

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Karolína Bílková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**Karolína Bílková**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**ABÚSUS ALKOHOLU, VLIV NA LIDSKÝ ORGANISMUS A  
ZPŮSOBY JEHO LABORATORNÍ DETEKCE**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Bršlicová

PLZEŇ 2024



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 1. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Karolína Bílková

Katedra: Záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Abúzus alkoholu, vliv na lidský organismus a způsoby jeho laboratorní detekce

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Bršlicová

Počet stran – číslované: 55

Počet stran – nečíslované: 18

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 29

Klíčová slova: alkohol, etanol, metabolismus alkoholu, laboratorní detekce etanolu, CDT, ALT, AST, biomarkery alkoholu

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. Teoretická část je zaměřena na fyziologické i patofyziologické procesy spojené s abusem alkoholu. Je zde věnovaná kapitola důležitým biomarkerům abusu alkoholu, které jsou klíčové pro diagnostiku problémů spojených s konzumací alkoholu. Dále jsem se věnovala především laboratorní diagnostice. V praktické části je popsána metodika, výsledky a vyhodnocení výzkumu. Tato část bakalářské práce je zaměřena na statistiku a analýzu dat z ÚKBH FN Plzeň a následné porovnání s celostátním trendem v oblasti závislosti na alkoholu. Dále na vyhodnocení kazuistik konkrétních pacientů. Výsledkem provedeného výzkumu je, že se celorepublikový trend výrazně neliší od dat z ÚKBH FN Plzeň.

## **Abstract**

Surname and name: Karolína Bílková

Department: Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Alcohol abuse, the effect on the human body and methods of its laboratory detection

Consultant: Ing. Kateřina Bršlicová

Number of pages – numbered: 55

Number of pages – unnumbered: 18

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 29

Keywords: alcohol, ethanol, alcohol metabolism, laboratory detection of ethanol, CDT, ALT, AST, alcohol biomarkers

### **Summary:**

This bachelor's thesis is divided into a theoretical and a practical part. The theoretical part is focused on physiological and pathophysiological processes associated with alcohol abuse. There is a chapter devoted to important biomarkers of alcohol abuse, which are important for diagnosis of problems associated with alcohol consumption. Furthermore, I focused mainly to laboratory diagnostics. The methodology, results and evaluation of the research are described in the practical part. This part of the bachelor's thesis consists of statistics and data analysis from the ÚKBH FN Plzeň and subsequent comparison with the national trend in the field of alcohol addiction. Further, the thesis deals with the evaluation of case studies specific patients. The result of the conducted research is that the audience-wide trend does not differ significantly from the data from the ÚKBH FN Plzeň.

## **Předmluva**

Téma této bakalářské práce jsem si zvolila proto, abych si prohloubila znalosti související s tématem abusu alkoholu, jakožto velice závažným problémem ve společnosti po celém světě. Konzumace alkoholu souvisí se značnou morbiditou a mortalitou. Dopady užívání alkoholu jsou spojeny s více než třiceti diagnózami. Zároveň má vliv na společnost. Cílem mé bakalářské práce bylo s cílem přiblížit problematiku týkající se abusu alkoholu od metabolismu etanolu až po jeho stanovení a stanovení markerů chronického užívání alkoholu.

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Kateřině Bršlicové za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů trpělivost a ochotu. Dále děkuji Bc. Kristýně Kavákové DiS. za ochotu a neutuchající psychickou podporu, Mgr. Miroslavu Balvínovi za odborné rady, odborné materiály a možnost nahlédnutí na ÚSL. Poděkovat bych chtěla rodině a to především mé sestře, partnerovi a všem přátelům za podporu a pomoc při psaní.

# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ.....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST.....	17
1 ABÚZUS ALKOHOLU.....	17
1.1 Co je abúzus alkoholu.....	17
1.2 Historie.....	17
1.3 Vliv na lidský organismus.....	17
2 METABOLISMUS ETANOLU.....	19
2.1 Metabolismus etanolu.....	19
2.2 Alkoholdehydrogenáza (ADH).....	19
2.3 Aldehyddehydrogenáza (ALD).....	19
2.4 Mikrozomální etanolový oxidační systém (MEOS).....	20
2.5 Kataláza.....	20
2.6 Akutní účinky metabolismu alkoholu.....	20
2.7 Chronické účinky metabolismu etanolu.....	21
2.8 Koncentrace alkoholu v krvi.....	21
3 BIOMARKERY ALKOHOLU.....	23
3.1 Přímé markery alkoholu.....	23
3.1.1 Etylglukuronid (EtG).....	23
3.1.2 Etylsulfát (EtS).....	23
3.2 Nepřímé markery metabolismu alkoholu.....	23
3.2.1 Aspartátaminotransferáza (AST).....	23
3.2.2 Alaninaminotransferáza (ALT).....	24
3.2.3 Karbohydrát deficientní transferin (CDT).....	24
3.2.4 Gama Glutamyl transferáza (GGT).....	25
4 METODY STANOVENÍ ABUSU ALKOHOLU.....	26
4.1 Orientační metody.....	26
4.1.1 Metoda analýzy dechu.....	27
4.1.2 Metoda analýzy slin.....	27
4.2 Osmolalita.....	28
4.2.1 Osmolální mezera (osmolal gap).....	28
4.2.2 Měření osmolality.....	28



4.3	Spektrofotometrie .....	29
4.4	Plynová chromatografie .....	30
4.5	Stanovení enzymů.....	31
4.5.1	Faktory ovlivňující enzymovou reakci .....	31
4.5.2	Kinetické měřicí postupy .....	32
4.5.3	Metody end-point .....	32
4.5.4	Imunochemické metody.....	33
4.5.5	Stanovení Alaninaminotransferázy (ALT).....	33
4.5.6	Stanovení Aspartátaminotransferázy (AST) .....	33
4.5.7	Stanovení gama glutamyltransferázy (GGT) .....	33
4.6	Stanovení CDT .....	34
4.6.1	Metoda Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s VIS detekcí...34	
4.6.2	Metoda kapilární elektroforézy ve volném roztoku systém MINICAP .....	34
4.7	Stanovení etylglukoronidu.....	35
4.7.1	Meření pomocí DRI etyl glukoronid assay .....	35
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	36
5	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	36
5.1	Hlavní cíl.....	36
5.2	Dílčí cíle .....	36
6	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	37
7	METODIKA PRÁCE.....	38
7.1	Stanovení etanolu metodou plynové chromatografie .....	38
7.1.1	Postup měření .....	38
7.2	Stanovení etanolu enzymatickou metodou s alkoholdehydrogenázou .....	39
7.2.1	Složení reagensů v testu .....	39
7.2.2	Odběr vzorku a příprava .....	39
7.2.3	Omezení – interference .....	40
7.3	Stanovení ALT s aktivací pyridoxalfosfátem.....	40
7.3.1	Složení reagensů v testu.....	40
7.3.2	Odběr a příprava vzorku .....	41
7.3.3	Omezení – interference .....	41
7.4	Stanovení AST s aktivací pyridoxalfosfátem.....	41
7.4.1	Složení reagensů v testu .....	42
7.4.2	Odběr vzorků a příprava .....	42
7.4.3	Omezení – interference .....	42
7.5	Stanovení GGT pomocí enzymatického kolorimetrického testu.....	43
7.5.1	Složení reagensů v testu .....	43

7.5.2	Omezení a interference .....	44
7.6	Stanovení CDT pomocí systému MINICAP .....	44
7.6.1	Analýza výsledku .....	44
7.7	Stanovení etylglukuronidu pomocí DRI ethyl glucuronide assay .....	45
7.7.1	Odběr vzorku a skladování.....	45
7.7.2	Složení reagensů v testu .....	45
7.7.3	Omezení a interference .....	45
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	46
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	47
9.1	Rozbor dat z ÚKBH.....	47
9.2	Kazuistiky.....	60
9.2.1	Kazuistika č. 1 .....	60
9.2.2	Kazuistika č. 2 .....	61
9.2.3	Kazuistika č. 3 .....	61
9.2.4	Kazuistika č. 4 .....	62
9.2.5	Kazuistika č. 5 .....	63
	DISKUZE.....	65
	ZÁVĚR .....	70
10	CITOVANÁ LITERATURA.....	71

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Procentuální zastoupení diagnóz.....	47
Graf 2 – Provedená vyšetření na etanol ve vztahu k diagnózám.....	48
Graf 3 – Pozitivní vyšetření na etanol ve vztahu k diagnózám .....	49
Graf 4 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám .....	50
Graf 5 – Procentuální zastoupení patologických výsledků vzhledem k diagnózám .....	51
Graf 6 – Procentuální zastoupení patologických výsledků CDT u jednotlivých diagnóz ..	52
Graf 7 – Počet pozitivních mužů a žen ve vztahu k věku .....	54
Graf 8 – Rozdělení jedinců dle rozmezí hladiny alkoholu v krvi.....	55
Graf 9 – Počet vyšetření etanolu v závislosti na měsících .....	56
Graf 10 – Vyšetření na EtG rozdělený dle věkových skupin a pohlaví .....	57
Graf 11 – EtG v závislosti na rozmezí .....	58
Graf 12 – Množství vyšetření na CDT rozdělených dle věkových skupin a pohlaví .....	59
Graf 13 – CDT v závislosti na rozmezí.....	60

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Zjednodušené schéma spektrofotometru, .....	30
Obrázek 2 Zjednodušené schéma plynového chromatografu, .....	31

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Stádia opilsti a jejich příznaky .....	22
Tabulka 2 – Počty provedených vyšetření a pozitivních výsledků v souvislosti s diagnózami .....	48
<i>Tabulka 3 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám.....</i>	<i>49</i>
Tabulka 4 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám rozděleno na muže a ženy .....	50
Tabulka 5 – Počet provedených vyšetření na EtG a počet patologických výsledků ve vztahu k diagnózám.....	51
Tabulka 6 – Vyšetření na EtG a patologické výsledky rozdělené na muže a ženy ve vztahu k jednotlivým diagnózám .....	51
Tabulka 7 – Počet provedených vyšetření a počet patologických výsledků u CDT ve vztahu k diagnózám.....	52
Tabulka 8 – Vyšetření a patologické výsledky u CDT rozdělené na muže a ženy ve vztahu k diagnózám.....	53
Tabulka 9 – Počet pozitivních mužů a žen vzhledem k věkovým kategoriím .....	53
Tabulka 10 – Rozdělení jedinců podle rozmezí hladiny alkoholu v krvi .....	54
Tabulka 11 – Testy provedené na etanol celkově u mužů a u žen v průběhu roku .....	55
Tabulka 12 – Vyšetření na etylglukuronid rozdělený dle věkových skupin a pohlaví .....	56
Tabulka 13 – Vyšetření na EtG rozdělen dle rozmezí .....	57
Tabulka 14 – Vyšetření na CDT rozdělené dle věkových skupin a pohlaví .....	58
Tabulka 16 – Počet vyšetření na CDT v závislosti na rozmezí.....	59
Tabulka 17 – Hodnoty pacientky – kazuistika č. 3.....	62
Tabulka 18 – Hodnoty pacienta – kazuistika č. 4.....	63
Tabulka 19 – Hodnoty pacientky – kazuistika č. 5.....	63

## SEZNAM ZKRATEK

ADH.....	alkoholdehydrogenáza
Aj.....	a jiné
ALD.....	aldehyddehydrogenáza
ALDH.....	aldehyddehydrogenáza
ALT.....	alaninaminotransferáza
Apo-ALT.....	apoenzym
AST.....	aspartátaminotransferáza
CDT.....	karbohydrár deficientní transferin
CK MB.....	kreatinkináza, muscle, brain
CNS.....	centrální nervová soustava
CYP2E1.....	cytochrom
EIA.....	enzymatická imunoanalýza
EtG.....	etylglukoronid
ETOH.....	etanol
EtS.....	etylsulfát
FAEE.....	estery etylových kyselin
FAS.....	fetální alkoholový syndrom
FN.....	Fakultní nemocnice
G6PDH.....	glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
GGT.....	gamaglutamyltransferáza
GIT.....	gastrointestinální trakt
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HZS.....hasičský záchranný sbor

LDH.....laktátdehydrogenáza

MCV.....mean cell volume, střední objem erytrocytu

MD.....malátdehydrogenáza

MEOS.....mikrozomální etanolový oxidační systém

NAD<sup>+</sup>.....nikotinamidadeninnukleotid oxidovaná forma

NADH.....nikotinamidadeninnukleotid redukována forma

Neg.....negativní

Onem.....onemocnění

Osmol.....osmolalita

P5P.....pyridoxal-5-fosfát

PEth.....fosfatydyl etanol

ROS.....reaktivní forma kyslíku, reactive oxygen species

ÚKBH.....Ústav klinické biochemie a hematologie

UP.....urgentní příjem

ÚSL.....Ústav soudního lékařství

VIS.....visible spectroscopy

VLDL.....lipoprotein s velmi nízkou hustotou

Výsl.....výsledek

Vyšet.....vyšetření

ZZS.....zdravotnická záchranná služba

## ÚVOD

Bakalářská práce s názvem „Abusus alkoholu, vliv na lidský organismus a jeho laboratorní detekce“ se zabývá problematiku zneužívání alkoholu a jeho vlivem na lidský organismus, včetně možnosti detekce této problematiky.

V České republice je abusus alkoholu velmi aktuální a probírané téma, protože patříme mezi země s nejvyšší průměrnou spotřebou alkoholu na obyvatele. Konzumace alkoholu má zároveň značný vliv na celkovou zdravotní zátěž. Alkohol patří k hlavním příčinám nemocnosti a předčasné úmrtnosti.

Nejprve jsem v teoretické části podrobně rozebrala metabolismus alkoholu a jeho dopady na organismus, abych poskytla solidní základ pro další analýzu. Dále jsem se zaměřila na vztah mezi hladinami alkoholu a aktuálním stavem jedince, a to zejména s ohledem na jeho fyzické a psychické zdraví.

V kapitole věnované biomarkerům alkoholu jsem se podrobněji zabývala markery důležitými pro diagnostiku a hodnocení závažnosti zneužívání alkoholu. Tyto biomarkery jsou klíčové pro identifikaci problémů s alkoholem a umožňují lékařům provádět relevantní diagnostiku a léčebné intervence.

V poslední části teoretické části jsem se pak věnovala laboratorní diagnostice zneužívání alkoholu. Popisovala jsem metody a techniky používané k detekci alkoholu v lidském těle.

Hlavním cílem bylo statisticky vyhodnotit a porovnat data shromážděná na ÚKBH FN Plzeň za rok 2023 vzhledem k celorepublikovým trendům užívání alkoholu.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ABÚZUS ALKOHOLU

### 1.1 Co je abúzus alkoholu

Zneužívání omamných a psychotropních látek, jako jsou drogy, alkohol nebo cigarety je označováno latinským termínem *abusus*. (1)

Moje bakalářská práce se zabývá zneužíváním alkoholu, který je ve společnosti velký problém. Chronické nadměrné užívání alkoholu představuje základní faktor vzniku mnoha interních, neurologických a psychiatrických onemocnění. Užívání alkoholu může změnit průběh a prognózu některých patologických stavů, také může ovlivnit působení léků. (2)

### 1.2 Historie

Existují archeologické nálezy a doklady které naznačují, že se alkohol konzumoval již v 7. - 5. tisíciletí před naším letopočtem v oblasti Blízkého východu. Egypťané vyobrazovali výrobu piva a vína. Důkazem jsou i články v Chamurappiho zákoníku, kde jsou popsány tresty za konzumaci a výrobu alkoholických nápojů. Ve starém Římě bylo muži přiznáno právo usmrtit svoji manželku, pokud ji přistihl v opilosti. Ve Spartě byli otroci, kteří byli opijeni za účelem ukázat odpor k alkoholu mladistvým. V Řecku byl opilec zabit či popraven. O zákazu alkoholu jsou zmínky i ve spisech Buddhy i Konfucia. Ve společnosti byl alkohol tolerován s rozvojem pivovarnictví a lihovarnictví ve středověku, ale alkoholiky mohl stihnout tělesný trest například v zemích jako je Holandsko, Anglie, Rusko. Ve Spojených státech a Sovětském svazu se pokusili o snížení konzumace alkoholu bohužel bezúspěšně. (3)

O tom, že je alkohol škodlivý zmiňovali ve svých pracích už Galén, Hippokrates, Aristoteles i Avicena. První zmínku o alkoholismu jako o nemoci učinil zakladatel americké psychiatrie Benjamin Rush. (3)

### 1.3 Vliv na lidský organismus

Konzumace alkoholu, konkrétně etanolu, je spojena s širokou škálou negativních fyzických a mentálních dopadů, stejně jako s negativními vlivy na společnost. Téměř žádný orgán v lidském těle není imunní vůči vlivu alkoholu. Odhaduje se, že pití alkoholu je spo-

jeno s více než 60 různými onemocněními. Alkohol je u některých onemocnění pouze jedním z faktorů, který může přispět ke vzniku nemoci nebo výrazně zhoršit její průběh (například cirhóza jater). U dalších onemocnění je alkohol plně odpovědný za jejich vznik, jako je alkoholová psychóza, polyneuropatie, kardiomyopatie, alkoholová gastritida, otrava alkoholem a další. Nejnovější studie také naznačují přímou účast alkoholu na vzniku specifických typů rakovin. Vedle známých negativních vlivů pití alkoholu nelze opomenout fetální alkoholový syndrom (FAS), což je soubor tělesných a mentálních vývojových vad lidského plodu způsobenou nadměrnou konzumací alkoholu během těhotenství. Alkohol dokáže překročit placentární bariéru a vstoupit do těla vyvíjejícího se plodu, což má za následek zpomalený růst, nižší porodní hmotnost a poškození nervové tkáně. Tyto účinky vedou k vážným poruchám osobnosti a chování dítěte a mnoha dalším negativním důsledkům. (4)

## 2 METABOLISMUS ETANOLU

### 2.1 Metabolismus etanolu

Etanol se absorbuje v celém gastrointestinálním traktu (GIT). Jeho vstřebávání zmírňuje nízká teplota a vysoký obsah cukru v nápoji, který na sebe váže vodu. Ke vstřebávání napomáhají i tučná jídla, která zpomalují vyprazdňování žaludku. Snadněji se absorbuje, když nápoj obsahuje oxid uhličitý např. perlivé nápoje. Také se rychleji vstřebá při pití na prázdný žaludek. Malé množství je vylučováno plícemi a v moči v nezměněné podobě, ostatní alkohol je metabolizován. (5)

Muži metabolizují přibližně jeden gram etanolu za hodinu na 10 kilogramů tělesné hmotnosti, zatímco ženy 0,85 gramů na 10 kilogramů tělesné hmotnosti za hodinu. Vzhledem k tomu, že ženy v průměru mají nižší hmotnost, proces odbourávání alkoholu u nich probíhá výrazně pomaleji. (5)

Etanol je z 90-98% z organismu vyloučen třemi známými metabolickými cestami. První je alkoholdehydrogenázou (ADH), druhá mikrosomálním etanolovým oxidačním systémem (MEOS) a třetí katalázou. Tyto tři metabolické cesty probíhají v GIT, ale hlavně v játrech, tudíž látky, které vznikají při metabolismu alkoholu, mohou poškozovat tyto orgány. (3)

### 2.2 Alkoholdehydrogenáza (ADH)

Alkoholdehydrogenáza je cytosolový enzym, který má na starost větší část metabolismu etanolu. ADH vyžaduje koenzym  $\text{NAD}^+$ , který je při oxidaci redukován na NADH. Etanol je oxidován na acetaldehyd. (3) (5)

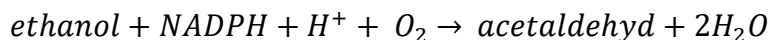
Kofaktory ADH jsou zinek nebo železo. ADH je dimer, který existuje v mnohočetných molekulových formách, kódovaných 7 geny. ADH se vyskytuje v mnoha tkáních a dělíme ji do 5 tříd. Každá třída se vyznačuje určitou strukturou, substrátovou specifitou, kinetickými vlastnostmi i lokalizací. (5)

### 2.3 Aldehyddehydrogenáza (ALD)

ALD je oxidoreduktáza, která katalyzuje dehydrogenaci aldehydu na příslušnou kyselinu. Nachází se v mnoha izoenzymech ve formě dimerů až oligomerů. Například při poruše ALD2 vznikne syndrom akutní alkoholové intolerance. (6)

## 2.4 Mikrozomální etanolvý oxidační systém (MEOS)

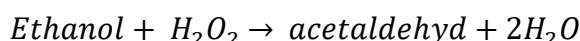
Druhá cesta, jak játra mohou oxidovat etanol je označována jako mikrozomální etanolvý oxidační systém neboli MEOS, který může oxidovat i jiné sloučeniny. Mezi další substráty pro MEOS patří mastné kyseliny, steroidy a barbituráty. MEOS oxiduje etanol na acetaldehyd, jak je vidět v následující rovnici.



