddechowych stosowanych w hepatologii jest nieinwazyjna ocena zaawansowania zmian patologicznych i rezerwy czynnościowej narządu, a także w późniejszym etapie monitorowanie postępu choroby lub regresji zmian będących wynikiem terapii [3]. Badania oddechowe miały być alternatywą dla konwencjonalnie w tym celu używanych parametrów laboratoryjnych oraz dla badania histopatologicznego biopsji wątroby. Ponieważ żaden z powszechnie stosowanych testów laboratoryjnych nie jest rzeczywistym wskaźnikiem funkcji komórki wątrobowej a przezskórna, gruboigłowa biopsja wątroby to badanie inwazyjne obciążone ryzykiem powikłań trwałe i wciąż trwają poszukiwania testu „idealnego” oceniającego rzeczywistą rezerwę czynnościową wątroby.

Testy ^{13}C stosowane w hepatologii w zależności od drogi metabolicznej poddawanej analizie dzieli się ze względu na miejsce zachodzenia reakcji na trzy zasadnicze grupy: mikrosomalne, cytoplazmatyczne i mitochondrialne (Tabela 1).

Tabela 1. Podział testów oddechowych ze względu na miejsce reakcji z określeniem enzymów, które w niej uczestniczą.

Grupa	Substrat	Enzymy
Testy mikrosomalne	Aminopiryna	P450s (CYP1A2?, 2C9?, 3A4?)
	Fenacetyna	CYP1A2 (CYP2E1)
	Metacetyną	CYP1A2
	Kofeina	CYP1A2(CYP2E1, 3A3,2B6)
	Diazepam	CYP2C19(CYP3A)
	Erytromycyna	CYP3A (CYP3A4, A5, A7?)
Testy cytoplazmatyczne	Galaktoza	Galaktokinaza
	Fenylalanina	Hydroksylaza
Testy mitochondrialne	Kwas alfa-ketokapronowy	Kompleks dehydrogenazy α -ketokwasu
	Metionina	Cykl Krebsa
	Kwas kapronowy	Cykl Krebsa

Testy mikrosomalne

Mikrosomy to drobne pęcherzyki powstające w wyniku zamknięcia się fragmentów błon reticulum endoplazmatycznego, błony komórowej i błon cystrn układu Golgiego, biorące udział w biosyntezie białka.

Test oddechowy aminopiryną (Aminopyrine Breath Tests – ABT)

Pierwszym testem oddechowym wprowadzonym w hepatologii w latach 70. był test z ^{14}C -Aminopiryną. Obecnie izotop ^{14}C zastąpiono izotopem ^{13}C , a znakowana w ten sposób dimetylaminoantypiryna jest jednym z najczęściej wykorzystywanych substratów. Znacznik ten szybko wchłania się i w mikrosomach hepatocytu jest metabolizowany przez monooksygenazy cytochromu P450 do formaldehydu i aminopiryny. Ostatecznie formaldehyd zostaje przekształcony do zawierającego izotop ^{13}C dwutlenku węgla, eliminowanego z krążenia z powietrzem wydychanym [4].

Test ABT jest bezpieczny. Nie opisywano działań niepożądanych po jednorazowym podaniu aminopiryny, ale raportowano przypadki agranulocytozy po stosowaniu przewlekłe niewielkich dawek [5].

Test z aminopiryną był pierwszym testem oddechowym w stosunku do którego wykazano, że wyniki uzyskane u zdrowych wolontariuszy statystycznie znamienne różnią się od wyników uzyskiwanych u pacjentów z marskością wątroby [6]. W dostępnym piśmiennictwie wielokrotnie porównywano wyniki testu oddechowego z aminopiryną z powszechnie stosowanymi parametrami oceny funkcji wątroby. Opisywano dobrą korelację wyników testu z poziomem albumin w surowicy krwi [7] i czasem protrombinowym [8]. Obserwowano również znamienne statystycznie różnice między wynikami ABT u pacjentów z grupy A i C wg skali Child-Pugh [9]. Badanie oddechowe zwiększało również możliwości prognostyczne skali Child-Pugh [10]. Wyniki testu oddechowego z ^{13}C aminopiryną porównywano do badania histopatologicznego biopsji wątroby. Wielokrotnie opisywano, że ABT różnicuje osoby zdrowe, chorych z przewlekłą chorobą wątroby i nieistotnym włóknieniem od chorych z marskością

wątroby o różnej etiologii [9,11–14], ale nie jest przydatny w różnicowaniu pośrednich stadiów zaawansowania włóknienia [11]. Nie stwierdzono pogorszenia wyników testu oddechowego u pacjentów ze stłuszczeniem wątroby opisywanym w biopsji [11]. Krótkotrwałe spożywanie alkoholu w mierzonych ilościach nie wpływa na wynik ABT, natomiast wyniki ABT są znacząco gorsze u pacjentów z alkoholową marskością wątroby niż u zdrowych ochotników [15].

