Mjerenje razine etanola u uzorcima pacijenata sa šećernom bolesti

Stvorić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:049858

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Stvorić

MJERENJE RAZINE ETANOLA U UZORCIMA PACIJENATA SA ŠEĆERNOM BOLESTI

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Stvorić

MJERENJE RAZINE ETANOLA U UZORCIMA PACIJENATA SA ŠEĆERNOM BOLESTI

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, rujan 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje:	Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje:	Farmacija
Nastavni predmet:	Farmaceutska toksikologija
Tema rada	je prihvaćena na __ sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na __ sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i __ sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta.
Mentor:	prof. dr .sc. Davorka Sutlović
Pomoć pri izradi:	dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

MJERENJE RAZINE ETANOLA U UZORCIMA PACIJENATA SA ŠEĆERNOM BOLESTI

Ivan Stvorić, broj indeksa: 62

Sažetak:
Ciljevi istraživanja: Ispitati stabilnost kliničkih bioloških uzoraka krvi pacijenata sa šećernom bolesti i djelovanje antikoagulansa EDTA u epruvetama za pohranu bioloških uzoraka krvi te ispitati metodu za analizu etanola.
Materijali i metode: Razrjeđivanjem početne standardne otopine etanola koncentracije 5,0 g/kg pripremljene su vrijednosti koncentracija: γ4=2,5 g/kg, γ3=1,5 g/kg, γ2=1 g/kg, i γ1=0,5 g/kg. Prikupljeno je 27 uzoraka krvi osoba oboljelih od dijabetesa te su zbog malih volumena međusobno grupirani i podijeljeni u 11 novih uzoraka. Svaki uzorak je podijeljen u dva uzorka, od kojih je jedan čuvan na +4°C, a drugi na sobnoj temperaturi. U uzorcima krvi određena je koncentracija glukoze u uzorcima u rasponu od 5.1 mmol/L (uzorak 1) do 19.4 mmol/L (uzorak 11). Svi su uzorci pohranjeni u Vakutajner epruvete s EDTA kao antikoagulansom. Kvantitativna analiza uzoraka krvi na alkohol vršena je 4 puta tokom mjesec dana pomoću GC-FID metode. Uzorci krvi su injektirani autoinjektorom u plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom (GC/FID), pomoću kojeg se „headspace“ tehnikom određivala koncentracija etanola u uzorcima krvi. Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCSolution software računalnim programom.
Rezultati: U prethodno navedenim uvjetima analizirano je ukupno 22 uzorka, podijeljenih u dvije grupe te 2 standardne otopine etanola. GC-FID instrumentalnom tehnikom nije utvrđeno prisustvo etanola u ispitivanim uzorcima. Suprotno očekivanjima, nije došlo do razvijanja etanola, te je koncentracija alkohola u svim uzorcima bila 0 g/kg kroz svih 30 dana mjerenja.
Zaključak: Nije došlo do razvijanja etanola u biološkim uzorcima krvi pacijenata sa šećernom bolesti, pohranjenima u epruvetama s EDTA, pri obje ispitivane temperature, +4°C te na sobnoj temperaturi. Uzorci pokazuju stabilnost na razvijanje etanola najmanje 30 dana.

Ključne riječi: Dijabetes, etanol, GC-FID metoda, EDTA,

Rad sadrži: 46 stranica, 8 slika, 14 tablica, 48 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.- predsjednik
2. prof. dr. sc. Marija Definis Gojanović, dr. med. član
3. prof.dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.- član-mentor

Datum obrane: 27. rujna 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Pharmaceutical toxicology
Thesis subject	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. __ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. __ and Faculty Council of School of Medicine, session no. __
Mentor:	Davorka Sutlović. PhD, full prof.
Technical assistance:	Maja Veršić Bratinčević, PhD

DETERMINATION OF THE ALCOHOL LEVELS IN THE BIOLOGICAL SAMPLES OF THE PATIENTS WITH DIABETES

Ivan Stvorić, index number: 62

Summary:
Diploma Thesis Title: Determination of concentration of alcohol in persons with diabetes.
Objectives: The aim of this study was to study stability of the clinical blood samples of patients with diabetes and the impact of anticoagulant EDTA on the containers for biological samples, as well as to develop analytical method for the determination of alcohol.
Material and Methods: Ethanol standard solutions were preapared, by diluting reference standard solution (concentration 5,0 g/kg). There has been 27 samples collected from the people with diabetes, and because of the small volumes they were mutually grouped and divided into 11 new samples. Each sample was divided into two separate samples. One of them was stored at +4°C and the other one at room temperature. All of the samples were stored in the Vakutajner tubes with anticoagulant EDTA. Quantitative analysis of the alcohol concentraton in blood samples was performed with GC-FID method, 4 times in a month. The blood samples were injected with the autosampler in the gas chromatograph with the flame ionization detector (GC/FID). The headspace technique was used to determine the alcohol concentrations in blood samples. The operation of the instrument and data processing have been with GCSolution software computer programme controlled.
Results: Using GC/FID instrumental method there was no presence of alcohol detected in the test samples. Contrary to expectations, there was no alcohol developed and the alcohol concentration was 0 g/kg in all of the samples during all of the 30 days of measurement.
Conclusion: There was no developed ethanol found in the blood samples of patients with diabetes, stored in the tubes containing anticoagulant EDTA and at both temperatures, +4°C and room temperature. The samples are stable for at least 30 days.

Key words: Diabetes, Ethanol, GC-FID method, EDTA

Thesis contains: 46 pages, 8 figures, 14 tables, 48 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, associate prof.	chairperson
2. Marija Definis Gojanović– PhD, full prof.	member
3. Davorka Sutlović - PhD- full prof.	supervisor

Defence date: September 27, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na vođenju u izradi rada i pametnim idejama.

Zahvaljujem dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na strpljenju, potpori i savjetima.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Dijabetes 2
1.1.1 Dijabetes tipa 1 2
1.1.2. Dijabetes tipa 2 3
1.1.3. Drugi specificirani tip 4
1.1.4 Gestacijski dijabetes 4
1.2. Povezanost dijabetesa s ispitivanjem koncentracije alkohola u uzorcima krvi u toksikološkim analizama 5
1.3. Alkohol 5
1.3.1. Farmakokinetika etanola 6
1.3.2. Farmakodinamika etanola 7
1.3.3. Liječenje alkoholizma 8
1.4. Alkoholna fermentacija 9
1.5. Biološki uzorci za analizu 10
1.5.1. Biološki uzorak krvi 10
1.5.2. Antikoagulansi 10
1.6. Stabilnost i pohrana bioloških uzoraka 12
1.7. Instrumentalna analiza 14
1.7.1. Plinska kromatografija (GC) 14
2. CILJEVI 17
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Kemikalije 20
3.2. Priprema standardne otopine etanola 21
3.3. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC/FID 21
3.4. Priprema uzoraka krvi za analizu 23
4. REZULTATI 27
4.1. Umjerna krivulja etanola 28
4.2. Koncentracije alkohola u uzorcima 28
5. RASPRAVA 32
6. ZAKLJUČCI 35
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 37
8. SAŽETAK 42
9. SUMMARY 44

10. ŽIVOTOPIS..... 46

1. UVOD

1.1. Dijabetes

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira dijabetes (*lat. Diabetes mellitus*) kao kroničnu bolest koja nastaje kada gušterača ne proizvodi dovoljno inzulina ili kada tijelo ne može koristiti inzulin koji proizvodi, a karakterizira ga kronična hiperglikemija (1). Dijabetes je veliki javno zdravstveni problem, što pokazuju i brojke. Broj osoba oboljelih od dijabetesa se povećao sa 108 milijuna u 1980. na 422 milijuna u 2014. Procjenjuje se da je 2012. godine 1,5 milijuna smrti izravno prouzročeno dijabetesom, a još 2,2 milijuna je pripisano povišenoj razini glukoze (2). Svjetska zdravstvena organizacija pretpostavlja da će dijabetes biti sedmi vodeći uzrok smrti u svijetu 2030. (3). Procijenjena prevalencija dijabetesa u dobnoj skupini od 20 – 70 godina u svijetu je 8,5%, u Europi 6,7%, a u Hrvatskoj (u dobnoj skupini 18 – 65 god.) jest 6,1% (od toga 41% nedijagnosticirano), a ukupna procjena iznosi oko 9,2% (4).

Prema trenutno postojećoj kliničkoj klasifikaciji četiri su tipa šećerne bolesti:

1. Dijabetes tipa 1 (E10 po MKB)
2. Dijabetes tipa 2 (E11 po MKB)
3. Drugi specificirani tip (E13 po MKB)
4. Gestacijski dijabetes (024.4 po MKB)

1.1.1 Dijabetes tipa 1

Dijabetes tipa 1 (poznat prije kao inzulin – ovisan dijabetes) predstavlja svega 7 do 10% svih slučajeva dijabetesa. Glavne značajke dijabetesa tipa 1 jesu selektivno uništenje beta stanica te teški ili apsolutni nedostatak inzulina. Dijabetes tipa 1 se dijeli na imunosni i idiopatski dijabetes. Imunosni je najčešći oblik. Početak bolesti se može dogoditi u bilo kojoj životnoj dobi, a obično se javlja u razdoblju djetinjstva i 30. godine života. Bolesti su podložni jednako dječaci i djevojčice. Dijabetes tipa 1 utvrđen je u svim etničkim skupinama. Bolesti obično prethodi faza bez simptoma (inzulitis) kada T stanice imunosnog sustava počinju infiltrirati i uništavati beta stanice gušterače. Napredovanje bolesti od inzulinitisa do potpuno razvijenog dijabetesa može potrajati čak nekoliko godina. Jedan od čimbenika podložnosti jest i višestruka genetska povezanost, ali samo 10 – 15% bolesnika ima pozitivnu obiteljsku anamnezu. Simptomi koji ukazuju na pojavu bolesti su: učestalo mokrenje, ponovno mokrenje u krevet nakon što je dijete odviknuto, žeđ, potreba za slatkim i hladnim

pićima, ekstremna glad, nagli gubitak tjelesne težine, slabost, svrbež genitalnog područja, umor, zamućen vid te druge promjene vida. Za osobe s dijabetesom tipa 1 nadomjesno liječenje inzulinom nužno je za život. Inzulin se primjenjuje subkutano pomoću ručnih uređaja za injektiranje ili inzulinske pumpe koja potkožno otpušta inzulin. Prekid terapije može biti poguban i uzrokovati dijabetičku ketoacidozu ili smrt. Dijabetička ketoacidoza je uzrokovana nedostatkom ili odsutnošću inzulina te je rezultat prekomjernog otpuštanja masnih kiselina i posljedičnoga stvaranja toksične razine ketokiselina. Osim terapije inzulina treba primijeniti i druge nefarmakološke mjere kao što su dijetetske mjere, fizičku aktivnost te kontrolu tjelesne težine (5)(6).