MEOS je smíšený oxidázový systém, který oxiduje jak etanol, tak NADPH. Kromě alkoholdehydrogenázy obsahuje cytochrom P450 v endoplazmatickém retikulu, zejména CYP2E1, který má mnohem vyšší Michealisovu konstantu  $K_M$  pro etanol, než alkoholdehydrogenáza. Proto MEOS funguje pouze při relativně vysokých koncentracích etanolu a je větší při chronickém užívání etanolu. MEOS zajišťuje toleranci při opakovaném užívání alkoholu. (7) (8)

## 2.5 Kataláza

Kataláza, enzym široce rozšířený v organismech, má též schopnosti oxidovat etanol, avšak její příspěvek metabolismu etanolu je minimální. Při oxidaci etanolu katalázou dochází k využití peroxidu vodíku.



Vodíkový peroxid nezbytný pro katalázou katalyzovanou oxidaci etanolu je především odvozen z reakce xantinové oxidázy v purinovém katabolismu, nebo ze sekvenčních účinků NADPH oxidázy a superoxidodismutázy. (7)

## 2.6 Akutní účinky metabolismu alkoholu

Mimo vliv na psychiku, i menší dávky alkoholu vyvolávají dilataci kapilár. Tento jev se projevuje zarudnutím pokožky, především v obličeji. Při vyšších koncentracích alkoholu v krvi dochází k výraznému překrvení spojivek. Tělesná teplota, krevní tlak a pulsová frekvence mírně stoupají, což může být doprovázeno pocením a celkově zvýšenou tělesnou aktivitou. Subjektivně je toto vnímáno jako pocit tepla se zvýšeným tepelným výdejem. Zvýšený tepelný výdaj spolu s ovlivněním centrální nervové soustavy, zejména ztrátou autokritiky a špatným posouzením situace a po chvíli i utlumení díky alkoholu a zvýšené tendenci ke spánku. V chladném počasí toto může vést k velkému riziku podchlazení až smrti. Vyšší

dávky alkoholu, zejména u nezkušených jedinců, mohou způsobit podráždění žaludeční sliznice a akutní gastritidu, která se projevuje nevolností až zvracením. (9)

## **2.7 Chronické účinky metabolismu etanolu**

Chronická intoxikace má za následek poškození centrální nervové soustavy (CNS) a periferní nervové soustavy, což vede k duševnímu a morálnímu úpadku. Na somatické úrovni způsobuje chronická konzumace vznik kardiomyopatie, nefropatie, gastritidy, pankreatitidy a především hepatopie. Morfologické změny v těchto orgánech, jak mikroskopické tak ultramikroskopické jsou hlavní oblastí zájmu patologů.

Zvláštní pozornost si zasluhuje poškození jater. Alkoholické poškození jater lze rozdělit do tří postupných typů. Steatoza představuje hromadění tuku v hepatocytech a je to první stupeň poškození jater. Nejlehčí forma a při absolutní abstinenci je zcela reverzibilní. Hepatitis alcoholica představuje druhý stupeň alkoholického poškození jater a její reverzibilita je sporná. Cirhóza jater je charakterizována přemnožením pojivové tkáně v játrech, která vede k nepravdělné přestavbě jaterního parenchymu a tvorbě pseudotubulů. Jedná se o trvalý stav, při úplné abstinenci je možná pouze stabilizace stavu. (9)

## **2.8 Koncentrace alkoholu v krvi**

Koncentrace hladiny alkoholu v krvi se nejčastěji uvádí v promilích (‰), ale v laboratorní diagnostice v toxikologii se používá jednotka SI, které jsou g/kg, tedy gramy absolutního etanolu na jeden kg krve. Naproti tomu na ÚKBH se používají g/L tedy gramy etanolu na jeden litr krve. Promile je stejná jako g/kg i g/L. (9)

V tabulce níže jsem rozdělila běžné projevy intoxikace podle obsahu alkoholu v krvi. Začíná to subklinickým obdobím, které se pohybuje mezi 0,2 až 0,5 ‰. V této fázi se neobjevují žádné příznaky kromě mírné euforie a cítění alkoholu z dechu. Následuje euforické období, kde se projevuje lehká euforie, zvýšená sebedůvěra, snížené inhibice, mírné problémy se svalovou koordinací a zpomalená reakční doba. Poté následuje fáze vzrušení, která přináší střední opilost, ztrátu kontroly nad sebou, emocionální nestabilitu, nadměrné mluvení, ztrátu kritického myšlení a koordinace. Následuje fáze zmatení, kde se projevuje silná opilost, zmatenost, závažné obtíže s porozuměním, chůzí a zrakem, nejasná řeč, snížená citlivost na bolest a apatie. Další fází je stav stuporu, což je závažná intoxikace. Jedinec není schopen chůze, cítí nevolnost a potřebu zvracet, má poruchy vědomí nebo spánku, někdy

průjem a krvácení do trávicího traktu, inkontinenci moči a stolice, počínající symptomy respirační a oběhové selhání, pokles krevního tlaku, zrychlený srdeční tep a modravé zbarvení kůže, hypotermie. Poslední fází je komatózní stav, který většinou končí bezvědomím. Může dojít k úmrtí, které může být způsobeno zástavou dechu nebo vzácněji zástavou srdce, aspirační pneumonií, plicním edémem nebo těžkou hypotermií. (10)

*Tabulka 1 – Stádia opilsti a jejich příznaky*

Stádia	Meze [%o]	Příznaky
Subklinické stádium	0,2-0,5	lehká euforie, alkohol je cítit z dechu
Euforické stádium	0,5-1,0	lehká euforie, vz-.mnestup sebedůvěry, odstranění zábran, snížení pozornosti, prodloužení reakčního času
Excitační stádium	1,0-2,0	střední opilst, ztráta sebekontroly, emoční labilita, mnohmluvnost, ztráta kritického úsudku, poruchy koordinace a rovnováhy
Konfuzní stádium	2,0-3,0	těžká opilst, zmatenost, výrazné poruchy chápání, chůze i zraku, smazaná řeč, pokles vnímání bolesti, apatie
Stuporozní stádium	3,0-4,0	závažná intoxikace, neschopnost chůze, nevolnost, zvracení, poruchy vědomí nebo spánek, někdy průjem, krvácení do GIT, inkontinence moči i stolice, počínající symptomy obrny dechového a oběhového centra, pokles tlaku, tachykardie, cyantóza, hypotermie
Komatózní stádium	> 4,0	většinou bezvědomí, hypo až areflexie, rigidita končenin, trismus, křeče, nystagmus či konjugovaná deviace bulbů, hypotermie, povrchní dýchání, cyantóza, oběhový kolaps, hypoglykémie, metabolická acidóza

*ZDROJ: Toxikologické informační středisko, Klinika pracovního lékařství VFN a I.LF UK dostupné z: <https://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-verejnost/alkohol>*

## 3 BIOMARKERY ALKOHOLU

Biomarkery jsou chemické sloučeniny, látky nebo enzymy, které jsou zvýšeny nebo sníženy v jakémkoli neobvyklém fyziologickém stavu biologického původu. Pomocí biomarkerů můžeme určit závažnost stavu daného jedince. (11)

### 3.1 Přímé markery alkoholu

Jsou to biomarkery, které jsou chemicky odvozeny od molekuly etanolu a jsou produkty metabolismu etanolu. Přímé markery vznikají, když je etanol metabolizován nebo reaguje s látkami přítomnými v těle. Jsou to sloučeniny vytvořené v metabolismu neoxidativní dráhy metabolismu etanolu. (11)

#### 3.1.1 Etylglukuronid (EtG)

Etylglukuronid (EtG) je přímý metabolit alkoholu, stálý a rozpustný ve vodě. Lze ho detekovat ve vzorcích séra, vlasů i moči. Je to jeden z nejspolehlivějších markerů chronické konzumace alkoholu. Může být detekován v moči po uplynutí 24 hodin již po požití 16g etanolu. K prokázání abstinence se může nechat detekovat v časovém rozmezí jeden den až jeden týden dle množství požitého etanolu a délky pití. Má vysokou specifitu a citlivost ve srovnání s EtS. Referenční mez je  $\leq 0,5$  mmol/L (11) (12)

#### 3.1.2 Etylsulfát (EtS)

Etylsulfát (EtS) je také přímý metabolit alkoholu, který má nižší specifitu a citlivost než EtG a je detekovatelný v moči až 1,5 dne. EtS je stabilní déle než 3 týdny. Je často používán jako marker konzumace alkoholu. Úmyslné zředění moči lze detekovat sledováním poměru EtS ke kreatininu. (11)

### 3.2 Nepřímé markery metabolismu alkoholu

Jedná se o enzymy nebo buňky, které podléhají akutní a chronické konzumaci alkoholu. Odrážejí toxické a nežádoucí účinky etanolu na různých orgánech, tkáních atd. Zahrnují jaterní enzymy jako aminotransferázy: alaninaminotransferázu (ALT), aspartátaminotransferázu (AST), karbohydrát deficientní transferin (CDT), gamma-glutamyltransferázu (GGT) atd. (11)

#### 3.2.1 Aspartátaminotransferáza (AST)

AST je jaterní enzym, který přímo nereflektuje těžké pití, ale zvyšuje se při poškození orgánu. AST aktivita je nejvyšší v mitochondriích. Aminotransferázy nejsou zvýšeny při akutní konzumaci alkoholu. AST má větší citlivost než ALT a má nízkou specifitu, proto

může být zvýšena u onemocnění, jako jsou virové hepatitidy. AST je méně specifická protože kromě poškození jaterních buněk se nachází i v srdeční svalovině, ledvinách a mozkových buňkách při stavech jako je infarkt myokardu či trauma svalů. Jakékoliv poranění buněk nebo selhání orgánů může vést ke zvýšeným hladinám AST. Poměr AST a ALT se používá k diagnostice onemocnění jater a užívání alkoholu. U pacientů s akutním poškozením jater je poměr 1 nebo nižší a u alkoholické hepatitidy se nachází na úrovni 2. Nezbytný koenzym pro obě aminotransferázy (AST i ALT) je pyridoxal-5-fosfát, kterého bývá nedostatek při alkoholickém onemocnění jater. Jaterní ALT je kvůli této nedostatečnosti snížena více než AST. Vysoký poměr sérové mitochondriální AST k celkovému sérovému AST naznačuje další důkaz alkoholického onemocnění jater. Referenční meze jsou od 0-15 dnů  $\leq 2,6 \mu\text{kat/L}$ , od 15 dnů do 2 let  $\leq 1,0 \mu\text{kat/L}$ , od 2 do 18 let  $\leq 0,8 \mu\text{kat/L}$ , ženy nad 18 let  $\leq 0,6 \mu\text{kat/L}$ , muži nad 18 let  $\leq 0,8 \mu\text{kat/L}$ . (11)

### **3.2.2 Alaninaminotransferáza (ALT)**

Alaninaminotransferáza (ALT) je specifitější než AST, protože se zvyšuje pouze při poškození jater. Tento jaterní enzym má nízkou citlivost. Poměr AST a ALT se používá k určení chronického alkoholového onemocnění. Hladiny ALT jsou také vysoké při hepatitidě, infekci, cirhóze, rakovině atd. AST, ALT, GGT jsou jaterní enzymy, které jsou detekovány pomocí testů jaterní funkce. Referenční meze jsou ve věku od 0-18 let  $\leq 0,5 \mu\text{kat/L}$ , nad 18 let  $\leq 0,8 \mu\text{kat/L}$ , muži nad 18 let  $\leq 1,2 \mu\text{kat/L}$ . (11)

### **3.2.3 Karbohydrát deficientní transferin (CDT)**

Karbohydrát deficientní transferin (CDT) při vysoké konzumaci alkoholu v některých případech ukazuje normální hladinu. Je detekovatelný až po dobu 2 týdnů od požití alkoholu. Vzniká tak, že je železo transportováno v těle glykoproteinem zvaným transferin. Za normálních podmínek může transferin vázat 4-6 uhlohydrátů (kyselin sialických). Konzumace alkoholu interferuje a ovlivňuje vazací schopnost kyseliny sialické na transferin, což způsobuje její nedostatek, odtud název karbohydrát deficientní transferin. CDT je velmi specifický u pacientů se zvýšeným GGT a hepatitidou. Konzumace alkoholu více než 60g po dobu 2-3 týdnů může zvýšit hladinu CDT. Zvýšená hladina se vrací do normálu po 2-4 týdnech abstinence. CDT může detekovat recidivu u osob závislých na alkoholu. CDT nedokáže detekovat lidi, kteří pijí ve velkém množství najednou, ale může rozlišit osoby, které nepijí a závislé na alkoholu. U jaterních poruch má CDT vyšší specifitu než GGT a MCV. Hladiny CDT nejsou ovlivněny léky ani běžnými chronickými onemocněními. Jeho hladiny mohou



být zvýšeny v případě nealkoholické hepatitidy nebo žlučových onemocnění. Než se CDT odbourá, trvá to 14 až 17 dní. Referenční mez je nad 2% patologický výsledek (11)

### 3.2.4 Gama Glutamyl transferáza (GGT)

Gama glutamyltransferáza (GGT) se používá k detekci dysfunkce jater a jako marker konzumace alkoholu. Hladiny GGT mohou být zvýšeny v krevním séru v důsledku cholestázy a antiepileptik. Kombinace hladin GGT, AST a ALT se využívá k přesnému určení míry konzumace alkoholu. GGT je enzym ze skupiny peptidáz. Jeho funkce spočívá v přenosu gama glutamyl skupiny z peptidů na akceptorový peptid. Přestože je GGT přítomno i v cytosolu, většina se nachází v membránách buněk. Nejvyšší aktivita GGT je pozorována v ledvinách, v kanálcích hepatocytu, pankreatickém acinu, prostatě a žlučovodu. GGT přenáší aminokyseliny přes buněčnou membránu, což je klíčové pro procesy zpětného vstřebávání aminokyselin. Jeho uvolňování do krve odráží toxické účinky alkoholu a dalších látek na mikroskopickou strukturu jaterních buněk. GGT je relativně vysoce specifický a citlivý enzym, což znamená, že jeho hladiny mohou rychle reagovat na problémy s játry. Díky němu dokážeme detekovat časnou fázi chronického zneužívání alkoholu. Několik studií prokázalo, že existuje příznivý vztah mezi množstvím konzumovaného alkoholu a aktivitou GGT v krvi. Pro zvýšení hladin GGT je třeba u mužů 74 gramů a u žen přibližně 60 gramů alkoholu týdně. Místo občasného nadměrného pití se hladiny GGT často zvyšují po dlouhodobém užívání alkoholu trvajícím několik týdnů. Díky poločasu GGT, který je 14-26 dnů se hladiny GGT obvykle vrátí do normálu během 2-6 týdnů zdrženlivosti od alkoholu. To z něj činí užitečný indikátor chronického užívání alkoholu. Referenční meze pro GGT jsou od 0-13 týdnů věku  $\leq 3,0 \mu\text{kat/L}$ , od 13 do 16 týdnů  $\leq 2,0 \mu\text{kat/L}$ , od 26 týdnů do 1 roka  $\leq 1,0 \mu\text{kat/L}$ , od 1 roka do 9 let je  $\leq 0,4 \mu\text{kat/L}$ , ženy od 3-18 let  $\leq 0,4 \mu\text{kat/L}$ , muži od 9-18 let  $\leq 0,7 \mu\text{kat/L}$ , ženy nad 18 let  $\leq 0,7 \mu\text{kat/L}$ , muži nad 18 let  $\leq 1,2 \mu\text{kat/L}$ . (11)

## 4 METODY STANOVENÍ ABUSU ALKOHOLU

Příjem etanolu do organismu způsobuje metabolickou acidózu, hypoglykémii, hyperurémii, zvýšenou aktivitu ALT a výrazný nárůst osmolality.

Pravidelná konzumace alkoholu může vést k patologickým změnám jater, od steatozy až po cirhózu, což se projevuje charakteristickými laboratorními nálezy. U jedinců s alkoholovou závislostí je často pozorována zvýšená aktivita GGT a zvýšený podíl karbohydrát deficitního transferinu (CDT). Někteří lidé trpící alkoholismem mohou mít poruchy výživy, a zvýšený počet erytrocytů může být spojen s nedostatkem vitamínu B12. Nedostatek vitamínu B1 může vést k laktátové kyselosti. Osoby závislé na alkoholu také často mívají narušený metabolismus tuků s významně zvýšenou koncentrací VLDL, což může vést k vzhledu séra podobnému chylóze. (5)

V některých situacích je nutné ověřit, zda daná osoba konzumovala alkohol před několika dny; i pokud hladina alkoholu v krvi je již nulová, tento krok je například součástí monitorování dodržování léčebného režimu u osob s alkoholovou závislostí. V moči lze detekovat metabolit alkoholu, etylglukuronid, obvykle pomocí imunochemických testů. (5)

Pro stanovení etanolu existuje několik metod. Orientační detekce z dechu a slin, které jsou méně přesné, ale dokážou stanovit přítomnost alkoholu do několika vteřin. Klinické laboratoře obvykle stanovují etanol spektrofotometricky s pomocí alkoholdehydrogenázy; tato metoda nevyžaduje speciální zařízení a je dostatečně rychlá. Nejspecifičtější metodou je plynová chromatografie, která je schopna rozpoznat i přítomnost jiných alkoholů, včetně metanolu. Pro právní a lékařské účely je požadováno stanovení koncentrace etanolu dvěma nezávislými způsoby, přičemž jedna z nich musí být plynová chromatografie. (5)

Koncentrace etanolu v krvi (v krevním séru) se tradičně vyjadřuje v g/l, i když lze koncentraci také udávat v SI jednotkách (1g/l=22mmol/l). Přítomnost alkoholu může být signalizována rozdílem mezi naměřenou a odhadnutou osmolalitou, známá jako osmolální mezera (osmolal gap, osmolality gap). (5)

### 4.1 Orientační metody

Orientační metody jsou důležitou a hojně využívanou metodou ke zjištění aktuální hladiny alkoholu především v dechu nebo ve slinách. Jsou jednoduché a velice rychlé.

#### 4.1.1 Metoda analýzy dechu

Dříve nejčastěji používaná metoda pro detekci alkoholu ve vydechovaném vzduchu byla založena na oxidaci etanolu na kyselinu octovou s využitím dichromanu. Šestimocný chrom, jehož sloučeniny jsou oranžové, byl redukován na  $\text{Cr}^{3+}$ , který má modrozelenou barvu. Nevýhodou této metody bylo používání karcinogenních sloučenin a nízká specifita stanovení. (13)

V současnosti jsou mnohem častěji využívány elektrochemické detektory alkoholu. Ty využívají redukčních vlastností etanolu, který lze snadno oxidovat na acetaldehyd nebo kyselinu octovou. Tato reakce může probíhat na vhodné kladně nabitě elektrodě, která odebírá elektrony etanolu. Protony pak migrují k záporně nabitě elektrodě, kde přijímají stejný počet elektronů a spolu s kyslíkem se slučují za vzniku vody. (13)

Levnější dechové detektory alkoholu využívají polovodičový senzor často z oxidu cínitého  $\text{SnO}_2$  s příměsí kovů vzácných zemin. Rychlost oxidace etanolu tímto způsobem závisí na teplotě, a proto čidlo bývá temperováno. Tyto detektory nejsou úplně selektivní a mohou reagovat i na další látky, které mohou podstoupit obdobnou oxidaci. Přesnější přístroje využívají palivový článek, který je citlivější a méně závislý na teplotě. (13)

Moderní dechové analyzátoři alkoholu prošly rozsáhlým vývojem a jsou schopny velmi přesně kalibrovat senzory a kontrolovat objem odebraného vzorku. Tyto přístroje také monitorují, zda je odebraný vzorek z hlubších plicních alveolů, aby výsledky odpovídaly koncentraci alkoholu v krvi. (13)

Policie ČR používá digitální analyzátoři dechu Drager Safety alcotest 7510 Standart, který je schválen Českým metrologickým institutem, jako průkazné měřidlo. Analyzátor je osazen vysoce přesným a selektivním elektrochemickým čipem Draeger Fuel Cell  $\frac{1}{4}$ ". (14)

#### 4.1.2 Metoda analýzy slin

Slinové testery využívají účinek enzymu oxidace alkoholu, který reaguje na přítomný alkohol v souladu s koncentrací alkoholu ve vzorku slin, na nějž je aplikován. Uživatel odhaduje hladinu alkoholu porovnáním změny barvy na testovacím proužku s kalibrovaným standartním barevným zdrojem, který zobrazuje různé hladiny alkoholu.