Wykazano, że wyniki badania ABT są również wartościowym narzędziem prognostycznym wystąpienia ciężkich powikłań u pacjentów z marskością wątroby [14]. Udowodniono, że ABT ma lepsze wartości prognostyczne niż skala MELD (Model for End-stage Liver Disease) u pacjentów oczekujących na przeszczep narządu [16,17].

Test z ^{13}C aminopiryną jest aktualnie najczęściej wykonywanym izotopowym badaniem oddechowym w hepatologii. Może on być skutecznym narzędziem w rozpoznawaniu marskości wątroby, monitorowaniu postępu choroby i prognozowaniu u pacjentów z zaawansowanym włóknieniem. Duże ograniczenie testu spowodowane jest wpływem czynników zewnętrznych takich jak płeć, wiek, leki czy palenie papierosów na metabolizm aminopiryny [13].

Test oddechowy z fenacetyną (Phenacetin Breath Test – PBT)

Fenacetyna po wchłonięciu z przewodu pokarmowego jest metabolizowana w wątrobie w mechanizmie pierwszego przejścia do acetaldehydu i etanolu. Reakcja zachodzi w mikrosomach hepatocytu. Następnie oba produkty przekształcane są do $^{13}\text{CO}_2$ wykrywanego w próbkach powietrza wydychanego [4]. Efekt pierwszego przejścia determinuje ściśle zależność metabolizmu fenacetyny od przepływu wrotnego.

Opisywano statystycznie znamienne gorsze wyniki badania u pacjentów z patologią wątroby [18], nie uwzględniono jednak możliwości istnienia krążenia omijającego wątrobę u pacjentów z marskością narządu. Porównywano wyniki badania z testem oddechowym z aminopiryną, uzyskując ich dobrą korelację u chorych z patologią wątroby, ale nie u zdrowych pacjentów [19].



Test oddechowy z fenacetyną jest słabo przebadanym i rzadko wykonywanym badaniem a dostępne piśmiennictwo jest ubogie i dotyczy głównie fenacetyny znakowanej radioaktywnym ^{14}C . Doświadczenia z PBT są niewystarczające, aby test ten mógł być stosowany w codziennej praktyce klinicznej.

Test oddechowy z metacetyną (Methacetin Breath Test – MBT)

^{13}C Metacetyna jest substancją podlegającą efektowi pierwszego przejścia przez wątrobę. Jest ona rozkładana przez zespół enzymów cytochromu P450 do acetaminofenu i $^{13}\text{CO}_2$ [4]. Biorąc pod uwagę jego prostotę nieinwazyjność i brak działań niepożądanych test oddechowy z metacetyną budzi zainteresowanie hepatologów. Jako mniej toksyczny i mniej podatny na wpływ czynników zewnętrznych MBT może zastąpić potencjalnie toksyczny test z aminopiryną [4].

Przeprowadzono wiele badań oceniających przydatność MBT w nieinwazyjnej diagnostyce włóknienia w porównaniu z powszechnie stosowanymi współczynnikami – APRI (AST to Platelet Ratio Index) i współczynnika AAR (AST to ALT Ratio). Wykazano, że wyniki MBT wykazują wyższą czułość i swoistość niż APRI i AAR [20]. Wielokrotnie próbowano ocenić skuteczność testu w różnicowaniu pacjentów zakwalifikowanych do różnych grup wg skali Child-Pugh. Autorzy zgodni byli, że MBT różnicuje pacjentów z grup B i C [21,22]. Natomiast wartość MBT w różnicowaniu pacjentów z grupy A i chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby bez marskości były sprzeczne [21,22]. Analiza krzywych ROC (area under the Receiver Operating Characteristic) wykazała dobre wartości różnicujące testu między chorymi z zaawansowanym włóknieniem i marskością a pacjentami zdrowymi, a także między dwoma wcześniej wymienionymi grupami a pacjentami z przewlekłym zapaleniem wątroby [22].

Udowodniono, że test oddechowy z metacetyną może być skutecznym narzędziem monitorującym pacjentów znajdujących się na liście oczekujących na przeszczepienie wątroby a także testem rokowniczym u pacjentów we wczesnej fazie po transplantacji [23]. Podejmowano też próby użycia MBT w prognozowaniu powrotu do zdrowia chorych z ostrą niewydolnością wątroby. Poprawę wyników MBT u pacjentów o pomyślnym przebiegu obserwowano już w 3 dobie choroby natomiast polepszenie wyników badań laboratoryjnych pojawiało się dopiero w między 7 a 9 dobą choroby [24].

Z uwagi na dobrą znajomość cyklu przemian metacetyny i jej szybki metabolizm wydaje się, że MBT może być przydatny w ocenie sprawności metabolicznej wątroby [3]. Jego ograniczeniem może być zależność od przepływu wrotnego.

