

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

**ELIMINACE ALKOHOLU V KRVI U PACIENTŮ
LÉČENÝCH KUMARINOVÝMI PREPARÁTY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.
Školitel specialista: Ing. Jaroslav Procházka

Hradec Králové 2017

Jana Kahounová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V České Lípě dne 30.4.2017

podpis.....

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Jana Kahounová

Školitel: Doc. PharmDr. Marie Vopršálová, Ph.D.
Ing. Jaroslav Procházka

Název diplomové práce:

ELIMINACE ALKOHOLU V KRVI U PACIENTŮ LÉČENÝCH KUMARINOVÝMI PREPARÁTY

Kumarinové preparáty jsou nejčastěji používaná perorální antikoagulancia. Hlavním zástupcem je Warfarin. Nejdůležitější funkcí warfarinu je snížení tvorby K-dependentních koagulačních faktorů v játrech. Alkohol je nejstarší a nejpoužívanější návyková látka. Společností je tolerována a pravidelné užívání malých dávek alkoholu je považováno za „zdraví prospěšné“.

Cílem mé práce bylo zjistit, jak se současné užívání kumarinových preparátů a alkoholu vzájemně ovlivňuje.

Celkem bylo otestováno 62 osob (33 mužů a 29 žen), z toho 27 osob (14 mužů a 13 žen) bylo léčeno kumarinovými preparáty, 35 osob (19 mužů a 16 žen) tvořilo kontrolní skupinu osob bez léčby kumarinovými preparáty. Všem osobám byla podána standardní dávka alkoholu. V časovém úseku - 0 (před podáním), 1½ a 3 hodiny (po podání) byla všem testovaným osobám měřena hladina alkoholu v krvi (COBAS INTEGRA 400 plus) a hodnota INR (SYSMEX CA 1500). Získaná data byla statisticky vyhodnocena a znázorněna pomocí modifikace grafu Bland-Altman.

Z výsledků této studie vyplývá, že užívání kumarinových preparátů na eliminaci alkoholu v krvi nemá významný vliv, neboť výsledky skupin s léčbou a skupin kontrolních se téměř neliší. Naproti tomu užívání alkoholu ovlivňuje terapeutický účinek kumarinových preparátů.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Jana Kahounová

Supervisor: Doc. PharmDr. Marie Vopršálová, Ph.D.
Ing. Jaroslav Procházka

Title of diploma thesis:

ELIMINATION OF ALCOHOL IN BLOOD OF PATIENTS TREATED WITH COUMARIN DRUGS

Coumarin preparations are the most commonly used oral anticoagulants. The main representative is Warfarin. The most important function of warfarin is to reduce the formation of K-dependent coagulation factors in the liver. Alcohol is the oldest and most widely used addictive substance. Alcohol is the oldest and most commonly used substance. Society is tolerated and regular use of small doses of alcohol is considered "beneficial to health".

The aim of my thesis was to find out how the concomitant use of coumarin drugs and alcohol interacts.

There were tested 62 people (33 men and 29 women), of whom 27 people (14 men and 13 women) were treated with coumarin drugs, 35 people (19 men and 16 women) formed the control group of individuals without treatment with coumarin drugs. All people were given a standard dose of alcohol. The blood alcohol level (COBAS INTEGRA 400 plus) and INR (SYSMEX CA 1500) were measured in the time-0 (before administration), 1½ and 3 hours (after administration). The data obtained was statistically evaluated and illustrated by the modification of the Bland-Altman chart.

The results of this study show that the use of coumarin preparations for the elimination of alcohol in the blood does not have a significant effect, as the results of treatment groups and control groups are almost no different. On the other hand, the use of alcohol affects the therapeutic effect of coumarin preparations.

OBSAH

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod	8
3. Teoretická část	9
3.1. Warfarin	9
3.1.1. Farmakokinetika warfarinu	9
3.1.1.1. Fáze absorpční	10
3.1.1.2. Fáze distribuční	10
3.1.1.3. Eliminační fáze a metabolismus warfarinu	10
<u>CYP2C9</u>	11
<u>CYP3A4</u>	12
3.1.2. Farmakodynamika warfarinu	12
3.1.3. Farmakogenetika warfarinu	12
3.2. Etanol	13
3.2.1. Farmakokinetika etanolu	14
3.2.1.1. Fáze absorpční	14
3.2.1.2. Fáze distribuční	14
3.2.1.3. Eliminační fáze a metabolismus etanolu	15
<u>Alkoholdehydrogenázová cesta</u>	15
<u>Mikrosomální systém oxidace etanolu</u>	16
<u>Oxidace etanolu katalázou</u>	16
3.2.2. Farmakodynamika etanolu	17
3.2.3. Účinky etanolu na CNS	17
3.2.3.1. Akutní intoxikace etanolem	17
3.2.3.2. Chronická intoxikace etanolem	18
4. Cíl práce	20
5. Experimentální část	21
<u>Použité vzorce a rozmezí hodnot</u>	22
5.1. Materiál, metody a přístrojové vybavení	23
5.1.1. Protrombinový test	23
5.1.2. Stanovení EtOH	24
5.1.3. Přístrojové vybavení	25
<u>SYSMEX CA 1500</u>	25

<u>COBAS INTEGRA 400 plus</u>	25
5.1.4. Použité reagensie	26
5.2. Pracovní postup	29
6. Výsledky	31
7. Diskuze	36
8. Závěr	38
9. Seznam použitých zdrojů	39
10. Příloha	42
10.1. Tabulky naměřených hodnot	42
10.2. Grafy vypočtených hodnot	45

1. SEZNAM ZKRATEK

ADH	alkoholdehydrogenáza
BMI	Body Mass Index
CNS	centrální nervový systém
CYP	cytochrom P
EtOH	etylalkohol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
INR	International normalized ratio
ISI	index citlivosti tromboplastinu
MEOS	mikrosomální etanolový oxidační systém
NAD ⁺	nikotinamiddinukleotid
NADP ⁺	nikotinamiddinukleotidfosfát
NMDA	N-metyl-D-asparagová kyselina
PIVKA	Proteins Induced by Vitamin K Absence
VKORC1	vitamín K epoxid reduktázový komplex 1

2. Úvod

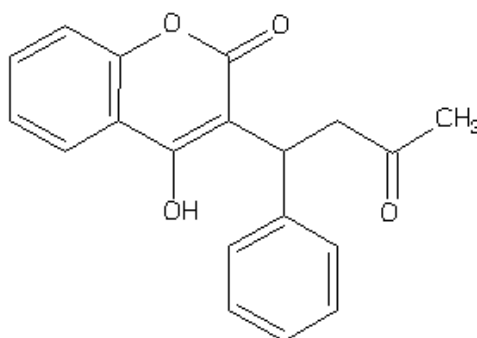
Prekurzorem kumarinových preparátů (derivátů) je kumarin, což je chemická sloučenina (benzopyron), toxin obsažený v mnoha rostlinách. Kumarinové preparáty se řadí mezi antikoagulanty; látky, které svým zásahem do koagulačního systému brání narůstání žilní či arteriální trombózy a tím znesnadňují recidivu žilních a arteriálních trombóz. V současnosti jsou nejčastěji užívané parenterálně podávané hepariny a perorálně užívané kumarinové deriváty. (*Matýšková M. a kol. 2005*). V ČR je hlavním prostředkem orální antikoagulační léčby warfarin (Warfarin Orion tbl. á 3 a 5 mg, Lawarin Pliva tbl. 2 a 5 mg, Warfarin LS). Ethylbiskumacetát (Pelentan tbl. 300mg, Pelentanetiae tbl. obd 75 mg, Léčiva) postupně zmizel z preskripce. Oba tyto kumarinové deriváty zasahují do přirozeného cyklu vitamínu K a brání karboxylaci specifických proteinů závislých na vitamínu K. (*Čepelák V., 2002*)

Alkoholy jsou nearomatické hydroxylové deriváty uhlovodíků, které vznikají náhradou jednoho či více atomů vodíku na atom uhlíku hydroxylovou skupinou. Nejznámější ze skupiny alkoholů je etanol. Etanol patří mezi nejvíce podceňované a různými mýty a stereotypy opředené návykové látky.

3. Obecná část

3.1. Warfarin

Warfarin je syntetický derivát dikumarolu, jež je odvozen od kumarinu. Asymetrický uhlík v poloze 9 umožňuje existenci dvou enantiomerů – R- a S-warfarinu, přičemž podávaná látka je racemická směs S a R enantiomeru, kdy S enantiomer je zodpovědný za hlavní podíl terapeutického efektu. Je to nejvíce používaný lék ze skupiny perorálních antikoagulancií. Používá se v prevenci tromboembolických příhod, včetně atriální fibrilace a hluboké žilní trombózy. Hlavní funkcí warfarinu je snížení tvorby K-dependentních koagulačních faktorů v játrech.



Obr. 1. Chemická struktura warfarinu

Systematic (IUPAC) name (*RS*)-4-hydroxy- 3-(3- oxo- 1-phenylbutyl)- 2*H*- chromen- 2-one

3.1.1. Farmakokinetika warfarinu

Výsledný antikoagulační účinek závisí na farmakokinetických vlastnostech kumarinového derivátu, na začátku léčby je však ovlivněn plazmatickou hladinou proteinů závislých na vitamínu K syntetizovaných před zahájením léčby. Ty mizí z plazmy různou rychlostí, proto může na začátku léčby v důsledku rychlého poklesu proteinu C převládnout porucha přirozených antikoagulačních mechanismů nad žádaným antikoagulačním účinkem. (Čepelák V., 2002). Při léčbě warfarinem (racemická směs S a R warfarinu, v níž S-warfarin představuje zhruba 70 % účinnosti

warfarinu) je problémem velká inter- i intraindividuální variabilita s úzkým terapeutickým oknem a vysokým rizikem krvácení, především rizikem hemoragického iktu a závažného intraabdominálního krvácení. (*Šlechtová J., 2009*).