I když některé testery slin zdánlivě účinně ukazují přítomnost alkoholu, oxidační enzym alkoholu používaný u těchto testerů je citlivý na teplotní vlivy. Při vyšších teplotách mohou výsledky ukázat nesprávně vysoké hodnoty, zatímco při nižších teplotách mohou být

až nepravdivě nízké. Dále se musí dávat pozor na čas, kdy testovaný požil alkohol. Test hned po požití alkoholu může zkreslit výsledky. (15)

## 4.2 Osmolalita

Osmolalita, vyjádřená v molárních jednotkách, je kvantitativní charakteristika závislá na počtu částic v roztoku, nezávisle na jejich velikosti. Tato veličina je udávána v milimolech obsažených v jednom kilogramu rozpouštědla (mmol/kg). Stejnou osmolalitu má roztok obsahující 1 mol glukózy, močoviny a dokonce i vysokomolekulárního albuminu. Roztok s 1 mol NaCl má (v případě úplné disociace) dvojnásobnou osmolalitu, protože obsahuje dvojnásobné množství částic (1 mol Na<sup>+</sup> a 1 mol Cl<sup>-</sup>) (5)

Osmolalita plazmy je přísně regulovaná osmoreceptory v mezimozku, které ovládají sekreci antidiuretického hormonu (ADH). ADH následně ovlivňuje zpětnou resorpci vody v distálním tubulu ledvin. (5)

Měření osmolality je možné pomocí osmometru. Pro odhad osmolality lze využít výpočet, který zohledňuje látky s nejvyšší koncentrací v plazmě (koncentrace všech analytů ve vzorku jsou vyjádřeny v mmol/l; koncentrace Na<sup>+</sup> se násobí dvakrát, aby výpočet zahrnul doprovázející anionty). (5)

$$\text{Osmolalita} = 2 \times \text{Na}^+ + \text{urea} + \text{glukóza}$$

### 4.2.1 Osmolální mezera (osmolal gap)

Osmolální mezera představuje rozdíl mezi naměřenou a odhadovanou osmolalitou. Odhadovaná osmolalita, vypočtená z výše uvedené rovnice, odpovídá osmolalitě naměřené, pokud nejsou v plazmě patologické látky zvyšující osmolalitu. Obě hodnoty běžně souhlasí, odlišují se jen v rozmezí do 5 nanejvýše 10mmol/kg vody. Srovnání výpočtu s měřením je užitečné v situacích, kde existuje podezření na přítomnost látek s malou molekulovou hmotností, které výpočet nezohledňuje. Například 1g etanolu (což odpovídá 1 promili alkoholu) v plazmě způsobí zvýšení naměřené osmolality o přibližně 23mmol/kg vody. (16)

### 4.2.2 Měření osmolality

Jak jsem už uvedla, měření osmolality se provádí na přístroji zvaném osmometr, který měří koncentraci částic v roztoku. Nejčastěji se měří na bázi kryoskopie, která využívá princip snížení teploty tuhnutí roztoku v závislosti na koncentraci částic ve zkoumaném vzorku.

Vzorek daný do přístroje se prvně velice rychle ochladí na několik stupňů pod bod tuhnutí. Zahájíme proces krystalizace, což vyvolá uvolňování tepla tuhnutí, a postupně zvyšuje teplotu až k bodu tuhnutí. Teplota tuhnutí zůstává konstantní po dobu, kdy se uvolňuje skupenské teplo tuhnutí rozpouštědla (fáze platau). Dále pokračuje ochlazování mrznoucího roztoku. Snížení bodu tuhnutí roztoku (měřeného vzorku), oproti bodu tuhnutí rozpouštědla je přímo úměrné osmolalitě. (17)

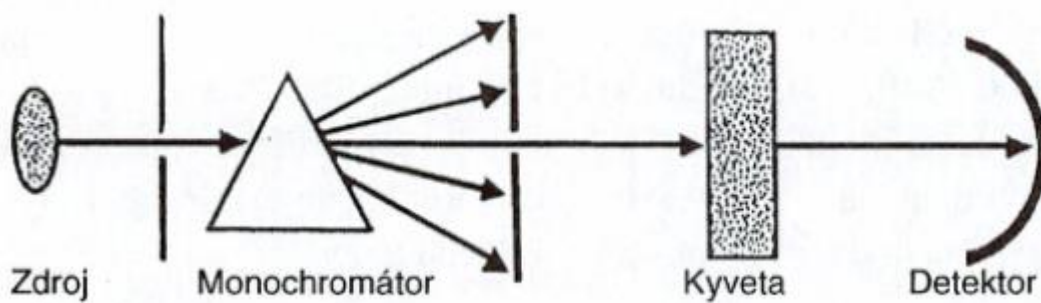
### 4.3 Spektrofotometrie

Fotometr je zařízení určené k měření intenzity záření, nebo poměru intenzit záření dvou paprsků. Termín fotometr se používá pro jakékoliv zařízení, které umožňuje sledovat změnu intenzity záření při průchodu absorbujícím prostředím.

Spektrofotometr je speciální typ fotometru, který od filtrového fotometru odlišuje především spektrální kvalitou záření. U spektrofotometrů je monochromatické záření generováno disperzním zářením, buď pomocí mřížky, nebo hranolu. Tyto prvky rozkládají polychromatické záření zdroje na spektrum, které se vymezení na monochromatický úzký svazek záření pomocí vstupní a výstupní štěrbin. Výsledek měření je absorpční křivka. Absorpční křivka je závislost absorbance nebo propusti na vlnové délce.

Spektrofotometr se skládá ze čtyř základních prvků. Zdroj zářivé energie, kterým je nejčastěji žárovka nebo výbojka. Disperzní záření, díky kterému se polychromatické záření rozkládá do spektra. Absorpční prostředí, kterým je květa s měřeným vzorkem. Jako poslední je detektor záření, který se skládá ze zesilovače a měřidla k odečítání hodnot propustnosti nebo absorbance. (18)

Množství etanolu je přímo úměrné vzrůstu absorbance při vlnové délce 340nm. (5)



Obrázek 1 Zjednodušené schéma spektrofotometru,

ZDROJ: Doležalová Věra et al., *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*

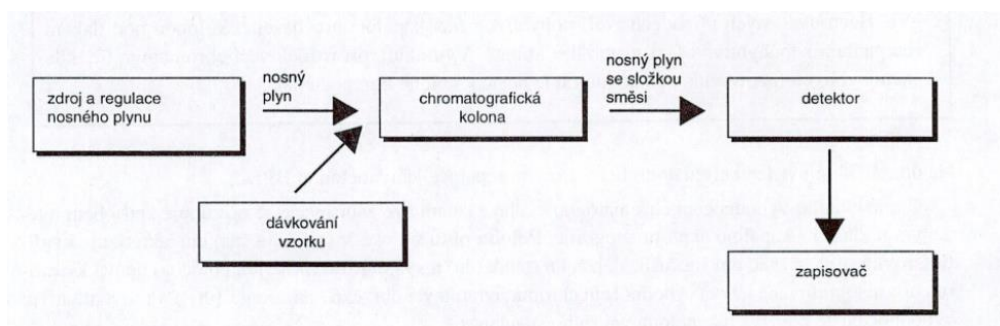
#### 4.4 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie slouží k oddělení směsí látek s různými teplotami varu a rozdělovacím koeficientem. Tato technika umožňuje rozdělit všechny látky, které se při pracovní teplotě přemění na plynnou fázi. Samotný proces separace se odehrává v zařízení zvaném plynový chromatograf.

Kapalné i plynné vzorky se aplikují do kolony pomocí injekčního zařízení. Injekční jehla projde membránou v dávkovacím prostoru kolony a vzorek se vstříkne do nosného plynu, který proudí kolonou. Tuhé vzorky jsou předem rozpuštěny v těkavých kapalinách. Látky s vysokým teplotním bodem mohou být převedeny na deriváty s nižším teplotním bodem. Pro analýzu těkavých látek v biologických vzorcích se používá head space metoda, která spočívá v analýze rovnovážné plynné fáze. Vzorek se umístí do uzavřené lahvičky a zahřeje se, čímž těkavé látky přecházejí do plynné fáze.

Po zplynění vzorku v dávkovači se páry jednotlivých složek směsi přenášejí nosným plynem do ohřáté kolony. Během průchodu kolonou dochází k separaci složek podle principů adsorpční nebo rozdělovací chromatografie, v závislosti na materiálu použitém pro náplň kolony. Oba tyto případy představují sloupcovou chromatografii, kde nosným médiem je plyn. Separované složky opouštějí kolonu a jsou detekovány detektorem propojeným se zapisovačem. Výsledný grafický záznam, nazývaný chromatogram, je pak podroben vyhodnocení.

Nosiči plynu obvykle používaní jsou dusík, helium, argon, vodík nebo oxid uhličitý, podle typu použitého detektoru. Kolona je obvykle dlouhá, úzká trubice z různých materiálů, jako je sklo nebo kov. Kapilární kolony jsou často spirálovitě stočené a mohou být velmi dlouhé. Plnicí materiál kolony se liší v závislosti na tom, zda probíhá dělení v systému plynu a pevné látky (adsorpční chromatografie) nebo plynu a kapaliny (rozdělovací chromatografie). (18)



Obrázek 2 Zjednodušené schéma plynového chromatografu,

ZDROJ: DOLEŽALOVÁ Věra et al., *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*

## 4.5 Stanovení enzymů

### 4.5.1 Faktory ovlivňující enzymovou reakci

**Teplota:** Aktivita enzymů se zvyšuje s teplotou, přičemž rozsah teplotních podmínek pro enzymatické reakce sahá od nízkých teplot kolem nuly až do teploty vyšší než + 100 stupňů Celsia. Nicméně vzhledem k složení enzymů, které jsou z bílkovin, hrozí riziko denaturace, tudíž je pro většinu enzymů optimální teplotní stabilita v rozmezí +20 až +40 stupňů Celsia. Pro metody stanovení enzymové aktivity se doporučuje provádět měření při teplotě +37 stupňů Celsia. (19)

**Koncentrace substrátu:** Koncentrace substrátu musí být nastavena tak, aby neovlivňovala rychlost během měření. Reakce by měla probíhat maximální možnou rychlostí ( $V_{max}$ ). (19)

**pH a pufr:** Pro každý enzym lze najít optimální pH, které se ovšem může lišit od pH, při němž enzymy pracují v lidském organismu. Pufr není důležitý pouze pro udržení požadovaného pH, ale i jeho složení a přítomnost nečistot ovlivňují enzymovou reakci. (19)

**Inhibitory a aktivátory:** Obě kategorie látek mohou být přítomny jak v analyzovaných vzorcích, tak v použitých činidlech. Inhibitory jsou látky, jež zpomalují rychlost enzymové reakce, zatímco aktivátory jsou látky, které ji naopak zrychlují. Inhibitory se rozdělují na soutěživé a nesoutěživé. Soutěživý inhibitor soutěží se substrátem o aktivní centrum enzymu. Tuto inhibici lze eliminovat nadbytkem substrátu, a jedná se tak o reverzibilní inhibici. Nesoutěživý inhibitor se váže na jiné místo enzymu než substrát, což mění konformaci enzymové molekuly a vede k poklesu až zastavení enzymové reakce. Tento typ inhibice nelze odstranit nadbytkem substrátu. (19)

**Koncentrace enzymu:** Při neměnné koncentraci substrátu je závislost reakční rychlosti na koncentraci enzymu lineární. (19)

#### 4.5.2 Kinetické měřicí postupy

V klinických laboratořích se nejčastěji provádí stanovení rychlosti enzymové reakce pomocí fotometrické metody, kde kontinuálně měříme absorbanci v závislosti na čase. To znamená opakované zaznamenávání změn absorbance ve stejných časových intervalech. Měříme buď úbytek nebo přírůstek substrátu, případně koenzymu nebo jiného reaktantu. Při stanovení koncentrace koenzymu typu NAD nebo NADP, používáme označení optický test. Tento postup využívá rozdíl absorpčních maxim mezi redukovanými formami ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) a oxidovanými formami ( $\text{NAD}^+$ ), přičemž pouze redukované formy absorbují při vlnové délce 340nm. (19)

Důležitý je i časový interval, během kterého provádíme měření. Obvykle není vhodné měřit okamžitě na začátku enzymové reakce, protože rychlost ještě není konstantní, tuto fázi nazýváme leg-fáze. Měříme až v okamžiku, kdy je rychlost reakce stabilní, tj. nezávislá na koncentraci reagujících látek (reaktantů). Tuto fázi reakce pečlivě kontrolujeme. Automatické analyzátory mají tyto časy definovány v parametrech metod. Totéž platí i pro kontrolu vyčerpání substrátu. (19)

#### 4.5.3 Metody end-point

Je to postup, kdy ponecháme reakci probíhat až do konce. V případě enzymů se hovoří o vyčerpání substrátu. Při stanovení enzymů již nejsou tyto metody obvykle doporučovány, spíše se s nimi setkáváme při analýze substrátu či jiných analytů (např. cholesterolu, celkové bílkoviny a dalších). Koncentrace se určují na základě celkové změny měřeného signálu. (19)

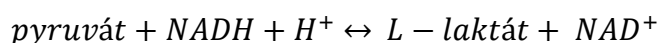
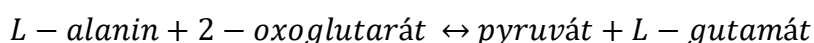


#### 4.5.4 Imunochemické metody

V případě, že máme k dispozici specifickou protilátku proti zkoumanému enzymu, můžeme využít některý z imunoanalytických postupů k přímému stanovení množství enzymu, vyjádřeného v jednotkách hmotnostní koncentrace (ng/l, ug/l). Například při stanovení izoenzymu CK MB se používá tato metoda, se tento způsob stanovení označujeme jako CK MB mass. Tyto metody jsou ekonomicky náročnější a z tohoto důvodu se v klinických laboratořích běžně nepoužívají, s výjimkou specifických situací. (19)

#### 4.5.5 Stanovení Alaninaminotransferázy (ALT)

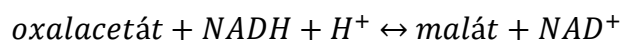
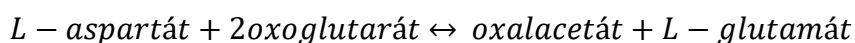
Pyruvát je pomocí enzymu laktátdehydrogenázy (LD) redukován na laktát, zároveň dochází k oxidaci NADH na NAD<sup>+</sup>. Rychlost úbytku měříme fotometricky při 340nm.



Apoenzym (Apo-ALT) je aktivován pyridoxal-5-fosfátem (P5P). V některých chorobách může docházet k nedostatku P5P, což by mohlo zabránit úplné aktivaci enzymu, proto je P5P přidáno do reakční směsi v konečné koncentraci 0,1mmpl/l. Podobně jako u AST se doporučuje spustit reakci pomocí druhého substrátu (2oxoglutarátu) po 10 minutách předinkubace analyzovaného vzorku s reakční směsí. Během předinkubace dochází také v reakční směsi k stranění pyruvátu obsaženého v analyzovaném vzorku. (19)

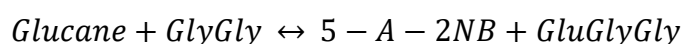
#### 4.5.6 Stanovení Aspartátaminotransferázy (AST)

Oxalacetát, vytvořený působením enzymu malátdehydrogenázy (MD), je redukován na malát, zatímco dochází k oxidaci NADH na NAD<sup>+</sup>. Rychlost úbytku NADH měříme fotometricky při 340nm. (19)



#### 4.5.7 Stanovení gama glutamyltransferázy (GGT)

GGT přenáší gama-glutamylovou skupinu ze substrátu (L-gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid neboli Glucane) na glycyglycin (GlyGly), který v této metodě plní i funkci pufru. Během reakce se uvolňuje 5-amino-2-nitrobenzoát (5-A-2NB). Míra aktivity GGT je stanovena fotometrickým měřením rychlost vznikajícího 5-A-2NB. (19)



## 4.6 Stanovení CDT

### 4.6.1 Metoda Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s VIS detekcí

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je momentálně nejrozšířenější chromatografickou metodou. Jedná se o separační techniku, která využívá kontinuální opakování rovnovážné distribuce mezi pevnou (stacionární) a kapalnou (mobilní fází). Základní instrumentální vybavení zahrnuje vysokotlakou pumpu se zásobníky na mobilní fázi, dávkovací zařízení spojené většinou s automatickým dávkováním vzorků (autosampler, chromatografickou kolonu, detektor a zařízení na záznam a zpracování signálu. Pumpy mohou pracovat v izokratickém módu (stejně složení mobilní fáze), nebo v gradientovém módu, kdy dochází v průběhu každé analýzy ke změně složení mobilní fáze ve prospěch organické složky, což urychluje separaci složitějších směsí látek. Chromatografické kolony jsou obvykle kovové trubice o délce mezi 5 až 25cm a vnitřním průměru 1 až 4,6mm, plněné sorbenty s velikostí částic od 1,7 do 7 $\mu$ m. Pro zpracování signálu z eluátu se používá detektor v tomto případě spektrofotometrický VIS detektor s detekcí 460nm. (20)

Před samotnou analýzou je nezbytná příprava vzorku, která zahrnuje precipitaci pro odstranění lipidů a proteinů. Klarifikovaný supernatant je následně zředěn dilučním roztokem, což připravuje vzorek k provedení analýzy. Hodnota CDT je poté odečtena z chromatogramu, který obsahuje příslušné izoformy transferinu (a-, mono-, di-, tri-, tetra- a pentasialotransferin). Celková plocha chromatogramu se označuje jako celkový (total) transferin a zastoupení disialotransferinu je vyjádřeno v relativních dílech. (21)

### 4.6.2 Metoda kapilární elektroforézy ve volném roztoku systém MINICAP

Molekuly s elektrickým nábojem jsou tříděny podle elektroforetické pohyblivosti v alkalickém tlumivém roztoku při určitém pH. Toto třídění závisí i na pH elektrolytu a elektroosmotickém toku. Systém MINICAP má dvě kapiláry v paralelním uspořádání, což umožňuje provádět dvě paralelní analýzy pro kvantifikaci CDT. Vzorek je zředěn specifickým ředícím roztokem a aplikován pomocí aspirace na anodovém konci kapiláry. Následuje vysokonapěťové třídění bílkovin s přímým detekováním při 200nm na katodovém konci kapiláry. Kapiláry jsou ihned promývány čistícím roztokem a následně opláchnuty tlumivým roztokem, aby byly připraveny k další analýze. Isoformy transferinu jsou pomocí pufru s alkalickým pH detekovány v následujícím pořadí: penta-, tetra-, tri-, di a asialotransferin. Množství CDT je získáno pomocí metody kalibrované na referenční hodnotu (HPLC) se nazývá CDT<sub>IFCC</sub>. Výsledek disialotransferinu s chromatogramu je přepočítán na CDT<sub>IFCC</sub> jehož hodnota se následně vydává. (22)

## 4.7 Stanovení etylglukoronidu

Etyl glukoronid je přímý metabolit etanolu, který vzniká enzymatickým spojením etanolu s kyselinou glukuronovou. Alkohol v moči je obvykle detekovatelný pouze několik hodin, zatímco EtG může být detekován až několik dní, i po úplném vyloučení alkoholu z těla. V současné době se EtG měří pomocí plynové chromatografie a kapalně chromatografie. (23)

### 4.7.1 Měření pomocí DRI etyl glukoronid assay

Měření etylglukuronidu pomocí DRI ethyl glucuronide assay je založeno na principu homogenního imunostanovení (EIA), které využívá soutěž mezi EtG, označeným glukoso-6-fosfát dehydrogenázou, a volným EtG ve vzorku moče o místa na specifických protilátkách proti EtG. V nepřítomnosti volného EtG ve vzorku moče se specifická protilátka váže na EtG označený G6PDH. Tím dochází ke snížení aktivity enzymu a tedy i ke snížení tvorby redukované formy NADH. Absorbance je měřena spektrofotometrickou kinetickou metodou. Nárůst enzymatické aktivity G6PDH je úměrný koncentraci volného EtG ve vzorku moče. (23)

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

Cílem této bakalářské práce je porovnat a vyhodnotit data získaná z měření probíhajícího na ÚKBH FN Plzeň za rok 2023.