Test oddechowy z kofeiną (Caffeine Breath Test – CBT)

Kofeina jest substancją pozbawioną toksyczności obecną powszechnie w pożywieniu człowieka [4]. Po całkowitym wchłonięciu z przewodu pokarmowego kofeina metabolizowana jest wyłącznie przez wątrobę, gdzie zostaje poddana demetylacji przez zespół oksydaz cytochromu P450 mikrosomów hepatocyta, z uwolnieniem CO_2 . CBT ma wiele cech opisywanego wcześniej „idealnego” testu oddechowego, mimo to piśmiennictwo dotyczące jego zastosowania klinicznego jest ubogie.

Opisywano istotną korelację wyników CBT z poziomem albumin i płytek krwi, słabą korelację z INR, bilirubiną, GGTP, a także parametrem oceniającym włóknienie – współczynnikiem AST/ALT [25,26]. CBT różnicuje pacjentów zakwalifikowanych do grup A, B i C wg skali Child-Pugh [26]. Badanie z kofeiną porównywano z wynikami histopatologicznymi bioptatu narządu. Stwierdzono, że wyniki CBT u osób zdrowych różnią się od wyników u pacjentów z marskością wątroby. Opisywano też różnice wyników CBT pomiędzy chorymi z zapaleniem wątroby a chorymi z istotnym włóknieniem. CBT nie pozwala natomiast na odróżnianie osób zdrowych od chorych z niewielkim zaawansowaniem zmian [25]. CBT może być narzędziem monitorującym terapię przeciwwirusową (Lamivudyna) u badanych z wirusowym zapaleniem wątroby typu B [25]. Wyniki badania z kofeiną korelują także z zaawansowaniem włóknienia u pacjentów ze stłuszczeniem wątroby [27].

Wydaje się, że CBT może być użytecznym dodatkowym narzędziem diagnostycznym, monitorującym przebieg choroby, a także w niektórych przypadkach potwierdzającym regresję zmian w trakcie terapii. Jednak wpływ czynników zewnętrznych na jej metabolizm wymaga dalszych badań, gdyż wiadomo, przykładowo że metabolizm kofeiny jest znamienne zwiększony u pacjentów palących papierosy [26,28].

Test oddechowy z diazepamem (Diazepam Breath Test – DBT)

Diazepam jak inne benzodiazepiny metabolizowany jest przez mikrosomalny cytochrom P450, głównie przez podtyp CYP2C19, jednak z uwagi na polimorfizm genetyczny podtypu CYP2C19 diazepam uważany jest aktualnie za nieodpowiedni substrat do testów oddechowych [4].

Test oddechowy z erytromycyną (Erythromycin Breath Test – ERMBT)

Erytromycyna po podaniu doustnym lub parenteralnym poddawana jest demetylacji przez cytochrom P4503A, głównie subpopulację CYP3A4 i CYP3A5. Typ 3A cytochromu jest najczęściej występującym i reprezentuje 25–30% wszystkich białek cytochromalnych wątroby. Cytochrom P4503A występuje również w enterocyty i obok glikoproteiny P bierze udział w metabolizmie wielu leków takich jak sterydy, leki immunosupresyjne, uspakajające i antyhistaminowe, estrogeny, makrolidy [3,4].

Ograniczeniem zastosowania ERMBT jest brak wystarczających danych dotyczących substratu znakowanego ^{13}C a większość piśmiennictwa dotyczy substratu znakowanego radioaktywnym ^{14}C [3]. Dostępne piśmiennictwo wskazuje na brak korelacji wyników ERMBT z powszechnie stosowanymi badaniami biochemicznymi czynności wątroby. Dodatkowo polimorfizm CYP3A oraz wpływ czynników zewnętrznych na metabolizm erytromycyny powodują, że ERMBT jest nieprzydatny w ocenie funkcji wątroby [29] natomiast może być interesującym narzędziem w ocenie polimorfizmu i aktywności P4503A [4].

W celu oceny frakcji wątrobowej CYP3A konieczne jest omińnięcie przewodu pokarmowego, co powoduje, że w testach tych znacznik podawany jest parenteralnie [30]. Zmienność populacyjną CYP3A wykazano wykonując ERMBT u 30 zdrowych ochotników i uzyskując sześć różnych profili wydalania

$^{14}\text{CO}_2$ niezależnych od płci, nikotynizmu i leków [31]. Opisywano wzrost wydalania dwutlenku węgla po zastosowaniu induktorów CYP3A (dexametazonu i rifampicyny), a także obniżenie wydalania po podaniu inhibitorów (oleandomycyna) [29,32]. Przy pomocy ERMBT udowodniono również, że u chorych ze znacznym zaawansowaniem zmian w wątrobie zakwalifikowanych do przeszczepienia narządu zimniejsza się ilość CYP3A [29]. W ostatnich latach podjęto próbę wykonania badania oceniającego metabolizm podanej doustnie ^{13}C erytromycyny u noworodków z zakażeniem układu moczowego. Nie uzyskano wzrostu wydzielania $^{13}\text{CO}_2$ w ciągu 24 godzin badania co świadczy o spowodowanym niedojrzałością organizmu braku aktywności CYP3A u noworodków [30].

