

Sviluppo di un metodo in elettroforesi capillare per la determinazione del lattulosio e del mannitolo nelle urine e sue applicazioni allo studio della permeabilità intestinale in diabetici di tipo 1

Rita Paroni¹, Isabella Fermo², Laura Molteni³, Laura Folini³, Matteo Rocco Pastore³, Andrea Mosca⁴, Emanuele Bosi³

¹Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università di Milano, Ospedale San Paolo, Milano

²Unità di Tecniche Separative, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

³Unità di Medicina Generale, Diabetologia e Endocrinologia, Istituto Scientifico San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

⁴Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Milano, Milano

ABSTRACT

Development of a capillary electrophoresis method for urinary lactulose and mannitol determination to assess the intestinal permeability in patients with type 1 diabetes. The assessment of the unbalanced intestinal permeability to lactulose (LAC) and mannitol (MAN) after oral administration is used for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Aim of this study was to set up a method by capillary electrophoresis to detect the concentration of MAN and LAC in urine to estimate the intestinal permeability in controls and in patients affected by type I diabetes mellitus. In <10 min the underivatized carbohydrates were separated at pH of 12.5 and with indirect UV detection at 254 nm. In controls (n=41) 11.3 (median; interquartile range: 5.7-15.3) and 303 (237-440) mg of LAC and MAN were excreted during the 5 h urine collection after the carbohydrate administration, while in diabetes patients (n=24) 16.5 (12.8-24.3) and 229 (170-354) mg of LAC and MAN were found. This simple and rapid technique is suitable to study intestinal permeability alterations in different cohorts of patients.

INTRODUZIONE

Il test al lattulosio-mannitolo (LAC-MAN) è un test diagnostico sensibile e non-invasivo utilizzato per la valutazione di una serie di malattie caratterizzate da alterazioni della integrità della mucosa intestinale (1,2). Il test è basato sulla somministrazione orale di due carboidrati a diverso peso molecolare (in genere un mono- e un disaccaride), che non devono subire idrolisi o essere trasportati attivamente a livello della mucosa intestinale, e sulla valutazione del loro rapporto di escrezione urinaria. I carboidrati e/o i polialcoli a basso peso molecolare come il MAN (~5-7 Å) attraversano la mucosa attraverso i pori acquosi sulla membrana cellulare utilizzando quindi per l'assorbimento una via "transcellulare". I disaccaridi come il LAC (~10-12 Å) utilizzano invece una via "paracellulare" attraverso le "tight junctions" tra enterociti adiacenti (1,3). Quindi, una alterata permeabilità intestinale con uno sbilanciamento del rapporto di escrezione urinaria tra di- e monosaccaridi (o polialcoli) può essere indice di danno alla mucosa, con aumento del passaggio di molecole ad alto peso molecolare (zuccheri o antigeni) attraverso la via paracellulare, o di una riduzione generalizzata dell'area della mucosa integra con diminuzione del passaggio delle piccole molecole.

La valutazione dell'assorbimento differenziale del LAC e del MAN permette di ottenere buone indicazioni per la diagnosi e la cura di patologie caratterizzate da

alterata permeabilità intestinale quali celiachia, morbo di Crohn, dermatite atopica, intolleranza al latte, fibrosi cistica, diarrea, HIV, diabete (3-8).

Numerosi dati sperimentali sia sul ratto (9) che sull'uomo (7,8) indicano la presenza di anomalie intestinali associate al diabete di tipo I, ad eziologia autoimmune. In particolare, nell'uomo, in concomitanza di diarrea, crescita batterica, malassorbimento e maldigestione, sono stati riscontrati una aumentata permeabilità, attivazione immunitaria e cambiamenti ultrastrutturali dell'epitelio intestinale.

Attualmente, per la quantificazione degli zuccheri nelle urine sono disponibili diverse tecniche analitiche quali procedure colorimetriche/enzimatiche, cromatografia su strato sottile, HPLC con rivelazione a indice di rifrazione, amperometrico o del tipo "evaporative light scattering", gas cromatografia o gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, elettroforesi capillare (CE) (10-15). Alcune di queste metodiche sono lunghe e poco specifiche, mentre altre prevedono un passaggio di derivatizzazione prima dell'analisi o l'utilizzo di rivelatori particolari non sempre disponibili nei laboratori diagnostici. La CE si pone come la tecnica ideale per l'analisi di composti a natura idrofila come i mono- e i disaccaridi (16). Tuttavia, nonostante l'alta efficienza di separazione, i brevi tempi di analisi, le ridotte quantità di campione e i bassi consumi di reagenti e solventi, questa tecnica analitica non è stata mai applicata specificatamente allo stu-

dio della permeabilità intestinale nell'ambito di protocolli clinici.