Před samotným zhodnocením dat bylo mým úkolem nastudovat tematiku týkající se abusu alkoholu a to nejen metabolismu alkoholu, akutní a chronickou intoxikací, ale i stanovení nebo patologií, které s nimi souvisejí.

## **5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE**

### **5.1 Hlavní cíl**

Hlavním cílem bylo statisticky vyhodnotit a porovnat data shromážděná na ÚKBH za rok 2023 vzhledem k celorepublikovým trendům užívání alkoholu.

### **5.2 Dílčí cíle**

1. Vyhodnotit kazuistiky u pacientů, jejichž vzorky byly naměřeny na ÚSL FN Plzeň a na ÚKBH FN Plzeň.
2. Dílčí cíl je seznámit se s metodami na stanovení abusu alkoholu a přístrojovým vybavením laboratoře a základní statistikou.

## **6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

První výzkumná otázka: Jaké je srovnání dat z laboratoře ÚKBH s celostátním trendem užívání alkoholu?

Druhá výzkumná otázka: Jaký je posudek na kazuistiku?

## 7 METODIKA PRÁCE

Zpracovala jsem data z Ústavu klinické biochemie a hematologie FN Plzeň. Stanovení etanolu probíhalo na analyzátoru Cobas 8000 od firmy Roche. Etylglukuronid se měřil na analyzátoru AU480 od firmy Beckman Coulter. Hodnota CDT se stanovila v systému MINICAP od firmy Sebia.

Dále jsem vyhodnocovala vzorky a kazuistiky poskytnuté z ÚSL FN Plzeň. Na ÚSL byly hodnoty etanolu měřeny na plynovém chromatografu Thermo Trace 1310 s autosamplerem Thermo TriPlus 300. Následně byly vzorky zamrazeny a převezeny na ÚKBH, kde jsem měřila hodnoty etanolu, AST, ALT, GGT, CDT, EtG. Hodnoty etanolu, AST, ALT, GGT byly měřeny na analyzátoru Cobas 8000 od firmy Roche, CDT v systému MINICAP od firmy Sebia a EtG na analyzátoru AU 480 od firmy Beckman Coulter.

### 7.1 Stanovení etanolu metodou plynové chromatografie

TriPlus 300 Headspace je automatický vzorkovač pro plynovou chromatografii s cílem stanovit koncentraci těkavých látek v kapalných nebo pevných matricích. Používá techniku headspace, kde jsou vzorky umístěny do těsně uzavřených skleněných lahvíček. Lahvička je zahřáta a těkavé látky jsou převedeny z kapalného vzorku do plynné fáze nad ním tzv. headspace, dokud není dosaženo stavu termodynamické rovnováhy.

Po zplynění vzorku v ohřívaném dávkovači jsou páry jednotlivých složek směsi přenašeny nosným plynem do ohřívané kolony. Během průchodu kolonou dochází k separaci těchto složek v souladu s principy adsorpční nebo rozdělovací chromatografie, v závislosti na materiálu použitého pro náplň kolony. Oba tyto případy reprezentují sloupcovou chromatografii, kde nosným médiem je dusík. Separované složky opouštějí kolonu a jsou detekovány detektorem, který je propojen se zapisovačem. Grafický záznam známý jako chromatogram, je poté podroben vyhodnocení. (18)

#### 7.1.1 Postup měření

Před provedením série analýz, musí být vždy ověřena funkčnost přístroje.

**Analýza vzorku:** 200 $\mu$ l vzorek s obsahem stanovované látky + 200 $\mu$ l terciární butanol (0,47g/L)

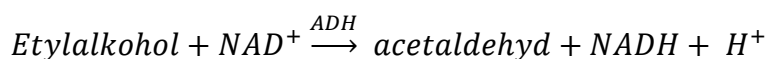
**Analýza testovací směsi:** 100µl směsného vzorku (směs těkavých látek – metanol, etanol, isopropanol, n-propanol) + 100µl roztoku toluenu + 200µl terciárního butanolu (0,47g/L)

**Analýza negativního vzorku:** 200µl destilované vody + 200µl terciárního butanolu (0,47g/L)

Dále už se měří vzorek séra, moči nebo sliziny. Do baničky dáme 200µl vzorku + 200µl terciárního butanolu (0,47g/L).

## 7.2 Stanovení etanolu enzymatickou metodou s alkoholdehydrogenázou

Princip testu je následující: Etylalkohol a NAD jsou pomocí alkoholdehydrogenázy (ADH) přeměněny na acetaldehyd a NADH. NADH vytvořená během reakce je přímo úměrná koncentraci etylalkoholu a je měřena fotometricky jako změna v absorbanci. (24)



### 7.2.1 Složení reagensů v testu

**R1:** pufr, konzervanty

**R2:** NAD (kvasinky) :  $\geq 3$  mmol/L

ADH (EC 1.1.1.1; kvasinky; 25°C):  $\geq 617\mu\text{kat/L}$  (37 U/ml)

Stabilizátory

Konzervanty

Reagencie jsou připraveny k použití. Mohou být vloženy přímo v analyzátoru v chlazeném prostoru po dobu až 12 dní. Reagencie jsou skladovány při teplotě 2-8 °C do uvedené doby spotřeby. (24)

### 7.2.2 Odběr vzorku a příprava

Odběr se provádí z žíly z loketní jamky. Na místě vpichu se nesmí použít dezinfekce s obsahem alkoholu či jiné prchavé látky. Pro dezinfekci je vhodný například Zephiran, bodný merthiolát nebo povidon jód. Odběr se provádí do zkumavek pro sérum či plazmu s K<sub>2</sub>-EDTA či Li-heparin, kdy stabilita vzorku je 2 dny při 35 °C, 2 týdny při 5 °C a 4 týdny při -15 °C. Při odběru do zkumavek s NaF/Na<sub>2</sub>EDTA a NaF/K-Oxalát je stabilita plazmy 2 týdny při 25 °C, 3 měsíce při 5 °C a 6 měsíců při -15 °C. (24)

Moč je stabilní 30 dní při 4 °C měla by se uchovávat v pevně uzavřených zkumavkách. Vzorek by neměl být opakovaně zmrazován a rozmrazován. Povolen je jeden cyklus zmrazení a rozmrazení, stabilita vzorku při zmrazení na -20 °C je 3 měsíce.

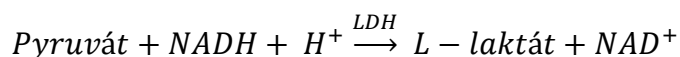
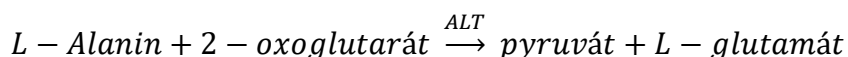
### 7.2.3 Omezení – interference

U séra/plazmy nebyly zjištěny žádné významné interference. Pouze ve zvláštních případech může gamapatie, především typu IgM způsobit nespolehlivé výsledky.

U testování moče též nevznikají významné interference. Pouze moč obsahující cukry kontaminovaná mikroorganismy může vzhledem k fermentaci cukru na alkohol poskytovat falešně pozitivní výsledky. (24)

## 7.3 Stanovení ALT s aktivací pyridoxalfosfátem

Princip spočívá v tom, že ALT katalyzuje reakci mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem. Vytvářený pyruvát je tak redukován NADH v reakci katalyzované laktátdehydrogenázou na L-laktát a NAD<sup>+</sup>. Pyridoxalfosfát slouží jako koenzym při přenosu aminoskupiny v reakci. Zajišťuje úplnou aktivaci enzymů. Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě ALT. Stanovuje se měřením poklesu absorbance při vlnové délce 340nm. (25)



### 7.3.1 Složení reagensie v testu

**R1:** TRIS pufr: 224 mmol/L, pH7,3 (37°C)

L-alanin 1120 mmol/L

Albumin (hovězí) 0,25%

LDH (mikroorganismy)  $\geq 45\mu\text{kat/L}$

Stabilizátory

Konzervanty

**Nádobka:** pyridoxalfosfát 730 $\mu\text{mol/L}$

**R3:** 2-Oxoglutarát 94mmol/L

NADH  $\geq 1,7$  mmol/L



Aditiva

Konzervanty

Nádobka obsahující pyridoxalfosfát se musí spojit pomocí adaptéru s nádobkou R1 a opatrně promíchat. Obsah nádobky se následně musí přemístit do nádobky R1.

Doba skladování reagensů je při teplotě 2-8 °C do doby spotřeby. Mohou být při použití v chlazeném prostoru analyzátoru až 2 týdny. (25)

### **7.3.2 Odběr a příprava vzorku**

Odebírá se plná žilní krev do zkumavky Li- heparin či K<sub>2</sub>-EDTA. Vzorky se musí po přijetí centrifugovat. Stabilita plazmy/séra je poté 3 dny při 15-25 °C, 7 dní při 2-8 °C a více jak 7 dní při -60 až -80 °C. (25)

### **7.3.3 Omezení – interference**

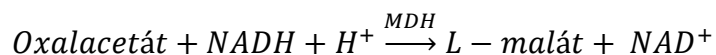
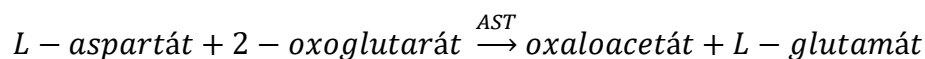
U měření séra/plazmy nebyly zjištěny žádné významné interference u ikteru a hemolýzy. Když je vzorek kontaminovaný erytrocyty zvýší výsledky, protože hladina analytu v erytrocytech je vyšší než v normálním séru. Úroveň interference může kolísat v závislosti na obsahu analytu v lyzovaných erytrocytech. (25)

Lipemické vzorky mohou způsobit označení >Abs v tomto případě se musí zvolit zacházení s naředěným vzorkem pro automatický rerun.

Při užívání běžných léčiv a terapeutických koncentracích nebyla zjištěna žádná interference. Výjimkou jsou Dobesilát vápenatý, který může způsobit uměle nízké výsledky ALT. Cyanokit též může ovlivnit výsledky. Fyziologické koncentrace sulfasalazinu nebo sulfapyridinu v plazmě mohou vést ke špatným výsledkům. Ve vzácných případech může gamapatie typu IgM způsobit nespolehlivé výsledky. (25)

## **7.4 Stanovení AST s aktivací pyridoxalfosfátem**

Metoda je založena na principu, že AST ve vzorku katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem za tvorby oxalacetátu a L-glutamátu. Oxalacetát poté reaguje s NADH v přítomnosti malátdehydrogenázy a vytváří NAD<sup>+</sup>. Pyridoxalfosfát slouží jako koenzym při přenosu u amino skupiny v reakci. Zajišťuje úplnou aktivaci enzymů. Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě AST a stanovuje se měřením poklesu absorbance při vlnové délce 340nm. (26)



#### 7.4.1 Složení reagensů v testu

**R1:** TRIS pufr: 264 mmol/L, pH 7,8 (37°C)

L-alanin 792 mmol/L

LDH (mikroorganismy)  $\geq 24 \mu\text{kat/L}$

LDH (mikroorganismy)  $\geq 48 \mu\text{kat/L}$

Albumin (hovězí) 0,25%

Stabilizátory

**Nádobka:** pyridoxalfosfát 730  $\mu\text{mol/L}$

**R3:** 2-Oxoglutarát 94 mmol/L

NADH  $\geq 1,7 \text{ mmol/L}$

Aditiva

Konzervanty

Nádobka obsahující pyridoxalfosfát se musí spojit pomocí adaptéru s nádobkou R1 a opatrně promíchat. Obsah nádobky se následně musí přemístit do nádobky R1. (26)

Doba skladování reagensů je při teplotě 2-8 °C do data spotřeby. Mohou být při použití v chlazeném prostoru analyzátoru až 2 týdny.

#### 7.4.2 Odběr vzorků a příprava

Odebírá se plná krev do zkumavky Li- heparin či K<sub>2</sub>-EDTA. Vzorky se musí po přijetí centrifugovat. Stabilita plazmy/séra je poté 4 dny při 20-25 °C, 7 dní při 4-8 °C a 3 měsíce při -20°C. (26)

#### 7.4.3 Omezení – interference

U měření séra/plazmy nebyly zjištěny žádné významné interference u ikteru a hemolýzy. Když je vzorek kontaminovaný erytrocyty zvýší výsledky, protože hladina analytu

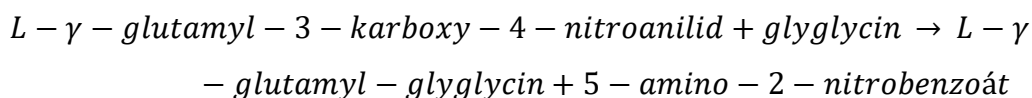
v erythrocytech je vyšší než v normálním séru. Úroveň interference může kolísat v závislosti na obsahu analytu v lyzovaných erythrocytech.

Lipemické vzorky mohou způsobit označení >Abs v tomto případě se musí zvolit zacházení s naředěným vzorkem pro automatický rerun.

Při užívání běžných léčiv a terapeutických koncentracích nebyla zjištěna žádná interference. Výjimkou jsou Dobesilát vápenatý, který může způsobit uměle nízké výsledky ALT. Cyanokit též může ovlivnit výsledky. Fyziologické koncentrace sulfasalazinu nebo sulfapyridinu v plazmě mohou vést ke špatným výsledkům. Ve vzácných případech může gamapatie typu IgM způsobit nespolehlivé výsledky. (26)

## 7.5 Stanovení GGT pomocí enzymatického kolorimetrického testu

$\gamma$ -glutamyltransferáza přenáší  $\gamma$ -glutamylovou skupinu L- $\gamma$ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu na glyglycin. Množství uvolněného 5-amino-2-nitrobenzoátu je přímo úměrné aktivitě GGT ve vzorku. Stanovuje se fotometricky měřením nárůstu absorbance. (27)



### 7.5.1 Složení reagensů v testu

**R1:** TRIS: 492mmol/L, pH 8,25

Glyglycin 492mmol/L

Konzervanty

Aditiva

**R2:** L- $\gamma$ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid 22,5 mmol/L

Acetát 10 mmol/L

Konzervanty

Stabilizátor

Reagencie jsou připraveny k použití rovnou v tekutém stavu. GGT-2 se skladuje při teplotě 2-8°C do doby expirace. Při použití musí být umístěny v chlazeném prostoru a mohou tam být po dobu dvou týdnů. (27)

### 7.5.2 Omezení a interference

U séra/plazmy nebyly zjištěny žádné významné interference. Pouze ve zvláštních případech může gamapatie, především typu IgM způsobit nespolehlivé výsledky. (27)

## 7.6 Stanovení CDT pomocí systému MINICAP

MINICAP CDT 8,8 provádí rozdělení isoform transferinu lidského séra v alkalickém pufru. Isoformy transferinu normálního séra se rozdělují na 5 hlavních frakcí: asialotransferin, disialotransferin, trisialotransferin, tetrasialotransferin a pentasialotransferin. Málo sializované isoformy vytváří CDT, které je markerem chronického abusu alkoholu.

Systém MINICAP funguje na principu kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Má dvě kapiláry v paralelním zapojení, které umožňuje, aby probíhaly dvě paralelní analýzy pro kvantifikaci CDT. Ředění vzorku specifickým ředícím roztokem probíhá na konci anodové kapiláry. Poté probíhá vysokonapětové dělení bílkovin a jejich přímá detekce při 200 nm na katodovém konci kapiláry. Přímá detekce slouží k přesnému kvantitativnímu určení jednotlivých frakcí CDT.

Kapiláry jsou následně ihned promývány promývacím roztokem a poté promyty tlumivým roztokem. Pomocí pufru se zásaditým pH jsou isoformy transferinu detekovány v pořadí: asialotransferin, disialotransferin, trisialotransferin, tetrasialotransferin a pentasialotransferin. (22)

### 7.6.1 Analýza výsledku

Na závěr analýzy je relativní kvantifikace isoform transferinu provedena automaticky a profily mohou být analyzovány. Systém vypočte koncentraci v procentech každé frakce. Na elektrofotometrickém záznamu jsou vypočítáním hodnot překresleny křivky isoformy transferinu s výjimkou asialotransferinu. Výsledkem je chromatogram.

Normální chromatogram = modře zbarven ( $CDT_{IFCC} \leq 1,7$ )

Atypický chromatogram = růžově zbarven

Patologický chromatogram = oranžově zbarven (takto zbarven i neprůkazný výsledek, tj. rozmezí  $CDT_{IFCC}$  od 1,8 do 2)

Pokud bude u pozitivního chromatogramu vykřičník v kroužku, chromatogram obsahuje i složku asialotransferinu. Ta je přítomna u silně pozitivních vzorků. (22)

## 7.7 Stanovení etylglukuronidu pomocí DRI ethyl glucuronide assay

Meření etylglukuronidu pomocí DRI ethyl glucuronide assay je měření na principu homogenní imuno stanovení (EIA), které je založeno na soutěži mezi EtG, který je značený glukoso-6-fosfát dehydrogenázou a volným EtG ve vzorku moče o místa na specifické protilátce proti EtG. V nepřítomnosti volného EtG ve vzorku moče se specifická protilátka váže na EtG značený glukózou fosfát 6 dehydrogenázou. Vazbou specifické protilátky dochází ke snížení aktivity enzymu a tím i ke snížení tvorby redukované formy NADH. Absorbance je měřena spektrofotometricky kinetickou metodou. Nárůst enzymatické aktivity G6PDH je úměrný koncentraci volného EtG ve vzorku moče. (23)

### 7.7.1 Odběr vzorku a skladování

Čerstvá moč je dodávána ve zkumavce z plastu nebo skla je stabilní po 7 dní při teplotě 2-8°C.

### 7.7.2 Složení reagensů v testu

**R1:** myší monoklonální anti-etylglukuronid protilátka

Glukozo-6-fosfát

Nikotin adenin dinukleotid v tris pufru s azidem sodným

**R2:** glukuronid značený glukozo-6-fosfát dehydrogenázou

Obě reagensie se skladují v ledničce o teplotě 2-8°C a do analyzátoru se vkládají před použitím. (23)

### 7.7.3 Omezení a interference

V některých případech může docházet k tvorbě EtG již v odebraném vzorku moče pokud je moč infikovaná E.coli nebo obsahuje etanol vzniklý fermentací ve vzorku moči diabetiků. Tato falešná pozitivita se může více projevit při nesprávném uchování vzorku. Může, vzniknou falešná negativita při bakteriální hydrolýze etylglukuronidu. (23)

## 8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Během celého roku 2023 proběhl sběr dat na ÚKBH FN Plzeň v souvislosti s abusem alkoholu a aktuální hladinou alkoholu v krvi. V souboru jsou zahrnuti všichni pacienti, u kterých bylo požadováno stanovení etanolu v krvi, etylglukuronidu v moči a CDT v séru.