Stwierdzono że, ERMBT może być przydatny do przewidywania szybkości metabolizmu leków immunosupresyjnych u pacjentów po przeszczepieniu wątroby. Udowodniono związek między stężeniem cyklosporyny i takrolimusu a wynikami ERMBT [33,34]. Wydaje się, że ERMBT może znaleźć zastosowanie w tzw. terapii indywidualnej (personalized medicine), której istotą jest próba oceny aktywności enzymów polimorficznych. Pozwoli to na wyodrębnienie osób szybko i wolno metabolizujących i dostosowanie dawki leku do potrzeb konkretnego pacjenta [35]. ERMBT może być przydatny w terapii indywidualnej jednak radioaktywność ^{14}C bardzo ogranicza jego zastosowanie.

Testy cytoplazmatyczne

Cytoplazma to obszar w komórce oddzielony od środowiska zewnętrznego błoną komórkową wypełniony płynnym złożonym koloidem wodnym.

Test oddechowy z galaktozą (Galactose Breath Test – GBT)

Galaktoza ulega fosforylacji w cytoplazmie hepatocytu poprzez galaktokinazę z uwolnieniem znakowanego CO_2 . Aktywność tego enzymu determinuje szybkość metabolizmu galaktozy. Można ją ocenić podając galaktozę parenteralnie i oceniając krzywą eliminacji galaktozy z krwi (Galactose Elimination Capacity – GEC) lub podając doustnie znakowaną ^{13}C galaktozę i oceniając krzywą wydalania znakowanego CO_2 (GBT). Ze względu na małą inwazyjność i łatwość wykonania GBT prawie całkowicie wyparł GEC [3]. Jednak nie udowodniono wyższości testu oddechowego z galaktozą nad GEC. Ocena czy droższy, ale nie inwazyjny GBT jest bardziej przydatny od inwazyjnego ale tańszego testu eliminacji galaktozy wymaga dalszych badań.

W dostępnych publikacjach nie wykazano korelacji GBT z powszechnie stosowanymi testami biochemicznymi oceniającymi czynność wątroby [36]. Potwierdzono właściwości różnicujące GBT między pacjentami zdrowymi i chorymi z marskością wątroby ocenianą na podstawie badania histopatologicznego biopsji narządu [37,38]. Opisywano, że badanie może być również przydatne w różnicowaniu pomiędzy pacjentami z grup A oraz B i C wg klasyfikacji Childa-Pough [37] oraz różnicowaniu chorych na grupy o różnym zaawansowaniu włóknienia [36]. Wyniki GBT u pacjentów z aktywnym zapaleniem wątroby typu C są znamienne statystycznie gorsze niż u zdrowych ochotników. Z pomocą testu można monitorować regresję zmian w wątrobie będącą wynikiem zastosowanej terapii antywirusowej [39].

Test oddechowy z fenyloalaniną (Phenylalanine breath tests – PHBT)

Fenyloalanina metabolizowana jest w cytoplazmie hepatocytu. Ulega początkowo hydroksylacji do tyrozyny, która następnie poprzez aminotransferazę tyrozyny przekształcana jest do produktu i CO_2 .

Wielu autorów raportuje ścisłą korelację wyników PHBT z testami laboratoryjnymi takimi jak AlAT, AspAT, czas protrombinowy, poziom albumin, bilirubiny całkowitej i sprzężonej [40–22]. Wykazano związek pomiędzy wynikiem PHBT a stężeniami kwasów żółciowych, kwasu hialuronowego i kolagenu 7S u dzieci po operacji niedrożności dróg żółciowych [42]. Wyniki PHBT są odwrotnie proporcjonalne do klasyfikacji wg Childa-Pough [40,41]. Na podstawie parametrów testu można zróżnicować osoby zdrowe i chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby zakwalifikowanych do klas B i C [21,22]. Wyniki badania nie mają wartości różnicujących pomiędzy zdrową kontrolą a pacjentami z grupy A wg skali Childa-Pough [22]. Udowodniono, że PHBT jest nie tylko dobrym testem w różnicowaniu pacjentów zdrowych od tych z marskością wątroby [40], ale również tych z pośrednim zaawansowaniem włóknienia [43]. Analiza krzywych ROC wykazała, że PHBT jest średnim badaniem różnicującym pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby i chorych z marskością narządu [22]. Podkreślano również, że badanie nie odpowiada na pytanie dotyczące etiologii marskości wątroby [44].

Test oddechowy z ^{13}C fenyloalaniną wydaje się być interesującym nieinwazyjnym i pozbawionym działań niepożądanych badaniem diagnostycznym, ale wymaga dalszych badań.