1.1.2. Dijabetes tipa 2

Dijabetes tipa 2 (ranije poznat kao inzulin – neovisan dijabetes) je najčešći oblik šećerne bolesti, a javlja se u 90% slučajeva. Dijabetes tipa 2 je kronični metabolički poremećaj kojeg karakterizira visoka razina glukoze u krvi, inzulinska rezistencija i relativni nedostatak sekrecije inzulina (7). Beta – stanice u ovakvih bolesnika stvaraju inzulin, ali je on nedovoljan za svladavanje rezistencije, stoga razina glukoze u krvi raste. Smanjeno djelovanje inzulina djeluje i na masti te su razine triglicerida i slobodnih masnih kiselina povećane, a recipročno je snižena koncentracija lipoproteina visoke gustoće (HDL). Dijabetes tipa 2 poprima razmjere epidemije u cijelom svijetu zbog sve veće učestalosti zapadnjačkog načina prehrane. Uglavnom se javlja nakon 40. godine života. Zbog povećane pretilosti, počinje se javljati češće i kod djece. Pretilost je veoma učestala kod osoba s dijabetesom tipa 2. Masno tkivo oko abdomena i na gornjem dijelu tijela povezuje se inzulinskom rezistencijom, srčanom bolešću, hipertenzijom i povišenim kolesterolom. Pušači su podložniji šećernoj bolesti tipa 2 i njezinim komplikacijama. Bolest se razvija postepeno i napreduje polako. Kod uznapredovale bolesti javljaju se simptomi slični simptomima dijabetesa tipa 1: prekomjerna žeđ, pojačano mokrenje, umor, zamagljen vid i gubitak težine. Također, kod žena su česte vaginalne gljivične infekcije. Oboljeli od dijabetesa tipa 2 u većini ne trebaju inzulin za preživljavanje, ali u 30% bolesnika inzulinska terapija ima povoljan učinak na kontrolu razine glukoze u krvi. Oko 10 – 20% osoba kojima je prvobitno dijagnosticiran dijabetes tipa 2, zapravo imaju oba tipa. Dijabetes tipa 1 se tada naziva sporo razvijajući tip 1 ili latentni autoimuni dijabetes odraslih (LADA), koji će na kraju trebati nadomjesnu terapiju inzulinom. U osoba s dijabetesom tipa 2 se obično ne razvija ketoacidoza, ali može nastati u stanjima

stresa, kao što je infekcija ili pri uporabi lijekova koji pojačavaju rezistentnost, npr. kortikosteroida. Pošto bolesnici s dijabetesom tipa 2 produciraju određene količine inzulina, terapija prvo počinje sa sredstvima za povećanje produkcije rezidualnog inzulina ili osjetljivosti na inzulin umjesto da se krene s nadomjesnom terapijom inzulinom. Za početno liječenje se preporučuju preparati sulfonilureje i metformin. Terapija tabletama nakon nekog vremena postane nedovoljna te se uvodi inzulin u terapiju. Kod trećine bolesnika bolest se može kontrolirati dijetom i tjelovježbom. Kontrola koncentracije glukoze u krvi može smanjiti podložnost razvitku komplikacija, kao što su retinopatija te oštećenja bubrega i živaca (5)(8).

1.1.3. Drugi specificirani tip

Dijabetes tipa 3 predstavlja mnoge druge specifične uzroke poviše razine glukoze u krvi kao što su pankreatektomija, pankreatitis, bolesti koje nisu povezane s gušteračom, terapija lijekovima (5).

1.1.4 Gestacijski dijabetes

Gestacijski dijabetes definira se kao povišena razina glukoze u krvi koja se prvi put očituje u trudnoći. Iako je koncentracija glukoze povišena ona je ipak nižih vrijednosti u odnosu prema osobama s dijagnosticiran dijabetesom tipa 1 i 2. Žene s gestacijskim dijabetesom imaju povećan rizik od komplikacija tijekom trudnoće te tijekom poroda. Gestacijski dijabetes se dijagnosticira prenatalnim „screeningom“, a ne putem prijavljenih simptoma (9).

1.2. Povezanost dijabetesa s ispitivanjem koncentracije alkohola u uzorcima krvi u toksikološkim analizama

Prekomjerna konzumacija alkoholnih pića često ima važnu ulogu u brojnim nesretnim slučajevima, stoga su toksikološke analize ispitivanja koncentracije alkohola u krvi neophodne, osobito u postmortem uzorcima pri utvrđivanju uzroka smrti osobe. Takve analize provode se brzim i točnim analitičkim metodama, no nerijetko se javlja problem stabilnosti uzorka. Naime, koncentracija alkohola u uzorcima krvi je podložna promjenama, zbog oksidacije alkohola te posljedičnog smanjenja koncentracije alkohola u uzorku ili uslijed djelovanja mikroorganizama koji fermentacijom uzrokuju povećanje koncentracije alkohola u krvi. S obzirom na povišene koncentracije glukoze u krvi u osoba s dijabetesom, moguće su i povećane koncentracije alkohola u krvi zbog djelovanja mikroorganizama. Neophodno je provesti pravilnu pripremu te čuvanje uzoraka kako bi se osigurala stabilnost i reprezentativnost uzoraka, neposredno, ali i neko vrijeme nakon samog uzorkovanja. U tu svrhu potrebno je poznavati uvjete stabilnosti bioloških uzoraka. (10)(11).

1.3. Alkohol

Prema IUPAC nomenklaturi alkohol je bilo koji organski spoj u kojem je hidroksilna funkcionalna grupa vezana na zasićeni ugljikov atom. Pojam „alkohol“ primarno se odnosni na etilni alkohol koji je dominantan u alkoholnim pićima (11). Uz pušenje, alkoholizam predstavlja najrašireniji tip ovisnosti. Konzumacijom alkohola uz fizičku ovisnost, razvija se i psihička. Kod dugotrajne konzumacije alkohola, nakon nekog vremena se razvija tolerancija na njegove učinke. Fizička ovisnost, koja se javlja kod konzumacije većih količina od onih socijalno prihvaćenih, prati razvijanje tolerancije. Simptomi ustezanja od alkohola se obično javljaju 12 do 48 sati nakon prekida unosa, a uključuju ubrzan rad srca, znojenje, tremor, pojačane reflekse, poremećaj krvnog tlaka. Kod težih oblika ovisnosti javlja se grčenje i halucinacije (12)(13). Delirium tremens je brz način nastupa konfuzije obično uzrokovan odvikavanjem od alkohola. Javlja se 48 do 72 sata nakon prestanka uzimanja alkohola (13)(14). Alkohol je jedna od najopasnijih supstanci za odvikavanje (15).

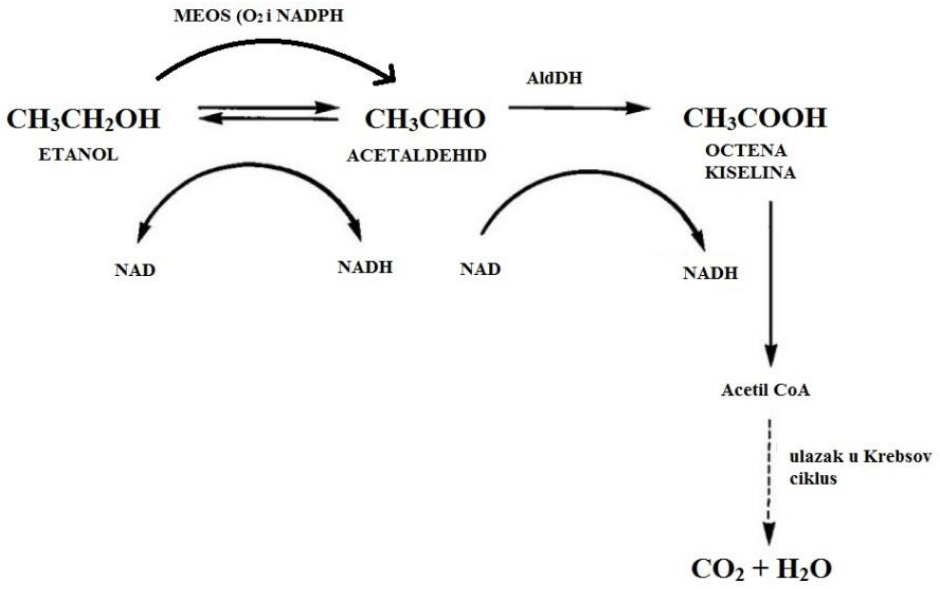
Tablica 1. Koncentracije alkohola u organizmu i pripadajući simptomi konzumacije alkohola (16). Količina alkohola u tijelu određuje se sadržajem alkohola u krvi (engl. *BAC– blood alcohol concentration*), a definira se kao težina etanola po jedinici volumena krvi.