Dohromady byl vznesen požadavek na 4595 vyšetření u 1638 žen a u 2957 mužů. Reálně bylo provedeno 3066 (68%) testů na etanol, 313 (7%) na CDT a 1105 (25%) na etylglukuronid. Kdy nejmladší vyšetřený pacient měl 3 roky a nejstarší 97 let

Stanovení etanolu v séru nebo plazmě je rutinním vyšetřením na ÚKBH. Jedná se o enzymovou metodu, jejíž odezva trvá v rutinně 4h, jako statim 2h. Během roku 2023 bylo vzneseno 3119 požadavků na stanovení alkoholu, provedených vyšetření bylo pak 3066. Z tohoto uvedeného čísla bylo 1328 pozitivních v rozpětí od 0,2 až do vyšší 5 g/L alkoholu. Z toho bylo 343 (tj. 30%) pozitivních žen v rozpětí 0,2 až do vyšší než 5 g/L alkoholu od věku 12 až 89 let. Pozitivních mužů bylo 985 (70%) v rozpětí 0,2 až do vyšší než 5 g/L alkoholu od věku 14 do 97 let.

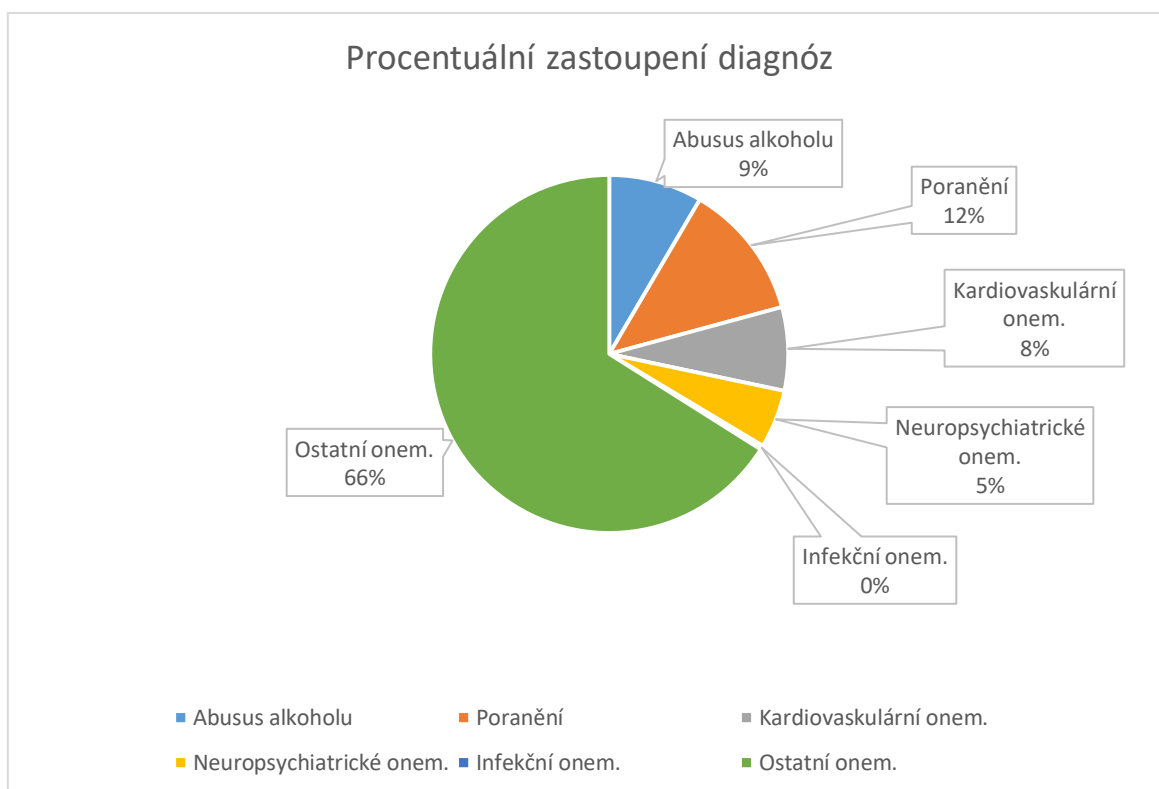
Etylglukuronid je minoritním metabolitem etanolu, který vzniká glukuronidací v játrech. V moči může být detekován po dobu následujících cca 24h po požití již 16g alkoholu. Je to velmi citlivý ukazatel, který se hodí pro kontrolu abstinence a pro diagnostiku chronického abúzu alkoholu. Na ÚKBH provádějí toto měření jako rutinní. Jedná se o enzymovou metodu, jejíž odezva trvá jeden týden. Během roku 2023 bylo vzneseno 1148 požadavků na stanovení etylglukuronidu, provedených vyšetření bylo následně 1105. Z tohoto uvedeného čísla bylo provedeno vyšetření u 570 mužů od 16 do 85 let, z toho patologickou hodnotu nad 2 mg/L mělo 51 mužů. U žen bylo toto vyšetření provedeno 535 pacientkám od 15 do 81 let, z toho mělo patologickou hodnotu nad 2 mg/L 38 žen.

CDT neboli karbohydrát deficientní transferin je marker abusu alkoholu. Při chronické středně až těžce zvýšené spotřebě etanolu (50-80g alkoholu na den po dobu 2-3 týdnů) se zvyšuje podíl CDT. Stanovení CDT v séru je rutinním vyšetřením na ÚKBH. Jedná se o kapilární elektroforézu, která je prováděna jednou za 14 dní. Během roku 2023 bylo vzneseno 341 požadavků na stanovení CDT a z toho bylo provedených 313 vyšetření. Z tohoto uvedeného čísla se jednalo o 191 mužů ve věkovém rozpětí 18-88 let, z toho patologickou hodnotu nad 0,02 mělo 40 mužů. U žen bylo provedeno 122 vyšetření a věkové rozpětí bylo od 14 do 91 let, z toho patologickou hodnotu nad 0,02 mělo 24 žen.

## 9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 9.1 Rozbor dat z ÚKBH

Na začátku vyhodnocení jsem soubor porovnávala vzhledem k diagnózám. Roztřídila jsem ho do 6 skupin. První skupina obsahuje diagnózy spojené s užíváním alkoholu a celkově s abusem alkoholu jako je např. alkoholická cirhóza jater, poruchy způsobené alkoholem, toxický účinek etanolu, nemoc jater, ztučnění jater, bezvědomí aj. Do druhé skupiny jsem zařadila poranění, jako jsou zlomeniny pohmožděniny, otřesy mozku atd. Třetí skupina obsahuje Kardiovaskulární onemocnění, jako jsou akutní infarkt myokardu, mozkový infarkt, hypertenze, srdeční zástavy, bolesti na hrudi, cévní mozkovou příhodu atd. Čtvrtá skupina je zaměřená na onemocnění neuropsychiatrické, jako například deprese, schizofrenie, bipolární porucha atd. Pátá skupina jsou infekční onemocnění jako tuberkulóza, toxoplazmóza a virová hepatitida. Šestá skupina jsou ostatní onemocnění jako absces řiti a svrab, astma převážně alergické, horečka, sledování pro neznámý patologický stav atd. Pro lepší přehled jsem jejich procentuální zastoupení vložila do grafu číslo 1.



Graf 1 – Procentuální zastoupení diagnóz

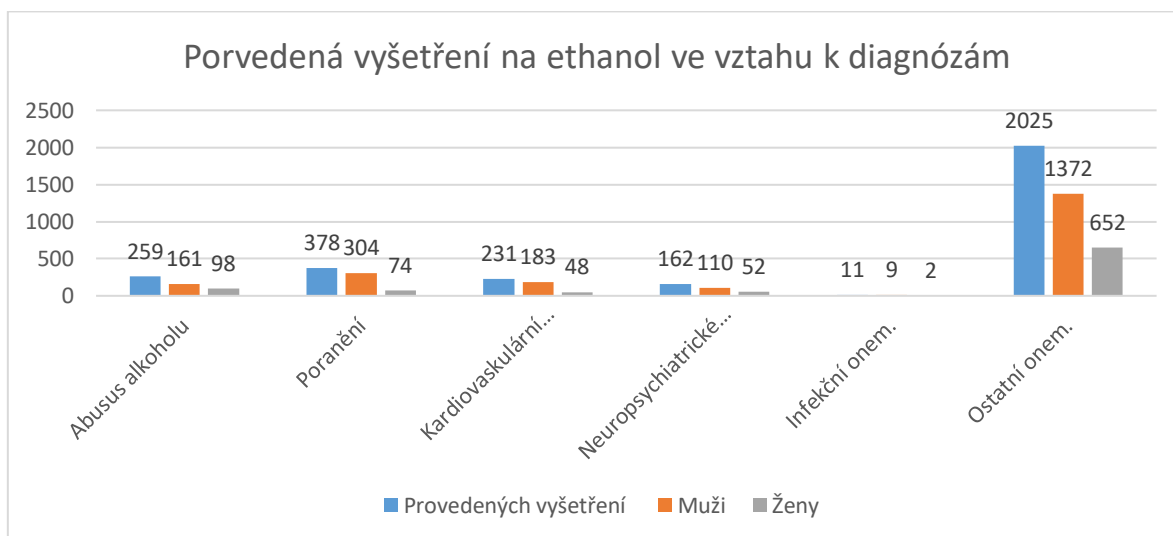
Soubor dat jsem roztřídila dle diagnóz do tabulky číslo 2. Tato tabulka uvádí počty provedených vyšetření a pozitivních výsledků etanolu v souvislosti s druhy zdravotních

stavů včetně abusu alkoholu, zranění, kardiovaskulárních onemocnění, neuropsychiatrických onemocnění, infekčních onemocnění a ostatních onemocnění. Uvedeny jsou celkové počty a podrobné rozdělení mezi muži a ženami.

K uvedené tabulce jsem vytvořila dva grafy. První zobrazuje porovnání počtu provedených vyšetření etanolu celkem, u mužů a u žen v různých kategoriích zdravotních stavů. Druhý graf znázorňuje porovnání počtu pozitivních testů na etanol celkem, u mužů a u žen v různých kategoriích zdravotních stavů. Z tabulky a grafů je patrné, že počet provedených vyšetření je vyšší než počet pozitivních vyšetření, což naznačuje, že většina vyšetřovaných osob neměla detekovanou hladinu etanolu. Dále je můžeme vidět, že ve všech kategoriích dominují muži nad ženami.

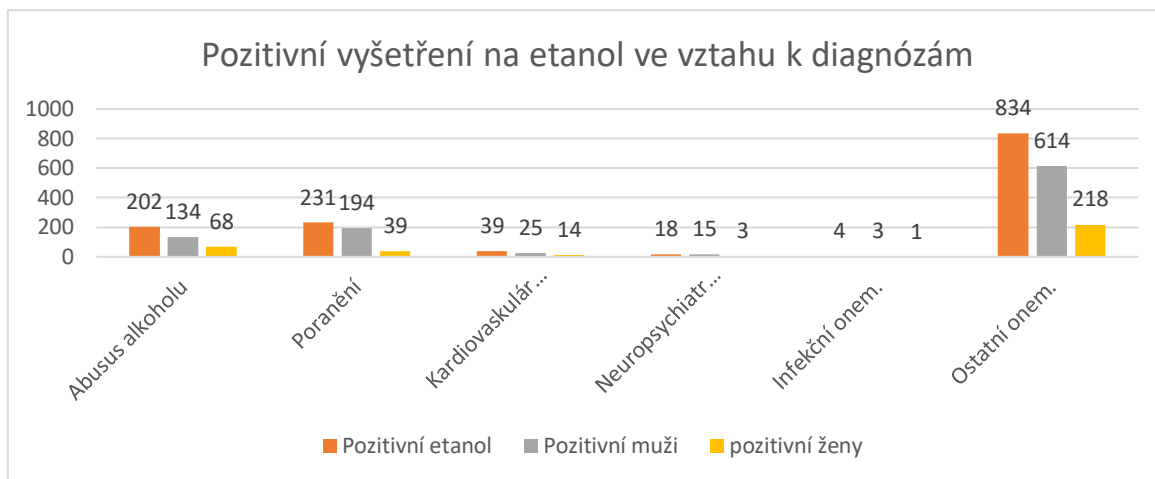
	Abusus alkoholu	Zranění	Kardiovaskulární onem.	Neuropsychiatrické onem.	Infekční onemo.	Ostatní
Provedených vyšetření	259	378	231	162	11	2025
Muži	161	304	183	110	9	1372
Ženy	98	74	48	52	2	652
Pozitivní etanol	202	231	39	18	4	834
Pozitivní muži	134	194	25	15	3	614
Pozitivní ženy	68	39	14	3	1	218

Tabulka 2 – Počty provedených vyšetření a pozitivních výsledků v souvislosti s diagnózami



Graf 2 – Provedená vyšetření na ethanol ve vztahu k diagnózám





Graf 3 – Pozitivní vyšetření na etanol ve vztahu k diagnózám

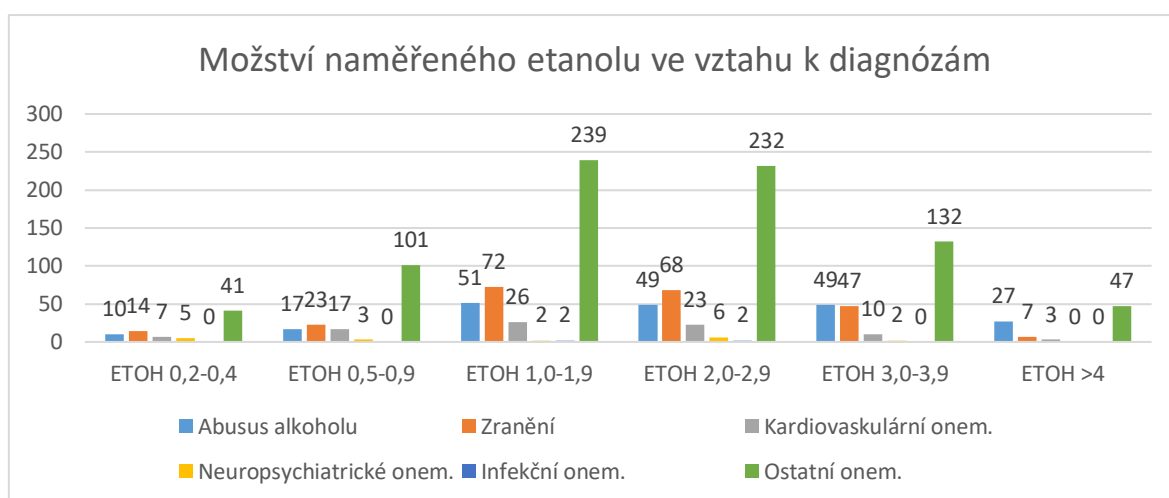
Tabulka číslo tři obsahuje informace o počtech pacientů v různých kategoriích zdravotního stavu. Každý řádek odpovídá určitému rozmezí hladiny etanolu v krvi (promile), který je popsán v kapitole 2.8, zatímco každý sloupec odpovídá konkrétnímu druhu diagnózy. Jednotlivé buňky obsahuje počet pacientů. S třetí tabulkou souvisí i tabulka číslo čtyři, kde jsou rozděleny počty pacientů na muže a ženy. K tabulce číslo tři jsem udělala vypovídající graf číslo 4. Graf zobrazuje porovnání počtu pacientů v různých kategoriích zdravotního stavu v závislosti na rozmezí hladiny etanolu v krvi. Na osách grafu jsou na ose x uvedeny různé kategorie zdravotního stavu, zatímco na ose y je uveden počet pacientů. Jednotlivé sloupce grafu reprezentují zastoupení pacientů v kategoriích diagnóz, které jsou od sebe odlišeny barvou. Graf poskytuje vizuální porovnání počtu pacientů v jednotlivých kategoriích diagnóz v závislosti na hladině etanolu v krvi. Z grafu je patrné, že nejvíce zastoupeným rozmezím je hladina etanolu mezi 1,0 až 1,9 promile, po ní 2,0 až 2,9 promile. Z tabulky číslo čtyři vidíme, že ve všech kategoriích diagnóz dominují muži.

Rozmezí [%o]	Abusus alkoholu	Zranění	Kardiovaskulární onem.	Neuropsychiatrické onem.	Infekční onem.	Ostatní onem.
ETOH 0,2-0,4	10	14	7	5	0	41
ETOH 0,5-0,9	17	23	17	3	0	101
ETOH 1,0-1,9	51	72	26	2	2	239
ETOH 2,0-2,9	49	68	23	6	2	232
ETOH 3,0-3,9	49	47	10	2	0	132
ETOH >4	27	7	3	0	0	47

Tabulka 3 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám

Rozmezí [%]	Abusus alkoholu		Zranění		Kardiovaskulární onem.		Neuropsychiatrická onem.		Infekční onem.		Ostatní onem.	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
ETOH 0,2-0,4	5	5	12	2	7	0	2	3	0	0	30	11
ETOH 0,5-0,9	11	6	17	6	13	4	3	0	0	0	72	29
ETOH 1,0-1,9	29	22	57	15	24	2	2	0	1	1	164	75
ETOH 2,0-2,9	29	20	58	10	17	6	6	0	2	0	167	59
ETOH 3,0-3,9	39	10	42	5	9	1	2	0	0	0	99	33
ETOH >4	21	6	6	1	2	1	0	0	0	0	37	10

Tabulka 4 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám rozděleno na muže a ženy

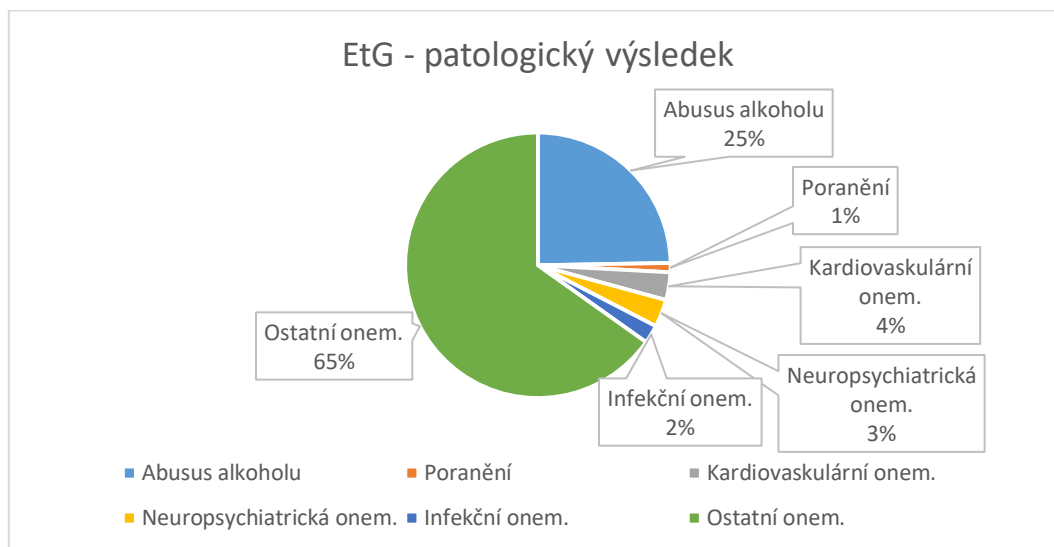


Graf 4 – Množství naměřeného etanolu ve vztahu k diagnózám

Do tabulky číslo 5 jsem rozdělila data na počet provedených vyšetření etylglukuronidu a počet patologických výsledků EtG v závislosti na různých diagnózách. Z tabulky můžeme vyčíst, že nejvíc provedených vyšetření bylo spojeno s abusem alkoholu, ale nejvíc patologických nálezů bylo spojeno s ostatními onemocněními. K tabulce jsem vyhotovila graf číslo 5, který nám ukazuje procentuální zastoupení patologických výsledků v jednotlivých diagnózách. Můžeme v grafu vidět, že je opravdu 65% patologických výsledků v ostatních diagnózách oproti tomu v diagnózách spojených s abusem alkoholu je 25% patologických výsledků.

	Abusus alkoholu	Poranění	Kardi- ovaskulární onem.	Neuropsychiatrická onem.	Infekční onem.	Ostatní onem.
EtG - počet vy- šetření [mg/L]	749	3	20	28	8	297
EtG - patologický výsledek [mg/L]	22	1	3	3	2	58

Tabulka 5 – Počet provedených vyšetření na EtG a počet patologických výsledků ve vztahu k diagnózám



Graf 5 – Procentuální zastoupení patologických výsledků vzhledem k diagnózám

Dále jsem do tabulky číslo 6 rozdělila provedená vyšetření na EtG a patologické výsledky na EtG na muže a ženy ve vztahu k jednotlivým diagnózám. Zde můžeme vidět, že ve všech kategoriích dominují muži, jak u počtu vyšetření, tak u patologických výsledků. Největší počet mužů i žen je v diagnóze týkající se ostatních onemocnění.