Scopo di questo studio era sviluppare un metodo semplice, rapido e poco costoso per determinare la concentrazione di LAC e MAN nelle urine mediante CE accoppiata ad un rivelatore spettrofotometrico, evitando passaggi di derivatizzazione del campione. La metodica era quindi applicata allo studio di un gruppo di pazienti affetti da diabete di tipo 1 e i risultati ottenuti comparati con quelli ottenuti su un gruppo di riferimento costituito da soggetti sani.

MATERIALI E METODI

Casistica

Erano studiati due gruppi di soggetti. Come popolazione di controllo erano valutati soggetti apparentemente sani, privi di familiarità per il diabete di tipo 1 e negativi agli autoanticorpi specifici per questa patologia (n=41, età media 24 anni, intervallo 9-54). Erano inoltre valutati pazienti con diabete di tipo 1 di lunga durata (>4 anni) con una durata media di malattia di 19 anni (n=36, età media 41 anni, intervallo 22-66).

Test di permeabilità intestinale

Il test consisteva nella somministrazione di 5 g di LAC e 2 g di MAN in 50 mL di acqua al paziente a digiuno, dopo il prelievo della urina basale. Nelle seguenti 5 h si procedeva alla raccolta delle urine utilizzando sodio azide come conservante. Dopo le prime 2 h di digiuno, al paziente era consentita la assunzione di cibo e di liquidi, per favorire la escrezione urinaria. Il volume totale delle urine delle 5 h era misurato e registrato e aliquote di 10 mL erano preparate e congelate a -20 °C sino alla analisi.

Uno specifico Consenso Informato era ottenuto da ciascuno dei soggetti arruolati nello studio.

Trattamento preanalitico dei campioni di urina

Le cartucce OASISTTM HLB per estrazione in fase solida (3 mL, 60 mg, Waters) erano montate su un Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds (Supelco) e pre-attivate con 1 mL di alcool metilico e 1 mL di acqua. Le urine (1 mL) erano addizionate allo standard interno (IS, 50 µL, 0,5 mg) e fatte passare attraverso la colonnina condizionata. L'eluato era raccolto in una provetta contenente 0,5 g di resina Amberlite IRA-400 (ammonio quaternario scambiatore anionico forte forma Cl⁻) (Aldrich). Dopo aver vortexato e centrifugato il campione, il supernatante (0,4 mL) era filtrato con un filtro da centrifuga Micro-SpinTM (Nylon 66, 0,2 mm, Alltech Associates) prima della analisi CE.

Condizioni analitiche in CE

Le analisi erano effettuate utilizzando uno strumento P/ACE System 5500 (Beckman Coulter) controllato dal software System Gold 8,1 e settato a polarità inversa (caricamento del campione al catodo). Il detector UV era

settato a 254 nm, la polarità invertita e l'offset negativo regolato a 90%. Il capillare in silice fusa (lunghezza=27 cm, 20 cm al detector; diametro interno, ID=50 µm) era assemblato in una cartuccia Beckman (200 x 400 mm). Il tampone di corsa era costituito da una miscela di acido sorbico 6 mmol/L, cetiltrimetil ammonio bromuro (CTAB) 1,25 mmol/L e LiOH 50 mmol/L (pH 12,5) (Fluka Chemie). Ogni giorno il capillare era lavato con 1 M LiOH, 0,1 M LiOH e tampone di corsa (5 min per ognuno) e dopo la applicazione di un voltaggio di -s20 kV per 10 min il capillare era pronto all'uso. Per l'analisi si utilizzava il seguente programma: 1 min pre-lavaggio con tampone di corsa (20 psi), caricamento del campione per 1 sec a pressione (0,5 psi) o da caricamento di acqua per 1 sec. La separazione avveniva a 20 °C applicando un voltaggio costante di -5 kV per 10 min con sviluppo di una corrente di circa 29 mA. Tra due analisi il capillare era lavato con tampone di corsa per 0,5 min applicando un voltaggio di -20 kV e quindi lavato con 1 M LiOH, 0,1 M LiOH, e acqua distillata (0,5 min ognuno). Alla fine della giornata lo stesso ciclo di lavaggi veniva ripetuto ma con una maggiore durata (10 min), mantenendo le due estremità del capillare in acqua per tutta la notte. Per la conservazione per lunghi periodi veniva essiccato.