BAC (*g/L*)	**BAC (% *v/v*)**	**SIMPTOMI**
0,5	0,05	Euforija, opuštenost, razgovorljivost
1	0,1	Depresija središnjeg živčanog sustava, mučnina, moguće povraćanje, umanjene funkcije motorike i osjetila
>1,4	>0,14	Smanjen protok krvi u mozak
3	0,3	Ošamućenost, moguća nesvijest
4	0,4	Moguća smrt
>5,5	>0,55	Smrt

1.3.1. Farmakokinetika etanola

Proces ulaska tvari u krvotok naziva se apsorpcija. Najveći dio apsorpcije etanola odvija se u tankom crijevu (80% ukupno unesenog alkohola) (17). Nakon konzumacije alkohola natašte, u roku od 30 minuta postiže se njegova maksimalna koncentracija u krvi (18). Svojstvo alkohola značajno za apsorpciju je njegova sposobnost miješanja s vodom. Difuzija alkohola je brža u tkiva koja su bogatija vodom. Nadalje, brzina apsorpcije ovisi o količini i koncentraciji unesenog alkohola te o tom pije li se alkohol na pun ili prazan želudac (19). Volumen raspodjele za etanol približno odgovara volumenu ukupne tjelesne tekućine (0,5-0,7 L/kg). Više od 90% etanola se metabolizira u jetri, dok se preostali, nepromijenjeni alkohol izlučuje plućima ili mokraćom. Metabolizam etanola u acetaldehid odvija se pomoću alkoholne dehidrogenaze (ADH) i mikrosomskog sustava za oksidaciju etanola (MEOS). Primarni put za metabolizam alkohola uključuje aktivnost ADH te nastanak nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADH) prijenosom vodikovog iona s alkohola na NAD^+. Višak NADH pridonosi metaboličkim poremećajima koji prate kronični alkoholizam, laktacidozi i hipoglikemiji. Pri porastu koncentracije etanola iznad vrijednosti od 100 mg/dL, sustav alkoholne dehidrogenaze postaje zasićen te raste doprinos enzimskog sustava MEOS. Velik dio nastalog acetaldehida se oksidira u octenu kiselinu pomoću aldehid dehidrogenaze

(ALDH). Octena kiselina se može dalje metabolizirati u vodu i ugljikov dioksid ili iskorištavati u obliku acetil-CoA (Slika 1).



Slika 1. Metabolizam etanola (20)

1.3.2. Farmakodinamika etanola

Kronična konzumacija alkohola utječe na funkcije vitalnih organa živčanog, probavnog, kardiovaskularnog i imunološkog sustava. Oštećenja tkiva, koja su posljedica alkoholizma, kombinacija su izravnih učinaka etanola i opterećenja metabolički aktivnim tvarima koje su produkti metabolizma alkohola. Alkohol ima izraženi akutni učinak na središnji živčani sustav. Glavni učinci koje ostvaruje su sedacija i smanjenje anksioznosti. Konzumacija većih količina alkohola može dovesti do nerazgovijetnog govora, oslabljene moći prosudbe i ataksije te se takvo se stanje naziva intoksikacija alkoholom. Kod ljudi koji kronično zloupotrebljavaju alkohol, uslijed razvoja tolerancije, potrebne su veće koncentracije za postizanje ovih učinaka. Alkohol izaziva depresiju središnjeg živčanog sustava, stoga u velikim količinama može uzrokovati komu, depresiju disanja i smrt. Također izaziva depresivan učinak na srce te mu smanjuje kontraktilnost. Nije zanemariv ni njegov utjecaj na arterijski tlak, kojeg dokazano povisuje. Njegov metabolit acetaldehid izaziva opuštanje glatkih mišića koje se očituje u vazodilataciji. U slučajevima teškog predoziranja, hipotermija koja se javlja u uvjetima niskih temperatura okoliša je upravo posljedica vazodilatacije. Najčešća medicinska komplikacija kronične konzumacije alkohola je bolest jetre. „Masna

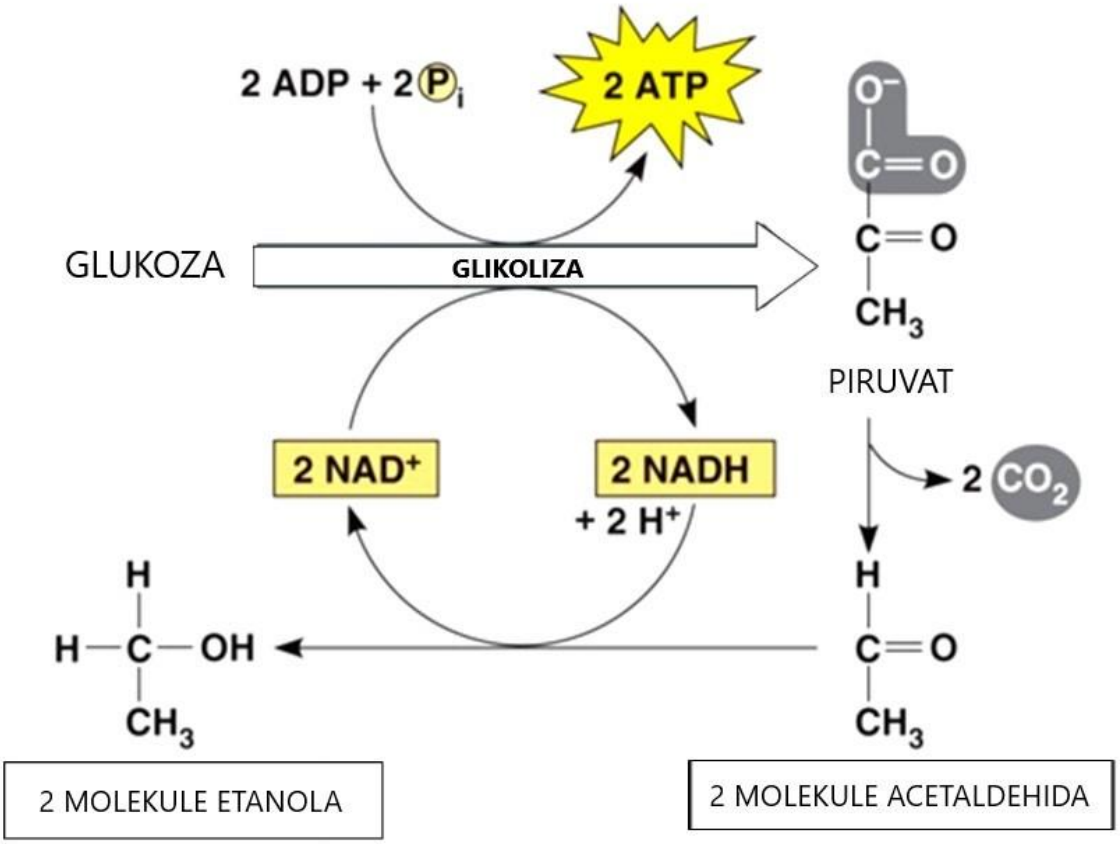
jetra“ uzrokovana alkoholom je reverzibilno stanje. Ipak, može napredovati do alkoholnog hepatitisa, ciroze i zatajenja jetre. Kronični alkoholizam predstavlja vodeći uzrok ciroze jetre u SAD-u te najčešći razlog za njeno presađivanje. Osim jetre, alkohol oštećuje i druge organe probavnog sustava. U zapadnom svijetu, najčešći uzrok kroničnog pankreatitisa je upravo alkoholizam. Konzumacijom alkohola povećava se sklonost gastritisu i oštećenje želučane sluznice. Alkohol oštećuje stanice tankog crijeva te posljedično smanjuje apsorpciju hranjivih tvari, stoga pothranjenost nije rijetkost u kroničnom alkoholizmu. Nadalje, može uzrokovati i hematološke poremećaje uslijed izravne inhibicije proliferacije svih staničnih elemenata u koštanoj srži. Kronični alkoholizam u trudnoći uzrokuje mentalnu retardaciju i urođene malformacije, što je poznato pod nazivom „fetalni alkoholni sindrom“. Neke od posljedica konzumiranja su mikrocefalija, loša mišićna koordinacija, nerazvijenost srednjeg dijela lica, anomalije zglobova, srčane greške i dr. Mehanizmi etanola koji su u podlozi teratogenog učinka još nisu poznati. Kronična konzumacija alkohola povećava rizik od karcinoma usta, ždrijela, jednjaka i jetre. U većini eksperimentalnih studija sam etanol se nije pokazao kancerogenim, ali je dokazano da njegov metabolit acetaldehid oštećuje DNA. Čimbenici rizika od zloćudnih bolesti su i promjene metabolizma folata te kronična upala koje uzrokuje alkohol. Zlouporaba velikih količina alkohola tijekom dugog vremenskog razdoblja dovodi do razvoja tolerancije te psihičke i fizičke ovisnosti. Uslijed prestanka konzumacije, razvija se sindrom ustezanja. Intenzitet sindroma ustezanja određuju doza alkohola, brzina i trajanje konzumacije alkohola (21).

1.3.3. Liječenje alkoholizma

Nakon provođenja detoksikacije, psihosocijalna terapija služi kao primarni tretman ovisnosti. Lijek koji se koristi u liječenju ovisnosti o alkoholu je disulfiram. Njegov mehanizam djelovanja je inhibicija aldehid dehidrogenaze, odnosno oksidacija acetaldehida u octenu kiselinu. Pri konzumaciji etanola u prisutnosti disulfirama, acetaldehid se nakuplja u velikim koncentracijama i izaziva neugodne nuspojave: crvenilo u licu, mučninu, povraćanje, vrtoglavicu i glavobolju. Takva reakcija naziva se „disulfiramska reakcija“. Naltrekson (antagonist opiodnih receptora) i akamprosat (antagonizam na NMDA receptorima i aktivacija $GABA_A$ receptora) su također odobreni kao pomoćna sredstva za liječenje ovisnosti o alkoholu u mnogim zemljama (21).