3.1.1.1. Fáze absorpční

Warfarin je téměř kompletně absorbován z trávicího traktu po p.o. podání s vrcholovou plazmatickou koncentrací v prvních 4 hodinách po podání. Warfarin prostupuje placentou a svojí interakcí s fetálními bílkovinami v kostech a krvi plodu může vyvolat řadu vrozených defektů charakterizovaných abnormální tvorbou kosti. (*Suchý D., 2009*). Současné požití potravy zpomaluje absorpci warfarinu, ale neovlivňuje jeho biologickou dostupnost. Snížení biologické dostupnosti warfarinu bylo naopak pozorováno při současném užívání některých léků (např. sukralfátu, cholestyraminu a v menší míře i kolestipolu). Proto je doporučováno podávat tyto léky odděleně od warfarinu s intervalem nejméně 3 hodiny. (*Kousalová L. a kol., 2003*). Biologická dostupnost může být snížena nevhodným skladováním, vystavením vlhku, teple nebo světlu.

3.1.1.2. Fáze distribuční

Warfarin je rychle distribuován do jater, kde se primárně kumuluje v mikrosomech. Asi 99 % warfarinu se váže na plazmatické proteiny (albumin). Takto vázaný warfarin je farmakologicky inaktivní, čímž je chráněn před biotransformací a exkrecí. Vysokou vazbu na bílkoviny odráží malý distribuční objem, který činí pro racemát 0,09 – 0,17 l/kg. Distribuční objem R izomeru může převýšit S izomer, což nejspíš odráží rozdílnou afinitu izomerů k vazbě na proteiny. (*Moravec O. a kol., 2011*). Warfarin se hromadí v játrech, slezině, plicích a ledvinách.

3.1.1.3. Eliminační fáze a metabolismus warfarinu

Warfarin je racemickou směsí dvou aktivních enantiomerů, přičemž S-forma je asi 3-7x účinnější než R-forma a je i rychleji eliminována. Eliminační poločas S-

warfarinu je 18-34 hodin, R-warfarinu 20-80 hodin. Pro warfarin jako celek se pak udává hodnota 1,5 dne. *(Vlček J. a kol., 2010)*

Hlavní cesta biotransformace je lokalizovaná v hladkém plazmatickém retikulu jater. Primárním metabolickým produktem jsou alkoholy warfarinu, které vykazují zanedbatelnou farmakologickou aktivitu, a hydroxyderiváty. Za většinu přeměn cizorodých látek v organismu jsou zodpovědné cytochromy P450. *(Poller a Hirsh, 1996).*

Podstatou chemických reakcí, ke kterým při metabolismu léčiv dochází, je téměř vždy reakce molekuly léčiva s aktivovaným atomem kyslíku. Schopnost aktivovat kyslík je dána způsobem vazby (obecně interakce) navázané molekuly kyslíku s bílkovinnou částí cytochromu P450. *(Zuber R. a kol., 2001)*

Na metabolismu warfarinu se podílí několik izoenzymů cytochromu P450, z nichž nejdůležitější je 2C9, význam má i 3A4. Neúčinné metabolity jsou vylučovány ledvinami. Eliminace warfarinu z organismu může být tedy ovlivněna renální insuficiencí. *(Vlček J. a kol., 2010)*

Variabilita v metabolismu warfarinu je dána interindividuálními rozdíly ve vztahu dávka-účinek.

CYP2C9

Cytochrom P450 CYP2C9 je produkován v játrech a je zodpovědný za 50% epoxigenázové aktivity v lidských játrech. V buňkách se tento protein nachází v endoplazmatickém retikulu. Cestou CYP2C9 je metabolizován S-warfarin a to na dva hydroxyderiváty 7- a 6-hydroxywarfarin, které jsou eliminovány renální exkrecí. Genetický polymorfismus genu CYP2C9 přispívá k interindividuální variabilitě odpovědi na warfarin. Vzhledem k tomu, že tento CYP katalyzuje i metabolismus mnohých léčiv (diklofenak, fenytoin, piroxicam, tetrahydrokannabinol, tolbutamid), potenciál lékových interakcí warfarinu je značný. *(Rettie A.E. a kol., 2006)*

CYP3A4

CYP3A4 zahrnuje metabolismus obou izomerů. V lidských játrech tvoří v průměru 30 % obsahu všech cytochromů P450. Jeho důležitost je dána tím, že se podílí na většině (asi 52 %) známých přeměn léčiv, které probíhají za účasti cytochromů P450. Jeho původní role byla zřejmě zprostředkování metabolismu a obecně přeměn endogenních steroidů v játrech a v dalších orgánech. (*Kousalová L., 2005*)

I když se zdá na první pohled vliv metabolismu R-warfarinu méně významný, je třeba si uvědomit, že hladiny méně účinného R-warfarinu v lidské plazmě jsou vyšší než S-warfarinu, což do jisté míry kompenzuje jeho nižší účinnost. Proto i lékové interakce na úrovni CYP3A4 zde mohou hrát roli, a to především u látek, které jsou silnými inhibitory tohoto enzymu.

Na metabolizaci R-warfarinu se významnou dílem podílí také CYP1A2, který metabolizuje warfarin na 6- a 8-hydroxywarfarin, a CYP1A1, který se vyskytuje hlavně extrahepatálně a na metabolizaci se podílí jen malou měrou.

3.1.2. Farmakodynamika warfarinu

Warfarin (4-Hydroxy-3-(3-oxo-1-fenylbutyl)kumarin) je nejčastěji používané nepřímé per orální antikoagulans. Je to kompetitivní antagonist vitamínu K (mají podobnou strukturu). Výsledkem jejich působení je snížení tvorby K-dependentních koagulačních faktorů v játrech – II, VII, IX a X, a také snížení syntézy přirozených inhibitorů koagulace – proteinu C a S. Během syntézy těchto proteinů je redukovaný vitamin K oxidován. Oxidovanou formu pak musí zregenerovat vitamin K epoxid reduktáza – enzym, který je také cílovou strukturou, kterou nepřímá antikoagulancia blokuje. Tím vznikají inaktivní PIVKA proteiny (Proteins Induced by Vitamin K Absence). Warfarin dále způsobuje snížení hladiny hydrochinonu (vitamínu KH₂) a současně brání jeho regeneraci z epoxidu. (*Matýšková M.a kol., 2005*).

3.1.3. Farmakogenetika warfarinu

Cílovým enzymem pro warfarin je vitamin K epoxid reduktázový komplex 1 (VKORC1). Gen pro humánní VKORC1 je lokalizovaný na 16. Chromozomu a obsahuje tři exony kódující integrální membránový protein. Genetické variace

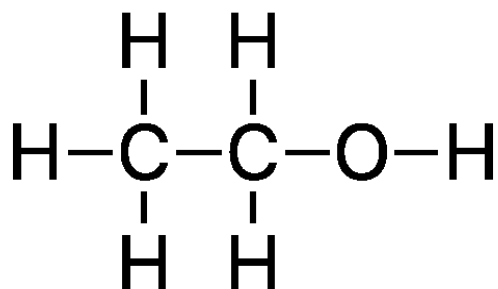
VRKOC1 hrají v lékové odpovědi na warfarin významnou roli. Mutace kódujícího úseku u pacientů homozygotů způsobuje syndrom kombinované deficiencie vitamin K dependentních faktorů 2. typu, zatímco u heterozygotů se vyskytuje rezistence na warfarin. Poslední výzkumy ukazují, že mutace 1639G→A v promotorové oblasti genu, známá u evropské populace, redukuje expresi VKORC1 v játrech a tím snižuje potřebnou dávku warfarinu. Ale i polymorfi smus 6853 G→C predikuje nižší dávku warfarinu u chronicky léčených pacientů. (*Šlechtová J. a kol., 2009*).

Biotransformaci warfarinu ovlivňuje také polymorfismus genu pro CYP2C9. U bělochů bylo identifikováno celkem 132 polymorfismů, sdružených do 6 velkých skupin příbuzných holotypů. Podstatný význam pro biotransformaci S-warfarinu mají varianty CYP2C9*2,*3,*11. (*Kessler P., 2005*).

3.2. Etanol

Ethanol (mimo chemii dle PČP etanol) nebo ethyalkohol (obecně alkohol) je druhý nejnižší alkohol. Jde o bezbarvou kapalinu ostré, ale ve zředění příjemné alkoholické vůně, která je základní součástí alkoholických nápojů. Je snadno zápalný, a proto je klasifikován jako hořlavina 1. třídy. Je dobře rozpustný ve vodě i v tucích.

Etanol je v malém množství produkován střevními bakteriemi a jeho stopy se vyskytují v ovoci. Alkoholické nápoje je obsahují ve výrazně vyšších koncentracích. (*Koolman J. a kol., 2012*)



Obr. 2. Strukturní vzorec etanolu

3.2.1. Farmakokinetika etanolu

3.2.1.1. Fáze absorpční

Protože je etanol dobře rozpustný ve vodě i v tucích, snadno prochází membránami a rychle se dostává do krevní cirkulace. Zhruba 20% dávky se vstřebává již v žaludku, od duodena do nižších částí gastrointestinálního traktu se vstřebává zcela volně, difúzí, po koncentračním spádu. Míra a rychlost vstřebávání závisí na několika okolnostech. Velký vliv na resorpci alkoholu má např. druh alkoholového nápoje, příměsí, rychlost konzumace alkoholového nápoje, náplň žaludku, přítomnost cukru nebo kyseliny uhličitě.

