

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

VANDA MATUC

BIOKEMIJSKA IN TOKSIKOLOŠKA DIAGNOSTIKA
ZASTRUPITVE Z METANOLOM IN ETILENGLIKOLOM

BIOCHEMICAL AND TOXICOLOGICAL DIAGNOSTIC OF
METHANOL AND ETHYLENEGLYCOL POISONINGS

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v toksikološkem in alkoholometričnem laboratoriju na Inštitutu za sodno medicino v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farmacije ter pod somentorstvom as. dr. Majde Zorec Karlovšek, univ. dipl. kem., znanstvene sodelavke.

Zahvala

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in somentorici as. dr. Majdi Zorec Karlovšek, univ. dipl. ing. kem., znanstveni sodelavki za vse nasvete ter za strokovno in prijazno pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Prav tako pa bi se zahvalila vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno opravila pod mentorstvom prof. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom dr. Majde Zorec Karlovšek.

Vanda Matuc

Predsednik komisije:
izr. prof. dr. Samo Kreft

Članica komisije:
asist. dr. Nataša Karas Kuželički

VSEBINA

SEZNAM KRATIC	4
POVZETEK	5
1. UVOD	6
1.1. ALKOHOLI	7
1.1.1. ETANOL (CH ₃ CH ₂ OH)	7
1.1.1.1. Toksikokinetika etanola	7
1.1.2. METANOL (CH ₃ OH)	9
1.1.2.1. Toksikokinetika metanola	9
1.1.3. ETILENGLIKOL (C ₂ H ₆ O ₂)	10
1.1.3.1 Toksikokinetika etilenglikola	10
1.2. KISLINSKO - BAZIČNO RAVNOVESJE	11
1.2.1. MOTNJE KISLINSKO-BAZIČNEGA RAVNOVESJA	12
1.2.2. PRESNOVNA ACIDOZA	12
1.2.2.1. Ketoacidoza	13
1.2.2.2. Diagnostično določanje presnovne acidoze	14
1.3. BIOLOŠKI VZORCI IN TOKSIKOLOŠKE PREISKAVE	15
1.3.1. ODVZEM BIOLOŠKIH VZORCEV	16
1.3.1.1. Odvzem biološkega materiala pri živem preiskovancu	16
1.3.1.2. Odvzem biološkega materiala na truplu	16
1.3.2. DOLOČANJE ETANOLA, METANOLA IN ETILENGLIKOLA	17
1.3.2.1. Aparature za merjenje alkohola v izdihanem zraku	17
1.3.2.2. Določanje etanola, metanola in etilen glikola v telesnih tekočinah ...	18
1.3.2. DOLOČANJE β-HIDROKSIMASLENE KISLINE Z ENCIMSKO METODO (SPEKTROFOTOMETRIČNO)	19
2. NAMEN DELA	21
3. MATERIALI IN METODE	22
3.1. MATERIALI	22
3.2. POSTOPEK DOLOČANJA ETILENGLIKOLA S PLINSKO KROMATOGRAFIJO	22
3.2.1. Priprava vzorcev	22
3.2.2. Nastavitev aparature za plinsko analizo pri določanju etilenglikola	23
3.2.3. Kromatogrami standardnih etilenglikolnih raztopin in bioloških tekočin	24
3.2.4. Odčitavanje koncentracij etilenglikola iz kromatograma	25
3.3. POSTOPEK DOLOČANJA METANOLA S PLINSKO KROMATOGRAFIJO S TEHNIKO NADPROSTORA (Head space)	25
3.3.1. Priprava vzorcev za določitev vsebnosti metanola	26
3.3.2. Nastavitev aparature za plinsko kromatografijo pri določanju metanola	26
3.4. DOLOČANJE β-HIDROKSIMASLENE KISLINE Z ENCIMSKO METODO (SPEKTROFOTOMETRIČNO)	27
3.4.1. Sestava reagenta	27
3.3.2. Nastavitev aparaturn in določanje β-hidroksimaslene kisline v vzorcih ...	27

3.4. STATISTIČNE METODE	28
4. REZULTATI	29
4.1. STATISTIČNI PODATKI O TOKSIKOLOŠKIH PREISKAVAH GLEDE VSEBNOSTI METANOLA IN ETILENGLIKOLA	29
4.1.1. Število naročil za toksikološko preiskavo in preiskave s pozitivnim rezultatom	29
4.1.2. Naročniki toksikoloških preiskav	30
4.1.3. Starost preiskovancev	32
4.1.4. Spol preiskovancev, pri katerih smo dokazali prisotnost metanola oziroma etilenglikola	33
4.1.5. Vzroki zastrupitev	35
4.1.6. Posamezni primeri zastrupitev z metanolom	37
4.1.7. Posamezni primeri zastrupitev z etilenglikolom	39
4.2. PRIMER TOKSIKOLOŠKE PREISKAVE POSMRTNO ODVZETIH VZORCEV VSEBNOSTI ETILENGLIKOLA	41
4.2.1. Umeritvena krivulja	41
4.2.2. Rezultati posmrtno odvzetih vzorcev za določanje vsebnosti etilenglikola	42
4.3. REZULTATI DOLOČANJA β -HIDROKSIMASLENE KISLINE	45
5. RAZPRAVA	46
6. SKLEP	54
7. VIRI IN LITERATURA	55

SEZNAM KRATIC

1. **ADH** - alkoholna dehidrogenaza
2. **ALDH** - aldehydna dehidrogenaza
3. **BPD** - Bolnišnično psihiatrični dispanzer
4. **Co-A** - koencim A
5. **CO₂** - ogljikov dioksid
6. **Ca²⁺** - kalcijev kation
7. **Cl⁻** - kloridni anion
8. **CIIM** - Center za intenzivno interno medicino
9. **CZ** - Center za zastrupitve
10. **CIT** - Center za intenzivno terapijo
11. **EM** - elektromagnetno valovanje
12. **EG** - etilenglikol
13. **GC** - plinska kromatografija
14. **H⁺** - proton vodika
15. **H₂O** - voda
16. **HCO₃⁻** - hidrogenkarbonatni, bikarbonatni ion
17. **HD** - hemodializa
18. **HBDH** - hidroksibutirat dehidrogenaza
19. **ISM** - Inštitut za sodno medicino
20. **IPP** - Internistična prva pomoč
21. **KB** – kislinsko-bazično
22. **K⁺** - kalijev kation
23. **Mg²⁺** - magnezijev kation
24. **NADH** - reducirana oblika nikotinamida adenin dinukleotida
25. **NAD⁺** - nikotinamid adenin dinukleotid
26. **NADPH** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
27. **NADP⁺** - nikotinamid dinukleotid fosfat
28. **Na⁺** - natrijev kation
29. **NaHCO₃** - natrijev hidrogenkarbonat
30. **O₂** - atom kisika
31. **PG** - propilenglikol
32. **SB** - Splošna bolnišnica
33. **SIS** - Stalna internistična služba
34. **UKC** - Univerzitetni klinični center

POVZETEK

Zastrupitve z metanolom in etilenglikolom so dokaj redke, vendar zelo nevarne in ob neustrezni pomoči velikokrat tudi smrtne. Najbolj strupeni so presnovni produkti metanola in etilenglikola, ki nastanejo v organizmu pod vplivom delovanja encimov alkoholne dehidrogenaze in aldehidne dehidrogenaze. Ti večinoma kisli produkti v organizmu povzročajo spremembe v kislinsko-bazičnem ravnovesju, ki je pomembno za normalno delovanje organizma. Ko se pH krvi zniža pod 7,35, pride do metabolične acidoze, ki je navadno prvi znak zastrupitve z alkoholi. Ob anamnezi in zdravniški diagnostiki je za potrditev zastrupitve z metanolom in etilenglikolom zelo pomembna laboratorijska diagnostika. Za zanesljivo laboratorijsko analizo pa je ključnega pomena pravilno rokovanje z vzorci vse od odvzema pa do konca analize. Najpogosteje se za analizo kot vzorca uporabljata kri in urin, v primeru odvzema iz trupel pa tudi želodčna vsebina, tekočina iz osrčnika, steklovina iz očesa idr. Metanol in etilenglikol se v praksi določata z metodo plinske kromatografije; poznamo tudi druge metode, ki pa se v praksi ne uporabljajo. Najpogosteje se acidoza pojavi pri alkoholikih, v tem primeru so lahko izvidi vsebnosti metanola in etilenglikola negativni. Če je poleg tega v serumu še povišana koncentracija acetona, se lahko spektrofotometrično izmeri raven β -hidroksimaslene kisline v serumu, ki je vzrok za porušeno kislinsko-bazično ravnotežje. V diplomski nalogi smo statistično ovrednotili podatke o zastrupitvah z metanolom in etilenglikolom v Republiki Sloveniji za zadnjih trinajst let. Podatke, ki smo jih pridobili po pregledu zapisnikov iz arhiva toksikološkega laboratorija na Inštitutu za sodno medicino, smo razvrstili na šest skupin, in sicer glede na število naročil, glede na to kdo so bili naročniki posameznih preiskav, glede na spol, starost in glede na vzrok zastrupitve. Vse pozitivne primere smo nadalje razvrstili glede na spol in starost ter glede na vzrok zastrupitve. V trinajstih opazovanih letih so na Inštitutu za sodno medicino prejeli 156 vzorcev, ki so bili analizirani glede vsebnosti metanola in etilenglikola. Prisotnost metanola je bila potrjena v osemnajstih primerih, medtem ko je bil etilenglikol potrjen v sedemintridesetih primerih. Pri sumu zastrupitve z metanolom, (kot tudi z etilenglikolom), je prevladovala moška populacija. Pri zastrupitvah z metanolom je bil vzrok večinoma neznan, medtem ko je bilo največ zastrupitev z etilenglikolom namernih. Poleg statistične analize smo opravili tudi toksikološke analize nekaterih vzorcev, ki so prispeli na Inštitut za sodno medicino glede vsebnosti metanola in etilenglikola. Rezultati analiz bioloških vzorcev so bili negativni tako na metanol kot tudi na etilenglikol. V nekaterih primerih z dobljenim negativnim rezultatom na metanol in etilenglikol in poznano alkoholno problematiko smo opravili spektrofotometrično analizo vsebnosti β -hidroksimaslene kisline. Pri teh meritvah smo v vseh primerih dobili povišane vrednosti β -hidroksimaslene kisline. S pojavom alkoholne ketoacidoze ali usodnega kopičenja β -hidroksi butirata se pogosto srečujemo tudi pri nenadnih naravnih smrtih odvisnikov od alkohola. Poleg analiz bioloških materialov živih preiskovancev pa smo glede vsebnosti etilenglikola analizirali tudi posmrtno odvzete vzorce in tako potrdili smrtno zastrupitev z etilenglikolom.

1.UVOD

1.1. ALKOHOLI

Alkoholi so hidroksilni derivati nerazvejanih ali razvejanih alifatskih ogljikovodikov ter aromatskih ogljikovodikov. Alkoholi, ki jih najpogosteje uporabljamo, vsebujejo do tri hidroksilne skupine, vendar je ponavadi pri teh alkoholih na ogljikov atom vezana le ena izmed njih.

Alkoholi, ki najpogosteje povzročajo zastrupitve, so etanol, metanol, etilenglikol in izopropanol. Na splošno velja, da se toksičnost veča z daljšanjem ogljikove verige. Alkoholi z dvema ali več hidroksilnimi skupinami se imenujejo glikoli. Najpreprostejši glikol je dihidroksi etan oziroma etilenglikol (EG), ki je glavna sestavina sredstev proti zmrzovanju in je zelo pogost povzročitelj zastrupitev. Drugi znani glikol, propilen glikol (PG), je mnogo manj strupen in ga srečujemo kot sestavino raznih farmacevtskih proizvodov.

Alkoholi in glikoli so si kemično zelo podobni, imajo enake razgradne poti in zato povzročajo podobne znake zastrupitev (1).

1.1.1. ETANOL ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Etanol ali etilni alkohol je osnovna sestavina alkoholnih pijač, uporablja pa se tudi kot topilo, antiseptik, v zdravilnih tinkturah in v kozmetiki. Je čista brezbarvna tekočina, katere nevarnosti so opredeljene z R (risk) in S (safety) stavki, ki se izražajo v sledečih simbolih: F (lahko vnetljivo), R11 (lahko vnetljivo), S16 (hraniti ločeno od virov vžigane kaditi), S7 (hraniti v dobro zaprti posodi) (2).

Etanol ima v primerjavi z metanolom in etilenglikolom nizko stopnjo toksičnosti, vedno pa ga obravnavamo kot prvega v skupini, saj so naključne akutne zastrupitve najpogosteje povzročene z etanolom oziroma v kombinaciji z drugimi strupi. Razumevanje presnovnih poti in metabolitov, ki pri tem nastanejo, je nujno za razumevanje mehanizmov toksičnosti in delovanja prevelikih odmerkov etanola in drugih alkoholov (1, 3).

1.1.1.1. Toksikokinetika etanola

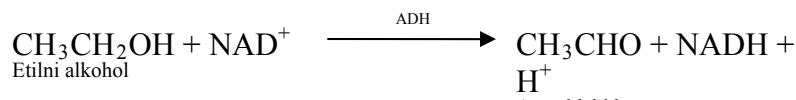
Fizikalno kemijske lastnosti etanola so slaba polarnost, šibek ionski naboj in nizka molekulska teža. Etanol topi maščobe in se meša z vodo, zato se zlahka absorbira in prehaja s pomočjo difuzije preko celičnih membran. Najbolj pogosta vstopna pot je peroralna. Etanol se iz prebavil hitro absorbira: absorbcija se prične v ustih in požiralniku, sledi pa absorbcija v želodcu, vendar se ga v tam absorbira manj kot 20%. Samo absorbcijo v želodcu močno upočasnijo hrana, še posebej, če je bogata z maščobami; večina se ga zato absorbira šele v tankem črevesu. Absorbcija je posledično zmanjšana predvsem zaradi upočasnjene peristaltike - na prazen želodec je celotna absorbcija zaključena v 1. do 2. urah. Drugi dejavniki, od katerih je odvisna absorbcija etanola, so odvisni od količine, koncentracije in sestave alkoholne pijače. Absorbcija je najhitrejša pri pijačah, ki vsebujejo 20-30% etanola, nižje koncentracije etanola, kot ga ima npr. pivo, pa se zaradi nižje vsebnosti alkohola absorbirajo počasneje. Peneče, gazirane pijače,

kot je npr. šampanjec oziroma peneče vino, se absorbirajo hitreje, saj prisotnost CO₂ pospešuje praznjenje želodca (1, 3).

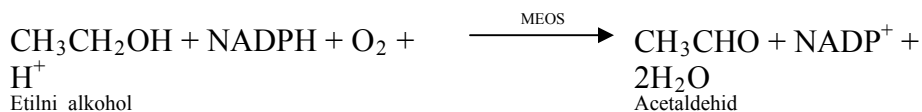
Večina alkohola se presnovi v jetrih (jetra 70 kg težkega človeka lahko v eni uri razgradijo do 10 mL (8g) alkohola), kjer se 90-95% zaužitega alkohola popolnoma oksidira (4). Oksidacija alkohola pa poteka tudi v drugih organih, ki vsebujejo alkoholno dehidrogenazo (ADH). 2% alkohola se v nespremenjeni obliki izloči z dihanjem (ta način izločanja s pridom uporabljamo pri alkotestih), 2-5% z urinom, nekaj pa tudi s potenjem, znojenjem, slino, solzami in drugo (1, 2).

Presnovna pot pri etanolu poteka v jetrih sočasno po dveh encimskih poteh. Tretji mehanizem presnove alkohola pa je povezan s katalazo v peroksisomih.

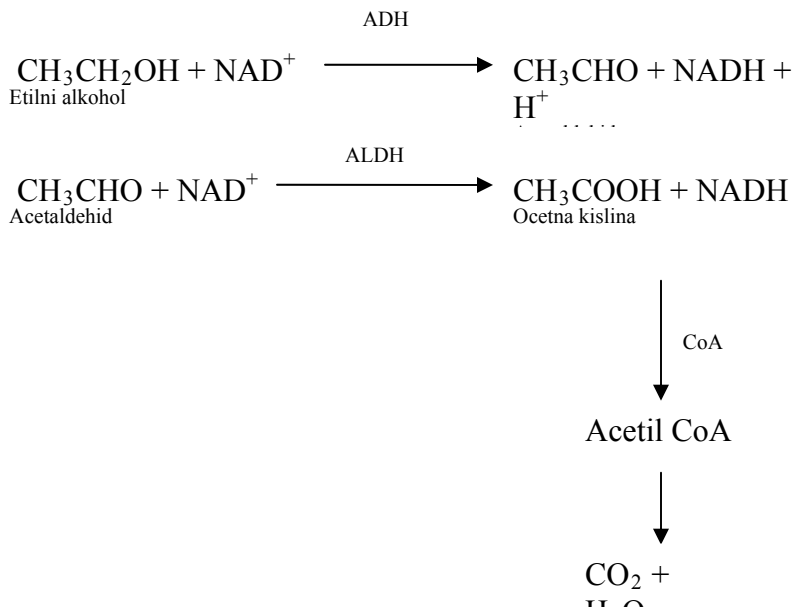
- **Alkoholno dehidrogenazna pot** poteka s pomočjo citosolnega encima ADH. To je glavna presnovna pot, kjer ADH katalizira oksidacijo etanola ob prisotnosti kofaktorja NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) v acetaldehid.



- **Mikrosomski etanol oksidirajoči sistem (MEOS)**, predstavlja pomembno pot presnove pri ljudeh, ki kronično uživajo alkohol. Z mikrosomalnim sistemom MEOS se etanol oksidira v acetaldehid. Poleg tega pa v reakciji nastajata še NADP (nikotinamid dinukleotid fosfat) in voda. Alkohol je encimski induktor. Medtem ko kratkotrajno pitje zavira delovanje encimov MEOS, ga dolgotrajno pitje spodbuja. Zato kronično pitje alkohola zviša aktivnost MEOS sistema, predvsem aktivnost citokroma P-450 (izooblika CYP2E1). Količina encima se lahko močno poveča in povzroči presnovno toleranco za alkohol.



V drugem koraku se nato nastali acetaldehid s pomočjo encima aldehidna dehidrogenaza (ALDH) ob prisotnosti kofaktorja NAD⁺ pretvori v očetno kislino, ki nadalje preko Acetil-CoA, vstopa v Krebsov cikel, kjer se presnovi v CO₂ in H₂O (3,6).



Slika 1: Presnovna pot etanola v organizmu

1.1.2. METANOL (CH₃OH)

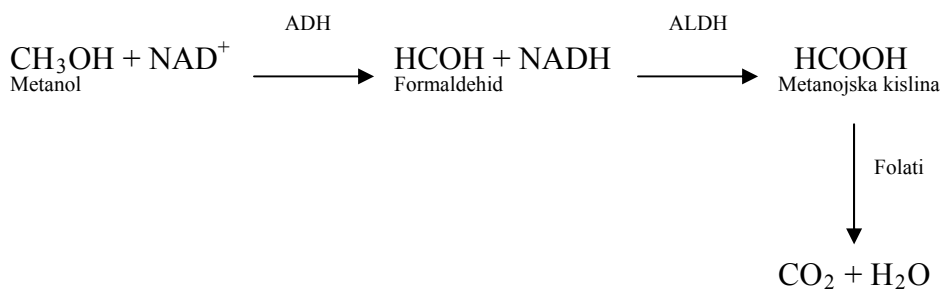
Metilni alkohol spada med nasičene enovalentne alkohole. Pridobiva se s pomočjo suhe destilacije lesa, papirja in konoplje, možno pa ga je tudi sintetizirati iz metana.

Metanol je brezbarvna, bistra, hlapljiva in zelo vnetljiva tekočina, ki se z vodo meša v vsakem razmerju. Uporabljamo ga kot topilo in hladilno tekočino. Poznane so številne tragične in množične zastrupitve zaradi zamenjave z etanolom (1, 3).

1.1.2.1. Toksikokinetika metanola

Metanol se dobro absorbira iz prebavnega trakta, možna pa je tudi absorbcija skozi kožo in pljuča. V krvi doseže najvišjo koncentracijo v 30 do 90 minutah po zaužitju.