1.4. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je biološki proces u kojem se u anaerobnim uvjetima iz glukoze stvaraju etanol i ugljikov dioksid. Proces se može podijeliti u dva dijela. Prvi proces koji se odvija je glikoliza, tj. razgradnja molekule glukoze na dvije molekule piruvata. U procesu glikolize dolazi do pretvorbe NAD^+ u NADH i oslobađanja energije. Dobivena energija se koristi za vezanje anorganskih fosfata na adenozin difosfat (ADP) i proizvodnju adenozin trifosfata (ATP), glavnog oblika energije u stanici. Potom se dvije nastale molekule piruvata pretvaraju u dvije molekule acetaldehida uz oslobađanje dviju molekula ugljičnog dioksida, te se primitkom vodikovog iona iz NADH dvije molekule acetaldehida pretvaraju u dvije molekule etanola, prikazano na slici 2. Taj se proces naziva fermentacija. Mikroorganizmi u nedostatku kisika koriste alkoholnu fermentaciju za proizvodnju energije. (22)



Slika 2. Alkoholna fermentacija (23)

1.5. Biološki uzorci za analizu

Biološki uzorci predstavljaju biološka tkiva i tekućine. Biološke tekućine, najčešće uzorci krvi i mokraće, koriste kod kliničkih toksikoloških analiza, dok se u poslijesmrtnim toksikološkim analizama koriste i biološke tekućine i tkiva. U toksikološkim analizama živih osoba koriste se različiti materijali, većinom su to krv, mokraća, želučani sadržaj (u 98% slučajeva) te manje zastupljeni uzorci kose, sline i noktiju. Jedan od važnijih koraka u provođenju toksikoloških analiza je pravilno sakupljanje bioloških uzoraka (24).

1.5.1. Biološki uzorak krvi

Krv predstavlja jednako važan uzorak u poslijesmrtnoj toksikologiji, kao i u kliničkoj toksikologiji. Krv je biološki uzorak koji se u toksikološkoj analizi najčešće koristi kao referentni uzorak (25). Uzorci krvi izuzimaju se, najčešće, iz vena podlaktice. Za pripremu ubodnog mjesta za analizu koncentracije alkohola zabranjena je uporaba alkohola ili nekog drugog dezinfekcijskog sredstva koje sadrži alkohol. U takvim se slučajevima ubodno mjesto dezinficira otopinom sublimata ili okcijanata, opere običnom vodom ili prebriše čistom vatom. U uzorke krvi se često dodaju antikoagulansi kako bi se smanjila mogućnost hemolize, ali oni mogu dovesti do promjena odrađenih komponenti. Uzorak krvi čuva se u hladnjaku na temperaturi od +4°C, ukoliko će se analiza obaviti nekoliko dana nakon izuzimanja, ili na temperaturi od -20°C, ukoliko će od izuzimanja do analize proći dulje vrijeme (26).

1.5.2. Antikoagulansi

Antikoagulansi su tvari koje sprječavaju zgrušavanje krvi ili krvne plazme te osiguravaju što manje značajnih promjena prije analitičkog procesa. Antikoagulantni učinak se događa vezivanjem iona kalcija (EDTA, citrati, natrijev flourid) ili inhibicijom trombinske aktivnosti (heparin, hirudin). Antikoagulansi, dodani u vakutajner epruvete (slika), se pomiješaju s krvlju odmah nakon izuzimanja uzorka. Vakutajner sistem za uzimanje venske krvi je zatvoren, sterilan sistem koji se koristi za različite laboratorijske analize krvi. Princip rada je takav da krv prilikom venepunkcije krv pod negativnim tlakom ulazi u sterilnu epruvetu koja je pod vakumom.



Slika 3. „Vakutajner“ epruvete (27)

Vakutajner epruvete se koriste za uzorkovanje, transport i obradu krvi. Svaka epruveta ima čep određene boje, koja određuje koja analiza se izvodi te koji se antikoagulans u njoj nalazi. Najčešće se koriste sljedeće epruvete:

1. Epruveta s crvenim čepom –7-10 ml krvi bez antikoagulansa
2. Epruveta s ljubičastim čepom – 2-3 ml krvi s 2-3 kapi EDTA kao antikoagulansom
3. Epruveta s plavim čepom – 4.5 ml krvi s 0.5 ml natrijevog citrata kao antikoagulansa
4. Epruveta s sivim čepom – 1 ml krvi te nekoliko kapi različitih antikoagulansa (EDTA, citrat, limunska kiselina)
5. Epruveta s zelenim čepom – krv s heparinom kao antikoagulansom

EDTA

Sol etilendiamintetraoctene kiseline omogućuje antikoagulantni učinak. Koriste se soli dikalijevog (K2), trikalijevog (K3) i dinatrijevog (Na2) iona, pri koncentracijama od 1.2 do 2.0 mg/mL krvi (4.1 do 6.8 mmol/L krvi) na bazi bezvodnog EDTA.

Citrat

Koristi se trinatrijev citrat s 0.100 do 0.136 mol/L limunske kiseline. Uočene su razlike između 3.2% i 3.8% citrata kad je u pitanju INR (međunarodni standardizirani omjer). WHO preporučuje 0.109 mmol/L (3.2%) limunske kiseline.

Heparin

Heparin je heterogena smjesa sulfatnih mukopolisaharnida. Njegov učinak je ovisan o endogenom antikoagulansu antitrombinu (28). Za dobivanje standardizirane heparizirane plazme preporučuje se korištenje 12 do 30 IU/mL nefrakcionirane natrijeve, litijeve ili amonijeve soli heparina molekulske mase 3 do 30 kD.

Hirudin

Hirudin je antitrombin koji je ekstrahiran iz pijavica ili pripremljen genetičkim inžinjerstvom. Inhibira trombin stvaranjem kompleksa s trombinom u omjeru 1:1. Koristi se u koncentraciji od 10 mg/L (29).

Natrijev Flourid (NaF)

Natrijev flourid ima dvostruki učinak na krv. Sprječava zgrušavanje krvi kad je dodan u istoj koncentraciji kao i oksalat. Također, sprječava sve učinke fosfataze. Kao rezultat toga, krv koja je tretirana s NaF može se osigurati do nekoliko dana bez hidrolize i sinteze fosforovih estera. Za antikoagulantni učinak dodaje se 10 mg praška NaF na 5 mL krvi (30).

1.6. Stabilnost i pohrana bioloških uzoraka

Na stabilnost uzoraka utječu brojni čimbenici, u koje ubrajamo fizikalno- kemijska svojstva, svojstva uzorka i matice, proceduru sakupljanja uzoraka, odabir spremnika za uzorak, upotrebu i izbor antikoagulansa, temperaturu pohrane uzorka i drugo (31). Uzrok nestabilnosti lijekova i sredstava ovisnosti posljedica je metaboličke razgradnje, kemijske transformacije ili njihove kombinacije. Nestabilnost pojedinih komponenti u uzorku uglavnom dovodi do smanjenja koncentracije. Ipak, neki konjugirani analiti, kao što su glukuronidi, dekonjugacijom mogu povećati koncentraciju analita pri određenim uvjetima. Prilikom pripreme i analize uzoraka treba pripaziti i na temperaturu, jer neki lijekovi pokazuju toplinsku nestabilnost. Također, treba imati na umu da koncentracija lijeka nije uvijek jednaka u vrijeme analize u odnosu na vrijeme prikupljanja uzorka. U idealnim uvjetima, stabilnost sredstava ovisnosti trebala bi se vrednovati na više načina: ispitivanjem kratkotrajne i dugotrajne stabilnosti uzorka ili matice uzorka, učinka ciklusa zamrzavanja i odleđivanja

uzoraka te stabilnosti na sobnoj temperaturi. Poznavanje kinetičkih varijabli i utjecaja temperature na sredstva ne znači nužno sposobnost predviđanja konačnih rezultata analize (32). U kliničkoj i poslijesmrtnoj toksikologiji podjednako su potrebni pouzdani kvalitativni i kvantitativni rezultati, u protivnom rezultati analize mogu dovesti do podcjenjivanja i precjenjivanja učinaka ili do netočnih interpretacija (33). U nekim okolnostima nakon analize potrebno je skladištenje uzoraka, ponekad i duže vremensko razdoblje, koje je u skladu s pravilima.

U „Narodnim novinama“ broj 86/14 donesen je Pravilnik kojim se određuje način i postupak vađenja uzoraka krvi i mokraće za analizu utvrđivanja koncentracije alkohola, prisustva opojnih droga te psihoaktivnih tvari kod osoba za koje postoje osnovane sumnje da su počinile kazneno djelo, te vozača i drugih sudionika u prometu, kao i uvjeti koje zdravstvene i druge ustanove moraju ispunjavati da bi mogle obavljati analize tih uzoraka. Člankom 12 istog Pravilnika predviđen je rok čuvanja uzoraka (34).

Članak 12.

Uzeti uzorci pohranjuju se u hladnjaku na temperaturi od +4 °C i čuvaju šest mjeseci od izvršene analize.

Enzimi mogu nastaviti svoje aktivno djelovanje i nakon izuzimanja uzorka te na taj način degradirati ili transformirati lijek in vitro. Taj se proces može odvijati tijekom transporta, skladištenja i analize.