Soluzioni standard e calibratori

Le soluzioni standard degli zuccheri (Sigma Chemical) erano preparate in acqua a concentrazioni di 20, 10 e 2 mg/mL. Una soluzione 10 mg/mL di ramnosio era utilizzato come standard interno (IS). Le soluzioni erano stabili 1 settimana a 4 °C. Per la preparazione delle curve di calibrazione, gli standard erano diluiti in acqua o in urina di controllo priva di glucosio e di MAN (volume final 1 mL) in maniera tale da coprire l'intervallo di concentrazione tipico del LAC (0,01-0,5 mg/mL) e quello tipico del MAN (0,05-2,0 mg/mL). I calibratori erano preparati per ogni seduta analitica.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La valutazione della escrezione urinaria di LAC/MAN dopo somministrazione dei due carboidrati è un test utile e non invasivo per la valutazione della integrità della mucosa intestinale. Nonostante la grande quantità di metodi analitici per i carboidrati basati sulla CE, pochi riguardano la loro determinazione su matrice urinaria (17) e nessuno è stato applicato alla quantificazione specifica del rapporto LAC/MAN dopo carico orale dei due zuccheri. Poiché i carboidrati-non derivatizzati non posseggono gruppi specifici in grado di assorbire all'UV, si utilizzava un metodo indiretto, riempiendo il capillare con un tampone caratterizzato da un forte assorbimento UV e rivelando il passaggio degli zuccheri come mancanza di assorbimento o picco negativo. A questo scopo il sorbato forniva la massima sensibilità di rivelazione a 254 nm, mostrando un alto coefficiente di assorbimento molare e una mobilità elettroforetica simile a quella dei carboidrati in assenza di fenomeni di interazione o di

ossidazione con essi.

I carboidrati sono composti debolmente acidi (pK_a da 12 a 13) e a pH fortemente basico, utilizzando un tampone tradizionale, sono carichi negativamente e quindi attratti elettroforeticamente all'anodo, in senso opposto a quello del flusso elettroosmotico. Per ottenere tempi di analisi ridotti era necessario aggiungere al tampone di corsa un surfattante cationico come il CTAB che permetteva un coating dinamico del capillare e l'inversione del flusso elettroosmotico. In queste condizioni, utilizzando la polarità invertita degli elettrodi ed effettuando il caricamento del campione al catodo, i carboidrati si muovevano co-direzionalmente al flusso elettroosmotico (EOF) con tempi di analisi relativamente brevi (<10 min). L'ordine di migrazione era in relazione al loro valore di pK_a , con i disaccaridi che mostravano una minore mobilità rispetto a monosaccaridi della stessa acidità dovuta al loro rapporto massa su carica. Il MAN, che di fatto è un polialcool, risultava il più trattenuto (Fig.1).

Dalle analisi di urine controllo, nessun picco veniva evidenziato ai tempi di migrazione (M_t) di LAC, MAN o di IS (dato non illustrato). Occasionalmente nei pazienti veniva riscontrato un picco al M_t del MAN probabilmente derivante dalla dieta. In questo caso il valore basale veniva sottratto a quello ottenuto dopo carico orale del polialcool.

Le curve di calibrazione venivano analizzate correlando il rapporto "area zucchero/area IS" con la concentrazione urinaria di LAC o di MAN, rispettivamente (g/L). Il fattore di risposta per entrambi gli zuccheri e particolarmente per il MAN è fortemente dipendente dalle condizioni analitiche, per inciso pH, concentrazione del sorbato e campo elettrico che, di contro, influenza la forma del picco, la risoluzione e il disturbo della linea di base. Le pendenze di 10 curve di calibrazione preparate e analiz-

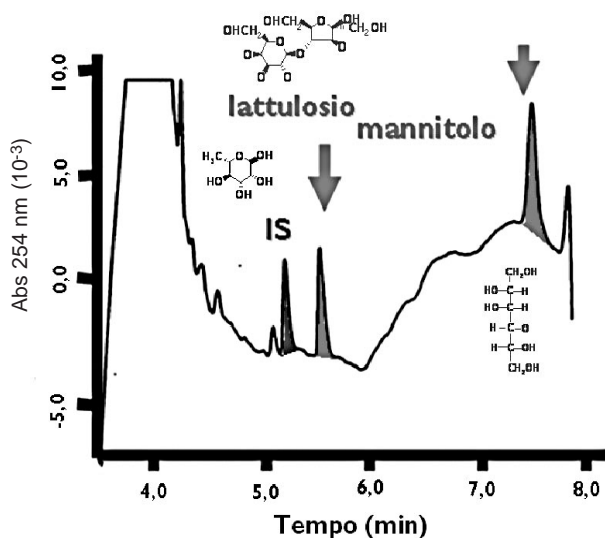


Figura 1

Elettroferogrammi di urine di controllo arricchite prima della analisi di standard interno (IS) e di lattulosio e mannitolo alla concentrazione di 1 g/L come standard. Nella figura sono riportate anche le strutture chimiche del LAC e del MAN.