Približno 5 do 7% metanola se v nespremenjeni obliki izloči preko ledvic, nekaj pa se ga izloči tudi z izdihanim zrakom. Sama presnova metanola v organizmu je zelo podobna presnovi etanola, le da so produkti pri razgradnji metanola mnogo bolj toksični. ADH oksidira metanol v formaldehid, ki se nato pod vplivom aldehidne dehidrogenaze in kofaktorja NAD⁺ oksidira v metanojsko kislino. Metanojska kislina oziroma mravljična kislina se v prisotnosti folatov razgradi do CO₂ in vode. Presnova metanola poteka 10 - krat počasneje od presnove etanola. Pri presnovi pa nastajata toksična presnovka, formaldehid in mravljična kislina. Formaldehid okvari predvsem vidni živec in očesno mrežnico, kopičenje mravljične kisline pa povzroča hudo presnovno acidozo z visoko anionsko vrzeljo, kar je pogosto prvi znak zastrupitve. Slepota se pojavi že ob zaužitju 5 do 10 mL metanola. Smrtna doza metanola brez zdravljenja je 30 mL, ob ustreznem zdravljenju pa je možno preživetje tudi ob zaužitju večjih količin metanola (1, 3, 5).



Slika 2: Presnovna pot metanola v organizmu

1.1.3. ETILENGLIKOL (C₂H₆O₂)

Etilenglikol ali dihidroksi etan je brezbarvna, gosta tekočina sladkobnega okusa in brez vonja. Uporablja se kot topilo in sredstvo za znižanje zmrzišča vode (avtomobilska industrija - antifriz) in v kemični industriji. Etilenglikol je sam po sebi zelo nizko toksičen, povzroča le sliko alkoholnega opoja in ima lokalni dražeč učinek na želodčno sluznico. Toksični so predvsem njegovi metaboliti, ki so vzrok metabolični acidozi, ledvični odpovedi in smrti (1, 3, 5, 7).

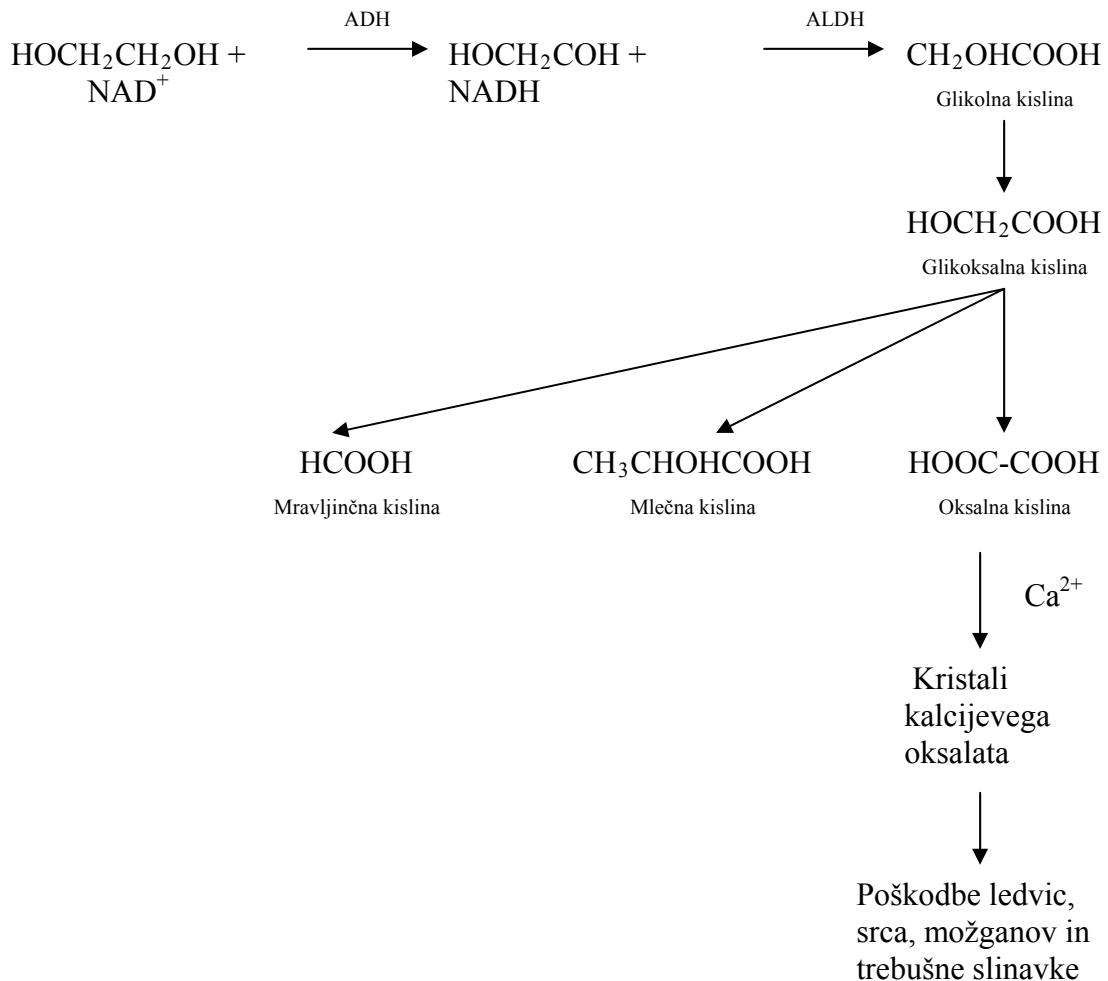
1.1.3.1. Toksikokinetika etilenglikola

Etilenglikol se zelo dobro absorbira iz prebavil. V povišanih koncentracijah ga zasledimo v krvi, urinu, očesni steklovinu in ostalih bioloških vzorcih cca 1 do 4 ure po zaužitju. V majhnih količinah se lahko absorbira tudi preko dihal in skozi kožo. Zaradi dobrega mešanja z vodo se dobro porazdeli po vseh telesnih tekočinah in tkivih. Približno 20% etilenglikola se izloči v nespremenjeni obliki skozi ledvice, večina pa se ga presnovi v jetrih (1,3,5,7).

Presnovna pot etilenglikola je podobna encimski poti etanola, le da pri etilenglikolu nastajajo drugi, bolj toksični produkti. Etilenglikol se pod vplivom encima ADH in kofaktorja NAD⁺ oksidira v glikolaldehid, glikolaldehid pa se pod vplivom aldehidne dehidrogenaze in kofaktorja NAD⁺ oksidira v glikolno in glikoksalno kislino, ki se metabolizirata v oksalno, mlečno in mravljinčno kislino. Med povišano aktivnostjo ADH in zaradi spremenjenega razmerja NAD⁺/NADH (reducirana oblika nikotinamida adenin dinukleotida) začne iz piruvata nastajati mlečna kislina. Zaradi kopičenja le-te oziroma glikolne kisline, laktata ali oksalata, pa nastane presnovna acidoza z močno povišano anionsko vrzeljo. Drugi metaboliti, ki nastajajo pri tem, se zelo hitro razgradijo in niso pomembni za nastanek acidoze. Oksalna kislina se veže s kalcijevimi ioni in tvori netopne kristale kalcijevega oksalata, ki se odlagajo v tkivih in povzročijo okvare posameznih organov, zlasti ledvic, možganov, srca in trebušne slinavke. Kristale kalcijevega oksalata lahko dokažemo tudi v urinu.

Klinična slika zastrupitve je odvisna od količine zaužitega etilenglikola in od časa pretečenega od zaužitja, prognoza pa je odvisna od časa, pretečenega od zastrupitve do začetka zdravljenja (1, 3, 5, 7, 8, 9).

Bolniku damo kot antidot etanol, ker ima le-ta večjo afiniteto do ADH kot etilenglikol in tako posredno preprečuje njegovo razgradnjo v toksične metabolite. Antidot dajemo v obliki alkoholne raztopine (whisky, 40% etanolne raztopine), pri motnjah zavesti pa uporabimo infuzijo (5% raztopina etanola v 5% raztopini glukoze).



Slika 3: Presnovna pot etilenglikola v organizmu

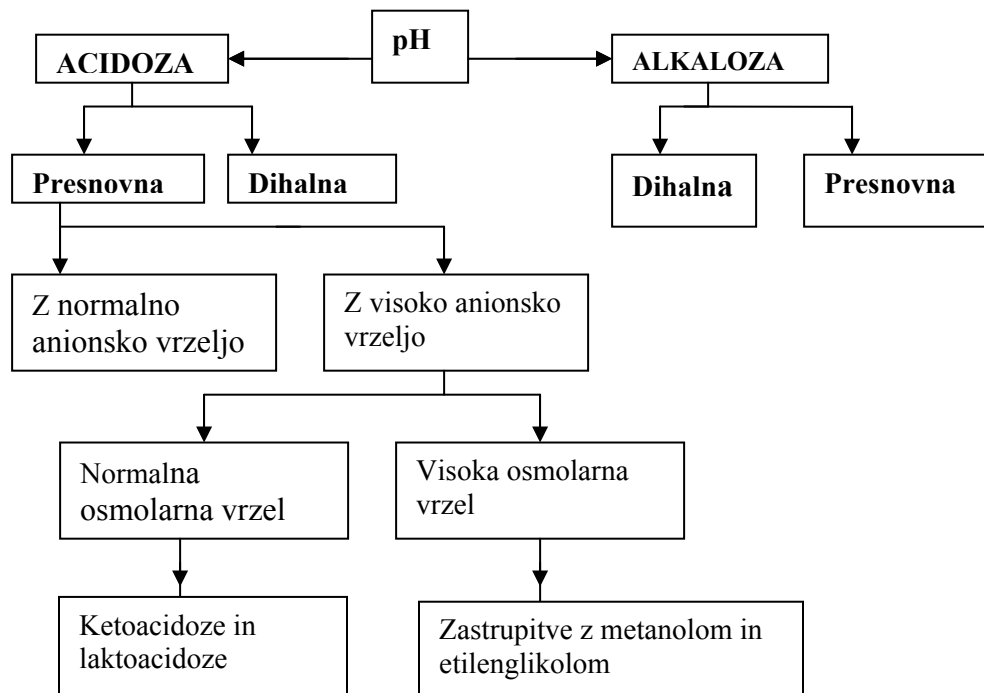
1.2. KISLINSKO-BAZIČNO RAVNOVESJE

Vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnovesja (KB) je ključnega pomena za nemoteno delovanje organizma ter za njegovo rast in razvoj. To vzdrževanje omogočajo predvsem zapletene povezave ledvičnih, pljučnih, skeletnih, gastrointestinalnih in jetrnih funkcij. Vzdrževanje pravilnega KB ravnotežja je odvisno od ravnovesja in količine kislin, ki so dajalci, in baz, ki so prejemniki protonov. Tako kisline kot baze vnašamo v organizem s hrano. Koncentracija protonov v krvi, ki jo izražamo s pH, je zelo natančno uravnavana, zato vsakršna odstopanja kažejo na razne motnje v delovanju organizma (11).

1.2.1. MOTNJE KISLINSKO - BAZIČNEGA RAVNOVESJA

Acidoza in alkalozata sta najpogostejši motnji kislinsko-bazičnega ravnovesja. O acidemiji govorimo, kadar je pH krvi nižji od 7,35, alkalozata pa je stanje, ko je pH telesnih tekočin višji od 7,45.

Tako acidozo kot tudi alkalozata lahko nadalje razdelimo na presnovne, do katerih pride zaradi motenj pri uravnavanju HCO_3^- (bruhanje, diareja, malabsorbcija ...) ter dihalne acidoze oziroma alkaloze, do katerih pride zaradi motenj pri izločanju CO_2 preko pljuč (umetno predihavanje, nosečnost, emfizem, debelost ...) (12).



Slika 4: Vrste motenj kislinsko - bazičnega ravnotežja

1.2.2. PRESNOVNA ACIDOZA

Za presnovno acidozo je značilna acidemija, ki jo opazimo kot znižano plazemsko koncentracija HCO_3^- , znižan pH krvi ali povečano koncentracijo H^+ ionov.

Metabolična acidoza ni nikoli primarna diagnoza, temveč odraža bolezen, ki jo lahko zdravimo s specifičnimi zdravili.

Patofiziološki mehanizmi, ki privedejo do razvoja presnovne acidoze, so najpogosteje povečano nastajanje nehlapnih kislin v telesu (ketoacidoza, laktoacidoza ter zastrupitve z metanolom in etilenglikolom), zmanjšano izločanje kislin preko ledvic in povečana izguba HCO_3^- preko prebavil (11, 12, 13).

1.2.2.1. Ketoacidoza

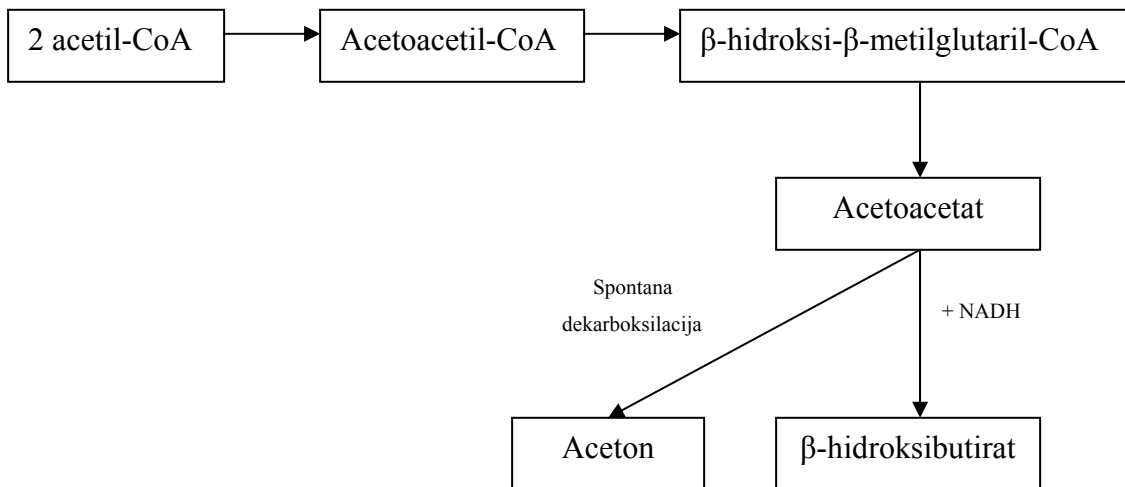
Ketoacidoza je presnovna acidoza, ki nastane zaradi kopičenja ketonskih spojin v organizmu (5, 14).

- **Ketonske** spojine se ob ketoacidozi pojavijo v telesnih tekočinah v povišanih koncentracijah. Ketogeneza (nastajanje ketonskih spojin v organizmu) se poveča, ko se porabijo zaloge glikogena v hepatocitih. Temu sledi padec koncentracije glukoze in povečano izločanje glukagona. Zaradi teh sprememb se pospeši razgradnja maščobnih kislin, kot stranski produkt lipolize pa nastanejo ketonske spojine. Kadar je ketogeneza močno povišana, se pH v organizmu nevarno zniža in nastane ketoacidoza (slika 5) (6, 11, 15).
 1. Aceton je najpomembnejši predstavnik ketonov, ki ga v telo lahko vnesemo tudi ob stiku z raznimi laki in umetnimi masami, saj se aceton uporablja kot topilo za te snovi. Je spojina, ki ne povzroča večjih sprememb v KB ravnotežju (15).
 2. Acetoacetat spontano dekarboksilira v aceton. V prisotnosti butirata dehidrogenaze in $\text{NADH} + \text{H}^+$ pa se reducira v β -hidroksimasleno kislino (15).
 3. β -hidroksimaslena kislina nastane iz acetoacetata v prisotnosti butirata dehidrogenaze in NADH ter je pri alkoholni ketoacidozi vodilna ketonska spojina (15).

Ketoacidoza nastane najpogosteje kot posledica sladkorne bolezni ali zlorabe alkohola. Pri zlorabi alkohola se ketoacidoza lahko pojavi, ker etanol povzroča dehidracijo ter zavira glukoneogenezo, zaradi hipoglikemije pa se pospeši lipoliza in tvorba ketonskih spojin.

Za nastanek alkoholne ketoacidoze je pomembna alkoholno dehidrogenazna pot metabolizma etanola do acetata oz. acetil-CoA, ki vstopa v nadaljne oksidativne procese. Pri ADH poti se poleg acetata in acetaldehida tvori tudi reducirana oblika spojine $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$. Ob velikih količinah vnešenega etanola se tvori veliko NADH , kar poveča razmerje NADH/NAD^+ . Posledica tega je upočasnjena presnova v ciklusu trikarboksilnih kislin, kar poveča koncentracijo laktata v krvi, hkrati pa zavre proces glukoneogeneze v hepatocitih. Končna posledica je znižanje ravni glukoze v krvi in povečana sinteza ketonskih spojin.

Alkoholna ketoacidoza se pri kroničnem uživalcu alkohola pojavi, ko le-ta iz različnih razlogov močno zmanjša vnos hrane. Ob stradanju je koncentracija acetil-CoA v hepatocitih močno povišana zaradi presnove etanola, upočasnitve razgradnje v ciklusu trikarboksilnih kislin in povečane lipolize. Zaradi visoke koncentracije acetil-CoA je močno povečana sinteza ketonskih teles, ki presega njihovo razgradnjo v perifernih tkivih. Zato se njihova koncentracija v krvi zviša, kar vodi v ketoacidozo (14,16).



Slika 5: Stopnje sinteze ketonskih teles iz acetil-CoA

1.2.2.2. Diagnostično določanje presnovne acidoze

- **Anionska vrzel** je najpogostejši parameter, ki ga določamo ob sumu na presnovno acidozo neznanega izvora ali ob sumu, da je presnovna acidoza posledica zastrupitve z alkoholi oz. z etilenglikolom. Določanje prisotnosti in količine alkohola oz. etilenglikola v telesnih tekočinah temelji na zapletenih analitskih metodah, medtem ko je določanje anionske vrzeli v plazmi precej bolj enostavno in skoraj povsod izvedljivo. Prav zaradi tega je merjenje anionske vrzeli zelo uporabna metoda za začetno obravnavo zastrupitev z neznanimi snovmi in bolnikov z metabolično acidozo neznanega izvora (3, 11).

Metoda je zelo občutljiva, vendar ni specifična. Njena občutljivost in specifičnost se močno povečata, če kombiniramo merjenje anionske vrzeli z določitvijo osmolarne vrzeli, ki pa mora biti določena z metodo znižanja zmrzišča.

Zaradi električne nevtralnosti v plazmi je količina negativnih nabojev uravnotežena s količino pozitivnih nabojev. Koncentracije nekaterih kationov in anionov lahko merimo z običajnimi rutinskimi analitskimi metodami, medtem ko drugih ne moremo meriti. Enostavno določljivi so natrijevi in kalijeve kationi ter kloridni in hidrogenkarbonatni ioni. Izvencelična koncentracija kalijevih kationov je v primerjavi z ostalimi koncentracijami majhna in se le malo spreminja, zato je pri izračunavanju anionske vrzeli nepomembna in jo v praksi zanemarimo.

$$\text{ANIONSKA VRZEL} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-) \sim \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$$

Večino preostalih anionov predstavljajo plazemske beljakovine, nekoliko manj pa fosfatni, sulfatni in organski anioni. K pozitivnim nabojem doprinesejo še nekateri kalcijevi in magnezijevi kationi, ki pa so nemerljivi, kar pomeni, da se tovrstne meritve ne opravljajo v sklopu rutinskih laboratorijskih preiskav.

Normalna vrednost anionske vrzeli gre na račun nemerjenih anionov, zato se ob pomanjkanju nemerljivih anionov normalen razpon anionske vrzeli zniža. Ker so v večini primerov v prebitku nemerljivi anioni, je anionska vrzel praviloma pozitivna.

Vzrok za povečano koncentracijo nemerljivih anionov je lahko povečana koncentracija albuminov, ali pa kopičenje drugih anionov. Klinično so med temi anioni zelo pomembni formiat, ki nastane pri zastrupitvi z metanolom, oksalat, ki nastane pri zastrupitvi z etilenglikolom, acetoacetat in betahidroksibutirat, ki nastaneta pri ketoacidozi, pa tudi acetat (zaradi uživanja etanola) in salicilati.