Kao što je već rečeno, do promjene uzorka može doći ukoliko nije dodan antikoagulans. Antikoagulans, najčešće NaF, u uzorcima je zastupljen u konačnoj koncentraciji 1–5 %. Samo ukoliko je izuzet manji volumen krvi višak NaF može utjecati na ispitivanje hlapljivih tvari mijenjanjem tlaka pare analita. Dodatkom NaF inhibiraju se mikroorganizmi koji pretvaraju glukozu u etanol odnosno sprječava se oksidacija etanola potaknuta djelovanjem mikroorganizama (35)(36)(37)(38).

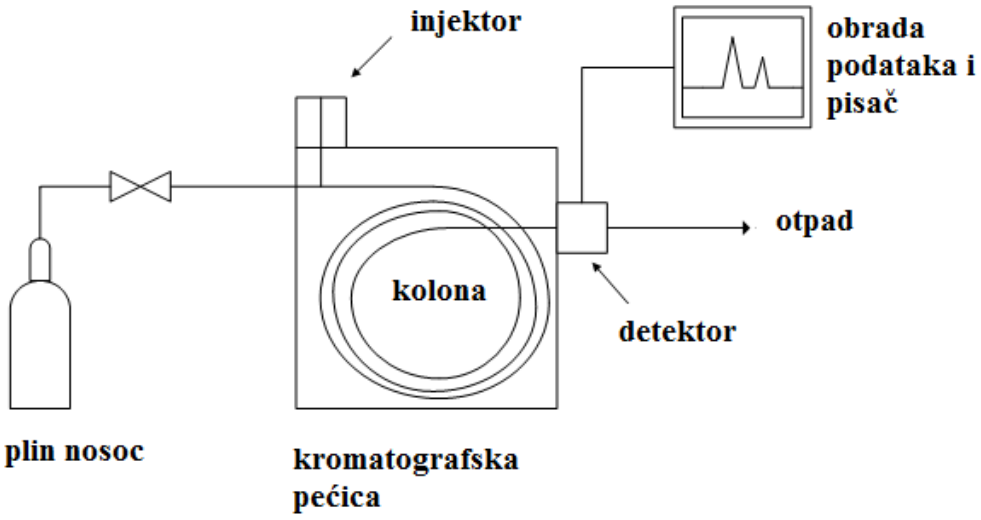
Korištenje antikoagulansa može imati i loše učinke. Čuvanje uzoraka pomoću NaF nije dozvoljeno ukoliko su uzroci pozitivni na organofosfate jer može vrlo brzo doći do raspadanja tih spojeva (39).

1.7. Instrumentalna analiza

Kromatografija je najčešće korištena fizikalna metoda koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i određivanje analita u kompleksnim smjesama. Korištenjem kromatografskih metoda omogućuje se raspodjela sastojaka između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna koja se giba u određenom smjeru. Ispitivani analit je, tijekom procesa, u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Nepokretna faza mora biti pažljivo odabrana da bi se različiti sastojci smjese za nju vezali u različitim vremenskim razdobljima, te omogućila razlučivanje matice uzorka. Ukoliko je nepokretna faza smještena unutar kromatografskog stupca, naziva se kolonskom kromatografijom, a ako je nanesena kao tanki sloj na inertnu podlogu, tada se govori o plošnoj kromatografiji. Podjela kromatografskih tehnika moguća je na temelju sastava pokretne faze. U plinskoj kromatografiji (engl. *gas chromatography*, GC) pokretna faza predstavlja inertni plin, u tekućinskoj kromatografiji (engl. *liquid chromatography*, LC) je kapljevina male viskoznosti, a u fluidnoj kromatografiji pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC) pokretna je faza gusti plin (fluid) iznad svoje kritične temperature i tlaka (40).

1.7.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija omogućuje ispitivanje i analizu spojeva koje je moguće prevesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400°C. Kao što je navedeno, pokretnu fazu predstavlja kemijski inertan plin, a njegov izbor ovisi o vrsti detektora. Najčešće se upotrebljavaju helij, dušik, argon ili ugljični dioksid (41). Od uvođenja analiza lako hlapljivih organskih otapala plinskom kromatografijom u toksikologiji, poboljšala se vjerodostojnost analitičkih nalaza, zbog visoke moći odvajanja i osjetljivosti plinske kromatografije. Neke od primjena u toksikologiji su određivanje koncentracije alkohola, hlapljivih tvari, anestetika, određivanja ugljičnog monoksida, i drugo (42).



Slika 3. Shematski prikaz osnovnih dijelova plinskog kromatografa (43).

Princip rada plinskog kromatografa prikazan je na slici 3. Upareni uzorak injektira se na početak kolone, te nošen pokretnom fazom, odnosno inertnim plinom, prolazi kroz kolonu. Uzorci se razdvajaju i u različitim vremenskim razdobljima dolaze do detektora. Do razdvajanja dolazi zbog razlike u fizikalno– kemijskim svojstvima te različitog afiniteta analita prema nepokretnoj i pokretnoj fazi.

Injektor je sastavni dio plinskog kromatografa koji omogućuje unošenje uzorka u instrument. Njegov odabir ovisi o karakteristikama uzorka, količini i karakteristikama analita te o vrsti kolone i karakteristikama nepokretne faze u koloni (41). Postoji mnogo različitih izvedbi injektora. Najznačajniji su injektor za punjene kolone, injektor s hlađenjem na koloni te kombinirani split/splitless injektor koji se i najviše koristi (44).

Kolone za plinsku kromatografiju mogu biti punjene i kapilarne. Optimalna temperatura kolone ovisi o temperaturi vrelišta ispitivanog uzorka. Pri nižim temperatura postiže se brže razdvajanje, ali je zbog toga vrijeme eluiranja duže. Prilikom analize bioloških uzroka koji imaju analite različitih vrelišta, poželjno je korištenje temperaturnog programa (41).

Detektori

Odabir detektora za pojedinu analizu ovisi o osjetljivosti i selektivnosti detektora, linearnom radnom području detektora, jednostavnosti korištenja, dostupnosti rezervnih dijelova i cijeni. Kromatografski detektori mogu biti univerzalni i selektivni. Pomoću univerzalnih detektora moguće je odrediti većinu analita, dok selektivni reagiraju samo na neke funkcionalne skupine, atome ili strukturne konfiguracije. Osjetljivost detektora mjeri se odnosom visine pika i visine bazne linije. Najčešće korišteni detektori su plameno–ionizacijski detektor (engl. *„Flame ionization detector*– FID*“*) i detektor toplinske vodljivosti (engl. *„Thermal conductivity detector*–TCD“).

Plinska kromatografija s „headspeace“ tehnikom se primjenjuje u analizi alkohola, ali i drugih lakohlapljivih organskih spojeva. „Headspeace“ je tehnika u kojoj se u plinski kromatogram injektira plinovita faza koja je u ravnoteži s tekućinom ili krutinom. Priprema uzorka krvi za analizu je jednostavna i pretežno podrazumijeva samo razrjeđivanje uzorka s puferom te dodatkom internog standarda (45)

2. CILJEVI

Ciljevi ovog rada bili su :

1. Ispitati dolazi li do razvijanja etanola u biološkim uzorcima krvi pacijenata sa šećernom bolesti pri ispitivanim temperaturama, +4°C te na sobnoj temperaturi.
2. Ispitati metodu za analizu etilnog alkohola.
3. Ispitati djelovanje antikoagulansa u epruvetama za pohranu bioloških uzoraka krvi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom radu su korištene slijedeće kemikalije:

1. Tercijarni butanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

2. Referentni standard: etanol
    - Kemijsko ime: hidroksietan
    - Empirijska formula: C_2H_5OH
    - Molarna masa: 46.07 g/mol
    - CAS broj: 64-17-5
    - Izgled: bezbojna tekućina
    - Točka taljenja: 114°C
    - Gustoća: 0,789 g/cm^3



Slika 4. Ampula standardne otopina etanola koncentracije (1 g/L).

3.2. Priprema standardne otopine etanola

Umjerna krivulja etanola dobivena je razrjeđivanjem početne standardne otopine etanola koncentracije 5,0 g/kg. Od početne otopine pripremljene su vrijednosti koncentracija: γ_4=2,5 g/kg, γ_3=1,5 g/kg, γ_2=1 g/kg, i γ_1=0,5 g/kg (Tablica 2).

Tablica 2. Priprema standardnih otopina etanola za umjernu krivulju.

Redni br. Konc	**$V_{početne\ otopine}$ (mL)**	**V_{vode} (mL)**	**Koncentracija etanola (g/kg)**
1	0,5	4,5	0,5
2	1	4	1
3	1,5	3,5	1,5
4	2,5	2,5	2,5

3.3. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC/FID

Koncentracija etanola u biološkim uzorcima krvi (engl. *Blood alcohol concentration*, BAC) određivala se „headspace“ tehnikom plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom i autoinjektorom. Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCSolution software računalnim programom. Korištena kolona plinskog kromatografa je Restek, RTx-BAC1, dužine 30 m, promjera 0,53 mm i debljine filma nepokretne faze 3 μm.

Plinski kromatograf:

- Shimadzu GC-2010
- maksimalna temperatura pećnice: 450 ^{0}C
- regulator protoka: 0-970 kPa

Plameno-ionizacijski detektor:

Shimadzu AOC-5000

- elektronički reguliran protok (engl. *Advanced Pressure Control*- APC)
- maksimalna temperatura: 450 ^{0}C



Slika 5. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom; Shimadzu GC-2010 (46).

3.4. Priprema uzoraka krvi za analizu

Na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split, izvađeni su uzorci krvi osoba oboljelih od dijabetesa. Prikupljeno je 27 uzoraka (dodijeljeni su im brojevi 1-27 u kemijsko-toksikološkom laboratoriju KBC-a Split) i podijeljeni su u 3 grupe:

a) uzorci s koncentracijom glukoze < 6 mmol/L
b) uzorci s koncentracijom glukoze od 6.1 mmol - 10 mmol/L
c) uzorci s koncentracijom glukoze > od 10.1 mmol/L

Zbog malih volumena svakog od uzorka krvi, pripremljeni su uzorci sljedećih volumena i koncentracija glukoze, prikazano u Tablicama 3 - 13. Svaki uzorak je podijeljen u dvije epruvete s ljubičastim čepom (antikoagulans: EDTA) te su uzorci čuvani u hladnjaku (uzorci: 1-11) i na sobnoj temperaturi (uzorci 1a-11a).