Testy mitochondrialne

Uszkodzenie funkcji mitochondrium hepatocytu prowadzi do wielu chorób np.: zespołu Reye'a, stłuszczenia wątroby ciężarnych, choroby alkoholowej wątroby oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Dysfunkcja mitochondriów odpowiedzialna jest również za objawy ostrej patologii wątroby w przebiegu intoksykacji szeroko rozumianymi ksenobiotykami. Substancje endogenne (leki, alkohol) metabolizowane są w głównej mierze właśnie poprzez mitochondria [45]. Prosty i nieinwazyjny test mogący ocenić działanie tych organelli hepatocytu, mógłby być pomocny w doborze odpowiedniej terapii.

Test oddechowy z kwasem α -ketoizokapronowym (α -Ketoiso Caproic Acid Breath Test – KICABT)

Rozkład kwasu α -ketoizokaproнового zachodzi poprzez dwa szlaki metaboliczne: dekarboksylacji pod wpływem dehydrogenazy α -ketokwasu i konwersji poprzez aminotransferazę leucyny do kwasu aminoleucynowego. Kompleks dehydrogenazy α -ketokwasu znajduje się również poza wątrobą np. w mięśniach szkieletowych, ale zwykle podlega fosforylacji i jest nieaktywny, co powoduje, że nie ma wpływu na wyniki testu [3]. W celu zablokowania alternatywnej drogi rozkładu kwasu α -ketoizokaproнового aminotransferaza blokowana jest jednoczasową podażą leucyny [46].

Dotychczas KICABT oceniano głównie w stłuszczeniach wątroby (NAFLD-non-alcoholic fatty liver disease, NASH-non-alcoholic steatohepatitis). Opiszano, że KICABT może być



przydatny w różnicowaniu przyczyny stłuszczenia. Wyniki testu są znamienne obniżone jedynie u pacjentów z chorobą alkoholową mimo zmian histopatologicznych o podobnym nasileniu [47]. Porównywano również, wyniki testu u pacjentów z marskością wątroby o etiologii alkoholowej i innej. W obu grupach metabolizm KICA był zwolniony w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami, przy czym wyniki u pacjentów z marskością alkoholową były gorsze niż u pacjentów z marskością o innej etiologii. Raportowano, że abstynencja powoduje poprawę wyników KICABT [48]. Wyniki badania z kwasem α -ketoizokapronowym są odwrotnie proporcjonalne do włóknienia wątroby ocenianego w biopsji. Interesujące wydają się również doniesienia, że otyłość nie powoduje pogorszenia rezultatów badania, natomiast pacjenci z prostym stłuszczeniem i otyłością mają znamienne gorsze wyniki badań niż chorzy ze stłuszczeniem bez nadwagi [49].

Badano również wpływ jednorazowego podania alkoholu i leków na metabolizm kwasu α -ketoizokapronowego. Stwierdzono, że etanol odwracalnie hamuje natomiast kwas alfasalicylowy przyspiesza rozkład KICA. Konieczna jest dalsza ocena wpływu ksenobiotyków w dawkach toksycznych na wyniki KICABT w celu rozszerzenia spektrum zastosowania testu w pacjentów z ostrą patologią wątroby.

Test oddechowy metioniną (Methionine Breath Test – MTHBT)

Metionina to aminokwas metabolizowany całkowicie w wątrobie. Do testów oddechowych stosowane są dwa rodzaje substratu Metyl- ^{13}C metionina i L-metionina- $1-^{13}\text{COOH}$. Metabolizm metyl- ^{13}C -metioniny zależy od dekarboksylazy kwasu butanowego, który uważany jest za enzym ograniczający powstawanie $^{13}\text{CO}_2$ a co za tym idzie determinuje funkcje mitochondrium. Z tego powodu w większości dostępnych prac wykorzystywana jest właśnie ta forma metioniny.

Piśmiennictwo dotyczące testu oddechowego z metioniną jest stosunkowo ubogie i dotyczy głównie zagadnienia szeroko rozumianej intoksykacji. Opisano znaczne pogorszenie wyników MTHBT u pacjentów po spożyciu niewielkich ilości alkoholu w porównaniu do wyników uzyskanych wyjściowo u tych samych zdrowych ochotników [50–52]. Badano również zależności rezultatów testu u zakażonych HIV bez farmakoterapii i leczonych preparatami antywirusowymi, uzyskując znamienne lepsze wyniki testu u chorych bez terapii, porównywalne z tymi u zdrowych ochotników [53]. Także wyniki MTHBT były znamienne obniżone u pacjentów po spożyciu toksycznych dawek kwasu walproinowego i ulegały normalizacji w okresie zdrowienia [54].