Anionska vrzel je velikokrat koristna informacija, a zahteva nadaljne preiskave. Pri metabolični acidozi s povišano anionsko vrzeljo lahko z diferencialno diagnozo natančneje opredelimo vzrok, ki je privedel do presnovne acidoze. Ko ugotovimo, da gre acidoza na račun kopičenja kislin in ne na račun izgube HCO_3^- , moramo te kisline tudi opredeliti. Z enostavnimi laboratorijskimi preiskavami lahko izključimo nekatera stanja (laktoacidoza, ketoacidoza ...), ki pogosto privedejo do metabolične acidoze. Če so omenjeni izvidi negativni in omenjena stanja tako izključena, lahko z veliko verjetnostjo pričakujemo prisotnost druge kisline oziroma njenih anionov. Najpogosteje gre v teh primerih za zastrupitev z metanolom, etilenglikolom ali salicilati (5, 13, 17).

- **Plazemska osmolarna vrzel** pomaga v plazmi odkriti molekule brez električnega naboja. Takšni so električno nevtralni toksični alkoholi, ki zato ne povečajo anionske vrzeli, saj se le-ta poveča šele pri razgradnji alkoholov ob nastanku novih kislinskih anionov. Ker so celične membrane zanje dobro prepustne, ne povzročajo osmotskih premikov vode in hiponatrijemije. Pri izračunu osmolarne vrzeli upoštevamo, da je osmotski tlak raztopine odvisen od količine raztopljenih delcev v vodi: beljakovin, glukoze in Na^+ . Koncentracije drugih kationov (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) so majhne in konstantne, zato jih zanemarimo. Zaradi električne nevtralnosti velja, da je količina pozitivnih delcev enaka količini negativnih delcev.

Pravo povečanje osmolarne vrzeli je posledica vnosa osmotsko aktivne snovi v telo. Izračunana vrzel, ki je večja od 10 mOsmol/L, je posledica bodisi vnosa snovi v telo, zelo verjetno toksičnega alkohola (etanola, etilenglikola, metanola), bodisi snovi, ki nastanejo pri kroničnem ledvičnem popuščanju, saj se pri slednjem kopičijo anioni (fosfat, sulfat, urat) in druge snovi (5, 13).

1.3. BIOLOŠKI VZORCI IN TOKSIKOLOŠKE PREISKAVE

Za dokaz zastrupitve so potrebne toksikološke preiskave. Biološki vzorci, ki jih analiziramo, so lahko odvzeti živemu preiskovancu ali pa jih odvzame obducent iz trupla. Pravilno ravnanje z vzorci je ključnega pomena za toksikološko analizo ter intepretacijo rezultatov.

Vzorčenje, ki predstavlja prvo fazo v toksikološki analizi, lahko usodno vpliva na potek, kvaliteto in pravilnost toksikoloških preiskav. Predpogoj za uspešno analizo so naslednje faze oz. podatki, ki jih moramo pri vzorčenju upoštevati:

- izbira pravega vzorca;
- pravilen odvzem vzorcev;

- pravilna označitev vzorcev (ime , priimek, datum ...);
- pravilno shranjevanje in transportiranje vzorcev;
- poznavanje razgradnje in možnost kontaminacije vzorca;
- spremni podatki, ki jih tvorijo osnovni podatki o preiskovancu (identiteta, spol, starost ...), opozorilni zdravstveni podatki (podatki o virusnih in infekcijskih boleznih, nedavnih boleznih, kroničnih boleznih ...), časovni podatki (datum in čas, ko je bil preiskovanec še zdrav, ko je zbolel, ko so bili odvzeti vzorci ...) in podatki o zdravljenju (podatki o zastrupitvi, simptomi, o tretmaju ...) (18).

1.3.1. ODVZEM BIOLOŠKIH VZORCEV

1.3.1.1. Odvzem biološkega materiala pri živem preiskovancu

Kot biološka vzorca za nujno toksikološko analizo se največkrat uporabljata kri in urin, pogosto pa kot vzorec odvezamo tudi želodčni izpirek (19).

- **Kri** je najpogostejši in najlažje dostopen biološki material za opravljanje toksikoloških analiz. Določene preiskave delamo v krvnem serumu, ki predstavlja tekočo frakcijo krvi, v kateri so odstranjene krvne celice. V tem primeru odvezamo kri brez antikoagulantov. Za posamezne preiskave pa je potrebno imeti polno kri, ki jo vedno odvezamo z antikoagulantnim sredstvom. Kot antikoagulate najpogosteje uporabljamo heparin, EDTA, citrate, oksalate, fluoride in druge (19, 20).
- **Urin** je zaradi velike količine najprimernejši za kvantitativno toksikološko analizo. Navadno vsebuje tudi visoke koncentracije strupov in njihovih metabolitov. Kadar gre za nujno toksikološko analizo urina, navadno ni potrebno dodajati konzervansov, pozorni pa moramo biti na temperaturo shranjevanja urina (19, 20).
- **Želodčni izpirek** je potrebno kot vzorec odvzeti, kadar sumimo na peroralno zastrupitev. Ta vzorec je koristen zato, ker v njem še ni nastalih presnovkov, temveč vsebuje ponavadi samo strup v visokih koncentracijah (19, 20).

1.3.1.2. Odvzem biološkega materiala na truplu

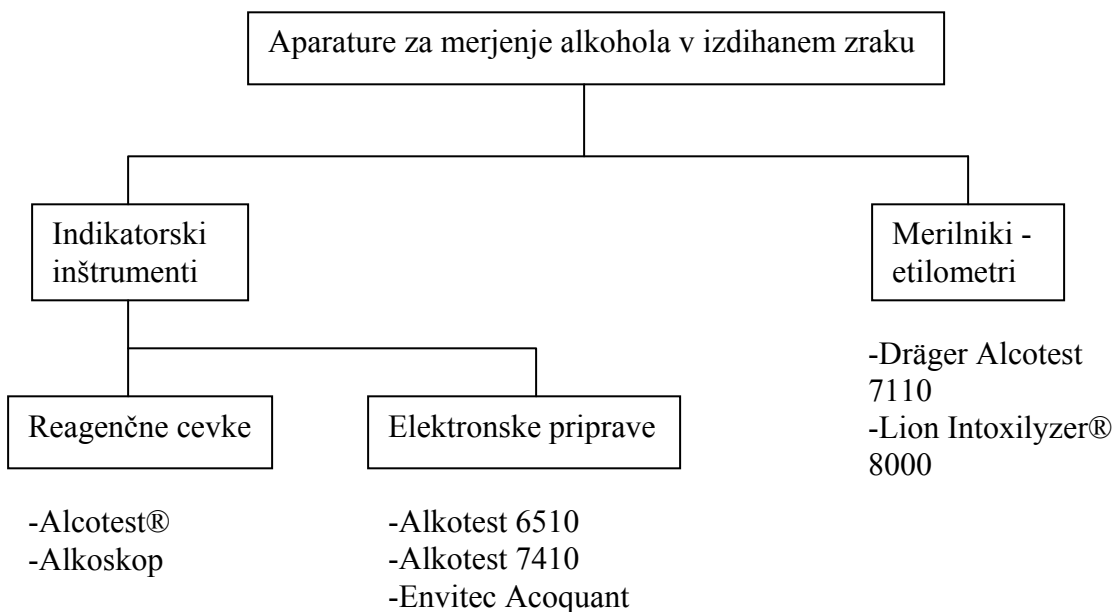
Ob obdukciji obducent odvezame naslednje vzorce:

- **Želodčna vsebina**, pri kateri se odvezame tudi najmanjši volumen. V primeru, da želodčne vsebine ni, se odvezame cel želodec ali pa črevesna vsebina.
- **Kri iz stegenske vene**. Odvezame se vsaj 30 mL krvi brez antikoagulantov ter 5 mL z dodanim 1% NaF za določitev alkohola.
- **Urin**. Odvezame se celotna količina urina. Če urina ni, se odvezamejo vzorci ledvic in žolčnika.
- **Jetra** se odvezamejo brez žolčnika in sicer 250 g.
- **Možgani in pljuča** se odvezamejo v primeru suma zastrupitve s hlapnimi snovmi.
- **Lasje in nohti** so primerni za ugotavljanje uporabe mamil in nekaterih zdravil.

- **Očesna steklovina** je primerna za analizo zdravil, etanola in kovin, zelo pa je uporabna tudi pri preiskavi razpadlih trupel (19).

1.3.2. DOLOČANJE ETANOLA, METANOLA IN ETILENGLIKOLA

1.3.2.1. Aparature za merjenje alkohola v izdihanem zraku



S pomočjo aparatov za merjenje alkohola v izdihanem zraku poskušamo oceniti koncentracijo alkohola v preiskovančevi krvi. Za merjenje alkohola v izdihanem zraku uporabljamo indikatorske inštrumente in merilnike ali etilometre (21).

- **Indikatorski inštrumenti:** naloga le-teh je potrditev prisotnosti ali odsotnosti etanola v izdihanem zraku. Na podlagi meritev koncentracije alkohola v izdihanem zraku je lahko podana tudi ocena koncentracije alkohola v krvi preiskovanca. Z indikatorskimi inštrumenti ocenimo ali je koncentracija alkohola presežena do te mere, da moramo nadaljevati postopek z merjenjem alkohola v izdihanem zraku s pomočjo etilometra oz. z alkoholimetrično preiskavo krvi ali urina (21).
- **Merilniki ali etilometri** so priprave, ki merijo koncentracijo alkohola v izdihanem zraku. Večinoma jih uporabljamo kot potrditvene merilce po predhodni potrditvi prisotnosti alkohola z indikatorskim inštrumentom. Etilometer meri etanolne koncentracije v izdihanem zraku v merilnem območju od 0 do 3 mg alkohola/L zraka in produktov reakcij, ki absorbirajo IR svetlobo pri različnih valovnih dolžinah (9.5 μm). K večji specifičnosti meritev pripomoremo s kombinacijo različnih detektorjev (21).

1.3.2.2. Določanje etanola, metanola in etilen glikola v telesnih tekočinah

Alkohol in metanol lahko določamo v telesnih tekočinah na različne načine. Eden izmed načinov je encimski postopek, drugi, najpogosteje uporabljeni način, pa je plinska kromatografija s tehniko nadprostora (21).

Etilenglikol določamo s plinsko kromatografijo, poslužujemo pa se tudi kolorimetrije.

- **Encimske metode** za merjenje alkohola temeljijo na delovanju encima ADH ter redukciji oz. oksidaciji koencimov. Pri encimskem postopku nastanejo produkti, ki jih merimo s pomočjo spektrofotomera in njihovo koncentracijo določimo kot spremembo absorbance (21, 22).
- **Kolorimetrično** določamo predvsem etilenglikol po predhodnem oksidiranju do formaldehida. Kolorimetrija spada med najstarejše metode in temelji na merjenju barvnih reakcij (21, 23).

- **Plinska kromatografija (GC)** je v rutini najpogosteje uporabljena metoda za določanje metanola in etilenglikola. Z GC lahko določamo metanol oz. etilenglikol neposredno, lahko pa določamo tudi njune presnovke.

Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin) zaradi selektivnega zadrževanja na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).

Eden izmed pomembnejših sestavnih delov plinskega kromatografa je kolona, kjer poteka separacija. Poznamo dve vrsti kolon. Polnjene kolone so lahko kovinske ali steklene, dolge do 2-3 m in polnjene s trdnim inertnim polnilom prevlečenim s tekočo stacionarno fazo. Druga vrsta kolon so kapilarne kolone, ki so dolge tudi do 50 m. Njihova prednost pred polnjenimi kolonami je krajši čas analize, daljša življenska doba in boljša ločljivost. Ko vzorec s pomočjo injektorja vbrizgamo v kolono, se le-ta na koloni loči s pomočjo mobilne faze, na koncu pa posamezno sestavino zaznamo s pomočjo detektorja. Lastnosti idealnega detektorja naj bi bile dobra občutljivost, stabilnost in ponovljivost, delovanje v širokem koncentracijskem in temperaturnem območju, hitra detekcija, podoben ali enak odziv na vse vzorce oziroma selektiven odziv na eno vrsto vzorca. Najpogosteje uporabljeni detektorji so: FID - plamensko ionizacijski detektor, TCD - toplotno prevodni detektor, TID - termodinamski detektor ter ECD ali detektor za zajetje elektronov in masni spekter (MS).

Za določitev in detekcijo hlapnih komponent uporabljamo plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem, za izolacijo alkoholov in drugih hlapnih komponent iz vodnega medija pa uporabljamo tehniko nadprostora.

Metoda s tehniko nadprostora (head space) spada med elegantnejše analizne metode ločevanj nevarnih spojin iz biološkega matriksa. Metoda temelji na principu zaprtega sistema (Henry-Daltonov zakon), kjer je parni tlak snovi v plinasti fazi sorazmeren koncentraciji te snovi v raztopini. Pri tehniki nadprostora se učinkovine iz vzorca (tekočina) porazdelijo v plinasto fazo, kjer jih nato analiziramo s plinsko kromatografijo. Pri povišani temperaturi se hlapne snovi hitreje in v večjem deležu porazdelijo iz matriksa v plinasto fazo nad vzorcem. Del tega plina (nadprostora) potuje na kolono, kjer se posamezne učinkovine različno dolgo zadržujejo, pri izhodu pa jih zazna detektor (20, 21, 24, 25, 26).

1.3.2. DOLOČANJE β -HIDROKSIMASLENE KISLINE Z ENCIMSKO METODO (SPEKTROFOTOMETRIČNO)

β -hidroksimasleno kislino določamo s pomočjo kinetično encimske reakcije v različnih bioloških vzorcih (kri, očesna steklovina, urin...). Metoda temelji na oksidaciji D-3-hidroksibutirata (3-HBDH) do acetoacetata s pomočjo encima 3-hidroksibutirat dehidrogenaze pri pH 8,5.

Encimi, ki sodelujejo v reakcijah, so katalizatorji biokemijskih reakcij v živih organizmih. S to vlogo usmerjajo in uravnavajo številne reakcije, ki omogočajo tvorbo energije, sinteze in metabolične razgradnje. Encimi pa lahko delujejo tudi neodvisno od živih celic.

V organizmu nastane veliko stranskih produktov presnove, ki lahko poškodujejo celice, če predolgo ostanejo nespremenjeni v organizmu. Večina teh produktov se razgrajuje in sčasoma odstrani iz organizma, pri določenih metabolitih pa razgradnja poteka občutno hitreje ravno zaradi pomoči encimov kot katalizatorjev, ki te reakcije pospešujejo in usmerjajo. Pri teh reakcijah je pomembna aktivacijska energija, katera predstavlja količino energije, ki jo morajo imeti molekule reaktantov, da se lahko pretvorijo v produkte. To prehodno stanje je stanje z najvišjo energijo in je zelo nestabilno. Te molekule se z enako verjetnostjo lahko povrnejo v izhodno stanje ali pa preidejo v produkte. Poleg aktivacijske energije so zelo pomembni tudi pH reakcijske raztopine, temperatura ter koncentracija encima. Encimi najbolje delujejo pri nekem optimalnem pH, ki se od encima do encima razlikuje, vendar je pri večini v območju med 6 in 8. Encimi so prav tako zelo občutljivi na temperaturne spremembe. Pri nizkih temperaturah začetna hitrost encimsko kataliziranih reakcij narašča sorazmerno z naraščajočo temperaturo, vendar pa se hitrost reakcije ustavi oz. celo začne padati pri določeni temperaturni točki, ki je za določen encim škodljiva. Pri večini encimov se začne hitrost zmanjševati v temperaturnem območju med 50°C in 60°C. Začetno hitrost reakcije lahko povečamo tudi s povišanjem začetne koncentracije encima.

Pri določanju β -hidroksimaslene kisline je zelo pomemben predvsem pH, ki mora biti 8,5. Če pH znižamo, reakcija poteče v drugo smer, njen rezultat pa bi bili produkti acetoacetata. Tekom encimske reakcije merimo spremembo absorbance (ko poteče encimska reakcija, se količina nastalih produktov meri ali določa spektrofotometrično) (16, 21, 22).

- Spektrofotometrija je analitska metoda, ki temelji na merjenju absorbcije svetlobe, ki prehaja skozi preiskovano raztopino. Absorbicijo lahko merimo v ultravijoličnem, vidnem ali infrardečem spektralnem območju, navadno pri absorpcijskem maksimumu, lahko pa tudi posnamemo spekter s pomočjo absorpcijskega spektrofotometra. Absorpcijski spekter predstavlja del vpadne svetlobe v odvisnosti od valovne dolžine. Spekter nam grafično prikaže, kaj se dogaja z elektromagnetnim (EM) valovanjem. Iz njegove oblike lahko sklepamo na kvantitativno in kvalitativno sestavo preiskovanega vzorca. Za analizo organskih spojin je najprimernejša spektrometrija v ultravijoličnem in infrardečem spektralnem območju.

Koncentracijo določenih spojin v spektrometriji določamo relativno, koncentracijo snovi v raztopini neznanega vzorca pa določamo posredno iz

umeritvene krivulje, ki jo pripravimo s pomočjo serije standardnih raztopin znanih koncentracij.

Za določitev je bistveno, da na hitrost reakcije vpliva samo merjena substanca, ostali parametri (pH, T ...), ki bi tudi lahko vplivali na hitrost reakcije, pa morajo biti konstantni.

2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo predstavili analize posameznih vzorcev s pomočjo metode plinske kromatografije, ki je še vedno najboljši kemijski parameter za določanje metanola in etilenglikola. Analize bomo izvajali s pomočjo bioloških vzorcev, odvzetih živim preiskovancem, pri katerih obstaja sum na zastrupitev z metanolom in etilenglikolom, pa tudi z vzorci, odvzetimi s trupla. S pomočjo plinske kromatografije bomo poskušali dokazati prisotnost metanola oz. etilenglikola, ki sta zelo pogost vzrok za nastanek metabolične acidoze. Ker pa sta lahko ta parametra v primeru acidemije tudi negativna, bomo v takih primerih analizo razširili in opravili še meritev β -hidroksimaslene kisline (spektrofotometrično) in z njeno pomočjo poskušali ugotoviti ali gre za alkoholno ketocidozo.

Poleg tega bomo v diplomski nalogi statistično opredelili število zastrupitev z metanolom in etilenglikolom v Sloveniji v letih od 1995 do 2007. Podatke o zastrupitvah bomo pridobili iz arhiva toksikološkega laboratorija na Inštitutu za sodno medicino (ISM); pregledali bomo zapisnike zadnjih 13 let (1995-2007), ki so vsebovali naročilo za toksikološko analizo vsebnosti metanola in etilenglikola. Vse podatke smo statistično obdelali in jih med seboj primerjali. Na ta način bomo opredelili:

- koliko je bilo obravnavanih primerov zaradi suma zastrupitve z metanolom in etilenglikolom po posameznih letih ter kolikšen je bil delež preiskav s pozitivnim izidom po posameznih letih;
- katere ustanove so v obravnavanem obdobju poslale največ naročil za toksikološko analizo in kolikšen je bil delež preiskav s pozitivnim rezultatom glede na posamezno inštitucijo;
- kakšna je bila starostna porazdelitev preiskovancev;
- kakšna je bila porazdelitev preiskovancev glede na spol;
- kakšni so bili vzroki zastrupitev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri statistični obdelavi podatkov smo kot materiale za delo uporabili zapisnike iz arhiva toksikološkega laboratorija na Inštitutu za sodno medicino. Zapisniki, ki poleg osebnih in osnovnih anamnestičnih podatkov pacienta vsebujejo tudi naročilo preiskave in biološke materiale, so na ISM prispeli s področja celotne Slovenije. Najpogostejša vzorca, ki sta bila prinesena na analizo za določitev vsebnosti metanola ali etilenglikola sta bila kri in urin, v nekoliko manjšem obsegu pa tudi želodčni izpirek. Prav tako sta bila kri in urin najpogosteje analizirana tudi pri analizah, ki smo jih opravili za diplomsko nalogo. Poleg krvi in urina pa smo analizirali tudi želodčno vsebino, steklovino iz desnega očesa in tekočino iz osrčnika, vendar je v teh primerih šlo za posmrtno določanje vsebnosti etilenglikola.

3.2. POSTOPEK DOLOČANJA ETILENGLIKOLA S PLINSKO KROMATOGRAFIJO

Postopek določanje koncentracije etilenglikola z metodo plinske kromatografije obsega pripravo standardov etilenglikola v vodni raztopini, pripravo vzorcev za določitev vsebnosti, nastavitve pogojev merjenja na plinskem kromatografu ter izris kromatograma s pomočjo integratorja ter interpretacijo le tega.