Vstřebávání etanolu do krve nalačno proběhne do 30 minut, při lehké náplni žaludku do 60 minut a při vydatné náplni žaludku do 90 minut. (*Ehrmann J. a kol., 2014*)

3.2.1.2.. Fáze distribuční

Etanol je v organismu velmi rychle distribuován. Rozděluje se rovnoměrně do vodní fáze v celém těle. Rozdělování mezi sérum a krvinky je posunuto ve prospěch séra (popř. plazmy). (*Balíková M., 2004*)

Distribuční objem alkoholu odpovídá objemu celkové tělesné vody. Zde jsou důležité rozdíly mezi pohlavími, zejména z důvodů různého složení těla (při stejné tělesné hmotnosti mají ženy nižší podíl celkové tělesné vody ve srovnání s muži, takže pokud žena o stejné tělesné hmotnosti jako muž, požije stejným způsobem stejné množství alkoholu, dosáhne hladina alkoholu vyšších hodnoty než u muže).

Distribuční prostor etanolu představuje 60% hmotnosti u žen a 70% hmotnosti u mužů. Pro muže o hmotnosti 70kg má tedy distribuční prostor objem téměř 50 litrů. Obsah alkoholu v alkoholických nápojích se obvykle udává v objemových procentech a při přepočtu na hmotnostní koncentraci je nutno respektovat specifickou hmotnost etanolu, která činí přibližně 0,79 kg/l. Vypije-li tedy 70kilogramový muž 100ml 38% destilátu, tj. 30g etanolu, vytvoří se v jeho vnitřním prostředí koncentrace 0,6g/l , tj. 0,6 promile etanolu. (*Ehrmann J. a kol. 2014*)

3.2.1.3. Eliminační fáze a metabolismus etanolu

Etanol je z těla odstraňován z 90-98% oxidačními procesy a současně je z 2-10% vylučován dechem a močí a v zanedbatelném množství i slinami, žaludeční šťávou, žlučí, stolicí a potem. (*Ehrmann J. a kol., 2014*)

Etanol se převážnou měrou metabolizuje, v původní formě se vyloučí jen několik procent původní dávky. Eliminace probíhá rychlostí nultého řádu, v průměrném rozmezí 0,1 – 0,2‰ (g/kg) za hodinu. (*Balíková M., 2004*)

Místem odbourávání etanolu jsou játra, ale může se rozkládat i v žaludku. Největší část etanolu je nejprve oxidována alkoholdehydrogenázou na acetaldehyd, další oxidace je katalyzována aldehyddehydrogenázou a vede ke vzniku acetátu. Enzymy etanolového metabolismu představují skupinu izoenzymů velmi rozdílného charakteru souvisejícího se značným genetickým polymorfismem. Rychlost odbourávání etanolu v játrech je limitována aktivitou alkoholdehydrogenázy omezované též množstvím NAD⁺, které je k dispozici. (*Koolman J. a kol., 2012*)

Etylalkohol se v lidském organismu metabolizuje kromě cestou alkoholdehydrogenázovou, také cestou mikrosomálního systému oxidace etanolu či pomocí katalázy z peroxizomů.

Alkoholdehydrogenázová cesta

Alkoholdehydrogenázová cesta je nejvýznamnější, oxiduje se jí až 90% přijatého etanolu. Klíčovými enzymy této cesty odbourávání etanolu jsou cytosolová alkoholdehydrogenáza a aldehyddehydrogenáza, která se vyskytuje v cytosolu, mitochondriích a mikrosomech. Jejich koenzymy jsou nikotinamidadenindinukleotidy. Hlavním enzymem alkoholdehydrogenázové cesty je cytosolová dimerická alkoholdehydrogenáza (E.C.1.1.1.1., ADH), což je oxidoreduktáza katalyzující oxidaci etanolu na příslušný aldehyd. Je popsáno více než šest tříd tohoto enzymu, které jsou charakterizovány substrátovou specifitou a dalšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. (*Ehrmann J. a kol., 2014*)

Alkoholdehydrogenáza je vývojově a sexuálně regulována, důsledkem toho je nižší aktivita alkoholdehydrogenázy u žen. Tento enzym není také inducibilní a jeho

rychlost je limitována nejen dostatkem NAD⁺, ale také jeho nasycením, kdy se rychlost přeměny u koncentrace 1‰ a vyšší již nezvyšuje. Aktivita alkoholdehydrogenázy je popisována v celé řadě tkání a je u obou pohlaví různá. Např. alkoholdehydrogenáza v žaludeční sliznici je výrazně aktivnější u mužů než u žen. Uvádí se, že u mužů oxiduje až jednu pětinu požitého etylalkoholu. Úloha žaludeční alkoholdehydrogenázy klesá u chronických alkoholiků v důsledku etanolového poškození sliznice a u pacientů trpících gastritidou v způsobenou *Helicobacter pylori*. (Ehrmann J. a kol., 2014)

Mikrosomální systém oxidace etanolu

Mikrosomální etanolový oxidační systém (MEOS) je jeden z izoenzymů cytochromu P450, označovaný jako cytochrom P450IIE1 nebo CYP2E1. Jeho koenzymem je nikotinamidadeninukleotidfosfát, NADP⁺. Tento izoenzym je přítomen v endoplazmatickém retikulu jater, ledvin, plic, placenty, mozku a kůže. Je indukovatelný nejen alkoholem, ale i řadou jiných látek, které oxiduje. Systém spotřebovává ve vyšší míře kyslík, což je jeden z mechanismů perivenulární toxicity etanolu a dalších látek indukujících CYP2E1. Produktem metabolismu etanolu pomocí MEOS je také acetaldehyd. (Ehrmann J. a kol., 2014)

Je prokázáno, že u osob s delší historií konzumace středních a vyšších dávek alkoholu se na oxidaci významnou měrou podílí právě MEOS, který zvyšuje rychlost odbourávání alkoholu.

Oxidace etanolu katalázou

Oxidace etanolu v organismu pomocí katalázy má v metabolismu etanolu nejmenší roli. Kataláza je hemoproteinového typu a je lokalizována v peroxizomech. Produktem katalázové reakce je také acetaldehyd. (Ehrmann J. a kol., 2014)

3.2.2. Farmakodynamika etanolu

Molekulární mechanismy působení alkoholu nejsou dobře známy, zejména proto, že se jedná o látku, která nesespecificky působí na řadu systémů. Předpokládá se, že alkohol působí nejen přes zvýšení inhibičního působení GABA-ergního systému mozku cestou GABA A receptoru, ale také přes snížení excitační neurotransmise uskutečňované glutamátovým systémem, zejména přes NMDA receptory. Tyto účinky alkoholu mohou vysvětlovat některé jeho intoxikační, amnestické a ataxické účinky. Přesný mechanismus, jímž tyto interakce přispívají k pocitu uspokojení, není jasný. Vyvolání tendence pro opakování příjmu alkoholu lze teoreticky vysvětlit účinky změněné aktivity GABA-ergního a glutamatergního systému na uvolňování dopaminu v mezolimbické dopaminové dráze. *(Zvěřina J. a kol., 2012)*

3.2.3. Účinky etanolu na CNS

Působení etanolu na organismus se označuje jako bifázické. Etanol působí na CNS jako narkotikum a výrazně ovlivňuje duševní pochody. Je bezesporu látkou psychotropní, těžko však zařaditelnou do některé z farmakologických skupin z toho důvodu, že jeho počáteční efekt je stimulační a euforizující, později tlumivý na CNS. Pro tento dvoufázový účinek se alkohol jeví v průběhu jako stimulans, euforikum i hypnotikum. *(Prokeš J., 2005).*

Účinky etanolu na chování úzce souvisí s obsahem etanolu v mozku. Během rovnovážného stavu je koncentrace etanolu v mozku rovna koncentraci v plazmě. Při jeho odbourávání ale ve srovnání s CNS rychleji klesá koncentrace etanolu v plazmě. Může tedy nastat stav, při němž naměřené hodnoty alkoholu v krvi jsou již hraniční a centrální nervový systém je ovlivňován podstatně vyšší hladinou alkoholu, což může být jedním z důvodů pozdních efektů konzumace alkoholu (tzv. „aftereffects“). *(Zvěřina J. a kol., 2012)*

3.2.3.1. Akutní intoxikace etanolem

Na vzniku a rozvoji akutní intoxikace se podílejí přímo molekula etanolu a obě hlavní metabolické cesty (alkoholdehydrogenázová, MEOS), které jsou lokalizovány

převážně v játrech a produkují acetaldehyd, jenž se dále může přeměnit na acetát a další látky této oxidace. Vytvořený acetát je v játrech zdrojem acetyl-CoA a vyšší nabídka acetyl-CoA vede k vyšší rychlosti syntézy mastných kyselin. (Ehrmann J. a kol., 2014)

Odbourávání etanolu vede ke zvýšení kvocientu NADH/NAD⁺, který významně ovlivňuje jaterní metabolismus, zejména pak inhibuje citrátový cyklus. Zvýšená tvorba laktátu, který přechází do krve, potlačuje vylučování kyseliny močové ledvinami a vzniká tak hyperurikémie. S inhibicí citrátového cyklu se snižuje i glukoneogeneze, což při nedostatečném příjmu sacharidů způsobuje hypoglykémii. Zároveň je inhibována i glykolýza, takže při příjmu sacharidů dochází k hyperglykémii. (Koolman J. a kol., 2012)