Opisywano upośledzenie metabolizmu metyl- ^{13}C -metioniny zarówno u pacjentów z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby jak i marskością wątroby o różnej etiologii. Wyniki badań były znamienne gorsze u pacjentów z zaawansowanym włóknieniem potwierdzonym w biopsji wątroby [55]. Najnowsze opracowania donoszą o przydatności testu we wczesnym prognozowaniu po przeszczepieniu wątroby. U pacjentów o pomysłnym przebiegu normalizacja wyników następowała w 5. dobie po zabiegu, u chorych z pierwotnym brakiem podjęcia funkcji narządu rezultaty testu nie poprawiały się [56].

Wydaje się, że test z metioniną może być narzędziem diagnostycznym i prognostycznym ale wymaga to dalszych badań na większych grupach pacjentów.

Test oddechowy kwasem kaprylowym (Octanoate Acid Breath Test – OBT)

Kwas kaprylowy to średnio łańcuchowy kwas tłuszczowy, który całkowicie i szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i jest metabolizowany wyłącznie w wątrobie. Przemiany kwasu kaprylowego zachodzą w mitochondriach hepatocytów. Kwas kaprylowy ulega β -oksydacji do koenzymu A, który wchodzi w cykl Krebsa dając końcowy produkt w postaci CO_2 [45].

Kwas kaprylowy jest najnowszym substratem izotopowych testów oddechowych, dlatego jego możliwości diagnostyczne nie są w pełni poznane. Badano korelację testu z powszechnie stosowanymi wykładnikami biochemicznymi uszkodzenia wątroby. Nie stwierdzono zależności rezultatów badania od poziomu albumin, czasu protrombinowego ani bilirubiny. Nie znaleziono również korelacji pomiędzy wynikiem OBT a skalą Child-Pough. Wyniki testu u chorych z marskością wątroby nie różniły się od rezultatów uzyskanych u zdrowych ochotników [57]. W dostępnych pracach opisano brak znamienych różnic w wynikach testu u pacjentów z różnym zaawansowaniem prostego stłuszczenia wątroby (NASH) [58]. Z tych powodów mimo zachęcającej farmakokinetyki kwasu kaprylowego dotychczasowe badania nie dają podstaw do zastosowania OBT w praktyce klinicznej.

Podsumowanie

Przegląd piśmiennictwa pokazuje, że dostępnych jest wiele substancji znakowanych ^{13}C , których metabolizm prowadzi do uwolnienia znakowanego CO_2 , co daje potencjalne możliwości zastosowania ich w teście oddechowym. Testy oddechowe mają niewątpliwie wiele zalet. Są nieinwazyjne i pozbawione działań niepożądanych. Nieskomplikowana procedura może być bezpiecznie powtarzana, również u chorych w stanie ciężkim, nieprzytomnych i z zaawansowaną patologią wątroby. Badanie to jest także dopuszczalne do stosowania u dzieci i kobiet w ciąży [45]. Istotnym atutem testów oddechowych jest możliwość pobrania próbek wydychanego powietrza poza ośrodkiem i przesłania ich w celu dalszej analizy. Mimo tych wszystkich zalet testy oddechowe nie weszły do praktyki klinicznej i nadal są wykonywane głównie w celach naukowych. Spowodowane jest to wysokimi kosztami aparatury niezbędnej do odczytu, oraz stosunkowo drogimi odczynnikami do badań.

Ograniczeniem dla wprowadzenia testów oddechowych do praktyki jest też niejednoznaczna interpretacja wyników, oraz ich podatność na czynniki oddziałujące na szybkość badanej reakcji i na czas od podania znacznika do jej rozpoczęcia. Po podaniu substratu jego przemiany zależą od szybkości opróżniania żołądka, wchłaniania z przewodu pokarmowego, przepływu krwi przez wątrobę. Na metabolizm wpływ mogą mieć alternatywne drogi eliminacji, również te występujące poza wątrobą [45]. W wielu badaniach oddechowych należy brać pod uwagę wiek, płeć, polimorfizm populacyjny czy obecność innych substancji egzogennych.

Prostota testu oddechowego w porównaniu do biopsji wątroby, która jest nadal „złotym standardem” w ocenie zaawansowania zmian histopatologicznych sprawia, że powstaje wiele badań próbujących ustalić obiektywną czułość i swoistość tej metody diagnostycznej. Wydaje się jednak, że dotychczasowa wiedza nadal nie pozwala wprowadzić badań oddechowych do rutynowej pracy klinicznej.