zate nell'arco di 3 anni mostravano un CV di 5,9% e 14,0% per LAC e MAN, rispettivamente. Il CV nella serie, valutato ripetendo 10 volte nell'arco dello stesso giorno l'analisi di un'urina arricchita con 0,1 g/L di LAC e MAN era di 4,5% e 7,5%, rispettivamente. Il recupero (>97% per entrambi gli zuccheri) era determinato aggiungendo LAC e MAN ad un campione di urina prima o dopo i passaggi di purificazione. Il limite di determinazione per entrambi gli zuccheri in urina era di 0,01 g/L. La prova di linearità, valutata nell'intervallo tra 0,01 e 0,05 g/L per il LAC e tra 0,05 e 2,0 g/L per il MAN, forniva coefficienti di determinazione (r^2) $\geq 0,995$.

Nella Figura 2 è riportata l'analisi effettuata sulle urine di due pazienti diabetici raccolte nelle 5 h successive al carico orale degli zuccheri. Poiché il metodo era stato sviluppato per valutare la permeabilità intestinale in pazienti diabetici, abbiamo testato la possibile influenza della glicosuria sulla determinazione del LAC aggiungendo quantità crescenti di glucosio alle urine di un soggetto di controllo raccolte dopo la esecuzione del test. Quando la concentrazione di glucosio eccedeva 0,17 g/L, la quantificazione del LAC non era più possibile; 12 dei 36 pazienti con diabete di tipo 1 sottoposti al test non mostravano un buon controllo metabolico e a causa della importante glicosuria non potevano essere valutati (Figura 3).

Nonostante altre tecniche come la gas-cromatografia o l'HPLC collegata ad un detector di tipo *light scattering* siano in grado di fornire una sensibilità 10 volte maggiore della CE, il metodo qui descritto permetteva di determinare in maniera soddisfacente la concentrazione urinaria dei due zuccheri dopo la esecuzione del test in 41 soggetti controllo e in 24 su 36 pazienti con diabete di tipo 1 di lunga durata. Nei controlli, la escrezione totale di LAC variava da 0,9 a 78 mg (mediana 11,3; intervallo interquartile 5,7-15,3) mentre quella di MAN da 78 a 857 mg (303, 237-440). I pazienti diabetici mostravano una escrezione urinaria di LAC significativamente più elevata (mediana 16,5 mg; intervallo interquartile: 12,8-24,3) associata ad una ridotta escrezione di MAN (229 mg,

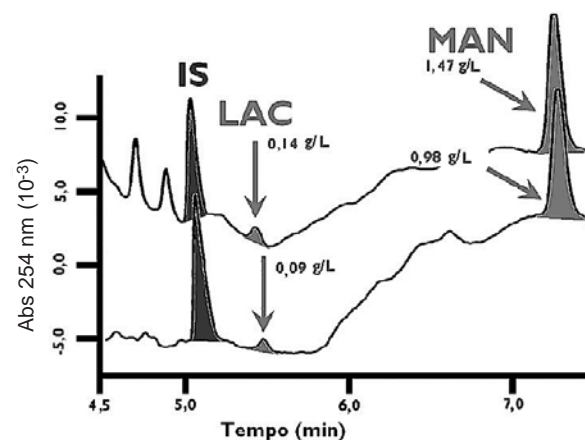


Figura 2

Elettroferogrammi rappresentativi delle urine di due pazienti diabetici raccolte nelle 5 h successive alla somministrazione di lattulosio (LAC) e mannitolo (MAN).

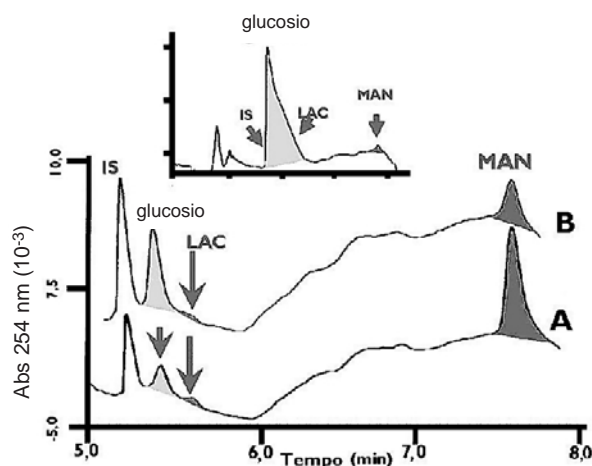


Figura 3

Urine di soggetti di controllo addizionate con diverse quantità di glucosio: campione A: 0,17 g/L (LAC = 0,12 g/L, MAN = 2,12 g/L); campione B: 0,36 g/L (LAC = 0,03 g/L, MAN = 0,36 g/L). Nell'inserto l'urina di un paziente diabetico con glicosuria = 8,4 g/L.