Acetaldehyd, který vzniká v nadbytku, není dostatečně rychle oxidován a hromadí se tak v organismu. Acetaldehyd je vysoce reaktivní sloučenina, pro organismus toxická a do jisté míry i kancerogenní. Způsobuje zvýšené vyplavování katecholaminů, které se podílejí na celkové reakci organismu na etanol, včetně bolesti hlavy, zvracení, dyspnoe, tachykardii a zarudnutí kůže. Acetaldehyd také brzdí citrátový cyklus, dále podporuje vznik volných radikálů, stimuluje tvorbu kolagenu a tvoří adiční sloučeniny např. s bílkoviny, nukleovými kyselinami a fosfolipidy. Tato toxická působení se však projevují spíše v delším časovém úseku. (Ehrmann J. a kol., 2014)

3.2.3.2. Chronická intoxikace etanolem

Chronické užívání alkoholu působí dlouhodobé zvýšení hladin acetyl-CoA, NADH + H⁺. Dále se tvoří zvýšené množství glycerol -3-fosfátu, je snížena oxidace mastných kyselin a naopak zvýšena jejich syntéza, což vede ke zvýšené tvorbě triacylglycerolu a tím ke zvýšené lipogenezi. Současně je inhibována aktivita lipoproteinové lipázy. Vzniká tak steatóza. Hromadí se acetaldehyd se kromě krevních bílkovin váže i na buněčné struktury hepatocytů, čímž může pozměnit strukturu jejich antigenních determinant. Imunitní systém může pak takto pozměněné buňky vnímat jako cizorodé antigeny a spustit humorální i buněčné imunitní reakce. (Ehrmann J. a kol., 2014)

Dlouhodobé užívání etanolu také negativně ovlivňuje řadu duševních pochodů (soudnost, rozvaha, reaktivita); dochází k poruše paměti, orientace, ztrátě zábran. Dále se snižuje výkonnost, sebekritičnost, schopnost koncentrace. Vyrůstá emoční dráždivost, expanzivnost, agresivita. Z fyzických známek je typická porušená pohybová koordinace, nápadná potácivá chůze, smazaná řeč. V pozdějším stádiu alkoholismu nastupují duševní poruchy, halucinace, delirium tremens, korsakovova psychóza. *(Prokeš J., 2005).*

4. Cíl práce

Cílem této experimentální diplomové práce bylo zhodnocení eliminace alkoholu v krvi a případné změny hodnoty INR u pacientů léčených kumarinovými preparáty a porovnání dosažených výsledků s výsledky kontrolní skupiny (zdraví dárce).

5. Experimentální část

Vlastní sběr dat probíhal od října 2016 do března 2017. Prostřednictvím dotazníků byli osloveni pacienti Hematologické ambulance a Interní ambulance při NsP Česká Lípa a.s., dále pacienti soukromých interních ambulancí ve spádové oblasti a také dobrovolní dárce krve TO Česká Lípa.

Dotazník obsahoval základní informace o plánované studii, otázky zahrnující – pohlaví, věk, výšku a váhu testované osoby, dále frekvenci konzumace alkoholu, případnou léčbu kumarinovými preparáty a nejčastěji konzumovaný druh alkoholického nápoje. Každý zájemce o účast ve studii na sebe v dotazníku zanechal kontakt, díky němuž jsem si s každým osobně domluvila termín a podmínky testování. Jednou z podmínek bylo dvouhodinové lačnění před testem.

Celkem se do studie přihlásilo 83 lidí. Otestováno bylo 62 osob (33 mužů a 29 žen), z toho 27 osob (14 mužů a 13 žen) bylo léčeno kumarinovými preparáty, 35 osob (19 mužů a 16 žen) tvořilo kontrolní skupinu osob bez léčby kumarinovými preparáty.

Po vyplnění dotazníku a vstupní konzultaci byly všem testovaným osobám odebrány vzorky krve a to na vyšetření hladiny etanolu v krvi a vyšetření protrombinového času (resp. INR). Poté byla všem podána standardní dávka alkoholu (100ml 40%alkoholu). Další odběry krve na vyšetření hladiny etanolu v krvi a na vyšetření protrombinového času byly provedeny po hodině a půl a dále po třech hodinách po požití standardní dávky alkoholu.

Všechny vzorky byly centrifugovány na centrifuze StatSpin® Express 3 od firmy MEDISTA. Protrombinový čas všech vyšetřovaných vzorků byl stanoven na koagulačním analyzátoru SYSMEX CA-1500 od firmy SIEMENS, hodnota etanolu v krvi pak na biochemickém analyzátoru COBAS INTEGRA 400 plus od firmy Roche/Hitachi.

Všechny naměřené údaje byly zpracovány jednotným způsobem. Nejprve jsem vypočítala rozdíly naměřených hodnot INR a ‰ každého testovaného jedince v čase 1½ a 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu od příslušných hodnot naměřených před požitím standardní dávky alkoholu. Poté jsem pro každý měřený časový interval vypočítala průměr z těchto rozdílů, směrodatnou odchylku a hodnoty minima a maxima pro Bland – Altmanův graf.

Pro hodnocení získaných dat jsem použila modifikaci Bland – Altmanova grafu, kdy jsem na osu X místo průměru vynášela věk a BMI testovaných osob, které jsem si předtím vypočítala z výšky a váhy uvedené na dotazníku.

Na osu Y Bland-Altmanova grafu jsem nanášela rozdíl hodnot INR a ‰, získaných referenční a srovnávací metodou (v tomto případě rozdíl hodnot INR, ‰ v daném čase a čase 0). Graf je doplněn o tři kontrolní čáry, jež reprezentují průměr rozdílů, od něhož jsou ještě zakresleny přímky ve vzdálenosti 1,96 s_d na obě strany. (Hendl J.,2004)

Pro lepší znázornění jsem v kapitole 4.3 sestavila 6 souhrnných grafů, které poukazují na vzájemné rozdíly získaných hodnot mezi jednotlivými skupinami testovaných osob.

Použité vzorce a rozmezí hodnot:

· výpočet BMI:

$$\text{BMI} = \frac{\text{hmotnost [kg]}}{(\text{výška[m]})^2}$$

· výpočet aritmetického průměru:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

· výpočet směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

· výpočet minima a maxima:

$$\text{Min (max)} = \bar{x} \pm 1,96 s$$

5.1. Materiál, metody a přístrojové vybavení

5.1.1. Protrombinový test

Protrombinový test (Tromboplastinový test, Quickův test) sleduje vnější cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin a zachycuje aktivitu faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu. (Pecka M., 2004)

Je to rychlý, citlivý screeningový test vhodný pro monitoring orální antikoagulační terapie kumarinovými preparáty, pro diagnostiku získaných či geneticky podmíněných onemocnění (např. absence koagulačních faktorů). Principem této metody je měření koagulačního času od přidání startovací reagentie (tromboplastin s přídavkem CaCl₂) k vyšetřované plazmě po vytvoření prvního detekovatelného fibrinového vlákna. (Hrachovinová I. a kol., 1999).

Vzorky byly odebírány vakuovým systémem do zkumavek s citrátem sodným (VACUETTE PREMIUM 9NC Coagulation sodium citrate 3,2%, 2ml).

Před vlastní analýzou je nutné vzorek upravit centrifugací, čímž se získá plazma chudá na trombocyty. Takto upravený vzorek je stabilní až 8 hodin při laboratorní teplotě a 24 hodin při teplotě 4-8°C. (Ministerstvo zdravotnictví, 2010)

Primární veličinou je čas. Použitím přístrojů s různými principy měření a použitím reagentií různých výrobců a šarží vznikají různé hodnoty. Pro pacienty bez léčby se pro vyjádření výsledků používá ratio (R), což je poměr časů pacientovy plazmy a plazmy normální, jejíž čas si každá laboratoř stanoví opakovaným měřením vhodného referenčního materiálu. Pro pacienty na antikoagulační léčbě se od roku 1982 stanovuje INR, což je poměr času pacientovy a normální plazmy umocněný na ISI (mezinárodní index citlivosti) použité reagentie. Jelikož jde o normalizovaný poměr, je získaný výsledek porovnatelný mezi různými laboratořemi. (Hrabcová R., 2008)

$$INR = \left(\frac{\text{koagulační čas vyšetřované plazmy pacienta}}{\text{koagulační čas kontrolní plazmy}} \right)^{isi}$$

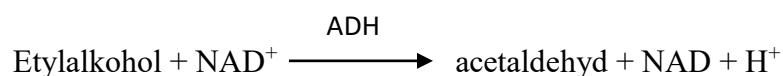
Fyziologické rozmezí R (INR): neléčení pacienti 0,8 – 1,2

INR: terapeutický rozsah při léčbě kumariny 2,0 – 4,0
(LP HTO, 2017)

Hodnota INR (International normalized ratio) se používá výhradně u pacientů léčených kumarinovými preparáty. Abnormální hodnoty nacházíme u orální antikoagulační léčby, při nedostatku vitamínu K, u jaterních onemocnění a v přítomnosti specifických a nespecifických inhibitorů. (Pecka M., 2010)

5.1.2. Stanovení etylalkoholu

Stanovení etylalkoholu patří mezi nejčastější analýzy vyžadované ve forenzní a toxikologické laboratoři. Etylalkoholová měření se používají při diagnostice a léčbě intoxikace a otravy alkoholem. Etanol lze v biologickém materiálu stanovit několika způsoby, včetně plynové chromatografie a osmometrických metod. Já jsem použila enzymatickou metodu s alkoholdehydrogenázou. Principem testu je reakce etylalkoholu s NAD, jež jsou pomocí alkoholdehydrogenázy přeměněny na acetaldehyd a NADH. NADH vytvořená během reakce je přímo úměrná koncentraci etylalkoholu a je měřena fotometricky jako změna absorbance.