1. **Uzorak 1.**
   GUK = 5.1 mmol/L
   V = 3500 µL

Tablica 3. Priprema uzorka 1 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
1	1750	4.7
2	1750	5.5

2. **Uzorak 2.**
   GUK = 5.7 mmol/L
   V = 4350 µL

Tablica 4. Priprema uzorka 2 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
4	1450	5.7
5	1450	5.7
6	1450	5.7

3. **Uzorak 3.**

   GUK = 5.8 mmol/L

   V = 3000 µL

   Tablica 5. Priprema uzorka 3 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
3	1500	5.6
7	1500	6.0

4. **Uzorak 4.**

   GUK = 6.23 mmol/L

   V = 4650 µL

   Tablica 6. Priprema uzorka 4 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
9	1550	6.2
8	1550	6.1
10	1550	6.4

5. **Uzorak 5.**

   GUK = 6.7 mmol/L

   V = 3400 µL

   Tablica 7. Priprema uzorka 5 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
11	1700	6.7
12	1700	6.7

6. **Uzorak 6.**

   GUK = 8.4 mmol/L

   V = 4800 µL

   Tablica 8. Priprema uzorka 6 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
14	1600	8.7
15	1600	8.7
13	1600	7.8

7. **Uzorak 7.**

   GUK = 9.63 mmol/L

   V = 4500 µL

   Tablica 9. Priprema uzorka 7 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
18	1500	10.0
16	1500	9.3
17	1500	9.6

8. **Uzorak 8.**

   GUK = 11.76 mmol/L

   V = 5700 µL

   Tablica 10. Priprema uzorka 8 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
19	1900	11.6
–21	1900	12.0
20	1900	11.7

9. **Uzorak 9.**

GUK = 12.7 mmol/L

V = 3200 µL

Tablica 11. Priprema uzorka 9 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
22	1600	12.7
23	1600	12.7

10. **Uzorak 10.**

GUK = 14.8 mmol/L

V = 3600 µL

Tablica 12. Priprema uzorka 10 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
25	1800	15.3
24	1800	14.3

11. **Uzorak 11.**

GUK = 19.4 mmol/L

V = 3200 µL

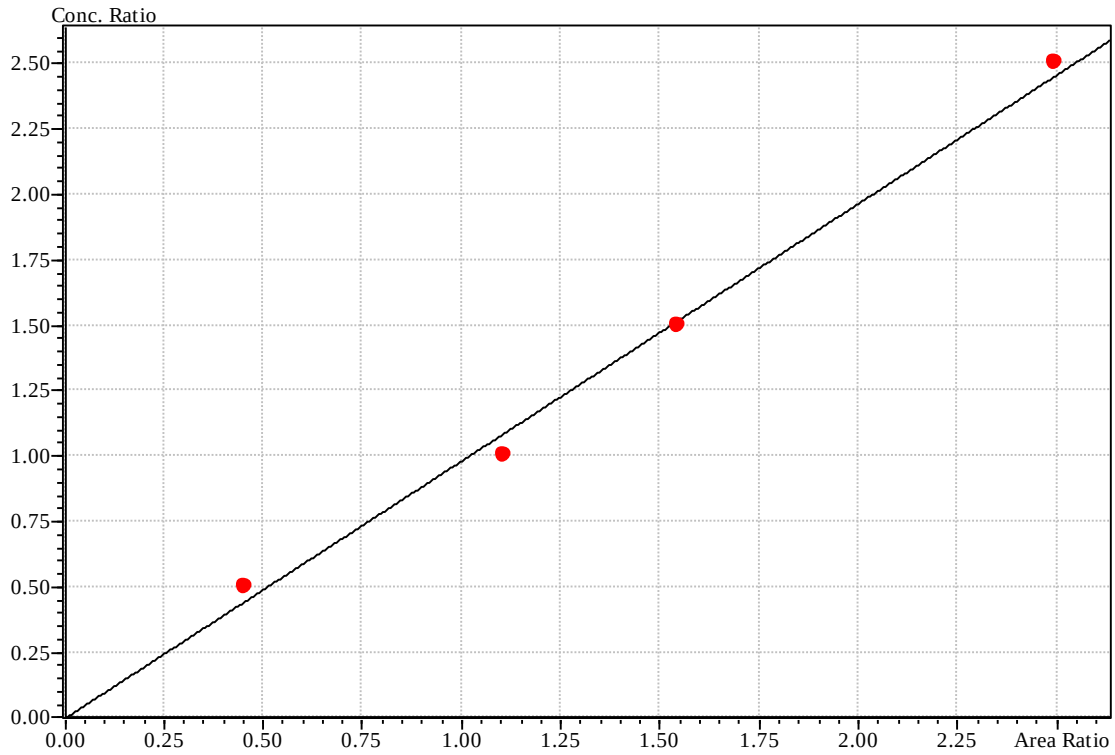
Tablica 13. Priprema uzorka 11 za analizu.

Broj uzorka	V (µL)	GUK (mmol/L)
27	1600	23.1
26	1600	15.7

4. REZULTATI

4.1. Umjerna krivulja etanola

Umjerna krivulja predstavlja rezultat pripreme i analize razrijeđenih standardnih otopina (opisano u poglavlju 3.2.). Umjernom krivuljom omogućeno je kvantitativno očitanje etanola u biološkim uzorcima. Umjerna krivulja za etanol konstruirana je linearnim spajanjem kalibracijskih točaka u vrijednosti 0.5 g/kg do 2.5 g/kg (Slika 6).



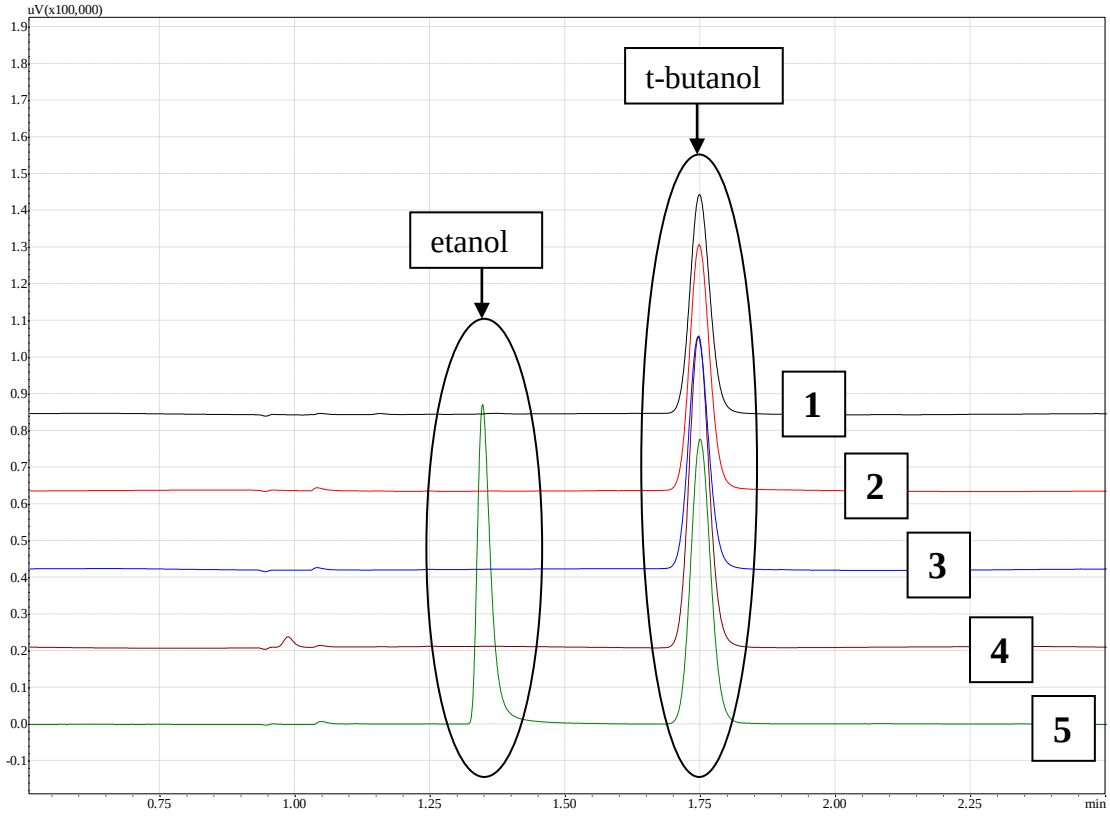
Slika 6. Umjerna krivulja etanola nastala linearnim spajanjem kalibracijskih točaka (0.5-2-5 g/ kg)

4.2. Koncentracije alkohola u uzorcima

Prikupljeni su dobiveni rezultati bioloških uzoraka krvi, pacijenata sa šećernom bolesti, kroz vremenski period od 30 dana. U svim uzorcima (1-11 i 1a-11a) dokazana je koncentracija alkohola je bila 0 g/kg (tablica 14).

Tablica 14. Koncentracija alkohola u uzorcima.