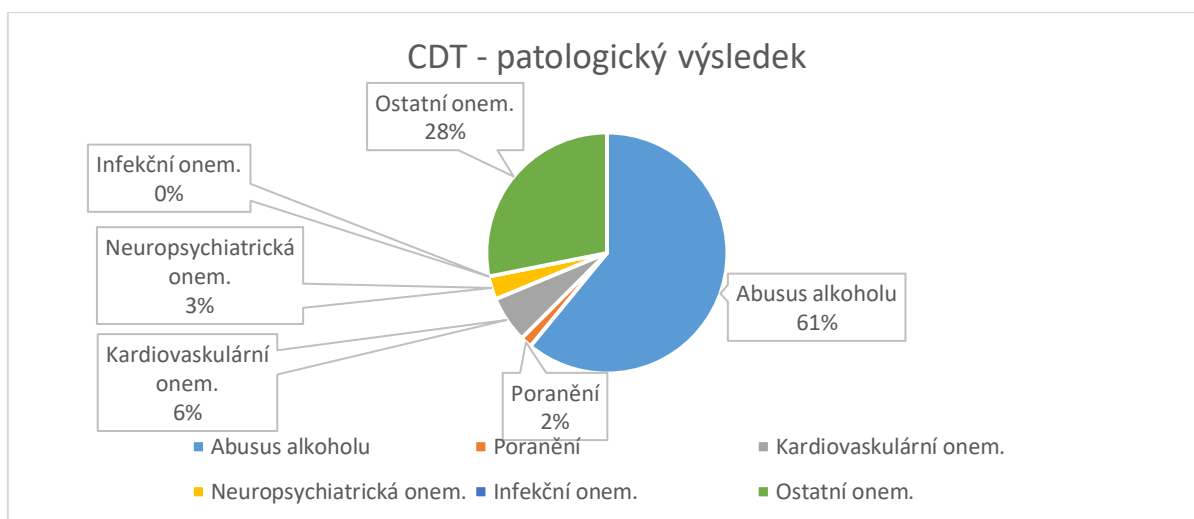
	Abusus al- koholu		Zranění		Kardiovasku- lární onem.		Neuropsychi- atrická onem.		Infekční onem.		Ostatní onem.	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
Počet vyšet. [mg/L]	391	358	2	1	11	9	14	14	4	4	148	149
Patol. výsl. [mg/L]	12	10	1	0	1	2	1	2	1	1	35	23

Tabulka 6 – Vyšetření na EtG a patologické výsledky rozdělené na muže a ženy ve vztahu k jednotlivým diagnózám

Do tabulky číslo 7 jsem rozdělila na počet provedených vyšetření na CDT a počet patologických výsledků u CDT v závislosti na různých diagnózách. Z tabulky je patrné, že nejvíce provedených vyšetření na CDT bylo u diagnóz spojených s abusem alkoholu. Dále i nejvyšší počet patologických výsledků byl spojen s diagnózami spojenými s abusem alkoholu. Reflektuje to fakt, že CDT je marker abusu alkoholu. K tabulce jsem vyhotovila graf číslo 6, kde je procentuální zastoupení patologických výsledků dle diagnóz. Můžeme vidět, že opravdu 61% patologických výsledků je spojených s diagnózami spojenými s abusem alkoholu.

	Abusus alkoholu	Poranění	Kardiovaskulární onem.	Neuropsychiatrická onem.	Infekční onem.	Ostatní onem.
CDT – počet vyšetření	185	2	21	22	2	81
CDT – patologický výsledek	39	1	4	2	0	18

Tabulka 7 – Počet provedených vyšetření a počet patologických výsledků u CDT ve vztahu k diagnózám



Graf 6 – Procentuální zastoupení patologických výsledků CDT u jednotlivých diagnóz

Do tabulky číslo 8 jsem rozdělila provedená vyšetření na CDT a patologické výsledky na CDT na muže a ženy ve vztahu k jednotlivým diagnózám. Můžeme vidět, že ve všech kategoriích, kromě neuropsychiatrických vyšetření dominují muži. U neuropsychiatrických vyšetření je více provedených vyšetření u žen, ale pozitivních je stejně jako mužů. Nejvíce pozitivních bylo mužů u diagnóz spojených s abusem alkoholu.

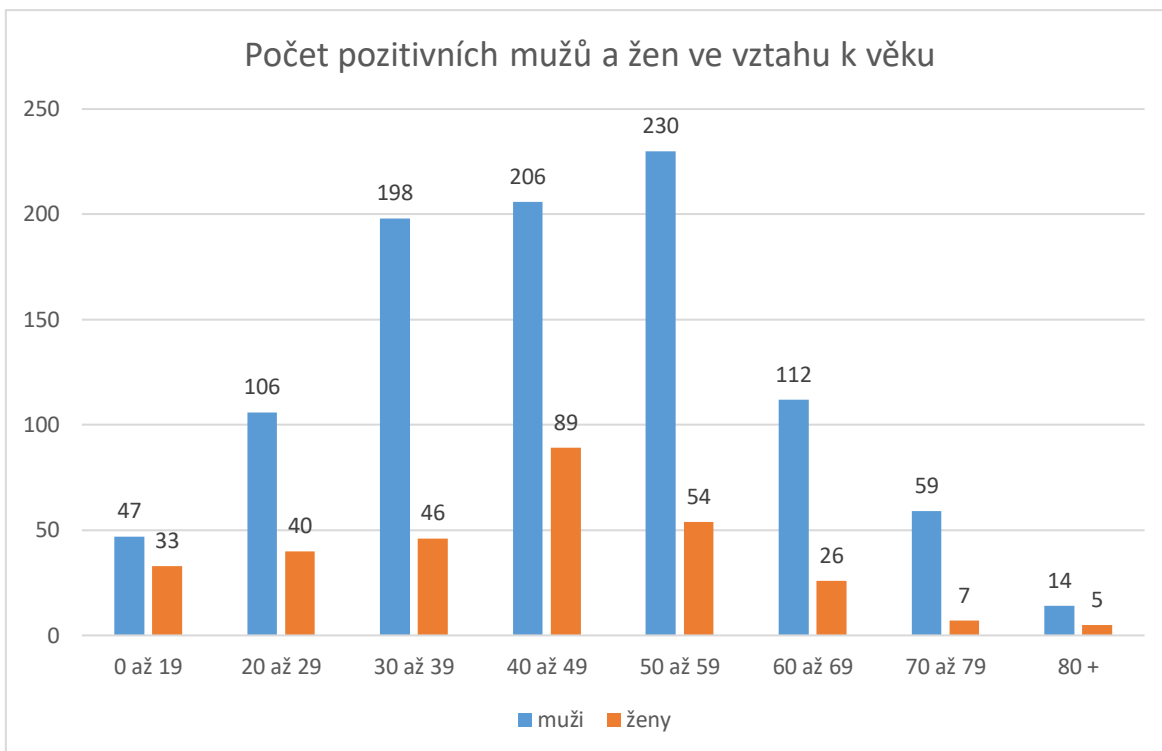
	Abusus al-koholu		Zranění		Kardiovaskulární onem.		Neuropsychiatrická onem.		Infekční onem.		Ostatní onem.	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
CDT - počet vyšetření	132	53	2	0	13	8	6	16	1	1	38	44
CDT - patologický výsledek	24	15	1	0	3	1	1	1	0	0	11	7

Tabulka 8 – Vyšetření a patologické výsledky u CDT rozdělené na muže a ženy ve vztahu k diagnózám

Po vyhodnocení celého souboru vzhledem k diagnózám jsem začala řešit data u jednotlivých vyšetření. V tabulce číslo 9, která obsahuje rozdělení jedinců podle věkových skupin. Údaje uvedené ve sloupcích zahrnují rozdělení dle pohlaví jejich procentuální zastoupení z celku a rozmezí, v kterých se pohybovali. Z tohoto rozdělení je patrné, že u mužů je nejvíce zastoupena věková skupina 50-59 let, u žen naopak věková skupina 40-49 let. Nejméně se mužů vyskytovalo ve skupině nad 80 let a u žen v téže skupině. K tabulce jsem vytvořila též graf číslo 7, ve kterém je vidět, že celkově nejdominantnější věkovou skupinou je 40-49 let.

Věkové skupiny	muži	Procenta [%]	Rozmezí		ženy	Procenta [%]	Rozmezí	
0 až 19	47	5	0,3	3	33	11	0,5	2,7
20 až 29	106	11	0,3	>5,0	40	13	0,3	2,7
30 až 39	198	20	0,2	>5,0	46	15	0,3	4,2
40 až 49	206	21	0,2	>5,0	89	30	0,2	4,8
50 až 59	230	24	< 0,2	4,8	54	18	0,2	> 5,0
60 až 69	112	12	0,3	3	26	9	0,4	4,2
70 až 79	59	6	0,3	3,4	7	2	0,4	3,9
80 +	14	1	0,4	3,5	5	2	0,5	2

Tabulka 9 – Počet pozitivních mužů a žen vzhledem k věkovým kategoriím

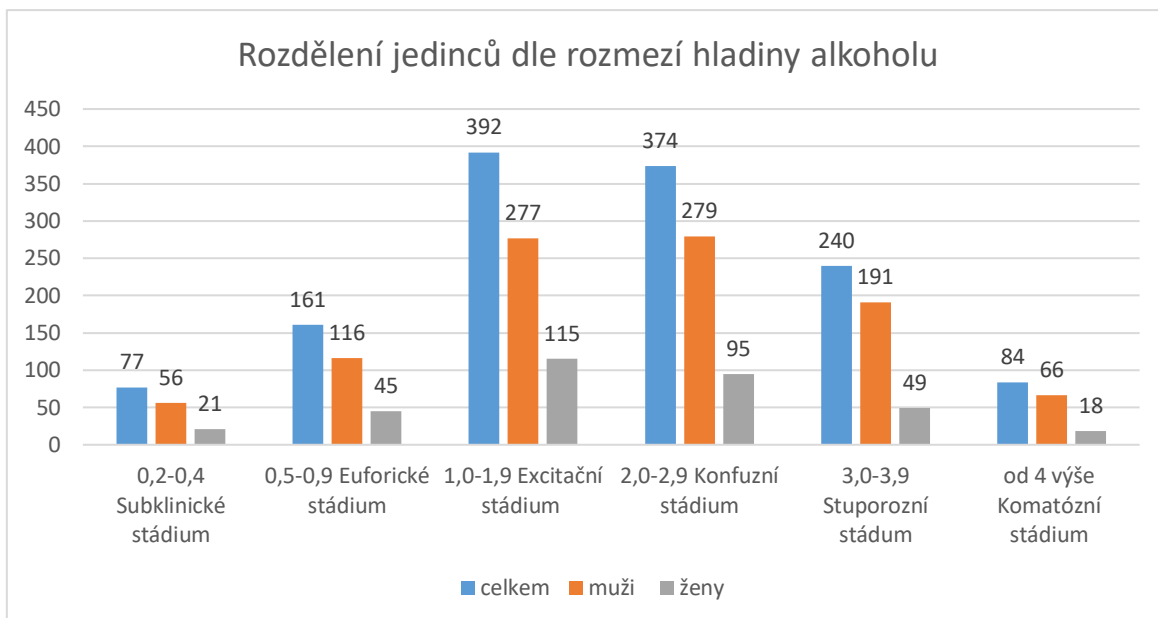


*Graf 7 – Počet pozitivních mužů a žen ve vztahu k věku*

Tabulka číslo 10 prezentuje rozdělení jedinců podle rozmezí hladiny alkoholu v krvi a příslušného stádia intoxikace, která jsou blíže popsána v kapitole 2.8. Uvedené údaje zahrnují celkový počet jedinců v daném rozmezí, procentuální zastoupení a rozdělení dle pohlaví. Z dat je zřejmé, že z celkového počtu je nejvíce jedinců ve skupině excitačního stádia. U mužů je nejvíce jedinců v konfuzním stádiu, žen je nejvíce v excitačním stádiu. Nejméně je jedinců z celkového počtu v subklinickém stádiu. Nejméně mužů je též v subklinickém stádiu a žen v komatózním stádiu. K uvedené tabulce jsem vytvořila graf číslo 8, kde je vidět že celkem nejpočetnější zastoupení je v excitačním stádiu.

Rozmezí [‰]	celkem	Procenta [%]	muži	Procenta [%]	ženy	Procenta [%]
0,2-0,4 Subklinické stádium	77	6	56	6	21	6
0,5-0,9 Euforické stádium	161	12	116	12	45	13
1,0-1,9 Excitační stádium	392	30	277	28	115	34
2,0-2,9 Konfuzní stádium	374	28	279	28	95	28
3,0-3,9 Stuporózní stádium	240	18	191	19	49	14
od 4 výše Komatózní stádium	84	6	66	7	18	5

*Tabulka 10 – Rozdělení jedinců podle rozmezí hladiny alkoholu v krvi*

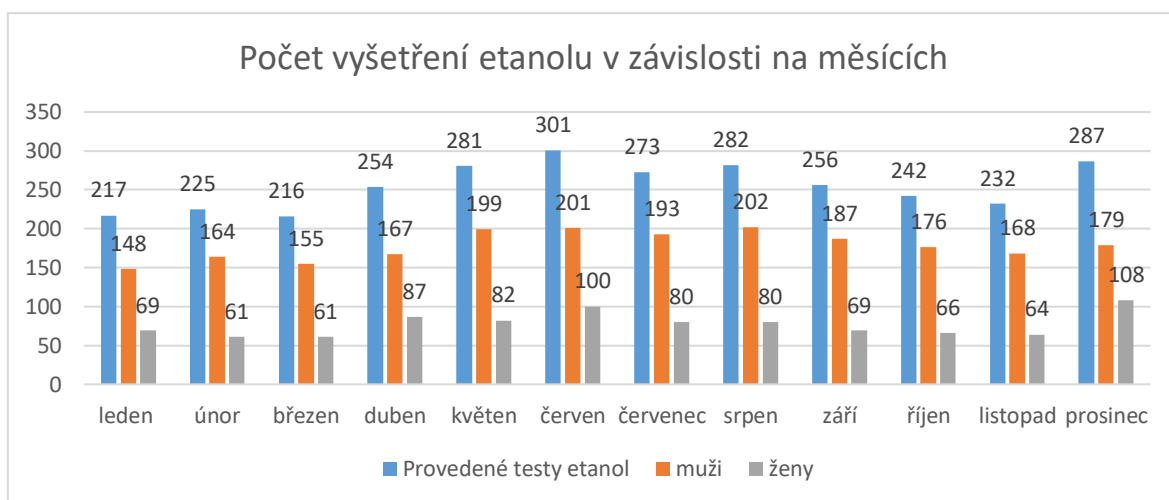


*Graf 8 – Rozdělení jedinců dle rozmezí hladiny alkoholu v krvi*

V tabulce číslo 11 jsou provedené testy etanolu v průběhu měsíců, rozdělené podle pohlaví. Uvedené údaje zahrnují celkový počet provedených testů etanolu pro každý měsíc, a počet testů rozdělených mezi muže a ženy. Celkově bylo nejvíce provedených vyšetření v červnu. U mužů bylo nejvíce provedených vyšetření v srpnu a u žen v prosinci. Nejméně bylo celkem provedených vyšetření v březnu. U mužů bylo nejméně provedených vyšetření v lednu a u žen v únoru a březnu. Data jsem následně shrnula pro lepší orientaci do grafu číslo 9.

Období	Provedené testy etanol	muži	ženy
leden	217	148	69
únor	225	164	61
březen	216	155	61
duben	254	167	87
květen	281	199	82
červen	301	201	100
červenec	273	193	80
srpen	282	202	80
září	256	187	69
říjen	242	176	66
listopad	232	168	64
prosinec	287	179	108

*Tabulka 11 – Testy provedené na etanol celkově u mužů a u žen v průběhu roku*



*Graf 9 – Počet vyšetření etanolu v závislosti na měsících*

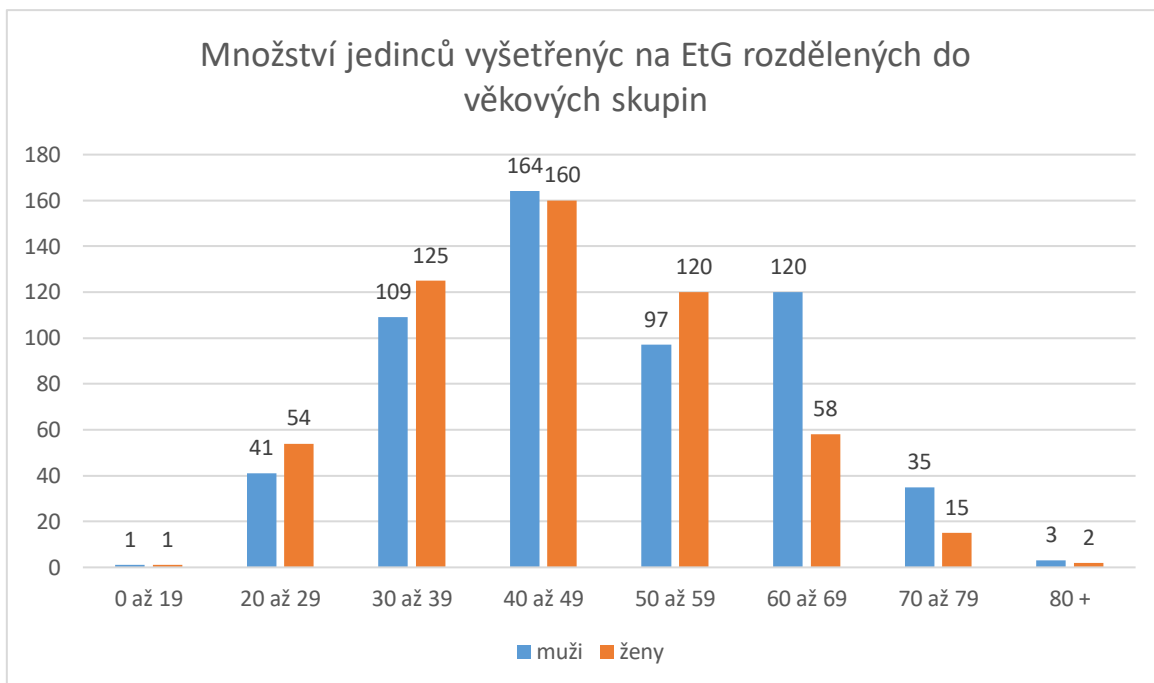
Dále jsem vyhodnotila vyšetření týkající se etylglukuronidu. Jak už jsem zmínila v teoretické části, EtG je velmi citlivý ukazatel abstinence a hodí se pro diagnostiku chronického abusu alkoholu.