3.2.1. Priprava vzorcev

- **Priprava etilenglikolnih raztopin z različnimi koncentracijami**

Za umeritveno krivuljo smo uporabili etilenglikol z zelo visoko stopnjo čistosti (Merck, p.a., pro analyse). Z gravimetričnim postopkom smo pripravili izhodno raztopino etilenglikola v bidestilirani vodi (10 g/L). Z volumetričnim postopkom razredčevanja smo pripravili sveže raztopine (0 (slepa raztopina), 0,5, 1, 2, 3, 5 in 10 g/L) etilenglikola za pripravo umeritvene krivulje. Pred injiciranjem vzorcev (etilenglikola v vodi ali telesnih tekočin) smo dodali notranji standard. Kot notranji standard smo uporabili 0,7 g/L raztopino 1,3- propilenglikola v metanolu (Merck, p.a., pro analyse). Vzorce smo pripravljali v razmerju 1:4. 100 μ L vodne raztopine etilenglikola smo dodali 400 μ L notranjega standarda. Vse skupaj smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih na minuto. Metanol obori proteine. V plinski kromatograf smo injicirali 2 μ L čistega supernatanta. Iz znanih koncentracij etilenglikola in iz količnika površin notranjega standarda smo pripravili umeritveno krivuljo, katero smo kasneje uporabili za odčitavanje koncentracij etilenglikola v vzorcih.

- **Priprava vzorcev za določitev koncentracij etilenglikola s pomočjo plinsko-kromatografske analize**

V analizo smo dobili posmrtno odvzete vzorce polne krvi, urina, tekočine iz osrčnika, steklovine in želodčne vsebine. 100 μL vzorca, ki ga preiskujemo, smo dodali 400 μL notranjega standarda; tako pripravljene vzorce smo dobro premešali in jih centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih na minuto, da je metanol oboril proteine v vzorcu.

Etilenglikol smo določali s plinsko kromatografijo, in sicer tako, da smo supernatant direktno injicirali v plinski kromatograf v količini 2 μL .

V želodčnem izpirku se lahko etilenglikol nahaja v visokih koncentracijah, zato smo želodčno vsebino redčili v razmerju 1:10 ali 1:20.

3.2.2. Nastavitev aparature za plinsko analizo pri določanju etilenglikola

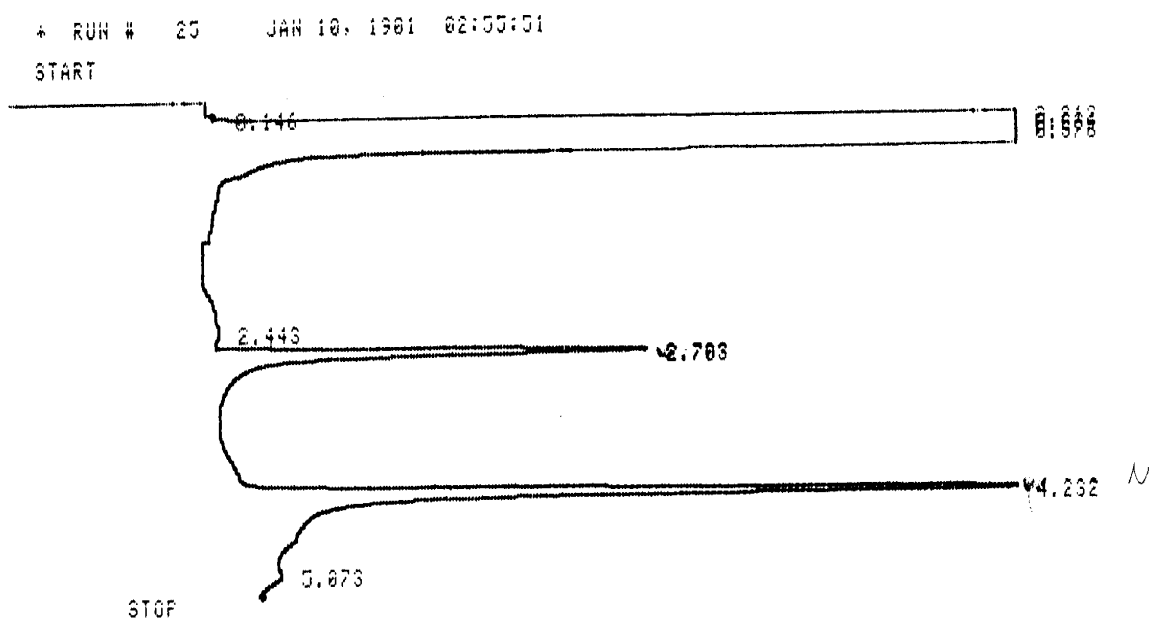
Za analizo smo uporabili kromatograf Hewlett Packard 5890 (HP 5890), s kolono HP (Crosslinked 50% PhMe Silicone (10 m \times 0,85 m \times 2,0 μm film tichess U.S.A.)). V koloni se temperatura spreminja gradientno: začetna temperatura kolone je 45°C, po 2,5 minutah se temperatura začne dvigovati, in sicer za 15°C na minuto, dokler ne doseže temperature 220°C. Vzorec smo injicirali skozi septum v injektor, katerega temperaturo smo nastavili na 230°C. Na injektorju se je uplinila vsa količina injiciranega vzorca. Kot nosilni plin smo uporabili dušik, ki je imel pretok 27 mL/minuto. Plina, ki sta povzročila pirolizo vzorca, sta bila vodik in zrak - vodik je imel pretok 23 mL/minuto, zrak pa 440 mL/minuto. Aparat ima plamensko ionizacijski detektor (FID), katerega temperaturo pri analizi etilenglikola smo nastavili na 300°C. Detektor zbere impulze, ki so sorazmerni številu atomov v spojini in jih pošlje integratorju, le-ta pa jih preračuna in izriše kromatogram. Uporabili smo integrator Hewlett Packard 3396 Series II (HP 3396 Series II). Čas analize je bil 10 minut.



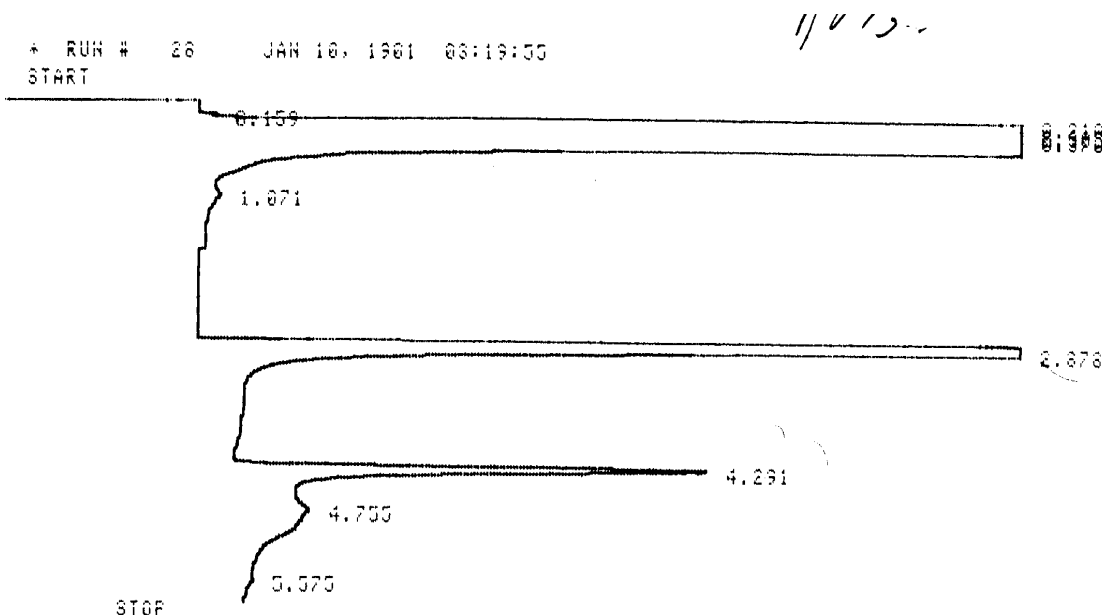
Slika 6: plinski kromatograf HP 5890

3.2.3. Kromatogrami standardnih etilenglikolnih raztopin in bioloških tekočin

- **Kromatogram** je rezultat kromatografske ločbe. Zelo pomemben faktor pri kromatografski ločbi je retencijski čas (t_r): čas, ki ga komponenta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno komponento. Na kromatogramih je retencijski čas notranjega standarda (1,3-propilenglikola) 4,21 minut. Retencijski čas etilenglikola pa je 2,64 minut. Pri analizi etilenglikolnih standardov za pripravo umeritvene krivulje smo dobili naslednje kromatograme:



Slika 7: Kromatogram 1 g/L vodne raztopine etilenglikola z dodatkom notranjega stanadrda



Slika 8: Kromatogram 10 g/L vodne raztopine etilenglikola z dodatkom notranjega standarda

3.2.4. Odčitavanje koncentracij etilenglikola iz kromatograma

Iz kromatograma smo odčitali retencijske čase in pod njimi pripadajoče površine za notranje standarde in biološke vzorce. Površine signalov, ki jih dajejo detektorji pri kvantitativni analizi, so sorazmerne koncentraciji določene komponente. Iz pripadajočih površin vzorcev (A_{vz}), standardnih koncentracij etilenglikola in iz površin notranjih standardov (A_{ns}) smo izračunali količnik (K) za vsako analizo posebej. Iz količnikov in koncentracij vodnih raztopin etilenglikola smo narisali umeritveno krivuljo, koncentracijo etilenglikola v vzorcih pa odčitamo iz umeritvene krivulje.

$$K = A_{vz} / A_{ns}$$

3.3. POSTOPEK DOLOČANJA METANOLA S PLINSKO KROMATOGRAFIJO S TEHNIKO NADPROSTORA (Head space)

Vsebnost metanola se najpogosteje določa z metodo plinske kromatografije s tehniko nadprostora. Ta metoda se uporablja za določanje plinastih oziroma lahko hlapnih substanc.

3.3.1. Priprava vzorcev za določitev vsebnosti metanola

V steklene vialo smo odpipetirali 0,1 mL krvi ali urina in 0,1 mL vodne raztopine notranjega standarda: terciarnega butanola (Merck, p.a., pro analyse). Vialo smo dobro zaprli s septumom in kovinskim zamaškom. Vialo smo vstavili v nadprostor vzorčevalnika in začeli z analizo. V seriji vzorcev dodamo poleg standardnih raztopin metanola tudi standard etanola, po potrebi pa tudi acetona.

3.3.2. Nastavitev aparature za plinsko kromatografijo pri določanju metanola

Za analizo smo uporabili aparat Hewlett Packard 5890 Series II (HP 5890 Series II). Vialo smo 10 minut termostatirali v vzorčevalniku (Agilent 7694 Head Space Sampler), ki je sestavljen iz procesorske enote in kopeli s silikonskim oljem pri temperaturi 55°C. Plinasti vzorec odvzame posebna sonda ter z njim napolni vzorčevalno zanko (65°C) z volumnom 1 mL. Vzorec potuje po ogreti cevi (75°C) v injektor plinskega kromatografa, katerega temperatura je 200°C. Vzorec potuje z nosilnim plinom skozi kolono. Kot nosilni plin smo uporabili dušik s pretokom 40 mL/minuto. Uporabili smo stekleno polnjeno kolono (Supelco, 0,2% Carbowax 1500 na Carbopack C, 60 – 80mesh) dolgo 1,83 m z notranjim premerom 2 mm, katere temperaturo smo uravnali na 76°C. Plamensko ionizacijski detektor je bil segret na 220°C. Detektor zbere impulze, ki so sorazmerni številu ogljikovih atomov v spojini, in jih posreduje integratorju. Integrator jih preračunava ter nam izpiše in izriše kromatografske podatke. Uporabili smo integrator Hewlett Packard 3396 A (HP 3396 A). Čas analize je 5 minut. Retencijski čas metanola je 0,573 minut, etanola 0,986 minut in terciarnega butanola 3,140 minut.



Slika 9: plinski kromatograf HP 5890 Series II

3.4. DOLOČANJE β -HIDROKSIMASLENE KISLINE Z ENCIMSKO METODO (SPEKTROFOTOMETRIČNO)

Pri ugotavljanju koncentracije β -hidroksimaslene kisline smo uporabili encimsko metodo, ki je primerna za merjenje deleža β -hidroksimaslene kisline (3-hidroksibutanojska kislina) v bioloških vzorcih in pri kateri produkt reakcije merimo spektrofotometrično. Metoda temelji na hitrosti oksidacije β -hidroksimaslene kisline v acetoacetat s pomočjo encima β -hidroksibutirat dehidrogenaza. V vseh primerih določanja smo uporabili reagent Ranbut, ki ga proizvaja podjetje Randox, biokemične analize pa smo izvedli v encimskem laboratoriju Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

3.4.1. Sestava reagenta

Reagent, ki smo ga uporabljali za določitev deleža β -hidroksimaslene kisline v biološkem vzorcu, je sestavljen iz treh različnih podenot:

- Puffer, s katerim uravnavamo kislost oziroma bazičnost vzorca. Puffer je zmes tris pufra (100 mmol/L, pH = 8,5), ki se najpogosteje uporablja za encimsko kinetiko, EDTA (2 mmol/L) in oksalne kisline (20 mmol/L). S pufri vzdržujemo pH vzorca in s tem omogočamo potek reakcije v smeri nastanka acetoacetata.
- Encim/koencim je druga komponenta reagenta, ki vsebuje koencim NAD^+ (2,5 mmol/L). Slednji predstavlja večjo organsko molekulo, ki sodeluje pri prenosu elektronov in funkcionalnih skupin. Encim 3-hidroksibutirat dehidrogenaza (3-HBDH) pa je oksidoreduktazni encim, ki omogoča reakcijo.
- Standard, ki vsebuje D-3-hidroksibutirat je zadnja sestavna komponenta reagenta in jo uporabimo za primerjavo dobljenih vrednosti pri določanju deleža β -hidroksimaslene kisline v vzorcu.

3.3.2. Nastavitev aparatur in določanje β -hidroksimaslene kisline v vzorcih

Analize smo opravili s pomočjo analizatorja Olympus AU400. Ta analizator je popolnoma avtomatiziran, zaradi česa se vsi postopki analize (pipetiranje vzorca (25 μL), pipetiranje standardov (25 μL), pipetiranje reagentov (1,00 mL)) opravijo samodejno. Analitik le vstavi vzorec in nastavi program merjenja na spektrofotometru Shimadzu UV-1601, s pomočjo katerega smo merili koncentracije β -hidroksimaslene kisline v vzorcih. To smo storili tako, da smo po vklopu aparata in po kalibraciji le tega (čas samopreverjanja je približno 3 minute) najprej v PHOTOMETRIC MODE s pritiskom na tipko GO TO WL vnesli željeno valovno dolžino. Ta je bila v našem primeru 340 nm. Vnos smo potrdili s tipko ENTER. Po vnosu valovne dolžine z vodo smo naravnali absorbenco na 0. S tipko MODE smo se pomaknili v glavni menu, kjer smo s tipko številka štiri, na tipkovnici izbrali kinetični način merjenja (KINETICS MODE). S pritiskom številke štiri smo se nadalje pomaknili v RATE MODE MENU, kjer smo izbrali temperaturo in jo z modrim gumbom naravnali na 37°C. Vse vpise smo potrdili s tipko ENTER.

Merjenje se začne, ko analizator Olympus AU400 podstavi vzorce in jih nato spektrofotometer posrka.

Rezultati obeh analiz so prikazani v tabelah v naslednjem poglavju.



Slika 10: analizator Olympus AU400

3.4. STATISTIČNE METODE

Vse podatke, ki smo jih pridobili iz arhiva zapisnikov v toksikološkem laboratoriju na ISM, smo obdelali s pomočjo računalniškega programa Excel. S tem programom smo obdelali tudi rezultate, dobljene pri analizah metanola, etilenglikola in β -hidroksimaslene kisline, in jih nato grafično in tabelarno predstavili.

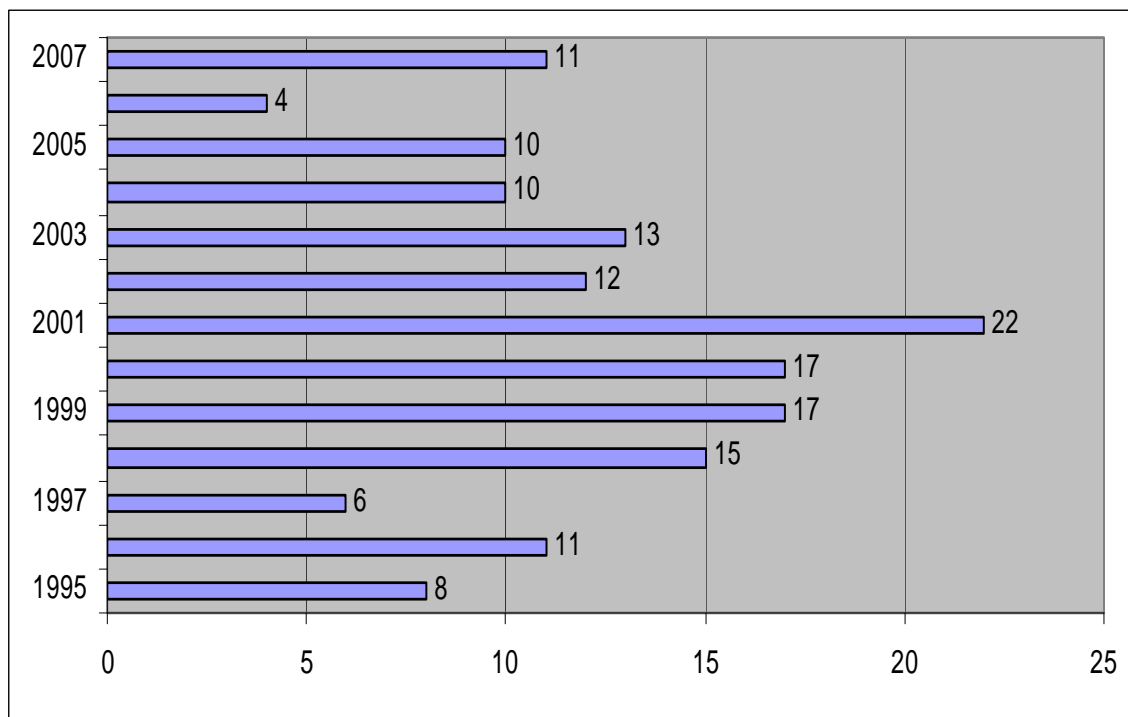
4. REZULTATI

4.1. STATISTIČNI PODATKI O TOKSIKOLOŠKIH PREISKAVAH GLEDE VSEBNOSTI METANOLA IN ETILENGLIKOLA

V letih od 1995 do 2001 je toksikološki laboratorij na ISM prejel 156 različnih vzorcev, ki so jih poslale različne ustanove zaradi suma zastrupitve z metanolom oziroma etilenglikolom. Ker pa ni bila vedno zahtevana meritev obeh parametrov, je bilo od 156 vzorcev opravljenih 149 (95.5%) analiz, s katerimi so potrdili ali ovrgli vsebnost etilenglikola ter 102 (65%) analize vsebnosti metanola. Od tega je bila v 37 (24%) primerih dokazana prisotnost etilenglikola medtem, ko je bil metanol potrjen v 18 (12%) primerih.

4.1.1. Število naročil za toksikološko preiskavo in preiskave s pozitivnim rezultatom

Na sliki številka 11 je grafično prikazano letno število naročil za toksikološko preiskavo vzorcev, ki so jih na Inštitut za sodno medicino prejeli v 13 opazovanih letih, glede vsebnosti metanola in etilenglikola.



Slika 11: Letno število naročil za toksikološko preiskavo vzorcev zaradi suma na zastrupitve z metanolom in etilenglikolom v opazovanem obdobju od leta 1995 do leta 2007

V preglednici II je prikazan pregled naročil za preiskavo in delež pozitivnih rezultatov po letih v opazovanem 13-letnem obdobju. Vseh pozitivnih analiz na metanol je bilo 18, na etilenglikol pa 37.