Uzorak	Koncentracija alkohola (g/kg) 0. dan	Koncentracija alkohola (g/kg) 3. dan	Koncentracija alkohola (g/kg) 15. dan	Koncentracija alkohola (g/kg) 30. dan
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
1a	0	0	0	0
2a	0	0	0	0
3a	0	0	0	0
4a	0	0	0	0
5a	0	0	0	0
6a	0	0	0	0
7a	0	0	0	0
8a	0	0	0	0
9a	0	0	0	0
10a	0	0	0	0
11a	0	0	0	0



Slika 7. Prikaz rezultata dobivenih analizama kliničkih uzoraka krvi, u vremenskom razdoblju od 30 dana, pohranjenih u hladnjaku na +4 ^{0}C, u kojima nije dokazano prisustvo i razvoj etanola:

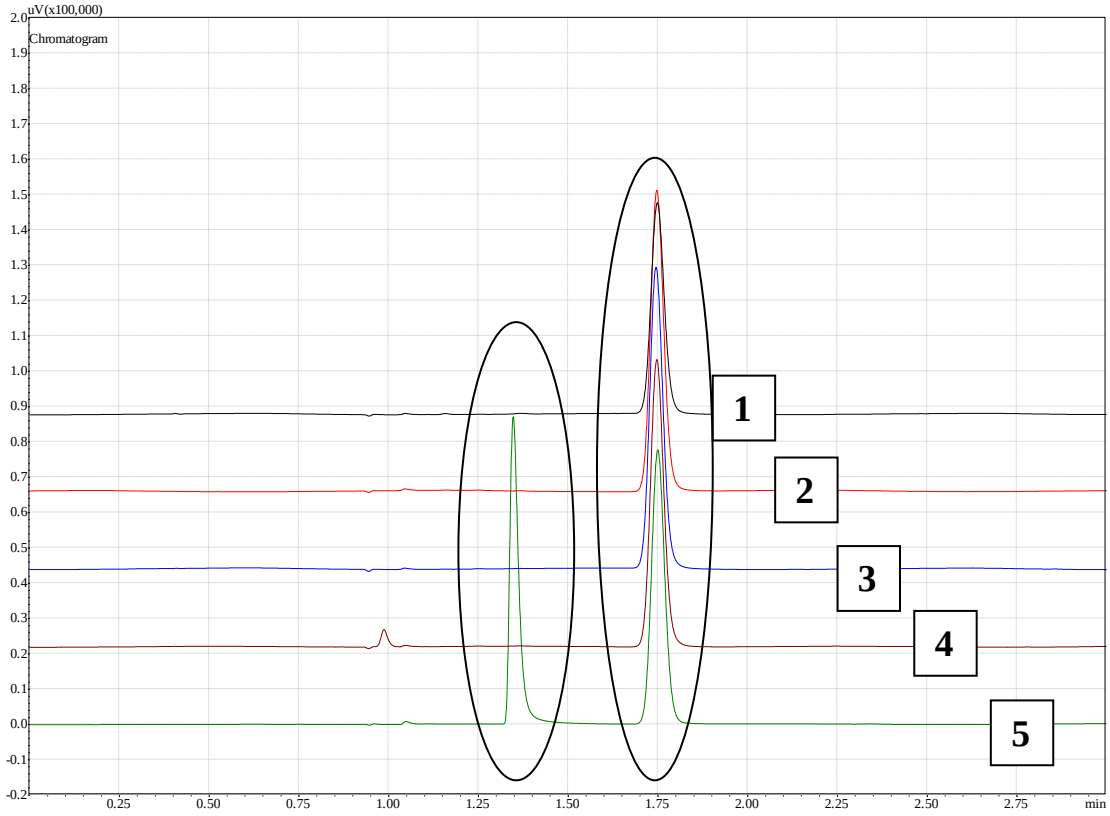
1- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 0. dan

2- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 3. dan

3- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 15. Dan

4- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 30. Dan

5- Kromatogram ukupne ionske struje standardne otopine etanola (1 g/kg)



Slika 8. Prikaz rezultata dobivenih analizama kliničkih uzoraka krvi, u vremenskom razdoblju od 30 dana, pohranjenih na sobnoj temperaturi, u kojima nije dokazano prisustvo i razvoj etanola:

1- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 0. dan

2- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 3. dan

3- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 15. Dan

4- Kromatogram ukupne ionske struje uzorka analiziranog 30. Dan

5- Kromatogram ukupne ionske struje standardne otopine etanola (1 g/kg)

5. RASPRAVA

Određivanje koncentracije alkohola u biološkim uzorcima živih i mrtvih osoba veoma je važno za sudsku medicinu i toksikologiju. Teoretski postoji mogućnost da se glukoza iz krvi fermentacijom prevede u alkohol. Mogućnost je veća kod osoba s dijabetesom. Svrha istraživanja bila je provjeriti dolazi li do konverzije glukoze u etanol i u kojoj mjeri.

U ovom radu obrađeni su sterilni klinički uzorci krvi pacijenata s šećernom bolesti, negativnih na prisustvo etanola, izuzeti u epruvete s EDTA kao antikoagulansom.

Kvantitativna analiza uzoraka krvi na alkohol vršena je 4 puta tokom mjesec dana pomoću GC-FID metode. Analizirano je ukupno 22 uzorka, podijeljenih u dvije grupe te 2 standardne otopine etanola. Obje skupine uzoraka analizirane su 0., 3., 15. i 30. dan. Prva grupa (uzorci 1-11) pohranjena je u hladnjaku, na temperaturi od $+4^0$C, a druga je grupa uzoraka (uzorci 1a-11a) pohranjena na sobnoj temperaturi. U uzorcima krvi određena je koncentracija glukoze u uzorcima u rasponu od 5.1 mmol/L (uzorak 1) do 19.4 mmol/L (uzorak 11). Svi ispitivani uzorci bili su negativni na prisustvo etanola, dokazano GC-FID instrumentalnom tehnikom. Suprotno očekivanjima, nije došlo do razvijanja etanola, te je koncentracija alkohola u svim uzorcima bila 0 g/kg kroz svih 30 dana mjerenja (Slika 7. i Slika 8.).

Za razliku od kliničkih uzoraka, u poslijesmrtnim uzorcima krvi dokazana je mikrobiološka aktivnost i promjena u izmjerenoj koncentraciji alkohola u određenom, kraćem, vremenskom razdoblju. Tako su Sutlović i suradnici (10) potvrdili prisustvo određenih mikroorganizama (*Citrobacter freundii, Enterococcus faecalis, Serratia marcescens, Candida glabrata*) koji su pogodovali fermentaciji šećera i promjeni koncentracije etanola. Za razliku od poslijesmrtnih uzoraka u kojima je bila prisutna mikrobiološka kontaminacija, u uzorcima živih osoba kontaminacija mikroorganizmima koja bi utjecala na stabilnost uzorka je značajno manja. Moguće je da je EDTA utjecao na inhibiciju fermentacije glukoze, odnosno da je EDTA onemogućio konverziju glukoze u etanol. Za pouzdane tvrdnje njegova utjecaja na fermentaciju potrebno je provesti daljnja istraživanja koja bi uključivala i mikrobiološku analizu uzoraka. Zasada se sa sigurnošću može govoriti o antimikrobnom djelovanju isključivo NaF-a kao antikoagulansa: C. Oddoze i suradnici (47) su upotrebom natrij fluorida kao antikoagulansa očuvali stabilnost uzorka na +4 °C i 25 °C, no ne duže od 24 sata.

Uz antikoagulanse, na stabilnost uzorka utječe i volumen samog uzorka u spremniku. Veličina spremnika mora odgovarati volumenu, a materijal spremnika vrsti biološkog uzorka, kako bi se spriječile neželjene kemijske promjene samog uzorka. Biološki uzorci živih osoba se u svrhu toksikoloških analiza najčešće izuzimaju u zatvorene i sterilne sustave, takozvane „Vakutajner“ epruvete, koje su korištene i u ovom istraživanju.

Pohrana uzoraka krvi u odgovarajućim uvjetima osigurava stabilnost uzoraka. Ukoliko se uzorci kratkotrajno pohranjuju, s namjerom provođenja analize 2 do 3 dana nakon izuzimanja uzorka, čuvaju se u hladnjaku na temperaturi +4°C. Kod dugotrajne pohrane uzoraka, dulje od dva tjedna, uzorci se pohranjuju na temperaturi -20°C. Izuzetak su uzorci kose, noktiju i osušene krvi koji se mogu pohraniti na sobnoj temperaturi (48). U ovom su istraživanju uzorci 1 - 11 čuvani na temperaturi +4°C, a uzorci 1a - 11a na sobnoj temperaturi u ukupnom razdoblju od 30 dana. Iako je dio uzoraka bio čuvan na sobnoj temperaturi, u tim uzorcima, suprotno očekivanjima, nije došlo do razvoja alkohola.

Dobiveni rezultati su veoma ohrabrujući. Kod kliničkih uzoraka krvi pacijenata s dijabetesom sa širokim rasponom izmjerene glukoze u krvi (5.1 mmol/L - 19.4 mmol/L) čak ni pri sobnoj temperaturi, što se podrazumijeva kao neprikladno čuvanje uzoraka, nije došlo do razvoja etanola. Preporuka je da se provedu ispitivanja s još višim koncentracijama glukoze u krvi pri različitim uvjetima čuvanja (drugačiji spremnici, temperatura, različite koncentracije EDTA, različiti antikoagulansi, volumeni uzoraka i slično), kako bi se mogle povući određene korelacije s dobivenim rezultatima.

12. ZAKLJUČCI

1. U biološkim uzorcima krvi pacijenata sa šećernom bolesti, pohranjeni u epruvete s antikoagulansom EDTA, ne dolazi do razvijanja etanola pri obje ispitivane temperature,+4°C te na sobnoj temperaturi.

2. Uzorci krvi pacijenata s dijabetesom, pohranjenih u epruvetama s antikoagulansom, izuzetih u svrhu određivanja koncentracije alkohola, pokazuju stabilnost na razvijanje etanola najmanje 30 dana.