Před vlastním odběrem vzorku je potřeba pečlivě zvážit výběr dezinfekčního prostředku (nesmí obsahovat alkohol ani jiné prchavé látky). Všechny vzorky byly odebrány vakuovým systémem do zkumavek VACUETTE PREMIUM (Z Serum Clot Activator) a před analýzou byly upraveny centrifugací. Takto upravený vzorek je stabilní 2 týdny při 5°C.

5.1.3. Přístrojové vybavení

SYSMEX CA-1500

Jediným typem koagulometru na HTO NsP Česká Lípa a.s. je SYSMEX CA-1500 od firmy Siemens. Je to plně automatizovaný optický koagulometr pro stanovení koagulačních vyšetření plazmy v *In Vitro diagnostice*, který provádí analýzu rychle a ve velkém objemu vzorků s vysokým stupněm přesnosti. Analýza vzorků je prováděna s použitím koagulačních, chromogenních a imunochemických metod. (Siemens, 2013)

Princip analýzy:

- Koagulační bodová detekční metoda: Reakční směsí vyšetřované krevní plazmy a použité reagencie prochází světelný paprsek. Koagulační čas se stanoví pomocí množství rozptylu světla, které je nastaveno pro bod detekce koagulace. Jako start detekce je považováno množství rozptylu světla 0% a jako kompletní koagulace je považováno množství rozptylu světla 100%. (Siemens 2013)

Specifika analyzátoru

- Kapacita: maximální (cca 120 testů/hodinu)

- Reprodukovatelnost: Protrombinový test C.V. 2% nebo méně

- Detektor: Optický detektor

- Protokol testu PT: objem vyšetřované plazmy - 50 μ l
objem reagencie (Thromborel®S) – 100 μ l

COBAS INTEGRA 400 plus

Analyzátor COBAS INTEGRA 400 plus je určen pro stanovení biochemických analytů, elektrolytů, specifických proteinů, monitorování léčiv, drog a tyroidního hormonu, přičemž vše je sloučeno do jednoho systému s jednotným provedením

reagenčních kazet. Stanovení analytů probíhá na základě čtyř měřících principů (absorbanční fotometrie, fluorescenční polarimetrie, turbidimetrie, potenciometrie) s kapacitou až 36 testů na palubě. (ROCHE, 2012)

Princip analýzy:

-Roztok v kyvetě je ozařován monochromatickým světlem (vybraná oblast elektromagnetického spektra) a světelné záření je molekulou analytu absorbováno. Detektor záření měří intenzitu dopadajícího světla (zářivý tok) neabsorbovaného roztokem. Při analýze je spektrofotometrem porovnávána intenzita zdrojem vysílaného záření s intenzitou záření dopadajícího na detektor. Množství absorbovaného záření je pak úměrné koncentraci látky ve studovaném roztoku. (ROCHE, 2012)

Specifika analyzátoru:

- Kapacita: maximální (až 400 testů/hodinu)
- Typ stanovení: End Point
- Spektrofotometr: Mřížkový monochromátor a diodové pole
- Zdroj světla: Halogenová lampa, 100 W
- Rozmezí vlnové délky: 340 – 800 nm
- Protokol testu EtOH: objem vyšetřovaného séra – 4 µl
objem reagensie R1 – 50 µl
objem reagensie R1 – 50 µl

5.1.4. Použité reagensie

Protrombinový test:

Thromborel® S (Siemens)

- **složení:** lyofilizovaný lidský placentární tromboplastin ($\leq 60\text{g/l}$), CaCl_2 (approx. $1,5\text{g/l}$), stabilizátory
- **ředění:** lyofilizovaný tromboplastin + 10 ml redestilované vody
Inkubace – 30min./ 37°C

- **stabilita:** 8 hod / 37°C
2 dny / 15 – 25°C
5 dní / 2 – 8°C

- **hodnota ISI:** 0,96

Etanol (EtOH):

Reagencie – pracovní roztoky

- **složení:** **R1** – pufr, konzervans
R2 – NAD (kvasinky): $\geq 3\text{mmol/l}$; ADH (EC 1.1.1.1; kvasinky; 25°C) $\geq 617\mu\text{kat/l}$ (37U/ml); stabilizátory, konzervans
- **ředění:** připraveno k použití
- **stabilita:** do expirace / 2 – 8°C
12 týdnů / v chlazeném prostoru v analyzátoru

Kontrolní materiál:

Control plazma N (Siemens)

- **rozmezí pro Protrombinový čas:** 9,9 – 13,5 sek.
INR: 0,85 – 1,27
- **ředění:** lyofilizovaná Control Plazma N + 1,0 ml redestilované vody
Inkubace 20 minut / laboratorní teplota
- **stabilita:** 4 hod / 15 -25°C
4 týdny / -20°C

Ci-Trol 2 (Siemens)

- **rozmezí pro Protrombinový čas:** 34,3 – 46,5 sek.
INR: 3,15 – 4,01
- **ředění:** lyofilizovaný Ci-Trol 2 + 1,0 ml redestilované vody
Inkubace 15 minut / laboratorní teplota
- **stabilita:** 8 hod / 15 -25°C
4 týdny / -20°C

Ammonia/Ethanol/CO2 Control N

- **rozmezí pro Etanol:** 0,414 – 0,618g/l
- **ředění:** připraveno k použití
- **stabilita:** 2 hod / 15 – 20°C (otevřená nádobka)
1 hod / 15 – 20°C (vzorkový kalíšek)
8 týdnů / 2 – 8°C (po otevření)

Ammonia/Ethanol/CO2 Control A

- **rozmezí pro Etanol:** 1,20 – 1,80g/l
- **ředění:** připraveno k použití
- **stabilita:** 2 hod / 15 – 20°C (otevřená nádobka)
1 hod / 15 – 20°C (vzorkový kalíšek)
8 týdnů / 2 – 8°C (po otevření)

5.2. Pracovní postup

1. Vstupní konzultace, příp. doplnění údajů v dotazníku, přidělení pořadového čísla
2. Odběr vzorků krve před podáním standardní dávky alkoholu
3. Označení vzorků a příslušných dotazníků pořadovým číslem a indexem „I“
4. Podání standardní dávky alkoholu (100ml,40%) – konzumace do 15 minut
5. Centrifugace vzorků na centrifuze StatSpin® Express 3, MEDISTA - 5 min./5600 ot.
6. Příprava reagensů a kontrolního materiálu
7. Stanovení INR na analyzátoru SYSMEX CA 1500, zápis získaných hodnot do tabulky
8. Odběr vzorků po 1 a ½ hodiny po konzumaci standardní dávky alkoholu
9. Označení vzorků a příslušných dotazníků pořadovým číslem a indexem „II“
10. Centrifugace vzorků na centrifuze StatSpin® Express 3, MEDISTA - 5 min./5600 ot.
11. Stanovení INR na analyzátoru SYSMEX CA 1500, zápis získaných hodnot do tabulky
12. Odběr vzorků po 3 hodinách po konzumaci standardní dávky alkoholu
13. Označení vzorků a příslušných dotazníků pořadovým číslem a indexem „III“
14. Centrifugace vzorků na centrifuze StatSpin® Express 3, MEDISTA - 5 min./5600 ot.
15. Stanovení INR na analyzátoru SYSMEX CA 1500, zápis získaných hodnot do tabulky
16. Vzorky na vyšetření hladiny alkoholu v krvi byly po centrifugaci průběžně ukládány do lednice a byly měřeny po větších sériích na analyzátoru COBAS INTEGRA 400 plus
17. Statistické vyhodnocení výsledků – výpočtem rozdílů všech naměřených hodnot v čase 1½ a 3 hodiny od konzumace standardní dávky alkoholu od hodnot získaných před konzumací; výpočet průměrů vypočtených rozdílů pro každý měřený časový interval, výpočet směrodatné odchylky pro každý měřený časový interval, výpočet minima a maxima pro Bland-Altmanův graf

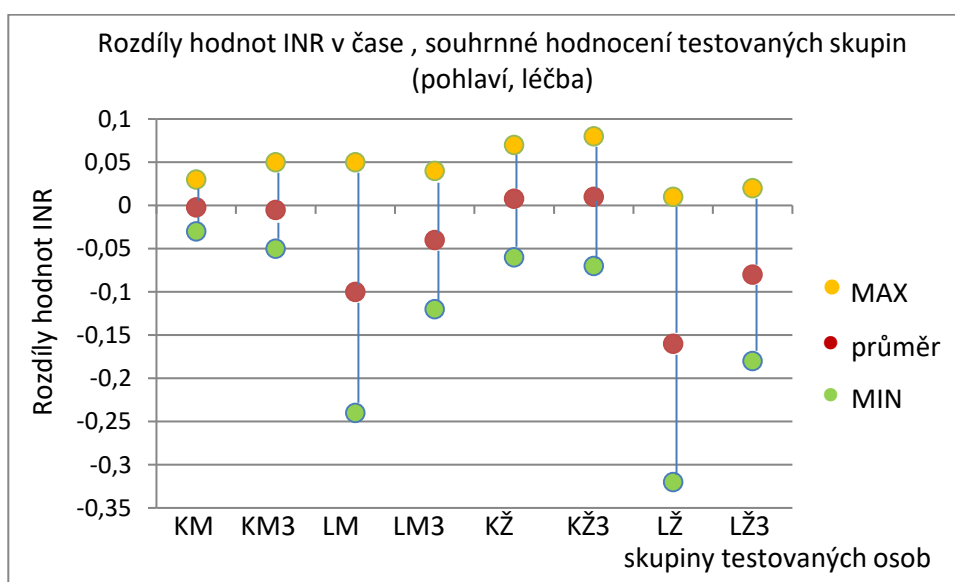
18. Sestavení 32 dílčích Bland-Altmanových grafů znázorňujících rozptyl vypočtených odchylek naměřených hodnot vždy pro daný věk, pohlaví a BMI pro danou skupinu vyšetřovaných osob.
19. Vytvoření souhrnných grafů
20. Vyhodnocení, závěr

6. Výsledky

Při měření INR u kontrolních skupin nevznikaly mezi prvním a následujícím měřením významné statistické rozdíly. Jak je i patrné z grafu na Obr. 3 a také z dílčích grafů na Obr. 9, 10, 13, 14 (kapitola 8.2.), dosahovaly vypočtené odchylky jak v čase 1½ tak i 3 hodiny od požití standardní dávky alkoholu minimálních hodnot. V kontrolní skupině mužů se rozdíly hodnot INR v čase 0-½ hodiny od požití (KM) pohybovaly v intervalu -0,03/0,03. V čase 0-3 hodiny od požití (KM3) to pak byl interval -0,05/0,05.