Preglednica II: Pregled naročil za preiskavo in delež pozitivnih rezultatov preiskav po letih v opazovanem obdobju od leta 1995 do leta 2007

Leto	Naročila	Število pozitivnih rezultatov na metanol	Delež pozitivnih rezultatov na metanol (%)	Število pozitivnih rezultatov na etilenglikol	Delež pozitivnih rezultatov na etilenglikol (%)
1995	8	0	0%	3	38%
1996	11	0	0%	5	45%
1997	6	0	0%	3	50%
1998	15	4	27%	4	27%
1999	17	1	6%	5	29%
2000	17	1	6%	2	12%
2001	22	3	14%	5	23%
2002	12	1	8%	2	17%
2003	13	3	23%	0	0%
2004	10	2	10%	1	10%
2005	10	1	10%	3	30%
2006	4	0	0%	3	75%
2007	11	2	18%	1	9%

4.1.2. Naročniki toksikoloških preiskav

V preglednici številka III je prikazan pregled ustanov, ki so v opazovanem obdobju na Inštitut za sodno medicino poslale naročila za analize vsebnosti metanola ali etilenglikola. Največ teh inštitucij ima sedež v Ljubljani, in sicer 12, vključno s prosekuro inštituta, ostali naročniki pa so splošne bolnišnice s področja celotne Slovenije. Poleg posameznih naročil, ki so jih te ustanove poslale, je v preglednici navedeno tudi število in delež pozitivnih rezultatov vsebnosti metanola oziroma etilenglikola po posameznih inštitucijah.

Preglednica III: Splošni pregled ustanov, ki so na ISM poslale naročila za toksikološko preiskavo v opazovanem obdobju od leta 1995 do leta 2007 ter število in delež pozitivnih rezultatov vsebnosti metanola in etilenglikola v opazovanem obdobju po posameznih ustanovah

Naročniki	Število naročil	Število pozitivnih rezultatov na metanol	Število pozitivnih rezultatov na etilenglikol
CIIT	56	7	10
IPP	24	7	4
CZ	8	0	3
ISM	3	0	0
Gastroenterološka interna klinika	3	0	0
Nevrološka klinika	1	0	0
Pediatrična klinika	1	0	0
Nefrološka klinika	6	1	0
SB Jesenice	9	1	3
SB Izola	6	0	2
SB Celje	12	2	8
SB Maribor	2	0	1
SB Nova Gorica	2	0	1
SB Novo mesto	6	0	1
SB Ptuj	2	0	1
SB Slovenj Gradec	3	0	0
SB Murska Sobota	2	0	2
SB Trbovlje	1	0	0
BPD	1	0	0
Center za intenzivno terapijo	2	0	1
Infekcijska klinika	2	0	0
KC SIS	4	0	0
Skupaj	156	18	37

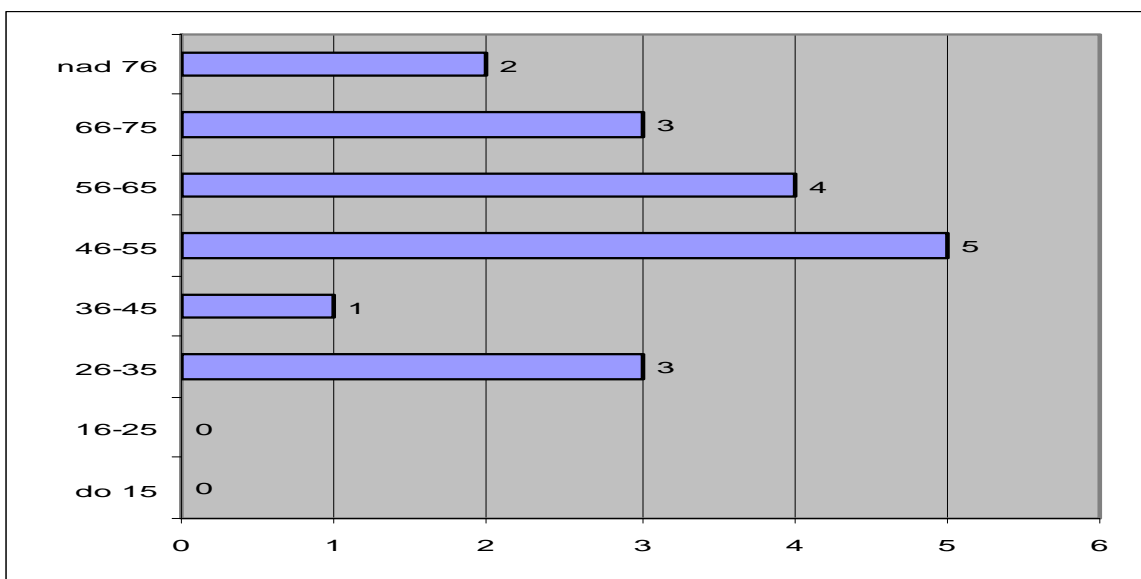
CIIT-Center za intenzivno interno medicino, IPP-Internistična prva pomoč, CZ-Center za zastrupitve, ISM-Inštitut za sodno medicino, SB-splošna bolnišnica, BPD-Bolnišnično psihiatrični dispanzer, SIS-Stalna internistična služb

4.3.1. Starost preiskovancev

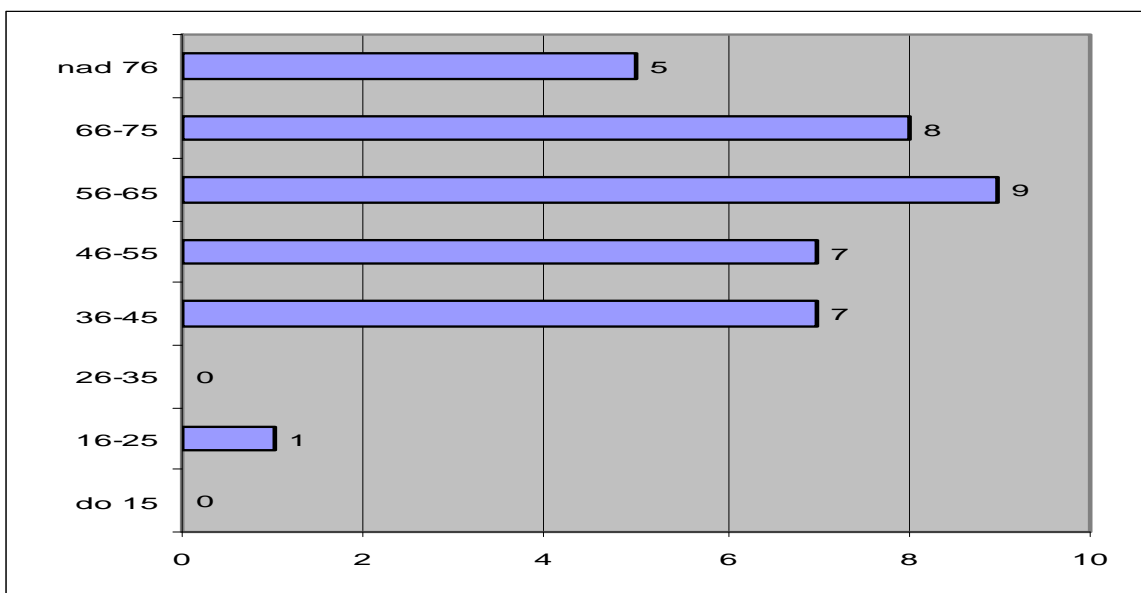
V preglednici številka IV je prikazano število vseh preiskovancev in število preiskovancev s pozitivnim rezultatom razvrščenih po starosti. Zaradi boljšega pregleda smo preiskovance razdelili v osem starostnih razredov. Preglednici smo dodali še diagrama, ki prikazujeta starostno porazdelitev preiskovancev, pri katerih je bila dokazana prisotnost metanola oziroma etilenglikola.

Preglednica IV: Število vseh preiskovancev v primerjavi s številom preiskovancev s pozitivnim rezultatom po starostnih skupinah

Starost (leta)	Vsi preiskovanci glede vsebnosti metanola	Pozitivni preiskovanci glede vsebnosti metanola	Vsi preiskovanci glede vsebnosti etilenglikola	Pozitivni preiskovanci glede vsebnosti etilenglikola
do 15	0	0	2	0
16-25	4	0	6	1
26-35	6	3	10	0
36-45	14	1	21	7
46-55	23	5	25	7
56-65	20	4	33	9
66-75	16	3	24	8
nad 76	6	2	8	5
skupaj	89	18	129	37



Slika 12: Starostna porazdelitev preiskovancev, pri katerih je bila dokazana prisotnost metanola



Slika 13: Starostna porazdelitev preiskovancev, pri katerih je bila dokazana prisotnost etilenglikola

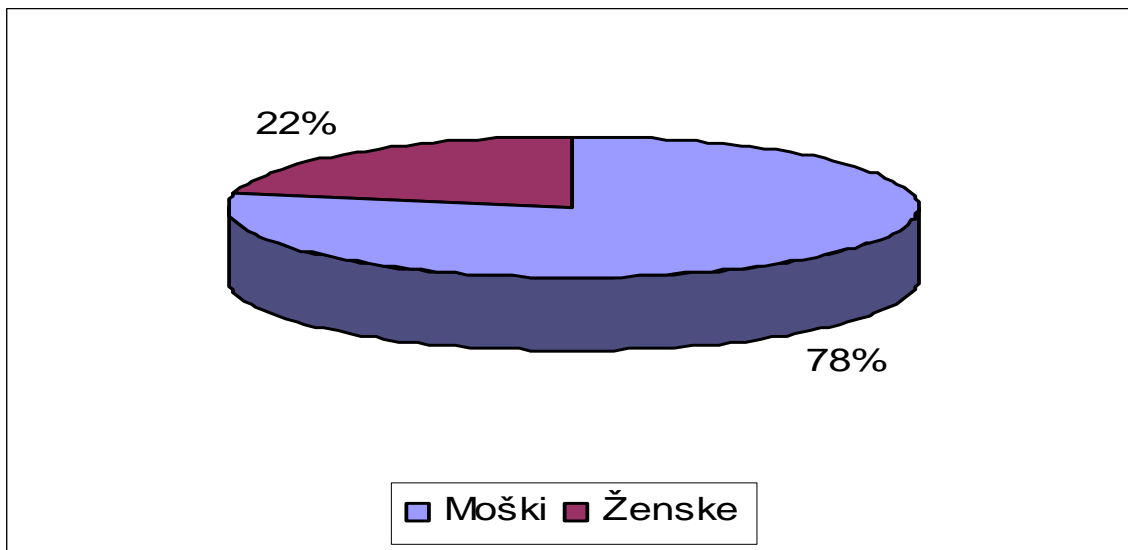
4.1.4. Spol preiskovancev, pri katerih smo dokazali prisotnost metanola oziroma etilenglikola

Preglednica številka V kaže število pozitivnih primerov vsebnosti metanola po posameznih letih glede na spol in delež moških oziroma žensk v določenem letu glede na število vseh pozitivnih preiskovancev. Iz preglednice je razvidno, da po številu pozitivnih primerov prevladuje moška populacija

Preglednica V: Pregled preiskovancev s pozitivnim rezultatom na metanol glede na spol v opazovanem obdobju od leta 1995 do leta 2007

Leto	Skupaj pozitivni glede vsebnosti metanola	Moški	Moški (%)	Ženske	Ženske (%)
1995	0	0	0%	0	0%
1996	0	0	0%	0	0%
1997	0	0	0%	0	0%
1998	4	4	100%	0	0%
1999	1	1	100%	0	0%
2000	1	0	0%	1	100%
2001	3	3	100%	0	0%
2002	1	0	0%	1	100%
2003	3	3	100%	0	0%
2004	2	2	100%	0	0%
2005	1	0	0%	1	100%
2006	0	0	0%	0	0%
2007	2	1	50%	1	50%

Na sliki številka 14 je predstavljen delež metanol-pozitivnih preiskovancev glede na spol v obdobju 1995 - 2007.



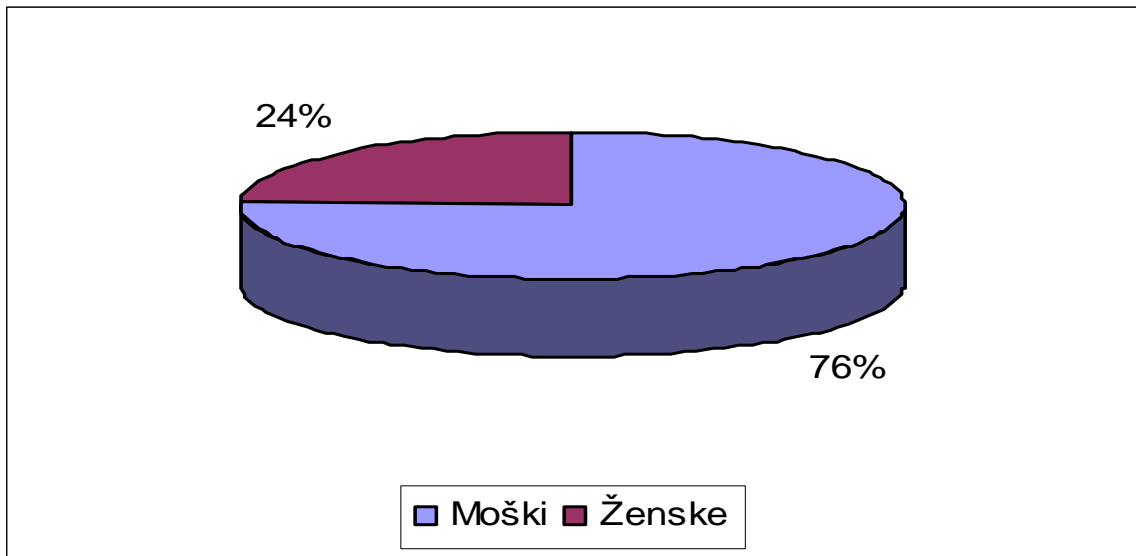
Slika 14: Delež metanol-pozitivnih preiskovancev glede na spol v letih 1995-2007

Preglednica številka VI kaže število primerov pozitivnih na etilenglikol po posameznih letih glede na delež moških oziroma žensk v določenem letu. Iz preglednice je razvidno, da po številu pozitivnih primerov prevladuje moška populacija.

Preglednica VI: Pregled etilenglikol-pozitivnih preiskovancev glede na spol v opazovanem obdobju od leta 1995 do leta 2007

Leto	Skupaj pozitivni glede vsebnosti etilenglikola	Moški	Moški (%)	Ženske	Ženske (%)
1995	3	2	67%	1	33%
1996	5	2	40%	3	60%
1997	3	3	100%	0	0%
1998	4	4	100%	0	0%
1999	5	5	100%	0	0%
2000	2	2	100%	0	0%
2001	5	4	80%	1	20%
2002	2	1	50%	1	50%
2003	0	0	0%	0	0%
2004	1	1	100%	0	0%
2005	3	2	67%	1	33%
2006	3	2	67%	1	33%
2007	1	0	0%	1	100%

Na sliki številka 15 je predstavljen delež etilenglikol-pozitivnih preiskovancev glede na spol v obdobju 1995 - 2007



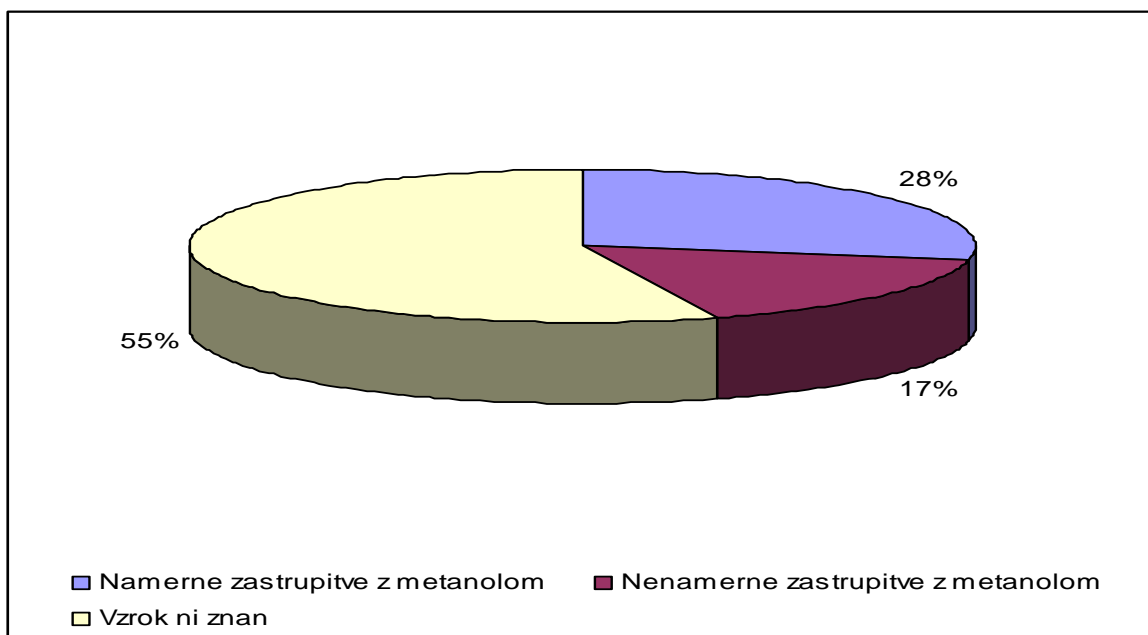
Slika 15: Delež etilenglikol pozitivnih preiskovancev glede na spol v letih 1995-2007

4.1.5. Vzroki zastrupitev

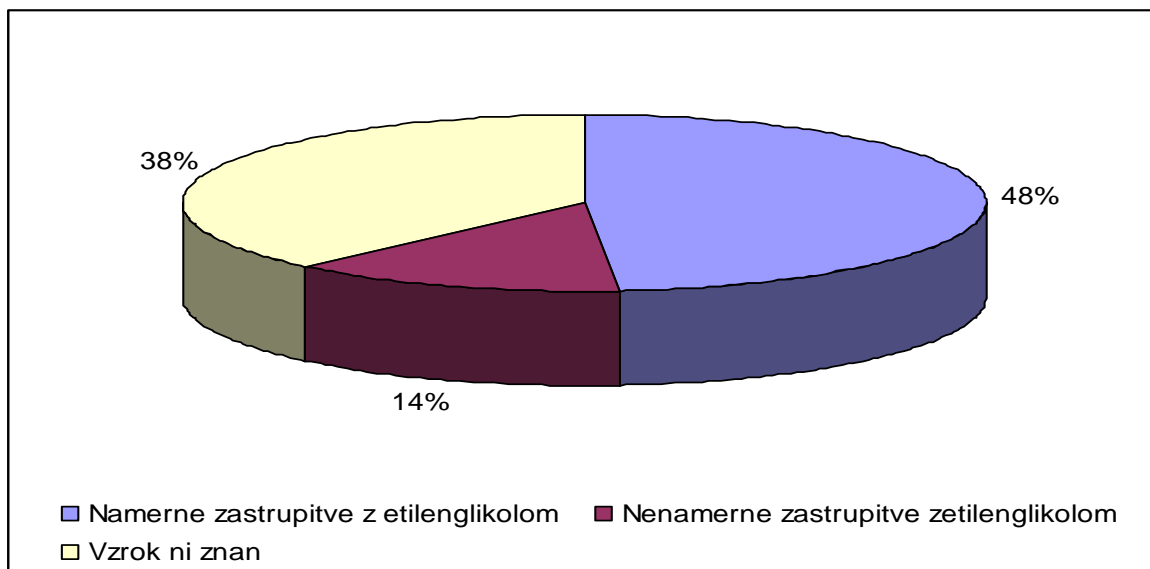
Pozitivne primere vsebnosti metanola oziroma etilenglikola (18 pozitivnih primerov za metanol in 37 pozitivnih primerov za etilenglikol) smo razdelili v tri kategorije:

- **namerna zastrupitev**, pri kateri so preiskovanci zlorabljali metanol ali etilenglikol v samomorilne namene;
- **nenamerne zastrupitve** oziroma nezgodne, pri katerih so preiskovanci zaradi različnih vzrokov zaužili metanol ali etilenglikol (največkrat pa zaradi napačnega skladiščenja);
- **neznan vzrok**, pri katerih ni bilo popolnih podatkov o zaužitju. Če so zdravniki te podatke imeli, jih v zapisniku niso navedli.

Na slikah 16 in 17 in preglednicah VII in VIII je prikazan delež in porazdelitev zastrupljenec z metanolom in etilenglikolom glede na vzrok zaužitja.