1. Braden A, Lembcke B, Kukera W: ^{13}C -breath tests: Current state of the art and future directions. *Digestive and Liver Disease*, 2007; 39: 795–805
2. Mion F: Place des tests respiratoires au carbone 13 en Exploration Fonctionnelle. *Digestive Acta Endoscopica*, 2000; 30: 3
3. Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA: Review article: breath testing for human liver function assessment. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002; 16: 1977–96
4. Nista EC, Fini L, Armuzzi M: ^{13}C -breath tests in the study of microsomal liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2004; 8: 33–46
5. Schneider JF, Schoeller DA, Nenchausky B: Validation of ^{13}C breath analysis as measurement of demethylation of stable isotope labeled aminopyrine in man. *Clin Chim Acta*, 1978; 84: 153–62
6. Hepner GW, Vesell ES: Assessment of aminopyrine metabolism in man by breath analysis after oral administration of ^{14}C -aminopyrine. Effects of phenobarbital, disulfiram and portal cirrhosis. *N Engl J Med*, 1974; 291: 1384–88
7. Hepner GW, Vesell ES: Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of ^{14}C aminopyrine. *Ann Intern Med*, 1975; 83: 632–38
8. Carlise R, Galambos JT, Warren D: The Relationship Between Conventional Liver Tests, Quantitative Function Tests, and Histopathology in Cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 1979; 24: 5
9. Herold C, Heinz R, Raderspiel-Troger M: Quantitative testing of liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C to assess disease severity. *Liver*, 2001; 21: 26–30
10. Irving CS, Schoeller DA, Nakamura KI: The aminopyrine breath test as a measure of liver function. A quantitative description of its metabolic basis in normal subjects. *J Lab Clin Med*, 1982; 100(3): 356–73
11. Schneider A, Teuber G, Paul K: Patients age is a strong independent predictor of 13 aminopyrine breath test results: a comparative study with histology, Duplex-Doppler and laboratory index in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006; 33: 300–4
12. Giannini EG, Fasoli A, Borro P: ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005; 3(3): 279–85
13. Herold C, Ganslmayer M, Ocker M: Inducibility of microsomal liver function may differentiate cirrhotic patients with maintained compared with severely compromised liver reserve. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003; 18: 445–49
14. Forestier J, Dumortier J, Guillaud O: Noninvasive diagnosis and prognosis of liver cirrhosis: a comparison of biological scores, elastometry, and metabolic liver function tests. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2010; 22(5): 532–4015. Saunders JB, Wright N, Lewis KO: Predicting outcome of paracetamol poisoning by using ^{14}C aminopyrine breath test. *Br Med J*, 1980; 1: 279–80
16. Ecocherd M, Boillot M, Guillaud O: Could metabolic liver function tests predict mortality on waiting list for liver transplantation? A study on 560 patients. *Clin Transplant*, 2010; 16: 1399–406
17. Degre D, Bourgeois N, Boon N: Aminopyrine breath test compared to the MELD and Child-Pugh scores for predicting mortality among cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transpl Int*, 2004; 17(1): 31–38
18. Breen KJ, Bury RW, Calder IV: A ^{14}C phenacetin breath test to measure hepatic function in man. *Hepatology*, 1984; 4: 47–52
19. Schoeller DA, Kotake AN, Lambert GH: Comparison of the phenacetin and aminopyrine breath test: effect of liver disease, inducers and cobaltus chloride. *Hepatology*, 1985; 5: 276–81
20. Branden B, Faust D, Sarrazin U: ^{13}C -methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21: 1791–85
21. Baruque SL, Razquin M, Jimenez I: ^{13}C -Phenylalanine and ^{13}C -methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig Liv Dis*, 2000; 32: 226–32
22. Festi D, Capodicasa S, Sandri L: Measurement of hepatic mass by means of ^{13}C -methacetin and ^{13}C -phenylalanine breath tests in chronic liver disease: comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. *World J Gastroenterol*, 2005; 11: 1421–48
23. Petrolati A, Festi D, De Berardinis G: ^{13}C -methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 15: 18(8): 785–90
24. Lalazar G, Adar T, Ilan Y: Piont – of-care continuous ^{13}C -methacetin breath test improved decision making in acute liver disease: Results of a pilot clinical trial. *World J Gastroenterol*, 2009; 15(8): 966–72
25. Park GJH, Katelaris PH, Jones DB: The ^{13}C -caffeine breath test distinguishes significant fibrosis in chronic hepatitis B and reflects response to lamivudine therapy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 22: 395–403
26. Park GJH, Katelaris PH, Jones DB: Validity of the ^{13}C -Caffeine Breath Test as a Noninvasive, Quantitative Test of Liver Function. *Hepatology*, 2003; 38: 1227–36
27. Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Orit Pappo O: The ^{13}C -Caffeine Breath Test Detects Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 2008; 42: 408–12
28. Caubet MS, Laplante A, Caille J: [^{13}C]Aminopyrine and [^{13}C]caffeine breath test: influence of gender, cigarette smoking and oral contraceptives intake. *Isotopes Environ. Health Stud*, 2002; 38(2): 71–77
29. Lown K, Kolars JC, Turgeon K, Merion RM: The erythromycin breath test selectively measures P450IIIa in patients with severe liver disease. *Clin Pharmacol Ther*, 1992; 51: 229–38
30. De Wildt SN, Berns MJP, Van den Anker JN: ^{13}C -Erythromycin Breath Test as a Noninvasive Measure of CYP3A Activity in Newborn Infants: A Pilot Study. *Ther Drug Monit*, 2007; 29: 225–30
31. Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG: Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest*, 1989; 83(2): 688–97
32. Schwartz JB: Erythromycin breath test results in elderly, very elderly, and frail elderly persons. *Clin Pharmacol Ther*, 2006; 79(5): 440–48
33. Watkins PB: Erythromycin Breath Test and Clinical Transplantation Therapeutic Drug Monitoring, 1996; 18(4): 368–71
34. 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: 309–16
35. Modak A: Diagnostic breath tests in personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008; 8(5): 563–64
36. Mion F, Rousseau M, Scaozec JY: [^{13}C]Galactose breath test: correlation with liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Eur J Clin Invest*, 1999; 29: 624–29
37. Saadeh S, Behrens PW, Parsi MA: The utility of the ^{13}C -galactose breath test as a measure of liver function. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 18: 995–1002
38. Giannini EG, Fasoli A, Borro P: ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005; 3(3): 279–85
39. Mion F, Rousseau M, Paliard P: ^{13}C galactose breath test: early indicator of liver fibrosis in hepatitis C infection. *Gut*, 1998; 43(3): S25–27
40. Koeda N, Iwai M, Kato A: Validity of ^{13}C -phenylalanine breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in patients with liver cirrhosis and acute hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21: 851–59
41. Zhang G, Bao Z, Zou J: Clinical research on liver reserve function by ^{13}C -phenylalanine breath test in aged patients with chronic liver diseases. *Geriatrics*, 2010; 10: 23
42. Wada M, Wada Y, Uchiyama M: ^{13}C -phenylalanine breath test correlates with liver fibrosis in postoperative biliary atresia. *Pediatrics International*, 2007; 49: 836–41
43. Ishii Y, Suzuki S, Kohno T: L-[1- ^{13}C] phenylalanine breath test reflects histological changes in the liver. *J Surg Res*, 2003; 114(2): 120–25
44. Moran S, Gallardo-Wong I, Rodriguez-Leal G: L-[1- ^{13}C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes. Environ Health Stud*, 2009; 45(3): 192–97
45. Portincasa P, Gratagliano I, Bonfrate L: Clinical Investigation of liver mitochondrial function: a role for ^{13}C -stable isotope breath tests? *Clujul Medical*, 2010; 83: 2
46. Candelli M, Cazzato IA, Zocco MA: ^{13}C -Breath Tests in the study of mitochondrial liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2004; 8: 23–31
47. Mion F, Rousseau M, Brazier JL: Human Hepatic Macrovesicular Steatosis: A Noninvasive Study of Mitochondrial Ketoisocaproic Acid Decarboxylation. *Metabolism*, 1995; 44(6): 699–700
48. Lauterburg BH, Liang D, Schwarzenbach FA: Mitochondrial dysfunction in alcoholic patients as assessed by breath analysis. *Hepatology*, 1993; 17: 418–22