V kontrolní skupině žen byl interval v obou případech širší. A to -0,06/0,07 po 1½ hodině po požití standardní dávky alkoholu (KŽ) a -0,07/0,08 po třech hodinách od požití (KŽ3).

Naproti tomu u obou skupin s léčbou vznikaly při měření INR významné statistické rozdíly a to především v čase 0-1½ hodiny. U mužů se rozdíly hodnot INR pohybovaly v intervalu -0,24/0,01 (LM) u žen až -0,32/0,01 (LŽ), přičemž věk nehrál významnou roli ani u jedné ze skupin – viz. Obr. 11, 15 (kapitola 8.2). Po třech hodinách po požití standardní dávky alkoholu se u obou skupin s léčbou intervaly zkracovaly zhruba na polovinu hodnoty vypočtené v čase 0-1½ hodin od požití. U skupiny mužů s léčbou tedy -0,12/0,04 (LM3), u skupiny žen s léčbou -0,18/0,02 (LŽ3).

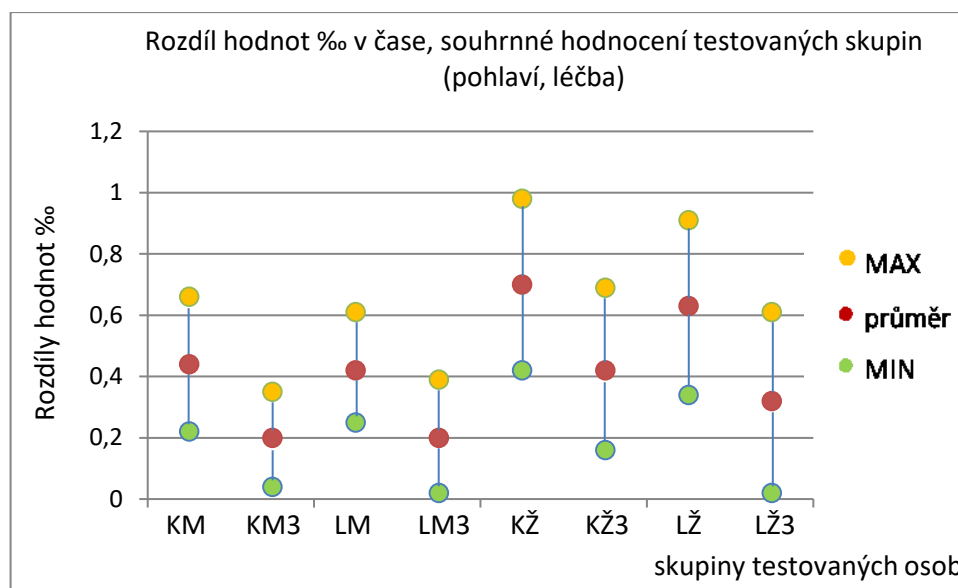


Obr. 3 Rozdíly hodnot INR v čase; znázornění průměru, minima a maxima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob

V grafu na Obr. 3 jsou po přehled zobrazeny všechny testované skupiny v obou časech. Z grafu je patrné, že u skupin s léčbou (LM, LM3, LŽ, LŽ3) dochází k poklesu hodnot INR a to hlavně po 1½ hodině od požití standardní dávky alkoholu (LM, LŽ).

Graf na Obr. 4 znázorňuje rozdíly hodnot ‰ všech testovaných skupin v čase 1½ i 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu. Průměrné hodnoty alkoholu v krvi a taktéž vzniklé intervaly min/max jsou u kontrolní skupiny mužů (KM, KM3) i skupiny mužů s léčbou (KL, KL3) takřka totožné. U žen dokonce skupina s léčbou (LŽ, LŽ3) vykazovala nižší výsledné hladiny alkoholu v krvi než kontrolní skupina žen.

U všech testovaných skupin probíhala eliminace alkoholu v krvi v průměru 0,1 – 0,2‰ za hodinu; tedy rychlostí nultého řádu.

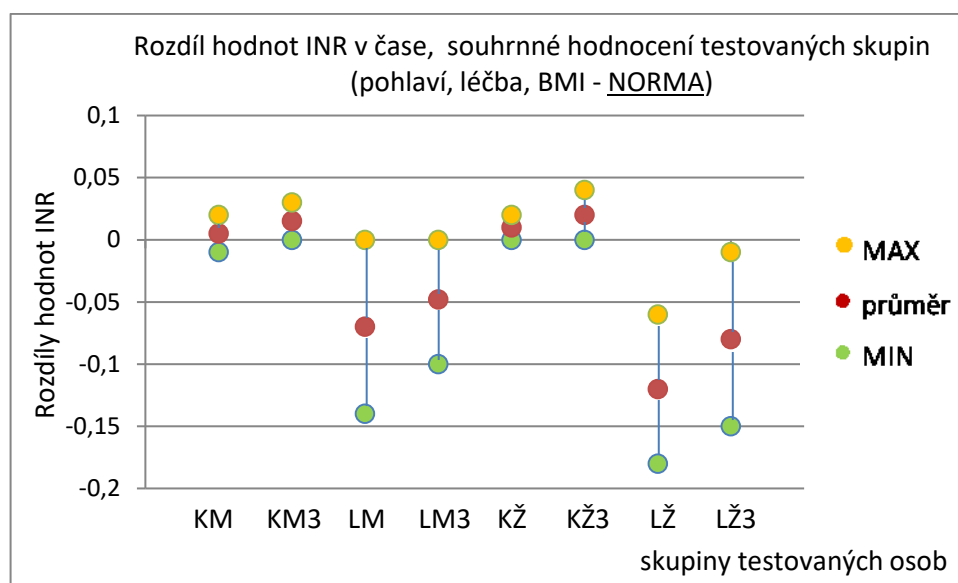


Obr. 4 Rozdíl hodnot ‰ v čase; znázornění průměru, minima a maxima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob

Další souhrnné grafy na Obr. 5, 6, 7, 8 poukazují na změny hodnot INR a ‰ alkoholu v krvi v čase v závislosti na BMI všech testovaných skupin. Testované osoby v každé skupině jsem rozdělila podle BMI do podskupin. K vzájemnému srovnání všech skupin jsem však použila pouze podskupiny s BMI nacházející se v oblasti normální váhy (=NORMA; BMI 18,5-25) a v oblasti nadváhy (=NADVÁHA; BMI 25-30). Ostatní skupiny (PODVÁHA; BMI >18,5 a všechny stupně OBESITY; BMI <30) jsem pro nízký počet testovaných jedinců v podskupině ze souhrnného hodnocení vyřadila. Rozdíly všech získaných hodnot v těchto početně slabších podskupinách lze však odečíst z dílčích grafů na Obr. 26 – 41 v kapitole 8.2.

V grafu na Obr. 5, který znázorňuje rozdíl hodnot INR v čase, je opět jasně zřetelný nejvyšší průměrný rozdíl hodnot INR u skupin s léčbou. U mužů je to po 1½ hodině od požití -0,07 (interval min/max -0,14/0) u žen pak za stejný časový úsek v průměru -0,12 (interval min/max -0,18/-0,06).

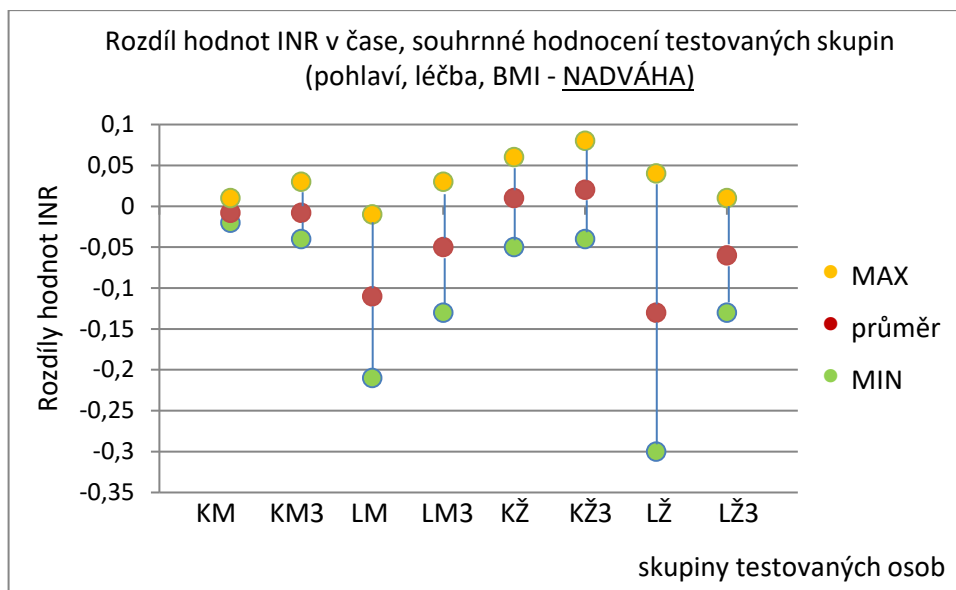
Naproti tomu rozdíly hodnot INR v čase u obou kontrolních skupin s normální váhou jsou po 1½ (KM, KŽ) i 3 hodinách (KM3, KŽ3) od požití standardní dávky alkoholu téměř zanedbatelné.