Slika 16: Pregled deležev zastrupitev z metanolom glede na vzrok zastrupitve v letih 1995 - 2007



Slika 17: Pregled deležev zastrupitev z etilenglikolom glede na vzrok zastrupitve v letih 1995 - 2007

Preglednica VII: porazdelitev zastrupljenecv z metanolom po spolu in glede na vzrok zaužitja v letih 1995 - 2007

	Namerna		Nenamerna		Vzrok neznan	
	<i>ženske</i>	<i>moški</i>	<i>ženske</i>	<i>moški</i>	<i>ženske</i>	<i>moški</i>
Skupaj	1	4	0	3	6	4

Preglednica VIII: porazdelitev zastrupljenecv z etilenglikolom po spolu in glede na vzrok zaužitja v letih 1995 - 2007

	Namerna		Nenamerna		Vzrok neznan	
	<i>ženske</i>	<i>moški</i>	<i>ženske</i>	<i>moški</i>	<i>ženske</i>	<i>moški</i>
skupaj	4	14	1	4	4	10

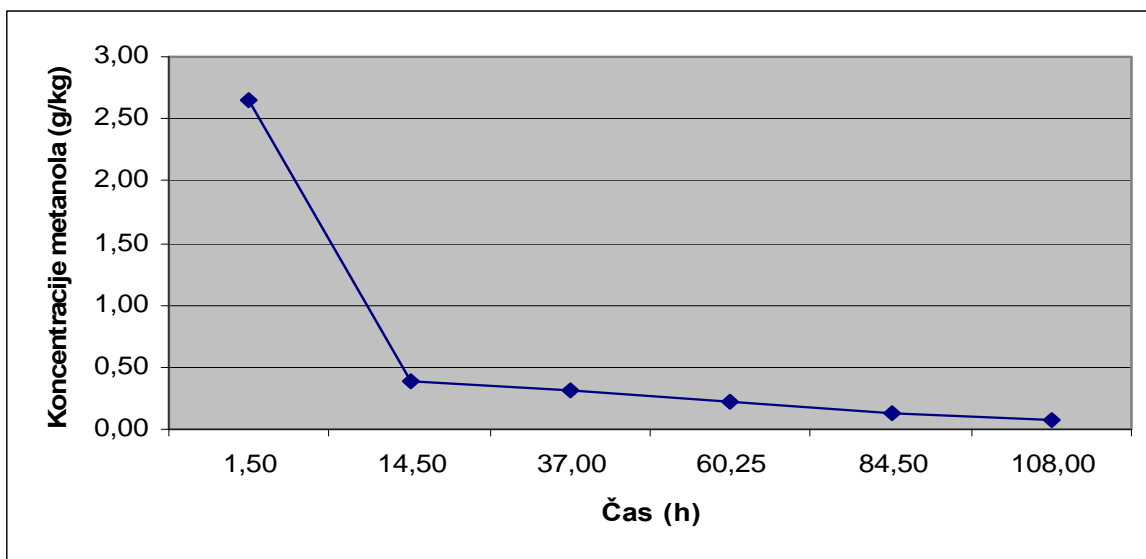
4.1.6. Posamezni primeri zastrupitev z metanolom

Primer 1: 54-letna preiskovanka je zaužila metanol v samomorilne namene. S plinsko kromatografijo je bil v odvzetih vzorcih krvnega seruma in urina dokazan metanol v vrednostih, ki jih prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Vrednosti in kontrolne koncentracije s plinsko kromatografijo izmerjenega metanola (primer 1)

Datum odvzema	Ura odvzema	Koncentracija metanola v serumu (g/kg)	Koncentracija metanola v urinu (g/kg)	Koncentracija etanola v serumu (g/kg)
23. marec	21:30	2,65	3,49	0,16
24. marec	10:30	0,39	0,59	0,82
25. marec	9:00	0,32		1,28
26. marec	8:15	0,23		2,05
27. marec	8:30	0,13	0,20	0,23
28. marec	8:00	0,08		1,69

Pacientko so hospitalizirali in ji odredili terapijo z etanolom. Vse naslednje kontrolne koncentracije so prikazane v preglednici IX, njihov padec pa vidimo na grafu številka 18.



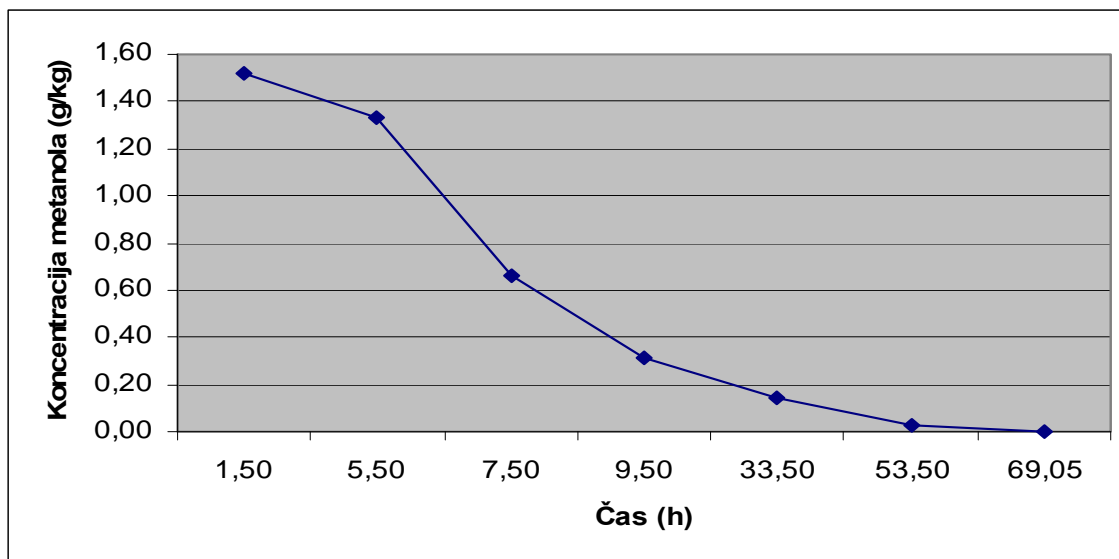
Slika 18: Prikaz upadanja koncentracije metanola v serumu v odvisnosti od časa (primer 1)

Primer 2: 45-letni moški z metabolično acidozo naj bi najverjetneje zaužil metanol. S pomočjo plinske kromatografije je bil v odvzetih vzorcih krvnega seruma in urina dokazan metanol in sicer v vrednostih, ki jih prikazuje preglednica X.

Preglednica X: Vrednosti in kontrolne koncentracije s plinsko kromatografijo izmerjenega metanola (primer 2)

Datum odvzema	Ura odvzema	Koncentracija metanola v serumu (g/kg)
15. maj	13:00	1,52
15. maj	pred HD (17:00)	1,33
15. maj	2 uri po HD (17:00)	0,66
15. maj	4 ure po HD (21:00)	0,31
16. maj	po HD (21:00)	0,14
17. maj	po HD (17:00)	0,03
19. maj	8:15	0,00

Pacienta so hospitalizirali. Za odstranjevanje metanola in njegovih metabolitov so uporabili hemodializo (HD). Kontrolne meritve koncentracije metanola, izvedene po hemodializi, so prikazane v preglednici številka X, njihovo spreminjanje s časom pa vidimo na grafu številka 19.



Slika 19: Prikaz upadanja koncentracije metanola v serumu v odvisnosti od časa (primer 2)

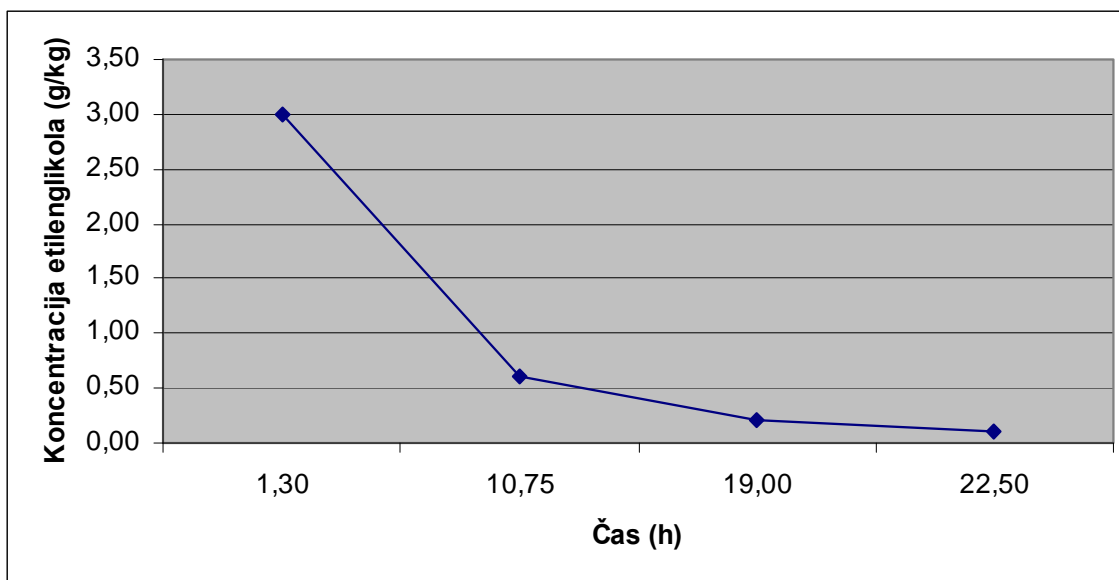
4.1.7. Posamezni primeri zastrupitev z etilenglikolom

Primer 1: Pacient je v samomorilne namene zaužil cca. 1L antifrizu, poleg tega je zaužil tudi alkoholne pijače (etanol). Z metodo plinske kromatografije so se v bioloških vzorcih krvnega seruma in urina določile naslednje vrednosti, ki so prikazane v preglednici XI.

Preglednica XI: Vrednosti in kontrolne koncentracije s plinsko kromatografijo izmerjenega etilenglikola (primer 1)

Datum odvzema	Čas odvzema	Koncentracija etilen glikola v serumu (g/kg)	Koncentracija etilenglikola v urinu (g/kg)
17. november	21:50	3,00	9,00
18. november	8:15	0,60	
18. november	17:30	0,20	
18. november	21:00	0,10	

Bolnika so hospitalizirali. V času hospitalizacije so bile izmerjene kontrolne vrednosti etilenglikola, ki so prikazane v tabeli XI, njihovo spreminjanje s časom pa vidimo na grafu številka 20. Podatkov o koncentraciji etanola nimamo.



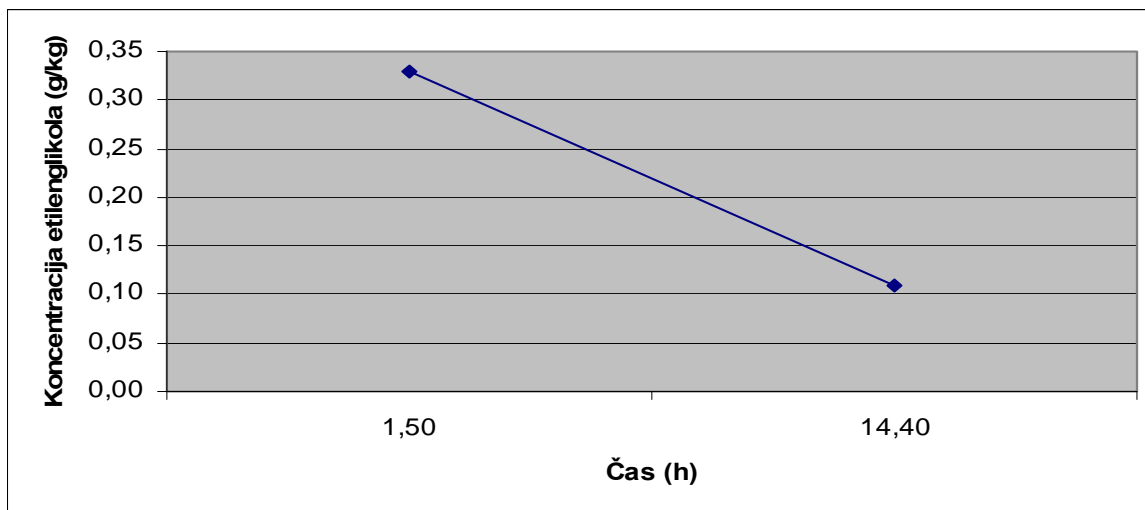
Slika 20: Prikaz upadanja koncentracije etileglikola v serumu v odvisnosti od časa (primer 1)

Primer 2: Pacient je naključno popil manjšo količino antifriz. V toksikološkem laboratorju na ISM je bila koncentracija etilenglikola izmerjena s plinsko kromatografijo v krvnem serumu in urinu, dobljene koncentracije pa so podane v preglednici XII.

Preglednica XII: Vrednosti in kontrolne koncentracije s plinsko kromatografijo izmerjenega etilenglikola (primer 2)

Datum odvzema	Čas odvzema	Koncentracija etilen glikola v serumu (g/kg)	Koncentracija etilenglikola v urinu (g/kg)
25. december	17:45	0,33	2,30
26. december	8:00	0,11	

V kontrolne namene je bila opravljena ena meritev koncentracije etilenglikola. Podatki so prikazani v tabeli številka XII, padec koncentracije pa je razviden iz spodnjega grafa (graf številka 21).



Slika 21: Prikaz upadanja koncentracije etileglikola v serumu v odvisnosti od časa (primer 2)

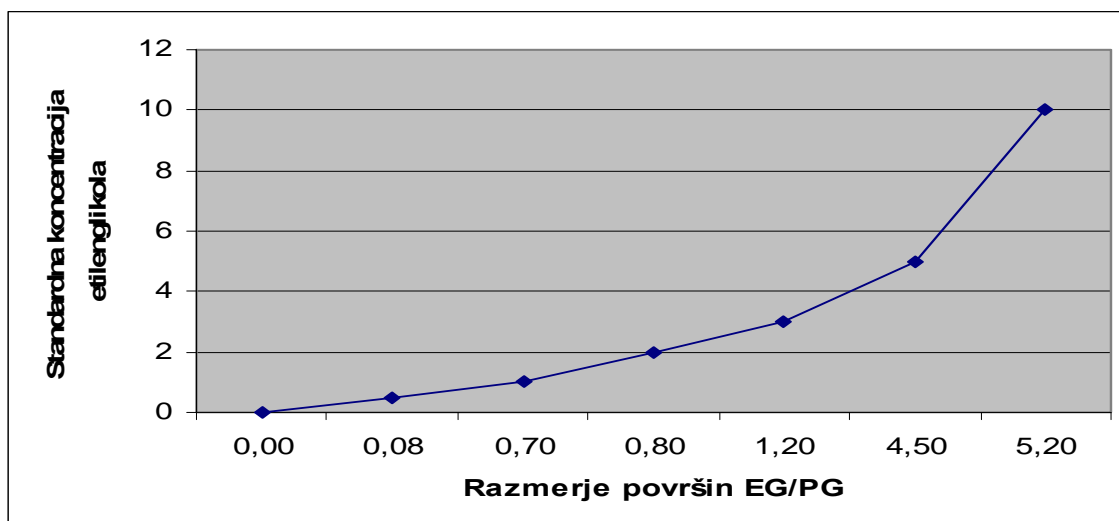
4.2. PRIMER TOKSIKOLOŠKE PREISKAVE POSMRTNO ODVZETIH VZORCEV VSEBNOSTI ETILENGLIKOLA

4.2.1. Umeritvena krivulja

Pred analizo biološkega materiala smo izmerili površine standardnim raztopinam in notranjemu standardu. Iz izmerjenih vrednosti smo s pomočjo programa Excel narisali umeritveno krivuljo, po kateri smo nato odčitali površino etilenglikola v biološkem vzorcu in dobili njegovo koncentracijo v promilih (g/L).

Preglednica XIII: prikaz meritev dobljenih pri plinski kromatografiji standardnih raztopin

Koncentracija standardne raztopine etilenglikola (g/L)	Razmerje površin EG/PG
0	0,00
0,5	0,08
1	0,70
2	0,80
3	1,20
5	4,50
10	5,20



Slika 22: prikaz razmerja površin kromatografskega vrha etilenglikola in 1,3-propilenglikola v odvisnosti od koncentracije etilenglikola

4.2.2. Rezultati posmrtno odvzetih vzorcev za določanje vsebnosti etilenglikola

Na ISM so pripeljali truplo 48 letnega moškega. Našli so ga na tleh v gozdu 50 m od cestnega počivališča. Moški je doma pustil poslovilno pismo. Zadnje čase naj bi bil depresiven, osebna zdravnica pa ga je napotila tudi na pregled k psihiatru.

Moški je v gozdu ležal na levem boku. Mrliške lise je imel zlite po levi strani trupla, na pritisk pa so bile iztisljive. Truplo je bilo ohlajeno pod temperaturo okolice. Znakov nasilja na truplu ni bilo opaziti. Ob glavi trupla so ležala očala z dioptrijo, približno 15 m stran pa so našli sveže odprto in do polovice izpraznjeno plastenko z Antifrizom.



Slika 25: Napol prazna plastenka Antifriza najdena v neposredni bližini trupla

- **Antifriz** je antikorozivno sredstvo proti zmrzovanju hladilne tekočine. Ima blag vonj in je dodatno rahlo vijolično obarvan. Ne vsebuje aminov, nitritov in fosfatov. Ena izmed glavnih sestavin antifriza je etilenglikol. Učinkuje proti pregrevanju, penjenju in nastanku usedlin. Ščiti motorje in hladilne sisteme pred zmrzovanjem. Delež etilenglikola v vodi vpliva na temperaturo znižanja zmrzišča.

S pomočjo plinske analize smo izmerili visoke koncentracije etilenglikola v bioloških vzorcih preiskovanca. Tabela številka XIV prikazuje razmerje površine med etilenglikolom in 1,3-propilenglikolom..

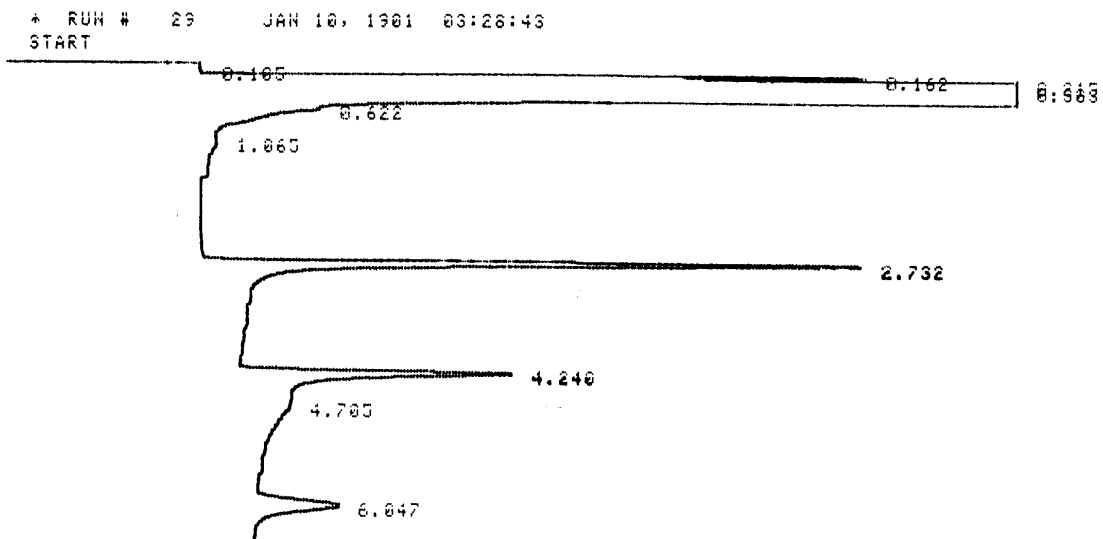
Preglednica XIV: Prikaz rezultatov dobljenih s plinsko kromatografijo v različnih bioloških vzorcih preiskovanca

Vzorec	Razmerje površin EG/PG
Serum	0,95
Urin	6,60
Tekočina iz osrčnika	0,58
Steklovina	3,20
Želodčni izpirek	1,80

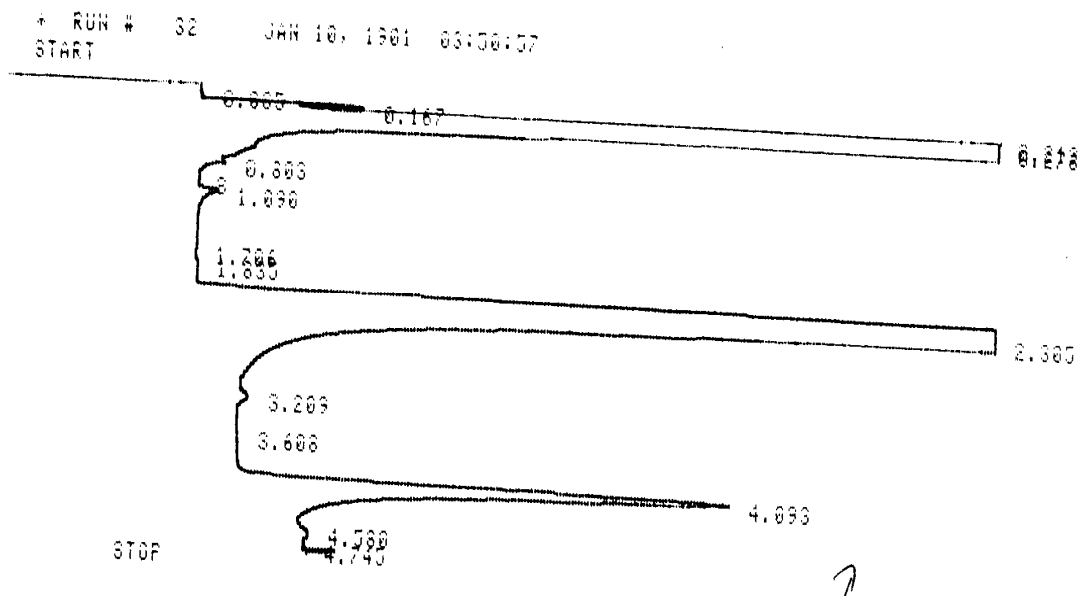
Glede na okoliščine je bil najverjetnejši vzrok smrti samomor z zastrupitvijo. Odrejena je bila sanitarna obdukcija. Pri obdukciji so bili odvzeti vzorci krvi, urina, želodčne vsebine, očesne steklovine in tekočine iz osrčnika. Te vzorce smo analizirali glede na vsebnost etilenglikola s pomočjo plinske kromatografije po postopku opisanem v poglavju 3.2. Po obdukciji in opravljeni toksikološki analizi je zdravnik postavil sledeče diagnoze:

- hud možganski in pljučni edem;
- akutna zastrupitev z etilenglikolom;
- pikčaste krvavitve v možganskem deblu;
- povečano in razširjeno srce;
- zmerna ateroskleroza venčnih arterij;
- zamaščena jetra;
- debelost;
- samomor.