Tabulka číslo 12 prezentuje rozdělení jedinců podle věkových skupin a příslušného pohlaví v rámci vyšetření na etylglukuronid. Uvedené údaje zahrnují počet jedinců v každé věkové skupině a procentuální zastoupení, spolu s rozdělením podle rozmezí hladiny etylglukuronidu v moči. Z tabulky je patrné, že největší zastoupení mužů je ve věkové skupině 40 až 49 let, to samé u žen. Data jsem následně shrnula pro lepší orientaci do grafu číslo 10. V grafu vidíme, že je opravdu nejpočetnější skupina 40-49 let.

věkové skupiny	muži	Procenta [%]	Rozmezí		ženy	Procenta [%]	Rozmezí	
			<0,1	>2,0			<0,1	>2,0
0 až 19	1	0,2	0,1		1	0,2	<0,1	
20 až 29	41	7,2	<0,1	>2,0	54	10,1	<0,1	>2,0
30 až 39	109	19,1	<0,1	>2,0	125	23,4	<0,1	>2,0
40 až 49	164	28,8	<0,1	>2,0	160	29,9	<0,1	>2,0
50 až 59	97	17,0	<0,1	>2,0	120	22,4	<0,1	>2,0
60 až 69	120	21,1	<0,1	>2,0	58	10,8	<0,1	>2,0
70 až 79	35	6,1	<0,1	>2,0	15	2,8	<0,1	>2,0
80 +	3	0,5	<0,1	0,6	2	0,4	0,3	>2,0

*Tabulka 12 – Vyšetření na etylglukuronid rozdělený dle věkových skupin a pohlaví*



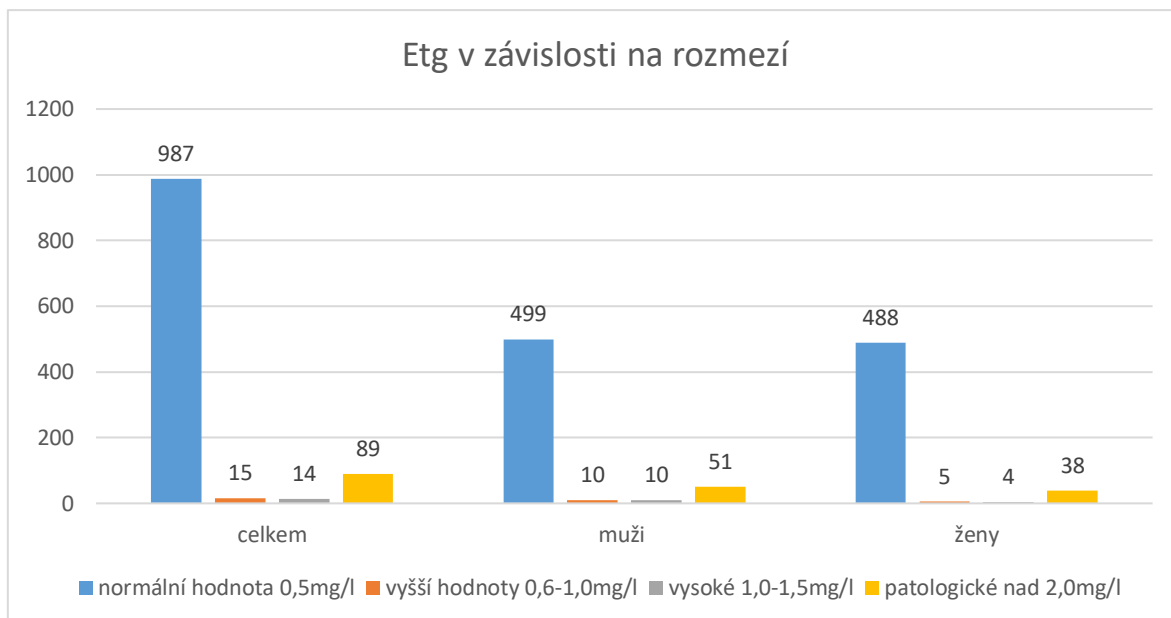


*Graf 10 – Vyšetření na EtG rozdělený dle věkových skupin a pohlaví*

Do tabulky číslo 13 jsem zahrнула data o výsledcích vyšetření na etylglukuronid v různých rozmezích koncentrace v moči. Uvedené údaje zahrnují celkový počet jedinců, z toho mužů a žen, jejichž výsledky spadají do každého z uvedených rozmezí. Z tabulky vyplývá, že bylo více mužů z celkového množství. Též měli více patologických nálezů. Pro lepší grafické znázornění jsem shrнула data do grafu číslo 11.

Rozmezí	celkem	muži	ženy
normální hodnota 0,5mg/l	987	499	488
vyšší hodnoty 0,6-1,0mg/l	15	10	5
vysoké 1,0-1,5mg/l	14	10	4
patologické nad 2,0mg/l	89	51	38

*Tabulka 13 – Vyšetření na EtG rozdělen dle rozmezí*

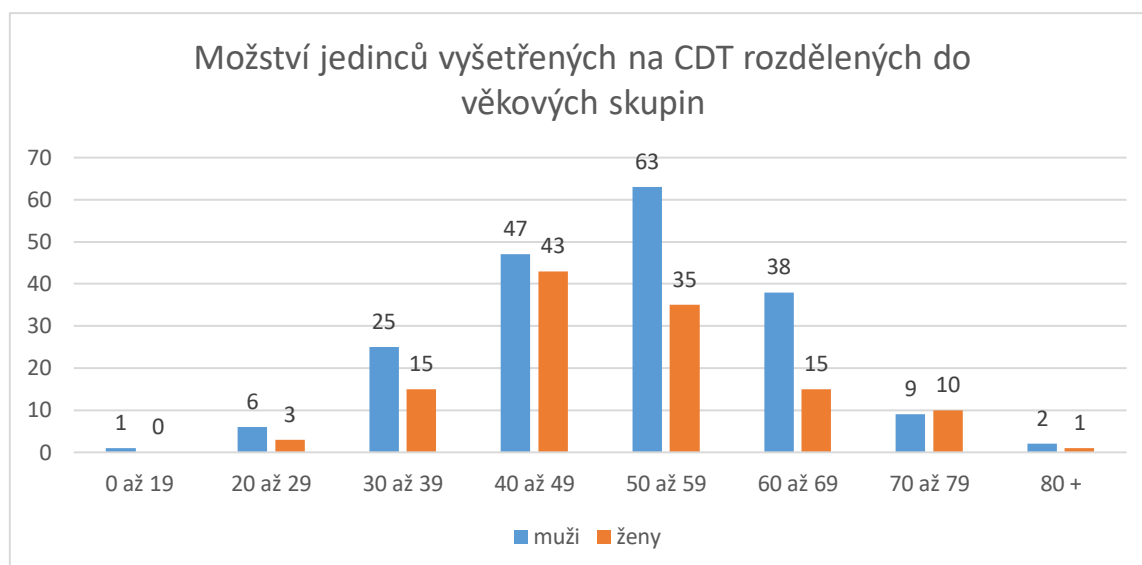


*Graf 11 – EtG v závislosti na rozmezí*

Tabulka číslo 14 prezentuje rozdělení jedinců podle věkových skupin a příslušného pohlaví v rámci vyšetření na CDT. Uvedené údaje zahrnují počet jedinců v každé věkové skupině a procentuální zastoupení, spolu s rozdělením podle rozmezí CDT v séru. Dle tabulky je zjevné, že též dominovali muži. Největší zastoupení mužů je ve věkové skupině 50-59 let. U žen je největší zastoupení ve věkové skupině 40-49 let. Pro přehlednost jsem data shrnula do grafu číslo 12.

Věkové skupiny	muži	Procenta [%]	Rozmezí		ženy	Procenta [%]	Rozmezí	
0 až 19	1	0,5	0,016		0	0	0	0
20 až 29	6	3	0,014	>0,08	3	2	0,011	0,018
30 až 39	25	13	0,008	0,05	15	12	0,009	0,03
40 až 49	47	25	0,008	0,08	43	35	0,007	> 0,08
50 až 59	63	33	0,008	0,066	35	29	0,007	0,051
60 až 69	38	20	0,008	0,054	15	12	0,009	0,033
70 až 79	9	5	0,01	0,031	10	8	0,009	0,026
80 +	2	1	0,006	0,01	1	1	0,009	

Tabulka 14 – Vyšetření na CDT rozdělené dle věkových skupin a pohlaví

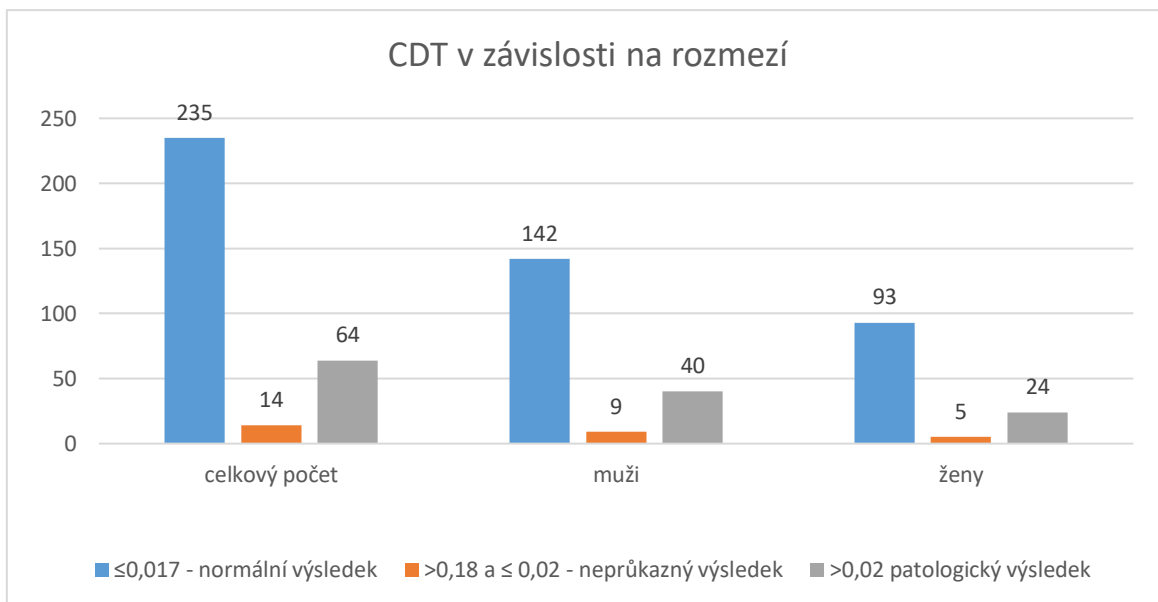


*Graf 12 – Množství vyšetření na CDT rozdělených dle věkových skupin a pohlaví*

Do tabulky číslo 15 jsem zahrnu data o výsledcích vyšetření na CDT v různých rozmezích koncentrace v séru. Uvedené údaje zahrnují celkový počet jedinců, z toho mužů a žen, jejichž výsledky spadají do každého z uvedených rozmezí. Z tabulky vyplývá, že bylo více mužů z celkového množství. Též měli více patologických nálezů. Pro lepší grafické znázornění jsem shrnu data do grafu číslo 13.

Rozmezí	celkový počet	muži	ženy
≤0,017 - normální výsledek	235	142	93
>0,18 a ≤ 0,02 - neprůkazný výsledek	14	9	5
>0,02 patologický výsledek	64	40	24

Tabulka 15 – Počet vyšetření na CDT v závislosti na rozmezí



Graf 13 – CDT v závislosti na rozmezí

## 9.2 Kazuistiky

### 9.2.1 Kazuistika č. 1

Neznámý nemocný se dle zápisu ve zdravotnické dokumentaci „motal po silnici“ přičemž byl ve tmě sražen osobním automobilem. Z počátku v bezvědomí, ale dýchající. Při příjezdu lékařské záchranné služby již při vědomí, ale neklidný a nespolupracující. Do FN transportován letecky. Později byl ztotožněn.

Z příjmového vyšetření v 19:36 měl vyšetřeny jaterní funkce jen pomocí ALT 0,68 ukat/L což u muže je ještě v normálních hodnotách. Stanovení na alkohol bylo pozitivní (3,5 g/L) a to potvrdilo i srovnání osmolalit změřené (378 mmol/L) a vypočítané osmolality (291 mmol/L). Po odečtení osmolalit jsme dostali osmolální okno, které bylo 87 mmol/L. Po přepočítání jsme dostali hodnotu alkoholu 3,74promile. Také toxikologický screening provedený imunochemickým kvalitativním stanovením byl pozitivní na amfetaminové deriváty, cannabinoidy a benzodiazepiny, což bylo zpětně potvrzeno i ÚSL.

Do toxikologické laboratoře byly doručeny 3 zkumavky krve a 1 nádobka moče odebíraná ve 23:50. V laboratoři se prováděl záchyt drog v moči (amfetaminové deriváty, cannabinoidy, opiáty, benzodiazepiny a kokain včetně jeho metabolitů) a stanovení etanolu v krvi.

Výsledek z toxikologické laboratoře zněl: Imunochemickým vyšetřením na analyzátoru Roche cobas c byly ve vyšetřované moči pozitivně zachyceny amfetaminové deriváty,

cannabinoidy a benzodiazepiny. Opiáty zachyceny nebyly. Testovací kazetou nebyl ve vyšetřované moči zachycen kokain ani jeho metabolity. Plynovou chromatografií byl ve vyšetřované krvi stanoven etanol o koncentraci 2,76 g/kg (‰).

Poté byly vzorky přepraveny na ÚKBH a zamraženy. Po rozmražení a následném změření byly výsledky: etanol 2,24 g/L, CDT 1,5 %, AST 1,1  $\mu$ kat/L, ALT 0,44  $\mu$ kat/L, GGT 0,77  $\mu$ kat/L a EtG 4,82 mg/L.

### **9.2.2 Kazuistika č. 2**

58 letý muž se zadrženým řidičským průkazem. Přišel 3x za sebou během září a října na odběr moči. V toxikologické laboratoři mu byla odebrána moč, vždy pod dohledem pracovníka toxikologické laboratoře. Pacient požadoval vyšetření na alkohol a benzodiazepiny. Oba testované analyty byly negativní.

Vzorky byli převezeny na ÚKBH a zamraženy. Z rozmražených vzorků byl změřen etylglukuronid, aby se vyloučila konzumace alkoholu před 24 hodinami. Naměřeny byly hodnoty etylglukuronidu vždy 0,01 mg/L tudíž negativní.

### **9.2.3 Kazuistika č. 3**

Pacientka, která je závislá na alkoholu požila v psychiatrické ambulanci neznámé množství desinfekce Cutasept z vlastních zásob. Po požití desinfekce nezvracela a byla převezena na UP v 11:00. Pacientka byla neklidná, nespolupracovala, ale jinak byla stabilní. Po konzultaci s toxikologickým centrem Praha měla desinfekce obsahovat alkohol a být bez dalších látek, které by mohli způsobit intoxikaci (malé množství propan-2-on – údaj z lékařské zprávy, možný překlep, nebo přeslechnutí v telefonu při rozhovoru s TIS).

ÚKBH měřil etanol enzymaticky z odběrů provedených v 11:30, 13:22 a 14:42, které byly negativní. Do toxikologické laboratoře dorazily dvě zkumavky krve (odběr v 15:00) v 15:35 s požadavkem na stanovení metanolu, acetonu a isopropanolu plynovou chromatografií. Ve vyšetřované krvi byl prokázán aceton v toxické koncentraci 2,2 g/L, dále isopropanol o vyšší toxické koncentraci 0,6 g/L. Metanol nebyl prokázán.

Výsledek neodpovídá informacím z toxikologického střediska. Desinfekce Cutasept dle bezpečnostního listu obsahuje 63% propan-2-olu.

Vzorky byly převezeny na ÚKBH a zamraženy. Poté jsem změřila následující etanol 0,04 g/L, CDT 3,5% a GGT 0,19  $\mu$ kat/L a další hodnoty viz tabulka číslo 16. Hodnoty, které

jsou označeny červeně, jsou patologické, viz referenční meze u jednotlivých markeru v kapitole číslo 3.

Odběr v:	11:32	13:22	17:12	15:00
AST [ $\mu$ kat/L]	2,11	2,11	1,87	
ALT [ $\mu$ kat/L]	1,4	1,4	1,42	
GGT [ $\mu$ kat/L]				0,19
ETOH [g/L]	neg.	neg	neg.	0,04
osmol. změřená [mmol/L]	339	341	337	
osmol. vypočítaná [mmol/L]	292	291	293	
CDT				0,035

Tabulka 16 – Hodnoty pacientky – kazuistika č. 3

#### 9.2.4 Kazuistika č. 4

Řidič se zákazem řízení, který se střetl s chodcem a psem. Ke srážce došlo v obci na přehledném úseku obytné zóny, kdy řidič nedbal ohleduplnosti a nepřizpůsobil rychlost jízdy. Chodec byl po srážce zraněn, pes nárazem usmrčen. Po střetu se řidič dobrovolně podrobil dechové zkoušce s výsledky 1,76 a 1,64 promile. Uvedl, že po nehodě požil blíže neurčené množství Tullamore Dew Honey. Dobrovolně se řidič také podrobil orientačnímu testu na přítomnost návykových látek s pozitivním výsledkem na cannabinoidy a amfetaminy. Řidič jevil známky opilosti, chování měl unavené, náladu tupou. Při chůzi vrávoral. Byl také dezorientovaný v čase a prostoru. Měl nevýraznou řeč, nepamatoval si okolnosti, oči zarudlé.

Poté lékařsky vyšetřen i s odběrem krve a moče. Odebraný materiál doručen na ÚSL - 3 zkumavky krve a 1 zkumavka moče. Bylo požadováno stanovení etanolu v krvi a záchyt amfetaminových derivátů a cannabinoidy v moči.

Výsledek byl odeslán v následujícím znění: Imunochemickým vyšetřením analyzátozem Roche cobac c byly ve vyšetřované moči pozitivně zachyceny amfetaminové deriváty a cannabinoidy. Plynovou chromatografií byl ve vyšetřované krvi stanoven etylalkohol o koncentraci 1,92 g/kg první odběr ve 22:45h a 1,84 g/kg druhý odběr ve 23:15h. Poté byly vzorky převezeny na ÚKBH a zamraženy.

Po rozmrazení byly změřeny kde hladiny etanolu 2,34 g/L ALT 0,28  $\mu$ kat/L, AST 0,52  $\mu$ kat/L, GGT 0,33  $\mu$ kat/L, CDT 4,6%, EtG 4,73 mg/L viz tabulka číslo 17. Hodnoty, které jsou označeny červeně, jsou patologické, viz referenční meze u jednotlivých markeru v kapitole číslo 3.

Odběr v:	22:45	ÚSL 22:45	ÚSL 23:15
ALT [ $\mu$ kat/L]	0,52		
AST [ $\mu$ kat/L]	0,28		
GGT [ $\mu$ kat/L]	0,3		
ETOH [g/L]	2,34	1,92	1,84
CDT	0,046		
U_ETG [mg/L]	4,73		
Drogy	AMF, THC		

Tabulka 17 – Hodnoty pacienta – kazuistika č. 4

### 9.2.5 Kazuistika č. 5

45 letá řidička osobního automobilu sjela do příkopu a otočila se s autem. Nalezena ležící vedle vozu. ZZS přivolána na místo v 21:44. Při příjezdu HZS pacientka při vědomí a komunikující. Na událost si nepamatuje, verbálně i fyzicky agresivní na personál. Převezena na urgentní příjem. Hodnoty viz tabulka číslo 18. Hodnoty, které jsou označeny červeně, jsou patologické, viz referenční meze u jednotlivých markeru v kapitole číslo 3.

Odběr v:	22:43	22:43	ÚSL 22:43	23:13	ÚSL 23:13
AST [ $\mu$ kat/L]	0,49			0,91	
ALT [ $\mu$ kat/L]	0,31			0,45	
GGT [ $\mu$ kat/L]	0,22			0,27	
ETOH [g/L]	2	2,3	1,79	2,67	1,91
osmol. změřená [mmol/L]	335			317	
osmol. vypočítaná [mmol/L]	286			270	
CDT		0,013		0,016	

Tabulka 18 – Hodnoty pacientky – kazuistika č. 5

Na ÚSL doručeny dvě zkumavky krve: 1. odběr v 22:43 h a 2. odběr ve 23:13h. Požadovaným vyšetřením bylo stanovení alkoholu, které se dělalo u obou odběrů. Výsledky jsou 1,79 g/kg první odběr a druhý 1,91 g/kg.

Koncentrace alkoholu stoupá, i když by již měla být pacientka v eliminační fázi. Důvodem bylo podání infuze, etanol se zpětně uvolňoval z tkání do krve.

Vzorky jsem opět měřila znovu na ÚKBH. Výsledky prvního odběru jsou 2,3 g/L etanolu a CDT 1,3%. Výsledky druhého odběru jsou etanol 2,67 g/L ALT 0,45 $\mu$ kat/L, AST 0,91  $\mu$ kat/L, GGT 0,27 $\mu$ kat/L, CDT 1,6%, GLU 1,86 mmol/L, UREA 4 mmol/L, Na 132 mmol/L a Osmolalita 317 mmol/L.

Díky změřeným hodnotám si můžeme vypočítat osmolalitu pomocí vzorce:

$$\text{Osmolalita} = 2 \times \text{Na}^+ + \text{urea} + \text{glukóza}$$

Po dosazení naše rovnice vypadá následovně:

$$\text{Osmolalita} = 2 \times 132 + 4 + 1,86$$

Výsledek je 269,86 mmol/L. Po odečtení od naměřené osmolality, která byla 317 mmol/L, dostaneme osmolální okno a to je 47,14mmol/L. Hodnotu osmolálního okna jsme dosadili do následující rovnice:

$$\text{osmolální okno} \times 0,043 = S - \text{etanol}(\text{‰})$$

Po vypočtení dostaneme hodnotu 2,02 ‰ etanolu.