Obr. 5 Rozdíl hodnot INR v čase; znázornění Průměru, maxima a minima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob majících BMI v rozmezí 18,5 – 25 (=NORMA)

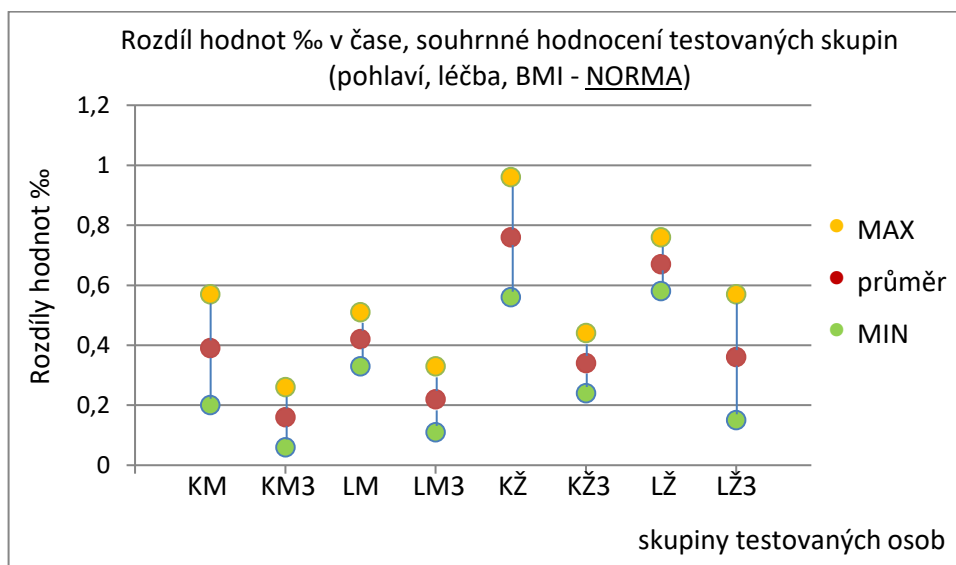
Pokud se zaměříme na hodnocení rozdílů hodnot INR všech skupin s normální váhou a všech skupin s nadváhou, zjistíme, že u některých skupin s nadváhou dochází jak k průměrnému nárůstu rozdílu hodnot INR v čase a to směrem do minusových hodnot, tak i rozšíření intervalu min/max.

Např. průměrný rozdíl hodnot INR v čase 1½ hodiny od požití standardní dávky alkoholu je u skupiny léčených mužů s normální váhou -0,07 (interval -0,14/0); u stejné skupiny s nadváhou pak -0,11 (interval -0,21/-0,01). Taktéž kontrolní skupiny žen vykazují malé rozdíly – skupina s normální váhou (KŽ, Obr.5) a skupina s nadváhou (KŽ, Obr.6) vykazují po 1½ hodině po požití stejnou průměrnou hodnotu rozdílů INR, avšak intervaly těchto skupin se liší. Skupina s normální váhou 0,02/0; skupina s nadváhou 0,06/-0,05.



Obr. 6 Rozdíl hodnot INR v čase; znázornění průměru, maxima a minima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob majících BMI v rozmezí 25 - 30 (=NADVÁHA)

Při hodnocení rozdílu hodnot ‰ alkoholu v krvi u skupin testovaných osob s normální váhou, viz. graf na Obr. 7 opět nacházíme výraznější odchylky mezi skupinami v rámci pohlaví, nikoli však v rámci užívání či neužívání kumarinových preparátů.

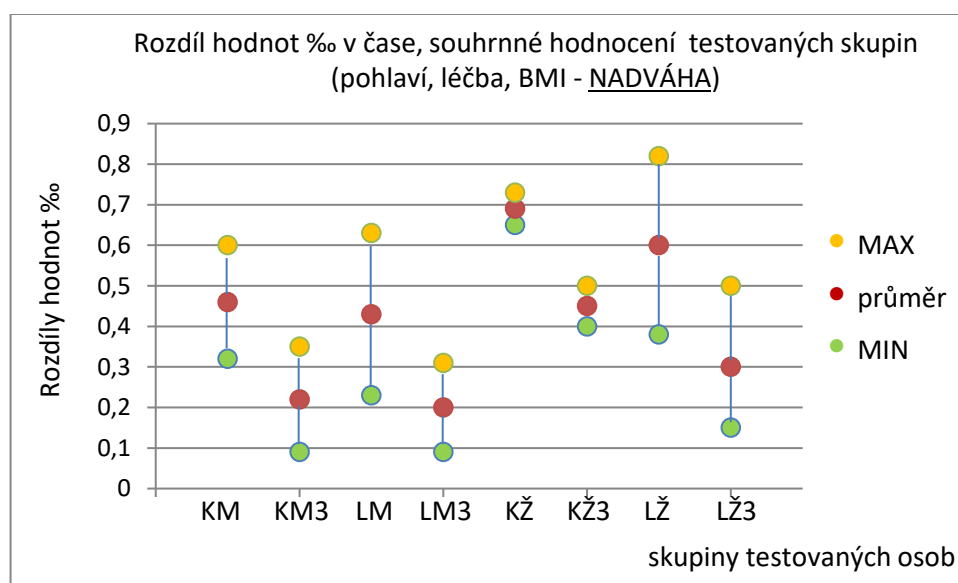


Obr. 7 Rozdíl hodnot ‰ v čase; znázornění průměru, maxima a minima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob majících BMI v rozmezí 18,5 – 25 (=NORMA)

Totéž platí i u hodnocení rozdílu ‰ alkoholu v krvi u všech skupin s nadváhou. I z grafu na Obr. 8 je patrný rozdílný distribuční objem etanolu mezi muži a ženami. Zatímco u kontrolní skupiny mužů je v čase 1½ po požití (KM) průměrný rozdíl hodnot ‰ etanolu v krvi 0,46, u kontrolní skupiny žen (KŽ) je průměrný rozdíl hodnot ‰ ve stejném čase 0,69.

Zajímavostí v této skupině je velmi úzký interval hodnot u kontrolní skupiny žen a naopak velmi široký interval u skupiny žen s léčbou. Tato skutečnost je dána většími rozdíly některých jednotlivců ve skupině. Pokud bych hodnoty těchto jedinců nezahrnula do hodnocení, byl by interval u skupiny žen s léčbou (LŽ) 0,70/0,50 (nyní 0,81/0,39).

Při vzájemném srovnání rozdílů hodnot ‰ v čase jednotlivých testovaných skupin v grafech na Obr. 7 a 8 je patrné, že osoby ve skupině s nadváhou dosahují v průměru o 0,10 nižších rozdílů hodnot ‰, což je opět dáno vyšším distribučním objemem u testovaných osob s nadváhou.



Obr. 8 Rozdíl hodnot ‰ v čase; znázornění průměru, maxima a minima hodnot odečtených z Bland – Altmanových grafů u jednotlivých skupin testovaných osob majících BMI v rozmezí 25 - 30 (=NADVÁHA)

7. Diskuze

Antikoagulační terapie warfarinem patří ke klíčovým léčebným opatřením v řadě interních indikací. Vlivem stárnutí populace počet pacientů užívajících kumarinové preparáty narůstá. Vzhledem k tomu, že tento lék má mnoho interakcí s jinými léky a také s potravinami obsahující vitamín K, je velmi důležitá správná edukace pacienta.

Jednou z mých doplňujících otázek v rámci vstupní konzultace před samotným testováním bylo, zda jsou pacienti užívající warfarin informováni o nevhodnosti konzumace alkoholu během své léčby. Zatím co znalost o dietetických opatření, zahrnujících vynechání stravy bohaté na vitamín K, byla u dotázaných osob na vysoké úrovni, skutečnost, že současné užívání warfarinu a alkoholu může ovlivňovat terapeutický efekt, byla pro naprostou většinu novinkou. Dokonce i informovanost o možných interakcích warfarinu s některými užívanými léky byla větší.

Odborná literatura povoluje pacientům léčených kumarinovými preparáty „mírnou konzumaci“ alkoholu představující 20 – 30g alkoholu/den, což odpovídá 0,5l piva, 2dl vína a 0,5dl destilátu.

Pro svou studii jsem záměrně zvolila jako standardní dávku alkoholu 100ml 40% alkoholu, což je dvojnásobné „povolené“ množství uváděné v odborné literatuře.

Z naměřených hodnot je dobře patrné, že u skupin s léčbou docházelo v čase 1½ hodiny od konzumace standardní dávky alkoholu vždy k poklesu INR. Po třech hodinách od konzumace se pak INR navracelo k původním hodnotám naměřených před konzumací. Z mé studie tedy vyplývá, že konzumace alkoholu snižuje účinek warfarinu, což je ale v rozporu s dostupnými informacemi v odborné literatuře.