- primeri kromatogramov vzorcev



Slika 23: Kromatogram vzorca polne krvi z dodatkom notranjega stanadrda



Slika 24: Kromatogram urinskega vzorca z dodatkom notranjega standarda

4.3. REZULTATI DOLOČANJA β -HIDROKSIMASLENE KISLINE

Primer 1: V zapisniku, ki je spremljal vzorce krvi in urina, je bil podatek, da je pacient kronični alkoholik. Zaradi suma zastrupitve z metanolom in etilenglikolom je bila odrejena toksikološka analiza, ki je dala negativne vrednosti. V krvi in urinu pa je bil dokazan aceton. Za natančno diagnozo metabolične acidoze smo opravili še analizo vsebnosti β -hidroksimaslene kisline, ki pa je dala visoke vrednosti, kar je prikazano tudi v tabeli številka XV.

Preglednica XV: Prikaz rezultatov β -hidroksimaslene kisline dobljenih s pomočjo plinske analize (primer 1)

Datum odvzema	Ura odvzema	koncentracija acetona v serumu (g/kg)	Koncentracija acetona v urinu (g/kg)	Koncentracija β-hidroksimaslene kisline v serumu (μmol/l)	Koncentracija β-hidroksimaslene kisline v urinu (μmol/l)
21.jul	15:00	0,03	0,02	2254	1307

Primer2: Pacient je imel ob sprejemu metabolično acidozo nejasnega izvora. Ker so bili rezultati toksikoloških preiskav vsebnosti metanola in etilenglikola negativni, smo opravili še analizo vsebnosti β -hidroksimaslene kisline, da bi lažje določili vzrok, ki je privedel do metabolične acidoze. Rezultati vseh meritev so prikazani v tabeli številka XVI.

Preglednica XVI: Prikaz rezultatov β -hidroksimaslene kisline dobljenih s pomočjo plinske analize (primer 2)

Datum odvzema	Ura odvzema	Koncentracija acetona v serumu (g/kg)	Koncentracija acetona v urinu (g/kg)	Koncentracija β-hidroksimaslene kisline v serumu (μmol/l)	Koncentracija β-hidroksimaslene kisline v urinu (μmol/l)
16.jul	12:25	0,2	0,3	10907	6135

5. RAZPRAVA

Etilenglikol in metanol sta alkohola, ki poleg izopropanola najpogosteje povzročata usodno zastrupitev.

Metanol ali metilni alkohol je v nizkih koncentracijah (do 1 g/L) prisoten v vseh alkoholnih pijačah iz sadja. Pri kroničnih pivcih alkoholnih pijač se koncentracija metanola v krvi lahko močno dvigne in preseže toksično koncentracijo 10 mg/L, kar vodi do hudih zastrupitev. Metanol je pomembna surovina tudi v kemijski industriji za pripravo formaldehida in plastičnih mas. Zaradi podobnosti z etanolom (barva, vonj...) obstaja velika nevarnost, da se ta kemijska surovina pojavlja na trgu v obliki »alkoholnih« pijač.

Etilenglikol se v prosti prodaji, največkrat pojavlja v tekočinah proti zmrzovanju (antifriz), ki jih uporabljajo vsi vozniki motornih vozil. Čeprav je rokovanje z antifrizom za večino ljudi skoraj vsakodnevno, pa le malokdo ve, kako hudo obliko zastrupitve povzroča njegova glavna alkoholna komponenta.

Prav zaradi nepoznavanja nevarnosti kemikalij naj bi se vse snovi, ki vsebujejo kemikalije, hranile v originalnih embalažah označenih z R in S stavki, ki nas opozarjajo na nevarnosti in na pravilno rokovanje. S hranjenjem vseh snovi v originalni embalaži bi lahko preprečili marsikatero naključno zastrupitev, do katere pride zaradi zamenjav različnih embalaž.

V tej diplomski nalogi smo se posvetili zastrupitvam z metanolom in etilenglikolom. Proučevali smo naročila za toksikološko preiskavo bioloških vzorcev, ki so v času od leta 1995 do leta 2007 prispele na Inštitut za sodno medicino. Ta naročila smo statistično obdelali glede na število naročil in število preiskav s pozitivnim rezultatom, glede na to kdo so bili naročniki toksikoloških preiskav, glede na starost in spol preiskovancev ter glede na namen zastrupitev. Iz vseh naročil, ki so v teh letih prispela na ISM, smo izločili nekaj zanimivih primerov ter si jih natančneje ogledali.

Slika številka 11 prikazuje celotno število naročil, ki so jih v opazovanem obdobju prejeli na Inštitut za sodno medicino, glede vsebnosti metanola in etilenglikola. Od vseh prispelih naročil (156) so v 102 (65%) delali analizo vsebnosti metanola, v 149 (95,5%) primerih pa je bila opravljena analiza vsebnosti etilenglikola.

Največ naročil je bilo v toksikološko preiskavo prejetih leta 2001 in sicer 22 primerov. V letih 1999 - 2000 so v toksikološki laboratorij prejeli po 17 naročil za preiskavo zaradi suma zastrupitve z metanolom ali etilenglikolom. Temu sledijo leto 1995 s 15 vzorci, leto 2003 s 13, vzorci in leto 2002 s 12, vzorci. Nad 10 vzorcev so prejeli tudi leta 1996 in 2007, ko so v analizo dobili 11 vzorcev. Ostala leta, ki smo jih vključili v preiskavo, so dobili po 10 (leta 2004 in 2005) ali manj vzorcev. V preglednici II so prikazana letna števila naročil toksikoloških preiskav skupaj s številom pozitivnih rezultatov preiskav. Opazimo, da število naročil v prvem delu opazovanega obdobja narašča, nato pa po letu 2001 upada in se umiri v povprečju na okoli 10 naročil letno. Število pozitivnih rezultatov je dosti višje pri etilenglikolu. Pri metanolu so negativni izvidi v letih 1995, 1996, 1997 in 2006, medtem ko so bili rezultati preiskav za etilenglikol negativni le leta 2003, pozitivni pa so bili v vseh ostalih letih. Prav tako je pri etilenglikolu višje tudi število pozitivnih izidov. Pri etilenglikolu je v treh letih (1996, 1999 in 2001) po 5

pozitivnih rezultatov, 4 pozitivne rezultate so določili leta 1998, po 3 pozitivne izvide pa leta 1995, 1997, 2005 in 2006. Sledita leti 2000 in 2002 s po 2 pozitivnima rezultatoma ter leti 2004 in 2007 s po 1 pozitivnim končnim izidom. Skupaj imamo 37 pozitivnih primerov. Število pozitivnih primerov vsebnosti metanola je bilo najvišje leta 1998, ko so vsebnost metanola dokazali v 4 primerih. Po 3 pozitivni primeri so bili v letih 2001 in 2003, po 2 pozitivna primera pa leta 2004 in 2007. Ostala leta (1999, 2000, 2002 in 2005) so imeli po 1 pozitiven primer. Skupaj so imeli 18 pozitivnih primerov vsebnosti metanola.

Logično bi bilo pričakovati korelacijo med številu naročil in številom zastrupitev, vendar temu ni tako. Število zastrupitev se sicer spreminja iz leta v leto vendar ne opazimo, nobenega izjemnega odstopanja. V povprečju je bilo zastrupitev z metanolom 1,3 na leto, zastrupitev z etilenglikolom pa 2,8 na leto, ne glede na število naročil.

V 13 opazovanih letih je na ISM na toksikološko analizo prispelo skupno 156 naročil za analizo vsebnosti metanola in etilenglikola.

Največ naročil so na ISM prejeli iz CIIM-a in sicer kar 56 naročil, kjer je bilo 13% pozitivnih primerov na metanol in 18% pozitivnih preiskav na etilenglikol. CIIM-u sledi Internistična prva pomoč s 24 naročili. IPP ima kar 29% pozitivnih primerov vsebnosti metanola in 17% pozitivnih primerov vsebnosti etilenglikola. CIIM, IPP in Center za zastrupitve z 8 naročili bi lahko v grobem šteli za eno samo ustanovo, saj gre pri teh službah navadno le za hitro razporeditev pacientov, ki iščejo nujno medicinsko pomoč. Skupaj so poslale 56% vseh naročil. Število naročil je zelo visoko prav zaradi tega, ker gre za službe nujne medicinske pomoči, katerih se ljudje ob bolezenskih spremembah najpogosteje poslužujejo. Prav tako (predvsem na IPP) pride po pomoč tudi veliko ljudi, ki so jih na te službe napotili osebni zdravniki, ko ti iz različnih razlogov niso mogli postaviti točne diagnoze oziroma ko so bile potrebne dodatne laboratorijske preiskave in odločitve o nadaljni hospitalizaciji, pa tudi ob hujših bolezenskih spremembah, ki potrebujejo hitro in bolj strokovno pomoč. Po številu naročil sledi Splošna bolnišnica Celje, ki jih je poslala 12. Splošna bolnišnica Celje ima tudi zelo visoko število pozitivnih primerov zastrupitev z etilenglikolom in sicer 8 primerov oziroma 67%.

Med ostalimi naročniki s področja Ljubljane je bila še Nefrološka klinika, ki je poslala 6 naročil, s katerimi so želeli ugotoviti, ali je za okvaro ledvic kriva zastrupitev z etilenglikolom. Po številu naročil ji sledi Stalna internistična služba s 4 naročili in Gastroenterološka klinika s 3 naročili. Nadalje sledi Infekcijska klinika z 2 naročiloma. Po eno naročilo so prejeli iz Nevrološke in Pediatrične klinike, kjer so v analizo poslali vzorec šestletnega dečka, ki je po nesreči zaužil manjšo količino antifrizi. 1 naročilo pa je prispelo tudi iz Bolnišnično psihiatričnega dispanzerja. Te klinike so skupno poslale 20 naročil oziroma 14%. Z izjemo Nefrološke klinike, ki je imela 1 potrditev zastrupitve z metanolom ter Centra za intenzivno terapijo z 1 pozitivnim primerom vsebnosti etilenglikola, nobena druga klinika ni imela pozitivnih primerov.

Ostali naročniki so bile splošne bolnišnice s področja celotne Slovenije, ki so skupaj poslale 29% vseh naročil za toksikološko preiskavo, od teh jih je imelo pozitiven rezultat vsebnosti metanola 17%, etilenglikola pa 51%. Poleg že omenjene Splošne bolnišnice Celje z 12. naročili je največ naročil (9) prispevala še Splošna bolnišnica Jesenice.

Posebej bi ocenili tudi toksikološke analize pri obdukciji na ISM odvzetega biološkega materiala. Takih naročil zaradi suma zastrupitve z metanolom ali etilenglikolom je bilo 2%, vendar med njimi v nobenem primeru niso potrdili prisotnosti iskanih substanc.

Naročila vseh preiskav in pozitivne rezultate smo razdelili po spolu in starosti.

Tako pri metanolu kot tudi pri etilenglikolu imamo zelo visok delež moških preiskovancev, ki je v obeh primerih približno 3 krat višji od deleža ženske populacije. Vzrokov, ki privedejo do tako visoke razlike, je veliko. Eden izmed njih je lahko pogostejše uživanje alkoholnih pijač (zastрупitve z metanolom) ali pa pogostejše delo z antifrizom (zastрупitev z etilenglikolom).

Od vseh preiskovancev (18), katerim so ugotovili prisotnost metanola, je bil delež moških z 78% mnogo večji od deleža žensk, ki je bil 22%. V vseh 13 preiskovanih letih, ki smo jih vključili v statistično analizo, je bil metanol pozitiven le pri 4 preiskovankah. Iz preglednice V je razvidno število pozitivnih moških oziroma žensk glede vsebnosti metanola po posameznih letih. V letih 1998, 1999, 2001, 2003 in 2004 se srečujemo samo z moško populacijo, medtem ko se v letih 2000, 2002 in 2005 srečujemo samo z žensko populacijo. Izjema je leto 2007, ko je število moških in žensk izenačeno.

Pri zastрупitvah z etilenglikolom je delež moških 76%, delež žensk pa je 24%. Od vseh zastрупitev (37) so etilenglikol dokazali 9 preiskovankam. Iz preglednice VI je razvidno število pozitivnih moških oziroma žensk glede po posameznih letih. Pri zastрупitvah so večinoma prevladovali moški. V letih 1997, 1998, 1999, 2000 in 2004 se pri zastрупitvah srečujemo samo z moško populacijo. Izjemi sta leti 1996, 2007, ko znaša delež etilenglikol pozitivnih žensk celo do 60%.

Podatke o starosti preiskovancev smo razdelili v 8 starostnih razredov. V primeru določanja vsebnosti metanola iz zapisnika ni bilo mogoče razbrati starosti preiskovancev pri 13 osebah, v primeru določanja etilenglikola pa pri 20 osebah. Zaradi tega smo za starostno porazdelitev oseb glede vsebnosti metanola uporabili le 89 (57%) preiskovancev v primeru določanja etilenglikola pa 129 (83 %) preiskovancev.

Največ zastрупitev z metanolom se pojavlja v starostnih skupinah med 26 in 75 let, medtem ko se prva zastрупitev z etilenglikolom pojavi že eno starostno skupino prej (med 16 in 25 leti). Največ zastрупitev z metanolom je bilo med leti 1995 in 2007 v starostni skupini med 26 in 35 let, in sicer so bili od 6 naročil pozitivni 3 primeri (50%). Pri etilenglikolu se največ zastрупitev pojavlja v starostnih razredih nad 36 let. V teh starostnih razredih je kar 92% vseh zastрупitev (36 pozitivnih primerov). V prvem starostnem razredu nimamo nobenega pozitivnega primera, kar velja tudi za metanol in etilenglikol.

Zaradi boljšega vpogleda, zakaj je prišlo do zastрупitev, smo pod drobnogled vzeli zapisnike vseh preiskovancev, ki so bili pozitivni glede ene ali druge substance. Iz sicer skopih podatkov v zapisnikih smo razbrali, da je do zastрупitev z metanolom največkrat prišlo zaradi uživanja alkoholnih pijač z visoko vsebnostjo metanola. To je velikokrat posledica domače nestrokovne priprave oziroma poseganja kroničnih uživalcev alkohola po nizkocenovnih in nekvalitetnih alkoholnih pijačah, ki so pripravljene iz surovin sumljivega izvora (tehnični metanol, tehnični etanol). Prav tako smo iz zapisnikov razbrali, da je največ zastрупitev pri ljudeh s kroničnim težavami z alkoholom oziroma pri poskusih samomora.

Ko smo prebrali vse zapisnike, smo na podlagi dobljenih podatkov zastрупljence razdelili v tri skupine, glede na vzrok zaužitja.

Med 18 primeri zastрупitev z metanolom opazimo, da vzrok v laboratoriju ni bil znan kar v 55% (10) primerov. Predvidevamo, da so njihovi zdravniki imeli informacije o zastрупitvi, le da teh niso navajali na napotnicah. Omenili so le, da gre med drugimi zaradi znakov in simptomov za sum zastрупitve z metanolom ter prosili za določitev orietntacijskih koncentracij metanola. Prav tako niso omenjali vzroka zastрупitve in

največkrat tudi niso pošiljali dodatnih vzorcev v kontrolo. Sledijo namerne zastrupitve z 28%, ki so ponavadi posledica zaužitja metanola v samomorilne namene ter nenamerne zastrupitve s 17%.

Pri zastrupitvah z etilenglikolom prevladujejo namerne zastrupitve, ko so si preiskovanci z zaužitjem etilenglikola (najpogosteje v obliki antifrizi) poskušali odvzeti življenje. Namernih zastrupitev je 48% oziroma 18 primerov. Namernim zastrupitvam sledijo zastrupitve z neznanim vzrokom in sicer 14 primerov ali 38%, nenamernih zastrupitev pa je 5 oziroma 14% in so najpogosteje posledica zaužitja etilenglikola zaradi nepravilnega shranjevanja, saj se pogosto dogaja, da je za shranjevanje uporabljena embalaža brez ustreznih napisov.

Ko pride do suma zastrupitve z metanolom ali etilenglikolom, je potrebno to zastrupitev kar najhitreje identificirati. Na zastrupitev z metanolom oziroma etilenglikolom pomislimo skoraj vedno, kadar ima pacient razvito presnovno acidozo, ki je posledica akumulacije mravljične ali glikolne kisline v tkivih. Vendar je ob sami diagnostiki potrebna pazljivost, saj prav glikolna kislina, ki nastaja iz etilenglikola, povzroča tudi dvig laktata v plazmi, kar pa povzroči diferencialno diagnostične zaplete. Prav zaradi tega moramo biti pozorni tudi na druge dejavnike, ki nam kažejo na zastrupitev z etilenglikolom, to pa sta predvsem povišana anionska in osmolarna vrzel. Za dokaz etilenglikola se preverja tudi urin in sicer zaradi nastanka kalcijevega oksalata. Urin je priporočljivo pregledovati vsako uro najmanj pet ur po zaužitju. Če so v urinu prisotni kristali kalcijevega oksalata, je potrebno takojšnje zdravljenje zastrupitve. Prav tako nam urin pacienta, za katerega se sumi, da je zaužil etilenglikol v obliki antifrizi, razkriva z vidom opazno flurescenco, saj antifrizi vsebujejo natrijev flurescin kot opozorilno barvilo. Flurescentnost je opazna pod Woodovo svetilko v prvih urah po zaužitju. To opazovanje mora biti potrjeno z ustreznimi kvantitativnimi testi.