## DISKUZE

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na problematiku zneužívání alkoholu a jeho vliv na lidský organismus, včetně možnosti detekce. V České republice je abusus alkoholu velmi aktuální a probírané téma, protože patříme mezi země s nejvyšší průměrnou spotřebou alkoholu na obyvatele. Konzumace alkoholu má zároveň značný vliv na celkovou zdravotní zátěž. Alkohol patří k hlavním příčinám nemocnosti a předčasné úmrtnosti.

Nejprve jsem v teoretické části podrobně rozebrala metabolismus alkoholu a jeho dopady na organismus, abych poskytla solidní základ pro další analýzu.

V praktické části jsem se zaměřila na analýzu dat shromážděných na Ústavu klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň za rok 2023. Dále také na kazuistiky u vzorků získaných z ÚSL FN Plzeň a následně naměřených na ÚKBH.

První výzkumnou otázkou bylo zhodnocení dat z ÚKBH vzhledem k celorepublikovému trendu užívání alkoholu. V rámci této bakalářské práce jsem využila k porovnání Zprávu o alkoholu v České republice 2023, která sjednotila statistiky z Ministerstva zdravotnictví, Národního výzkumu užívání tabáku a alkoholu aj. Ta uvádí, že celkové zdravotní dopady užívání alkoholu nejsou v ČR systematicky monitorovány. Morbidita a mortalita spojená s konzumací alkoholu je ovšem možná sledovat prostřednictvím onemocnění, u nichž je alkohol identifikován jako nezbytná příčina. Mezi tyto onemocnění patří zejména poruchy duševního zdraví a chování spojené s užíváním alkoholu, alkoholické jaterní onemocnění, pankreatitida způsobená alkoholem nebo intoxikace. (28)

V ČR je nejvíce zatížená alkoholem věková skupina ve věku od 33 do 44 let. Z dat ve FN Plzeň vyplývá, že nejvíce zatěžovaná skupina je ve věku 40 až 49 let.

Údaje o trendech v hospitalizaci pacientů, u nichž je příčina hospitalizace zcela přisuzována užívání alkoholu, jsou dostupné z Národního registru hrazených zdravotních služeb (NRHZZ), který spravuje Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Celkem je sledováno 22 diagnóz podle Mezinárodní klasifikace nemocí. Analyzujeme-li počet hospitalizací, je patrný stabilní trend míry nemocnosti na choroby, které lze zcela připsat konzumaci alkoholu v ČR (28)

Podle získaných dat je ročně hospitalizováno 13,6 tisíc osob kvůli onemocněním přímo spojených s užíváním alkoholu, z toho 7,8 tisíce osob kvůli poruchám chování spojeným s užíváním alkoholu (57 % v roce 2022), 4,4 tisíce osob kvůli alkoholickým onemocněním jater (33 %) a 1,2 tisíce osob kvůli alkoholické pankreatitidě. Z celkového počtu hospitalizovaných osob v roce 2022 bylo 9 340 mužů a 4 252 žen. V rámci Fakultní nemocnice Plzeň, bylo vyšetřeno v souvislosti s alkoholem 3066 osob z toho 162 (5%) pro poruchy chování v souvislosti užíváním alkoholu, 259 (9%) pacientů s nemocemi, které přímo souvisely s abusem alkoholu, 231 (8%) s kardiovaskulárním onemocněním. A z celkového počtu bylo 2139 mužů a 926 žen. (28)

Případy hospitalizací z důvodu úrazů pod vlivem návykových látek, případně těch, u nichž byl vliv návykových látek patrný z vedlejší diagnózy, jsou zaznamenány v Národním registru hrazených zdravotních služeb. Z celkového počtu 1,8 milionu hospitalizací v roce 2022 bylo u 15 959 případů (což představuje 0,9 % z celkového počtu) zjištěno užití návykových látek. Z tohoto počtu bylo u 15 510 případů (což představuje 97,2 % ze všech případů úrazů pod vlivem návykových látek) zjištěno užití alkoholu. Ve FN Plzeň bylo hospitalizovaných pro poranění 378 osob, což představuje 12%, z nich bylo 231 pozitivních na etanol, to dělá 60% ze všech případů úrazů. (28)

Druhou výzkumnou otázkou je, jaký je posudek kazuistik.

### **Kazuistika č. 1**

Na ÚSL bylo naměřeno plynovou chromatografií 2,76 promile etanolu. NA ÚKBH jsem naměřila enzymatickou metodou 2,24 promile ze zamraženého vzorku. Při příjmu o cca 4 hodiny dříve měl pacient náběr, z kterého bylo naměřeno 3,5 g/L etanolu. Hodnoty v čase klesají, což nasvědčuje metabolickému zpracování alkoholu a žádné další požití. Hodnoty stanovené plynovou chromatografií a enzymaticky se liší, ale to může být zapříčiněno manipulací vzorku při jeho rozmrazování. Obě srovnávané hodnoty jsou v rozmezí konfuzního stádia, které odpovídá těžké opilosti, motání.

Při úvahách, jestli pacient již má poškození jater z požití alkoholu byli dodělaný všechny jaterní testy. Z těch bylo mimo normální rozmezí jen AST a to jen mírně. To by mohlo znamenat, že pacient ještě nemá poškozená játra. Při vypočítání poměru AST/ALT již tento závěr není tak jednoduchý. U pacientů s akutním poškozením jater je poměr 1 nebo nižší a u alkoholické hepatitidy se nachází na úrovni 2. U pacienta je poměr vypočítaný na

2,5. Nezbytný koenzym pro obě aminotransferázy (AST i ALT) je pyridoxal-5-fosfát, kterého bývá nedostatek při alkoholickém onemocnění jater. Jaterní ALT je kvůli této nedostatečnosti snížena více než AST. Vysoký poměr sérové mitochondriální AST k celkovému sérovému AST naznačuje další důkaz alkoholického onemocnění jater.

Etylglukuronid měl vysoký, což potvrzuje požití etanolu před 24 hodinami. Alkohol se již stihl metabolizovat a vyloučit močí. Pacient tedy požíval alkohol již delší dobu. CDT měl neprůkazné.

### **Kazuistika č. 2**

Muž, který žádá o navrácení řidičského průkazu. Na ÚSL měl všechny výsledky na etanol negativní. I po doměření etylglukuronidu v moči, vyšel negativní. Tak můžeme poznat, že pacient abstinguje.

Dobré by bylo i změření CDT, které by pokrylo větší časové období, ale bohužel jsme neměli potřebný materiál na vyšetření.

Stanovení CDT v případech žádostí o navrácení řidičského oprávnění by byl lepší marker. CDT nám mapuje konzumaci alkoholu v rozmezí 2 týdnů. Kdy konzumace alkoholu nad 60g již zvýší prokazatelně hodnotu CDT. Zvýšená hladina se vrací do normálu po 2-4 týdnech abstinence. CDT může detekovat recidivu u osob závislých na alkoholu, ale nedokáže detekovat lidi, kteří pijí ve velkém množství najednou. Může rozlišit osoby, které nepijí a závislé na alkoholu a to je právě případ navrácení řidičského oprávnění. Žadatelé při stanovení jenom etanolu v moči stačí nepít před odběrem. Při stanovení etylglukuronidu je abstinence nutná 24-48 hodin a při stanovení CDT 2-4 týdny.

### **Kazuistika č. 3**

Žena závislá na alkoholu vypila desinfekci. Pacientce byla na ÚSL naměřen negativní etanol a pozitivní toxická míra acetonu a propanolu v séru. Na ÚKBH jsem též naměřila negativní etanol, CDT měla vysoké, což potvrzuje závislost na alkoholu. GGT měla nízké, tudíž u ní ještě nepozorujeme alkoholické poškození jater. Ale další jaterní enzymy AST i ALT již jsou zvýšené, což signalizuje poškození jater akutního původu.

Lékaři na UP FN Plzeň potřebovali zjistit, jestli vypitá desinfekce pacientce ublíží a její zdravotní stav se zhorší. Jejich obavy bohužel jen stanovení etanolu enzymaticky nebylo schopno rozptýlit. Stanovení enzymaticky vycházelo opakovaně negativní, ale stanovované

osmolality v porovnání s vypočítanou osmolalitou signalizovali vysoký osmolární gap. Bylo nutno zjistit obsah desinfekce a výsledky z náběru v 15 hodin zaslány na ÚSL byl rozhodující.

Ve vyšetřované krvi byl prokázán aceton (propan-2-on) v toxické koncentraci 2,2 g/L což některé zdroje odhadují jako smrtelnou dávku LD50 pro člověka na 1 159 mg/kg (při požití). Dále isopropanol (propan-2-ol) o vyšší toxické koncentraci 0,6 g/L. V organismu se isopropylalkohol oxiduje alkoholdehydrogenázou v játrech na aceton. Eliminační poločas je 2,5 až 3,2 hodiny. Podstatně pomalejší je však eliminace vzniklého acetonu, u člověka je poločas 22,4 hodiny. Takže, jestli desinfekce Cutasept dle bezpečnostního listu obsahuje 63% propan-2-olu, je po 4 hodinách již rozložena na aceton, který již pacientku ohrožoval na životě. Zásahem lékařů pacientka přežila.

Isopropylalkohol výrazně dráždí oči a sliznice. Způsobuje útlum centrálního nervového systému a ve vysokých dávkách také potlačuje kardiovaskulární systém. Na útlum CNS má také vliv metabolit aceton, což zvyšuje a prodlužuje účinek útlumu. Odstranění acetonu může způsobit mírnou acidózu (tvorba acetátu a formiátu). Posun NAD/NADH může potlačit glukoneogenezi a vést tak k hypoglykémii – zejména u dětí s nedostatečnou výživou, při hubnutí nebo po fyzické zátěži. Mohou se projevit symptomy opilosti, periferní vazodilatace a hypotermie. Při dýchání může být cítit ovocný zápach způsobený tvorbou acetonu, který nebyl dále metabolizován. (29)

#### **Kazuistika č. 4**

Muž se zákazem řízení, který srazil chodce se psem, kromě cannabinoidů a amfetaminů mu byl naměřen na ÚSL etanol při prvním měření 1,92 promile a druhým měřením 1,84 promile. Já jsem mu následně na ÚKBH naměřila 2,34 promile z náběru ve 22,45. Pacient se pohybuje na rozhraní mezi excitačním a konfuzním stádiem, tudíž mezi střední a těžkou opilostí. Také jeho tvrzení, že se napil, až po nehodě se nezakládá na pravdě, jelikož mu hodnoty etanolu po hodině klesají a nedochází k dalšímu vstřebávání etanolu ze žaludku.

Déle jsem mu změřila hodnoty ALT, AST, GGT které byly negativní, ale měl vysoké hodnoty CDT a etylglukuronidu, které ukazují na fakt, že je nejspíše závislý na alkoholu.

## Kazuistika č. 5

Ženě po autonehodě byl změřen na ÚSL alkohol z prvního odběru 1,79 promile a z druhého odběru 1,91 promile. Na ÚKBH jsem naměřila z prvního odběru 2,3 promile a z druhého 2,67 promile etanolu. Dle naměřeného alkoholu se pohybovala též mezi excitačním a konfuzním stádiem opilosti. Pacientce stoupala hladina etanolu, bylo to způsobené podanou infuzí a zpětnou vstřebáváním etanolu z tkání do krve.

Dále jsem ji na ÚKBH stanovila hodnotu ALT, AST, GGT, CDT. Jediná hodnota AST byla vyšší, ta ukazuje na možné poškození jater, onemocnění žlučových cest selhání myokardu, onemocnění kosterní svalů a jiné. Poměr AST/ALT je 2,02 z druhého odběru. Viz kazuistika č. 1. Hodnota CDT byla neprůkazná. Dále jsem stanovila osmolální okno, které mi stanovilo hodnotu etanolu na 2,0,2 promile. Což odpovídá i změřeným hodnotám etanolu z ÚSL.

Všechny výsledky měřené enzymaticky na ÚKBH byly vždy vyšší než na ÚSL, kde byly měřeny plynovou chromatografií, toto je možná způsobeno zmražením vzorku. Plynová chromatografie je přesnější. Nevýhody plynové chromatografie jsou, že je nákladnější na údržbu a déle se čeká na výsledky. Doba odezvy od náběru po výsledek je v rámci dní. Výhody jsou, že je přesná a citlivá a má širší rozsah využití, protože může být využita na různé druhy vzorků. Enzymové stanovení je rychlejší a odezva tam je v rámci minut (30 min) maximálně do 2 hodin. Náklady na zařízení a provoz mohou být nižší v porovnání s chromatografií, zejména pokud jde o rutinní analýzy. Na druhou stranu je méně přesná, má omezenou citlivost, to znamená, že nízké koncentrace etanolu mohou být obtížněji detekovatelné

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala abusem alkoholu vlivem na lidský organismus a jeho laboratorní detekcí. Mým cílem bylo poukázat na závažnost této problematiky. Alkohol je součástí života skoro každého z nás, patří ke všem oslavám a je ve společnosti tolerován. Jedná se o legální drogu, která je levná, snadno dostupná a silně návyková.

Cílem této práce bylo zpracovat data nasbíraná na ÚKBH FN Plzeň za rok 2023 a porovnat je s celorepublikovým trendem v užívání alkoholu.

V teoretické části jsem podrobně rozebrala metabolismus alkoholu a jeho dopady na organismus dále jsem se zaměřila na vztah mezi hladinami alkoholu a aktuálním stavem jedince. V kapitole věnované biomarkerům jsem se podrobněji zabývala markery důležitými pro diagnostiku a hodnocení závažnosti užívání alkoholu. V poslední části teoretické části jsem se věnovala laboratorní diagnostice zneužívání alkoholu. V teoretické části jsem použila jak tuzemskou, tak i zahraniční odbornou literaturu, abych zajistila komplexní pohled na danou problematiku.

Praktická část byla zaměřena na vyhodnocení získaných dat. V metodice práce byly popsána jednotlivé metody na stanovení etanolu, AST, ALT, CDT, GGT. Dále byla vyhodnocena data shromážděná za rok 2023 shrnuta do jednotlivých tabulek a podloženy grafy.

Data z FN Plzeň se shodují s celorepublikovým trendem užívání alkoholu.

Dále jsem vyhodnotila jednotlivé kazuistiky

Bakalářská práce splnila své cíle a zároveň zodpověděla výzkumné otázky. Výsledky mé bakalářské práce poskytují cenné informace o stavu zneužívání alkoholu v roce 2023 a mohou sloužit, jako podklad pro další výzkum.

## 10 CITOVANÁ LITERATURA

1. **BĚLOHRADSKÁ, Andrea.** *Co je Abusus?* [elektronický článek ] místo neznámé : dulul.cz, 2022.
2. **MORAVCOVÁ E., BEDNAŘÍK, DASTYCH M., NOVOTNÁ H., POKORA J.** *Srovnání diagnostické validity karbohydrát deficientního transferinu a dalších laboratorních markerů chronického abúzu etanolu.* č. 1, Brno : Časopis lékařů českých, 2004.
3. **ZIMA, Tomáš.** *Poškození jater pankreatu a trávicího traktu alkoholem .* Praha : Medprint, 1996. ISBN 80-902036-1-2.
4. **ADAMOVSÝ Ondřej Adamovský Mgr., PhD.** *Toxikologie alkoholu a možnosti ovlivnění jeho odbourávání.* [Elektronický článek] Brno : Masarykova Universita, 2016.
5. **RACEK Jaroslav, RAJDL Daniel et al.** *Klinická Biochemie.* Praha : Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-545-0.
6. **EHRMANN Jiří.** *Alkohol a játra.* Praha : Grada, 1967. ISBN 80-247-1048-X.
7. **ROSENTHAL Robert D., GLEW H. Miriam.** *Medical biochemistry human metabolism in health and disease.* Hoboken : Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-12237-2.
8. **LIEBERMAN Michael, PEET Alisa.** *Basic medical biochemistry a clinical approach.* Philadelphia : Wolters Kluwer, 2018. ISBN 978149632818.
9. **HIRT Miroslav, VOREL František a kolektiv.** *Soudní lékařství II. díl.* Praha : Grada, 2016. ISBN 987-80-271-9468-1.
10. **Toxikologické informační středisko.** *Alkohol.* [Online] Klinika pracovního lékařství VFN a 1. LF UK. <https://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-verejnost/alkohol>.
11. **Chhattisgarh Journal of Science and Technology.** Biomarkers of Alcohol Metabolism and its Relevance in Forensic Investigations. [Online] 2022. [http://164.100.113.105/attachments/attachments/publications/25.\\_2022.vol.19.issue\\_3\\_Alcohol\\_\\_biomarker.pdf](http://164.100.113.105/attachments/attachments/publications/25._2022.vol.19.issue_3_Alcohol__biomarker.pdf). ISSN 0973-7219.

12. **ÚKBH FN Plzeň.** *Metody. Ústav klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň.* [Online] Fakultní nemocnice Plzeň . <https://ukbh.fnplzen.cz/cs/node/988>.
13. **WIKISKRIPTA** *Elektrochemické stanovení etanolu ve vydechovaném vzduchu.* [Online] 1. LF UK. [https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrochemick%C3%A9\\_stanoven%C3%AD\\_etanolu\\_ve\\_vydechovan%C3%A9m\\_vzduchu](https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrochemick%C3%A9_stanoven%C3%AD_etanolu_ve_vydechovan%C3%A9m_vzduchu). ISSN 1804-6517.
14. **DRÄGER.** Dräger Alcotest® 7510 Evidential alcohol measuring device. *Příbalový leták.* Lübeck : Drägerwerk AG & Co. KGaA, 2017.
15. **KUBIČKA, Jiří.** *Metody a principy měření alkoholu v těle .* [Bakalářská práce] České Budějovice : Jihočeská Univerzita, 2011.
16. **WIEWORKA, Mgr. Ondřej.** *Osmometrie.* Brno : FN Brno.
17. **SUDOVÁ, Mgr. Vendula.** *Osmolalita.* Plzeň : autor neznámý, 2022.
18. **DOLEŽALOVÁ Věra et. al.** *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii.* Brno : Institutu pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-198-5.
19. **DASTYCH Milan et. al.** *Klinická biochemie.* Brno : MUNI MED, 2015. ISBN 978-80-210-7788-1.
20. **BROZMANOVÁ Hana.** *Laboratorní metody v terapeutickém monitorování léků.* [Elektronický článek] místo neznámé : [www.klinickafarmakologie.cz](http://www.klinickafarmakologie.cz), 2020.
21. **SUDOVÁ Vendula, RAJDL Daniel.** *Karbohydrát- deficientní transferin CDT. Aktuální příbalový leták ÚKBH FN Plzeň.* Plzeň : ÚKBH FN Plzeň, 2023.
22. **VIMMEROVÁ Hana, RAJDL Daniel.** *MINICAP CDT IFCC CZ. Aktuální příbalový leták ÚKBH.* Plzeň : ÚKBH FN Plzeň, 2023.
23. **Scientific, Thermo.** *DRI Ethyl Glucuronide Assay. Aktuální příbalový leták k metodě DRI Ethyl Glucuronide Assay.* Frentham : Microgenics Corporation, 2018.
24. **ROCHE DIAGNOSTIC.** *ETOH2.* místo neznámé : Roche Diagnostic.



25. **ROCHE DIAGNOSTIC.** Alaninaminotransferáza dle IFCC bez aktivace pyridoxalfosfátem. *Příbalový leták.* místo neznámé : Roche Diagnostic, 2023.

26. **ROCHE DIAGNOSTIC.** ASTPM. 2022.

27. **ROCHE DIAGNOSTIC.** GGT-2. 2022.

28. **CHOMYNOVÁ, P., DVOŘÁKOVÁ, Z., GROHMANNOVÁ, K., ORLÍKOVÁ, B., GALANDÁK, D.,** Zpráva o alkoholu v České republice 2023. Praha : Úřad vlády České republiky, 2024. ISBN 978-80-7440-334-7.

29. **WIKIPEDIA.** *Isopropylalkohol.* [Článek]2022. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Isopropylalkohol>