3. Metoda je primjenjiva za kvalitativnu i kvantitativnu analizu etanola.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf (pristup: 29.03.2017.)

2. URL: http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf (pristup: 29.03.2017.)

3. Mathers CD, Loncar D, Boreham J, Thun M, Heath J, Doll R. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. Samet J, editor. PLoS Med [Internet]. 2006 Nov 28 [cited 2017 Aug 29];3(11):e442. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0030442

4. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. str. 422.

5. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. str. 727.

6. URL: http://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/28/Dijabetes-tip-1.htm (pristup: 30.03.2017.)

7. URL: https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes (pristup: 30.03.2017.)

8. URL: http://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/29/Dijabetes-tip-2.html (pristup: 30.03.2017.)

9. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85975/1/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf (pristup: 30.03.2017.)

10. Sutlovic D, Nestic M, Kovacic Z, Gusic S, Mlinarek T, Salamunic I, et al. Microbial ethanol production in postmortem urine sample. Med Sci Law [Internet]. 2013 Oct 28 [cited 2017 Aug 29];53(4):243–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812407

11. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. Forensic Sci Int [Internet]. 2007 Jan [cited 2017 Aug 29];165(1):10–29. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073806002891

12. URL: http://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/138/Alkoholizam.html (pristup: 04.04.2017.)

13. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 95.

14. Healy D. Psychiatric drugs explained. Churchill Livingstone Elsevier; 2009.

15. Posner JB, Saper CB, Schiff N, Plum F. Plum and Posner's Diagnosis of Stupor and Coma [Internet]. Oxford University Press; 2008 [cited 2017 Aug 29]. Available from: http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780195321319.001.0001/med-

9780195321319

16. Pohorecky LA, Brick J. Pharmacology of ethanol, Pharmacol. Ther. 36 (1988) 335-427.

17. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 230.

18. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. p. 388.

19. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011.str. 230., 231.

20. P. W. Mullen, The metabolism and pharmacokinetics of alcohol in man, Journal of the forensic science society 17 (1977) 49-55.

21. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 2011. 389.-393.

22. URL: http://study.com/academy/lesson/alcohol-fermentation-definition-equation-process.html (pristup: 12.04.2017.)

23. URL: http://darwinsgirlfriend.tumblr.com/post/118276755551/key-concepts-cellular-respiration (pristup: 13.04.2017.)

24. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 305.

25. Millo T, Jaiswa AK, Behera C. Collection, preservation and forwarding ofbiological samples for toxicological analysis in medicolegal autopsy cases : A review, J.Indian Acad. Forensic Med. 30 (2008) 96-100.

26. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 307.

27. URL: https://ivamilosevic5.wordpress.com/2016/01/17/vakutajner-sistem-za-krvne-analize/ (pristup: 05.05.2017.)

28. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 2011. p. 591.

29. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/65957/1/WHO_DIL_LAB_99.1_REV.2.pdf?ua=1 (pristup: 06.05.2017.)

30. Burkens JC. The use of sodium fluoride as a blood anticoagulant in blood phosphorus determinations. Biochem J [Internet]. 1935 Mar [cited 2017 Aug 29];29(3):796–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16745726

31. Carroll FT, Marraccini JV, Lewis S, Wright W. Morphine-3- D GlucuronideStability in Postmortem Specimens Exposed to Bacterial Enzymatic Hydrolysis, Am. J.Forensic Med. Pathol. 21 (2000) 323-329.

32. Negrusz A, Cooper G, Clarke's analytical forensic toxicology. Vol. 2,

PharmaceuticalPress, London, 2013, str. 633.

33. Peters FT. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical andforensic toxicology? Anal Bioanal Chem. 388 (2007) 1505-1519.

34. URL: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_07_86_1723.html (pristup:29.05.2017.)

35. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology, Forensic Sci. Int. 142 (2004)75-100.

36. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of drugs in storedpostmortem femoral blood and vitreous humor, J. Forensic Sci. 49 (2004) 820-825.

37. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life andat postmortem, Toxicol. Rev. 24 (2005) 51-62.

38. R. J. Flanagan, G. Connally, Interpretation of analytical toxicology results in life andat postmortem, Toxicol. Rev. 24 (2005) 51-62.

39. Moriya F, Hashimoto Y. Comparative studies on tissue distributions oforganophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated withthese chemicals, J. Forensic Sci. 44 (1999) 1131-1135.

40. Kašelan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija. In: Plošna Kromatografija. 1st ed. zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2006.

41. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 346.-349.

42. Dragel DT, Beck E, Principe AH. Some Applications of Gas Chromatography toForensic Chemistry, J. Crim. L. Criminology & Police Sci. 54 (1963) 96-100.

43. URL:http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography#mediaviewer/File:Gas_chromatograph.png (pristup: 01.04.2015.)

44. URL: http://lab-training.com/landing/gc- module-5/ (pristup: 01.07.2017)

45. Kolb B, Ettre LS. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice.Vol. 2, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

46. URL: http://www.shimadzu.com/an/gcms/qp2010se.html (pristup: 15.09.2017.)

47. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. Clin Biochem [Internet]. 2012 [cited 2017 Aug 30];45:464–9. Available from: https://folk.uib.no/mfapu/Pages/BV/BVSite/pdf_files/literature/oddozo_2012_cb_45_464.pdf

48. Plant SQ, Kit DN a. Storage and Stability. Clarke's Anal Forensic Toxicol. 2008;(Storage and Stability):3–7.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Ispitati stabilnost kliničkih bioloških uzoraka krvi pacijenata sa šećernom bolesti i djelovanje antikoagulansa EDTA u epruvetama za pohranu bioloških uzoraka krvi te ispitati metodu za analizu etanola.

Materijali i metode: Razrjeđivanjem početne standardne otopine etanola koncentracije 5,0 g/kg pripremljene su vrijednosti koncentracija: γ_4=2,5 g/kg, γ_3=1,5 g/kg, γ_2=1 g/kg, i γ_1=0,5 g/kg. Prikupljeno je 27 uzoraka krvi osoba oboljelih od dijabetesa te su zbog malih volumena međusobno grupirani i podijeljeni u 11 novih uzoraka. Svaki uzorak je podijeljen u dva uzorka, od kojih je jedan čuvan na +4°C, a drugi na sobnoj temperaturi. U uzorcima krvi određena je koncentracija glukoze u uzorcima u rasponu od 5.1 mmol/L (uzorak 1) do 19.4 mmol/L (uzorak 11). Svi su uzorci pohranjeni u Vakutajner epruvete s EDTA kao antikoagulansom. Kvantitativna analiza uzoraka krvi na alkohol vršena je 4 puta tokom mjesec dana pomoću GC-FID metode. Uzorci krvi su injektirani autoinjektorom u plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom (GC/FID), pomoću kojeg se „headspace“ tehnikom određivala koncentracija etanola u uzorcima krvi. Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCSolution software računalnim programom.

Rezultati: GC-FID instrumentalnom tehnikom nije utvrđeno prisustvo etanola u ispitivanim uzorcima. Suprotno očekivanjima, nije došlo do razvijanja etanola, te je koncentracija alkohola u svim uzorcima bila 0 g/kg kroz svih 30 dana mjerenja.

Zaključak: Nije došlo do razvijanja etanola u biološkim uzorcima krvi pacijenata sa šećernom bolesti, pohranjenima u epruvetama s EDTA, pri obje ispitivane temperature, +4°C te na sobnoj temperaturi. Uzorci pokazuju stabilnost na razvijanje etanola najmanje 30 dana.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Determination of concentration of alcohol in persons with diabetes.

Objectives: The aim of this study was to study stability of the clinical blood samples of patients with diabetes and the impact of anticoagulant EDTA on the containers for biological samples, as well as to develop analytical method for the determination of alcohol.

Material and Methods: Ethanol standard solutions were preapared, by diluting reference standard solution (concentration 5,0 g/kg), in the following concentrations:γ_4=2,5 g/kg, γ_3=1,5 g/kg, γ_2=1 g/kg, i γ_1=0,5 g/kg. There has been 27 samples collected from the people with diabetes, and because of the small volumes they were mutually grouped and divided into 11 new samples. Each sample was divided into two separate samples. One of them was stored at +4°C and the other one at room temperature. Glucose concentration was determined in the blood samples ranging from 5.1 mmol/L (sample 1) to 19.4 mmol/L (sample 11). All of the samples were stored in the Vakutajner tubes with anticoagulant EDTA. Quantitative analysis of the alcohol concentraton in blood samples was performed with GC-FID method, 4 times in a month. The blood samples were injected with the autosampler in the gas chromatograph with the flame ionization detector (GC/FID). The headspace technique was used to determine the alcohol concentrations in blood samples. The operation of the instrument and data processing have been with GCSolution software computer programme controlled.

Results: Using GC/FID instrumental method there was no presence of alcohol detected in the test samples. Contrary to expectations, there was no alcohol developed and the alcohol concentration was 0 g/kg in all of the samples during all of the 30 day of measurement.

Conclusion: There was no developed ethanol found in the blood samples of patients with diabetes, stored in the tubes containing anticoagulant EDTA and at both temperatures, +4°C and room temperature. The samples are stable for at least 30 days.

10. ŽIVOTOPIS

Ivan Stvorić rođen je 24. veljače 1994. godine u Slavonskom Brodu sa stalnim prebivalištem u Slavonskom Brodu. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu „Vladimir Nazor“ u Slavonskom Brodu. Prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Matija Mesić“ upisuje 2008. godine te maturira 2012. s vrlo dobrim uspjehom . Od 2012. godine studira na Integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju farmacije u Splitu. Od akademske godine 2015./2016. član je Studentskog zbora Medicinskog fakulteta u Splitu te član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta u Splitu. Od 1. ožujka do 1. rujna 2017. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Trstenik.