Ker so posledice zastrupitve lahko usodne, sta hitra diagnostika in zdravljenje ključnega pomena. V Sloveniji zdravniki uporabljajo (posamezno ali v kombiaciji), tri terapije, primerne tako za zdravljenje zastrupitev z metanolom kot tudi z etilenglikolom. Metabolična acidoza se korigira z natrijevim hidrogenkarbonatom, ki znižuje kislost v telesu. Ob določenih pogojih se izvaja hemodializa, pri kateri gre za odstranitev metanola in etilenglikola ter njunih toksičnih produktov iz telesa, in je 10 krat učinkovitejša kot izločanje skozi ledvice. Hemodializa se pri zastrupitvah z metanolom uporablja, kadar je koncentracija metanola nad 0,5 g/L, pH krvi pa je normalen ob metabolni acidozi pa tudi, če so koncentracije metanola nižje od 0,5 g/L. Pri zastrupitvah z etilenglikolom se hemodializa izvaja, ko je pH krvi pacienta manjši od 7,15 (metabolična acidoza) ali pri pacientih, ki imajo povišano koncentracijo etilenglikola, četudi le-ti še nimajo izražene presnovne acidoze. Hemodializa se izvaja zato, da se zmanjša tveganje poškodb ledvic, izvajati pa jo moramo vsaj toliko časa, dokler koncentracije metanola oziroma etilenglikola v krvi niso nižje od 0,5 g/L ali dokler se ne normalizira metabolična acidoza. Istočasno se lahko s hemodializo uporablja tudi etanol kot antidot (antidoti so snovi, ki nevtralizirajo oziroma inaktivirajo strupe in njihove metabolite, ali pa inhibirajo učinek strupa z nasprotnim delovanjem), ki ga bolniku dajemo peroralno ali s pomočjo infuzije. Etanol upočasni konverzijo metanola ali etilenglikola v bolj toksične metabolite, saj ima približno 100 krat večjo afiniteto do encima ADH, ki razgrajuje metanol in etilenglikol v toksične metabolite. Bolnik lahko zaužije etanol kot antidot takoj po zaužitju strupa ali neposredno po izpiranju želodca v dozi 0,5 g/kg telesne teže, kar znaša približno 100 mL predhodno z vodo razredčenega čistega alkohola. Z redčenjem se izognemo dodatnemu

draženju želodčne sluznice. Za ustrezno zavoro presnove metanola in etilenglikola je potrebno vzdrževati koncentracijo etanola med 1 g/kg in 2 g/kg, ob kateri se presnovni čas strupov podaljša s 3 na 17 ur. Pri zastrupitvah z metanolom je potrebno dajati etanol, ko so koncentracije metanola med 0,4 g/L in 0,5 g/L in je pH krvi normalen, ter kadar se izvaja hemodializa. Pri zastrupitvah z etilenglikolom pa mora biti etanol uporabljen, ko so koncentracije etilenglikola okoli 1,8 g/L ter pri izvajanju hemodialize. Etanol je potrebno dajati, dokler bolnik ni klinično stabilen in nima več presnovne acidoze. Med hemodializo moramo koncentracije etanola podvojiti.

Velikokrat se etanol zaužije skupaj z metanolom ali etilenglikolom, kar je precej pogost pojav predvsem pri kroničnih alkoholikih. Tovrstno uživanje ima za telo manj posledic, ker se ob velikih koncentracijah etanola metanol in etilenglikol ne presnovita v kisle metabolite. Kakor hitro pa začnejo koncentracije etanola v krvi padati in dosežejo vrednosti nižje kot 0,5 g/L, pride do presnove metanola in etilenglikola. Ko se začeta presnavljati, se v krvi prične zviševati nivo mravljične oziroma glikolne in oksalne kisline, ki sta glavna krivca za nastanek presnovne acidoze. Zaradi tega bi bilo priporočljivo, če bi se poleg merjenja koncentracij metanola in etilenglikola merile tudi koncentracije presnovnih produktov, saj bi tako lahko spremljali tudi raven oziroma upadanje koncentracije etanola. Te meritve bi tudi pokazale, v kolikšni meri sta se metanol in etilenglikol že presnovila, temu primerno pa bi tudi lahko bila določena intenzivnost terapije z etanolom.

Vse praktične naloge, kot so bile meritve metanola in etilenglikola ter zbiranje podatkov, smo opravili od junija do septembra 2008 na Inštitutu za sodno medicino. Meritve β -hidroksimaslene kisline pa smo opravili v istem obdobju v encimskem laboratoriju UKC Ljubljana. V tem času so bili obravnavani tudi naslednji zanimivi primeri.

Posamezni zanimivi primeri zastrupitve z metanolom:

Primer 1: Po anamnestičnih podatkih naj bi 54 letna preiskovanka v samomorilne namene zaužila metanol in najverjetneje tudi dimetilformamid, ki so ga našli ob njej. Pacientka je bila zaposlena kot laboratorijska delavka in je imela dostop do kemikalij. Čas in količina zaužitja organskih topil v zapisniku nista navedena. Bolnica se je zdravila pri psihiatru zaradi nepečnosti in prividov. Ob prihodu v bolnišnico je bila nezavestna z metabolično acidozo. Po izpiranju želodca je dobila kot antidot etanol. S plinsko kromatografijo je bil v prvem odvzetem vzorcu krvi dokazan metanol v koncentraciji 2,65 g/kg. Pacientka je bila hospitalizirana šest dni, v tem času se je nivo metanola v krvi ob redni terapiji z etanolom znižal na 0,08 g/kg. V koncentracijski krivulji (slika 20) vidimo potek eliminacije metanola s časom. Kot je razvidno iz krivulje, je hitro ukrepanje (hemodializa) pripomoglo, da se je nivo metanola že v prvih urah močno znižal. Upočasnitev presnove metanola se je v nadaljnjih postopkih vzdrževala le z dodajanjem antidota (etanol).

Primer 2: Pri tem primeru gre za nezgodno zastrupitev z metanolom in njegovimi presnovki. Zastrupljeni je imel na delovnem mestu dostop do metanola in je bil hlapom metanola tudi izpostavljen. Visoka koncentracija metanola v krvi ob sprejemu (1,52 g/kg) pa nedvomno govori o peroralnem vnosu metanola. Pacienta so nemudoma hospitalizirali, uporabljena je bila terapija s hemodializo. Po terapiji s hemodializo je

koncentracija metanola v krvi začela padati in se je znižala na 0,00 g/kg po cca. 69 urah, kar prikazuje tudi slika 21.

Posamezni zanimivi primeri zastrupitve z etilenglikolom:

Primer 1: Iz zapisnika je bilo razvidno, da je v tem primeru šlo za namerno zastrupitev z etilenglikolom, saj je bilo navedeno, da je pacient zaužil 1L antifriz. Zaužita količina bi bila smrtna prav za vsakega od nas, saj je smrtni odmerek etilenglikola približno 100 - 150 mL. Ob sprejemu je bil nezavesten s hudo metabolično acidozo. Pacienta sta pri življenju ohranili dve okoliščini. Najprej to, da je ob antifrizu zaužil tudi sicer neznano količino alkoholne pijače (etanol), kar je močno zmanjšalo hitrost presnove etilenglikola v toksične produkte, ki povzročijo metabolično acidozo, okvarijo ledvice in povzročijo smrt. Drugi vzrok pa je bilo hitro posredovanje zdravnikov, ki so nezavestnemu pacientu takoj z infuzijo dali 10% raztopino etanola ter 1 M natrijevega hidrogenkarbonata, s pomočjo katerega so zvišali pH krvi in s tem uravnali presnovno acidozo, poleg tega pa so ga tudi hemodializirali. Pacient je bil hospitaliziran, vendar nimamo podatkov o dodatnih terapijah. V času hospitalizacije so bile opravljene kontrolne meritve vsebnosti etilenglikola v krvi. Iz teh podatkov je razvidno, da je koncentracija padla na 0,10 g/kg po cca. 23 urah.

Primer 2: V zapisniku je navedeno, da je pacient po nesreči popil 0,5 - 1dL antifriz. Pri tem pacientu gre za nezgodno zaužitje antifriz najverjetneje zaradi skladiščenja v neoriginalni embalaži. Ker je pacient ob prihodu v zdravstveni dom povedal, kaj je zaužil, je takoj v terapevtske namene dobil 1 dL žganja (etanol) kot antidot za etilenglikol. Podatkov o hospitalizaciji in nadaljni terapiji nimamo, je pa bila v kontrolne namene opravljena še ena meritev koncentracije etilenglikola. Podatki so prikazani v tabeli, padec koncentracije pa je razviden iz slike 23.

Primer 3: Na ISM so 27. 07. 2007 pripeljali truplo moškega, ki je v samomorilne namene zaužil večjo količino etilenglikola v obliki antifriz. Odrejena je bila sanitarna obdukcija, zdravnik pa je odvzel biološke materiale, ki smo jih analizirali glede vsebnosti etilenglikola. S toksikološko analizo smo izmerili koncentracije etilenglikola v krvi odvzeti iz leve stegenske vene (1,6 g/L), v tekočini iz osrčnika (1,0 g/L), v steklovini desnega očesa (5,5 g/L) in v urinu (6,8 g/L). Toksikološka analiza je pokazala, da je šlo izključno za zastrupitev z etilenglikolom, saj so bili rezultati analize izjemno visoki in nezdružljivi z življenjem.

Najvišja je bila koncentracije etilenglikola v urinu, kar kaže na smrt v eliminacijski fazi. Koncentracija alkohola je v urinu višja pri ljudeh, ki umrejo v eliminacijski fazi. Precej visoka pa je bila tudi koncentracija v steklovini odvzeti iz desnega očesa, kar kaže prav tako na smrt v eliminacijski fazi. Velja namreč, da koncentracija alkohola v očesni steklovini pada počasneje kot v krvi.

Prav zaradi različnih koncentracij, ki nam pokažejo, za katero fazo gre v času smrti in v izogib morebitnim neželenim spremembam, ki nastanejo po smrti (posmrtna razgradnja alkohola, posmrtno nastajanje alkohola, posmrtni difuzijski procesi ...), se pri obdukciji odvzame vedno različne biološke materiale, saj so posamezni vzoci podvrženi različnim posmrtnim vplivom.

Posamezni zanimivi primeri, kjer je bila vsebnost metanola in etilenglikola negativna:

V obdobju praktičnega dela smo na ISM prejeli tudi dve naročili ($T_1=2115/08$, $T_2=2077/08$) za analizo vsebnosti metanola in etilenglikola kot vzroka metabolične acidoze. Rezultati opravljenih analiz so bili negativni in jih nismo vključili v diplomsko nalogo. Pri kromatogramih metanola smo opravili tudi meritve acetona v serumu in urinu. Etanol je bil v vseh vzorcih negativen. Analizo smo zato nadaljevali z določitvijo koncentracije β -hidroksimaslene kisline, saj nas je zanimalo, kaj je bil vzrok metabolične acidoze. Določanje le-te sicer ni rutninsko, vendar pa z njo lahko posredno dokažemo alkoholno ketoacidozo. Povišane koncentracije β -hidroksimaslene kisline v krvi (nad 500 $\mu\text{mol/L}$), so znak acidoze, ki je lahko usodna, če je koncentracija β -hidroksimaslene kisline višja kot 2000 $\mu\text{mol/L}$. β -hidroksimaslena kislina je zanesljiv kazalec alkoholne ketoacidoze, ki se najpogosteje razvije pri kroničnih uživalcih alkohola. Zanimivo je tudi, da so kljub podatkom o dolgotrajnem in prekomernem uživanju alkohola, vrednosti alkohola v krvi nizke oziroma povsem negativne, ob tem pa so vrednosti β -hidroksimaslene kisline največkrat zelo visoke. Edina vrednost, ki nas usmeri, da se občasno odločimo za analizo β -hidroksimalene kisline, je rahlo povišana vrednost acetona, ki kot ketonsko telo tudi nastaja pri ketoacidozah.

Primer 1 ($T_1=2115/08$):

V prvem primeru določanja β -hidroksimalene kisline je iz zapisnika razvidno, da je bil pacient, kronični alkoholik, ob sprejemu na kliniko zlateničen z metabolično acidozo. Zaradi suma zastrupitve z etilenglikolom in metanolom je bila odrejena toksikološka preiskava vsebnosti etilenglikola in metanola ter alkoholometrična preiskava vsebnosti acetona. Z izjemo acetona so bili vsi drugi izmerjeni parametri negativni.

Zaradi pozitivnega rezultata analize acetona v krvi (0,03 g/kg) in v urinu (0,02 g/kg) smo se odločili opraviti še analizo β -hidroksimaslene kisline, s pomočjo katere bi (v primeru, da je izvid pozitiven) lažje opredelili vzrok, ki je privedel do metabolične acidoze. Analizo smo opravili v encimskem laboratoriju na UKC z encimskim postopkom spektrofotometrično.

Primer 2 ($T_2=2077/08$):

V drugem primeru je iz zapisnika razvidno, da je imel pacient ob sprejemu metabolično acidozo nejasnega izvora. Zaradi suma intoksikacije z metanolom in etilenglikolom je bila zaprošena analiza vsebnosti metanola, etilenglikola in acetona. Končni rezultati analize so pokazali prisotnost acetona, medtem ko sta bila metanol in etilenglikol negativna.

Zaradi povišane koncentracije acetona v krvi in urinu smo se zaradi lažje določitve vzroka metabolične acidoze dodatno odločili še za analizo β -hidroksimaslene kisline. Analizo smo opravili v encimskem laboratoriju na UKC z encimskim postopkom spektrofotometrično.

Analizi, ki smo ju opravili v encimskem laboratoriju UKC Ljubljana, sta pokazali, da je koncentracija β -hidroksimalene kisline višja od 2000 $\mu\text{mol/L}$. Na podlagi prejšnjih

podatkov lahko rečemo, da je bila v obeh primerih potrjena visoka vrednost β -hidroksimalene kisline, kar je značilno za alkoholno ketoacidozo, ki se pogosto pojavlja pri kroničnih uživalcih alkohola.

Toksikološka diagnostika biokemijskih parametrov metanola in etilenglikola je zelo pomembna, saj so zastrupitve s tem alkoholom oziroma glikolom lahko usodne, čeprav v Republiki Slovenija niso zelo številčne. S hitro in primerno diagnostiko lahko preprečimo smrtne primere zastrupitev, saj lahko zdravniki v primeru pozitivnih rezultatov izberejo ustrezno terapijo in z njo preprečijo nastanek škodljivih metabolitov (etanolni antidot) oziroma pospešijo izločanje metanola in etilenglikola iz organizma (hemodializa).

6. SKLEP

V tej diplomski nalogi smo se najprej seznanili z alkoholi, predvsem z metanolom in etilenglikolom, in spremembami v kislinsko-bazičnem ravnovesju, ki so posledica zaužitja alkoholov. Poleg tega smo si podrobneje pogledali, kako se pravilno rokuje z biološkimi vzorci, ki jih analiziramo, in analizne postopke za določanje alkoholov.

Z opravljenim delom, opisanem v tej diplomski nalogi, smo tudi pogledali, kako pogosto in na kakšen način se v Sloveniji pojavljajo zastrupitve z metanolom in etilenglikolom. V trinajstih letih našega opazovanega obdobja je bilo 156 primerov, pri katerih je bil sum zastrupitve z metanolom ali etilenglikolom. Med temi je bila v 18 primerih potrjena zastrupitev z metanolom, kar je v povprečju ena zastrupitev letno in v 37 primerih zastrupitev z etilenglikolom, kar pomeni v povprečju tri zastrupitve letno. Ugotovili smo, da je največ naročil prispelo iz ustanov z Ljubljanskega področja, v obeh primerih pa so prevladovali moški zastrupljeni. Prav tako smo ugotovili, da se je največji delež prvih serumskih koncentracij metanola ali etilenglikola gibal pod 0,40 g/L. To je koncentracija, ki sama po sebi ne bi povzročila hudih toksičnih učinkov, vendar pa ničesar ne pove o koncentraciji bolj toksičnih presnovkov. Predvsem pri etilenglikolu je bilo največ zastrupitev povzročenih zaradi samomorilnih namenov, v obeh primerih pa je bila zastrupitev pogosto povezana s kroničnim uživanjem alkoholnih pijač. Žal je v Sloveniji razširjeno oboje (samomorilnost in alkoholizem).

Za praktično določanje metanola smo uporabili plinsko kromatografijo s tehniko nadprostora. Pri tem kromatografskem postopku se poleg metanola vedno analizirata tudi etanol in aceton. Slednji nam kot ketonsko telo lahko pokaže na ketoacidozo katere vzrok je kronično uživanje alkohola. Na povišano koncentracijo acetona v serumu moramo biti še posebej pozorni, ko so ostale vrednosti merjenja alkohola negativne. V tem primeru se lahko analiza razširi na določanje β -hidroksimaslene kisline. Določanje le-te sicer ne spada med rutinske preiskave, vendar lahko le z določanjem β -hidroksimaslene kisline, ki je pri ketoacidozi vodilno ketonsko telo, potrdimo alkoholno ketoacidozo, ki se pojavlja predvsem pri kroničnih in podhranjenih uživalcih alkohola. Prav zaradi tega bi bilo morda smiselno določati β -hidroksimasleno kislino vedno, ko ne moremo opredeliti vzroka acidoze.

V vseh vzorcih, ki smo jih analizirali se je plinska kromatografija izkazala kot ustrezna metoda za določanje tako etilenglikola kot tudi metanola. Posebno pozornost je potrebno posvetiti le pripravi (razbeljakovinjenju) vzorcev krvi odvzetih iz trupla.

7. VIRI IN LITERATURA

1. TA. Gossel, JD. Bricker: Principles of clinical toxicology, Third edition, Raven Press, New York, 1994, str. 75-89.
2. Lex, (Varnostni list RS - etanol): <http://www.lex.si/uploads/media/Ethanolum.pdf> (20.01.2009)
3. M. Možina, M. Jamšek: Zastrupitve, Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2005, str. 1444-1494.
4. Medeno srce, etanol: <http://medenosrce.dsms.net> (20.01.2009)
5. M. J. Ellenhorn: Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning, Second edition, Williams and Wilkins, A Weverly company, Second edition, 1997, str. 47-51, 1139, 1149-1155.
6. S. Markovič: Bolezni trebušne slinavke, jeter in žolčnika, Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2005, str. 589-592.
7. Petrol, (Varnostni list RS – Antifriz 40): www.tus.si/doc_download.php?id=106. (20.01.2009)
8. M. Lainšček, S. Žužek, R. Mikolič, F. Štivan: Zastrupitve z etilenglikolom ob hkratnem zaužitju etanola, Zdravstveni vestnik, 2003, str. 59-62.
9. D. Marušič, S. Žužek, T. Pikelj, M. Možina: Zastrupitve z etilenglikolom, Urgentna medicina: izbrana poglavja 6, Slovensko združenje za urgentno medicino, Ljubljana, 2000, str. 447-451.
10. M. Možina: Racionalna oskrba z antidoti, Knjiga izvlečkov, Ministrstvo za zdravstvo, Ljubljana, 2000, str. 63.
11. J. Lindič, R. Kveder: Bolezni ledvic, Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2005, str. 941, 961-966.
12. A. Jost, M. Pakiz: Kislinsko - bazično ravnovesje, Medicinski mesečnik, oktober-november 2005, str. 12-23.
13. J. Lindič: Presnovna acidoza, Nefrologija, Klinični oddelek za nefrologijo, KC Ljubljana, 2001, str. 52-115.
14. Wikipedia, (ketoacidoza): <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ketoacidoza> (20.01.2009)

15. Wikipedia, (ketonska telesa): http://sl.wikipedia.org/wiki/Ketonsko_telo (20.01.2009)
16. P. Kadiš, J. Balažic, V. Ferlan-Marolt: Alcoholic ketoacidosis: a cause of sudden death of chronic alcoholic, Forensic science International, 1999, str. 53-58.
17. M. Gričar: Izračun anionske vrzeli - pomoč pri diferencialni diagnostiki metabolne acidoze, Urgentna medicina: izbrana poglavja 4, 1995, str. 93-96.
18. J. Osredkar: Laboratorijske preiskave, Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2005, str. 1527-1582.
19. G. Koželj: Problematika Odvzema biološkega materiala s trupla, Inštitut za sodno medicino, Ljubljana, 1999, str. 67-72.
20. Stran študentov ffa, farma-društvo, (gradiva): <http://www.farma-drustvo.si> (20.01.2009)
21. J. Balažic, B. Ermenc: Navodila za vaje, Medicinska fakulteta, Ljubljana 1996, str. 40-48.
22. F. Rodney Boyer: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005, str. 126-161.
23. Eionet, (kolorimetrija): <http://www.eionet.europa.eu/gemet/concept?langcode> (20.01.2009)
24. J. Perkavec, M. Perpar: Kromatografija, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Ljubljana, 1971, str. 118-177.
25. Medicinska fakulteta, (kromatografija): <http://www2.mf.uni-lj.si/~bikevams/kromat78.pdf> (20.01.2009)
26. Študijsko gradivo, (kromatografija), <http://gfz.hr/~subistnic/kromatografija.ppt> (20.01.2009)
27. N. Gros: Analizna kemija-eksperimentalni del, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 1998, str. 200-238.