49. Parra D, González A, Martínez JA: *In vivo* assessment of the mitochondrial response to caloric restriction in obese women by the 2-keto[1-¹³C]isocaproate breath test. *Metabolism*, 2003; 52(4): 463–67
50. Candelli M, Miele L, Armuzzi A: ¹³C-methionine breath tests for mitochondrial liver function assessment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2008; 12: 245–49
51. Armuzzi A: Non-Invasive Assessment of Human Hepatic Mitochondrial Function through the ¹³C-Methionine Breath Test. *Scand J Gastroenterol*, 2000; 35(6): 650–53
52. Wutzke KD, Forberger A, Wigger M: Effect of alcohol consumption on the liver detoxication capacity as measured by [¹³C]methacetin- and [methyl-¹³C]methionine-breath tests. *Isotopes Environ Health Stud*, 2008; 44(2): 219–26
53. Milazzo L, Piza M, Sangaletti O: [¹³C]Methionine breath test: a novel method to detect antiretroviral drug-related mitochondrial toxicity. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 55: 84–89
54. Spahr L, Negro OF, Rubia-Brandt L: Acute valproate-associated microvesicular steatosis: could the [¹³C]methionine breath test be useful to assess liver mitochondrial function? *Dig Dis Sci*, 2001; 46: 2758–61
55. Spahr L, Negro F, Leandre G: 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
56. Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A: Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hep*, 2003; 15: 7
57. Van de Casteele M, Luybaerts A, Gey pens B: Oxidative breakdown of octanoic acid is maintained in patients with cirrhosis despite advanced disease. *Neurogastroenterol Motil*, 2003; 15: 113–20
58. Schneider ARJ, Kraut C, Lindenthal B: Total body metabolism of ¹³C-octanoic acid is preserved in patients with non-alcoholic steatohepatitis, but differs between women and men. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005; 17(11): 1181–84