170-354). Questo dava luogo ad un rapporto di escrezione urinario LAC/MAN significativamente elevato (0,067, 0,050-0,127; mediana, intervallo interquartile) nei pazienti diabetici rispetto al gruppo di controllo (0,025, 0,018-0,050) ($P < 0,01$ Mann-Whitney rank sum test).

CONCLUSIONI

Il metodo CE qui proposto è rapido, semplice e poco costoso e quindi utile per l'analisi di molecole a basso peso molecolare come gli zuccheri non derivatizzati nelle urine. Il metodo necessita di uno strumento per CE con un semplice equipaggiamento (detector UV e capillare in silice fusa) e sfrutta il coating dinamico del capillare con un comune surfattante come il CTAB. A condizione che la glicosuria sia tenuta sotto controllo durante la esecuzione del test, la CE si è rivelata adeguata per evidenziare rapidamente alterazioni della permeabilità intestinale in diabetici di tipo I. Un incremento della sensibilità mediante utilizzo di strumenti di nuova generazione dotati di rilevatori più sensibili e sistemi di termostatazione del capillare più efficienti (maggiore stabilità della linea di base e minore rumore di fondo) è comunque auspicabile.

I nostri risultati evidenziano nel diabete di tipo 1 la presenza di un danno funzionale dell'intestino tenue, caratterizzato da una maggior permeabilità per le grosse molecole (LAC) in presenza di una diminuita permeabilità a quelle piccole (MAN). Tali risultati potrebbero avvalorare la ipotesi che l'agente eziologico del diabete di tipo 1 (antigene alimentare, virus o altro) agisca in primo luogo a livello della mucosa intestinale, inducendo una reazione immunopatologica locale che evolve poi in una reazione autoimmune contro le cellule beta dell'isola pancreatica.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato supportato da un finanziamento del Ministero Università e Ricerca Scientifica Tecnologica, Roma.

BIBLIOGRAFIA

1. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 1992;82:471-88.
2. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;108:1566-81.
3. Hollander D. The intestinal permeability barrier: a hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:721-6.
4. Johnston SD, Smye M, Watson RGP. Intestinal permeability and morphometric recovery in celiac disease. *Lancet* 2001;358:259-360.
5. Pignata C, Budillon G, Monaco G, et al. Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. *Gut* 1990;31:879-82.
6. Dupont C, Barau E, Molkhou P, et al. Food-induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk-sensitive enteropathy and atopic dermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989;8:459-65.
7. Mooradian AD, Morley JE, Levine AS, et al. Abnormal intestinal permeability to sugars in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1986;29:221-4.
8. Carratu R, Secondulfo M, de Magistris L, et al. Altered intestinal permeability to mannitol in diabetes mellitus type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:264-9.
9. Meddings JB, Jarand J, Urbanski SJ, et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* 1999;276:G951-7.
10. Strobel S, Brydon WG, Ferguson A. Cellobiose/mannitol sugar permeability test complements biopsy histopathology in clinical investigation of the jejunum. *Gut* 1984;25:1241-6.
11. Menzies IS, Mount JN, Wheeler MJ. Quantitative estimation of clinically important monosaccharides in plasma by rapid thin layer chromatography. *Ann Clin Biochem* 1978;15:65-76.
12. Chavez-Servin JL, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr A* 2004;1043:211-5.
13. Generoso M, De Rosa M, De Rosa R, et al. Cellobiose and lactulose coupled with mannitol and determined using ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, are reliable probes for investigation of intestinal permeability. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;783:349-57.
14. Marsilio R, D'Antiga L, Zancan L, et al. Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in studies of intestinal permeability in pediatrics. *Clin Chem* 1998;44:1685-91.
15. Abazia C, Ferrara R, Corsaro MM, et al. Simultaneous gas-chromatographic measurement of rhamnose, lactulose and sucrose and their application in the testing gastrointestinal permeability. *Clin Chim Acta* 2000;338:25-32.
16. El Rassi Z. Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species. *Electrophoresis* 1999;20:3134-44.
17. Jin LJ, Li SFY. Screening of carbohydrates in urine by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1999;20:3450-4.