Např. v časopise *Interní medicína pro praxi* byl v roce 2011 uveden článek zabývající se režimovým opatřením při terapii warfarinem, kde Moravec O. a kol. uvádějí, že „excesivní konzumace alkoholu vede ke zpomalení metabolizace warfarinu v játrech“, z čehož vyplývá, že po požití standardní dávky alkoholu by mělo docházet k nárůstu INR, nikoliv jeho snížení. Etanol je enzymatickým induktorem warfarinu, zvyšuje jeho volnou, na proteiny nevázanou, složku v plazmě a způsobuje tak snížení terapeutického efektu warfarinu. Pacient je pak ohrožen krvácivými komplikacemi. Podobné informace jsou citovány v dalších člancích odborných časopisů, např.: *Medicína pro praxi* (Grofová Z., 2009), *Praktické lékárenství* (Prudká H., 2011), *Practicus* (Kessler P., 2011).

Možné vysvětlení rozporu informací v literatuře a výsledků mé studie bych viděla ve velikosti použité standardní dávky alkoholu a také v možné dehydrataci testovaných jedinců. Během testování nejedli ani nepili, tudíž mohlo dojít ke zvýšené koncentraci léku v plazmě.

Další zajímavostí, vyplývající z mé studie, byl výskyt šesti léčených osob (4 muži, 2 ženy – v Tab. 2 a 4 označení modře), jejichž hodnoty INR se po konzumaci standardní dávky alkoholu výrazně neměnily. Všechny tyto osoby uvedly v dotazníku každodenní konzumaci alkoholu. Domnívám se tedy, že je jejich léčba přizpůsobena každodennímu alkoholem dehydrovanému stavu.

Naopak dvě osoby se v dotazníku označily jako abstinenti (v Tab. 2 a 4 označení červeně) a jejich rozdíl hodnot INR v obou časových intervalech byl ve srovnání s ostatními testovanými jedinci podstatně vyšší.

Toto zjištění podporuje teorii, že chronický abúzus inhibuje antikoagulační efekt kumarinových preparátů, což je dáno především tím, že etanol indukuje podjednotky CYP450.

Z mé studie vyplývá, že při současném užívání kumarinových preparátů a alkoholu v malých dávkách nedochází k výraznému ovlivnění antikoagulačního efektu warfarinu. Avšak vždy je nutné zvážit zdravotní stav a variabilitu daného jedince.

8. Závěr

Kumarinové preparáty jsou široce užívanou lékovou skupinou u řady pacientů s kardiovaskulárními onemocněními a při léčbě a prevenci hluboké žilní trombózy a plicní embolie. Patří mezi léky s poměrně úzkou terapeutickou šíří a s rizikem krvácení při předávkování. Vykazují široké spektrum lékových interakcí vznikajících různými mechanismy.

Antikoagulační efekt je také zásadně ovlivněn genetickými faktory, věkem, pohlavím, tělesnou konstitucí a zdravotním stavem jedince, a v neposlední řadě dodržováním dietních opatření, vylučující potraviny bohaté na vitamín K.

Při současném užívání kumarinových preparátů a alkoholu v malých dávkách nedochází k výraznému ovlivnění antikoagulačního efektu warfarinu.

Obecně platí fakt, že excesivní konzumace alkoholu vede ke zpomalení metabolismu warfarinu v játrech, zatímco chronický abúzus navozuje spíše opačný efekt. Chronický excesivní abúzus alkoholu (navíc s předpokládanou špatnou compliance pacienta) je jednou z kontraindikací perorální antikoagulace.

Vzhledem k tomu, že jsou per orální antikoagulancia indikována po závažných zdravotních komplikacích (velké úrazy, tromboembolické příhody, hluboká žilní trombóza apod.), měl by si každý jedinec, užívající tyto preparáty, zamyslet nad tím, zda je vůbec nutné alkohol užívat.

9. Seznam použitých zdrojů

Balíková M., (2004) Forezní a klinická toxikologie – Laboratorní toxikologická vyšetření, 1. vydání, GALÉN, 81-82

Čepelák V., (2002) Ambulantní antikoagulační léčba, dostupné z:
<http://www.csth.cz/soubory/antikoagulacni.pdf>

Ehrmann J., Hůlek P. a kol. (2014) Hepatologie, 2.vydání, Grada, 318-324

Grofová Z., (2009) Léčba warfarinem, Medicína pro praxi 341-343

Hendl J., (2004) Přehled statistických metod zpracování dat. Praha: Portál. 89-96

Hirsh J., Futer V., Ansell J., Halperin J. L., (2003) American heart association/American college of kardiology foundantion guide of warfarin therapy, *Circulation*, 692-711

Hrabcová R., (2008) Laboratorní monitorování antikoagulační léčby., Laboratoř hematologie, Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín, Noviny č. IX, str. 3,

Hrachovinová I., Matýšková M., Zavřelová J., (1999) Hematologie pro zdravotní laboranty. 1.vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 37-52

Kessler P. (2005) Farmakogenetika warfarinu, dostupné z:
http://www.thrombosis.cz/sources/Guidelines-Warfarin_farmakogenetika_STH_III062.pdf

Kessler P. (2011) Léčba orálními antikoagulancii, dostupné z:
<http://www.warfarin.cz/>

Kohout P., Kessler P., Růžičková L. (2007) Dieta při antikoagulační léčbě, 1. vydání, 26-29

Koolman J., Röhm K.-H. (2012) Barevný atlas biochemie, 4. vydání, Grada, 324-329

Kousalová L., Beranová J., Azenbacher P., (2003) Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4, Přehledové články klinické farmakologie 151-157

Malý J., Matýšková M., Penka M., (2005) Antikoagulační léčba – Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné lékaře, CDP-PL

Martínková J. a kol., (2007) Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, 1. vydání, Grada, 22-45, 258

Ministerstvo zdravotnictví, Národní číselník laboratorních položek *MZČR – NČPL* 02.28.01, dostupné z:
http://www.ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_D53/hypertext/_KOMP_PT.htm

Moravec O., Hutýra M., Ph.D., Skála T., Táborský M., (2011) Terapie warfarinem a režimová opatření – mýty a fakta, Interní medicína 431-435

Pecka M., (2004) Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie hemostázy, 1. vydání, Finidr, 131, 139-142

Pecka M. a kol., (2010) Praktická hematologie – Laboratorní metody, 1. vydání, Infinity, 192-238

Rettie A.E., Tai G. (2006) The pharmacodynamics of warfarin: closing in on personalized medicine. Mol. interv., č. 4, 223-227

Poller L., Hirsh J., (1996) Oral anticoagulants, 1. vyd. London: Arnold, 280

Prokeš J., (2005) Základy toxikologie – obecná toxikologie a ekotoxikologie, 1.vydání, Galén, 19-23, 190-191

Roche, (2012) Uživatelský manuál COBAS INTEGRA 400 plus

Siemens, (2013) Uživatelský manuál Sysmex® CA-1500 Systém

Suchý D., (2006) Lékové interakce warfarinu s běžně používanými léčivy a potravinovými doplňky, dostupné z:

<https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/06/06.pdf>

Ševela K., Ševčík P. a kol., (2011) Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně, 2.vydání, Grada, 28-29, 129-132

Šlechtová J., Hajšmanová Z. Farmakogenetika a farmakokinetika warfarinu dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/3-09/KBM09-3-Slechtova.pdf>

Vlček J., (2010) Klinická farmacie I, 1.vydání, Grada, 57-66

Zvěřina J., Janhuba K., Emmerová M., Racek J., Špičák J., (2012) Publikace české technologické platformy pro potraviny – Bezprostřední vliv nízkých dávek alkoholu na lidské chování, dostupné z: www.ctpp.cz

10. Příloha

10.1. Tabulky naměřených hodnot

Tab. 1 – Kontrolní skupina muži, rozdíly hodnot INR a ‰ v čase 1½ a 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu

kontrolní skupina - muži					
věk	BMI	INR		‰	
		0-1½	0-3	0-1½	0-3
37	31,3	0,01	-0,02	0,39	0,16
37	26,3	-0,01	-0,02	0,25	0,06
38	35,4	-0,02	-0,03	0,37	0,17
39	28,9	0,00	0,00	0,33	0,09
39	25,7	0,04	0,05	0,52	0,26
41	27,5	-0,02	0,01	0,62	0,36
41	26,5	0,00	-0,04	0,48	0,27
44	32,8	0,02	0,03	0,46	0,22
45	26,5	0,01	-0,01	0,50	0,20
49	30,9	0,00	0,00	0,42	0,12
50	28,5	-0,01	-0,03	0,38	0,11
51	27,8	-0,01	0,00	0,61	0,38
52	24,8	-0,01	0,00	0,57	0,26
57	29,9	-0,02	-0,04	0,35	0,16
58	27,7	-0,01	-0,01	0,35	0,17
60	25,3	0,00	0,04	0,61	0,33
61	22,6	0,02	0,03	0,20	0,06
67	28,0	-0,01	-0,02	0,44	0,20
70	26,4	-0,02	-0,03	0,51	0,31

Tab. 2 – Skupina s léčbou muži, rozdíly hodnot INR a ‰ v čase 1½ a 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu

Skupina léčena kumarinovými preparáty - muži					
věk	BMI	INR		‰	
		0-1½	0-3	0-1½	0-3
39	24,9	-0,07	-0,04	0,39	0,19
39	29,9	-0,21	-0,13	0,36	0,28
40	24,2	-0,04	-0,02	0,51	0,37
42	25,0	-0,02	0,00	0,37	0,11
43	24,9	-0,15	-0,05	0,42	0,22
46	25,5	-0,26	-0,06	0,55	0,31
50	29,3	-0,13	-0,04	0,64	0,30
52	27,7	-0,03	-0,15	0,50	0,23
53	28,1	-0,13	-0,03	0,48	0,28
58	25,7	-0,14	-0,05	0,41	0,16
62	29,7	-0,03	-0,02	0,39	0,16
65	29,9	-0,08	-0,02	0,34	0,13
69	29,0	-0,02	-0,01	0,28	0,05
71	29,9	-0,03	0,03	0,36	0,07

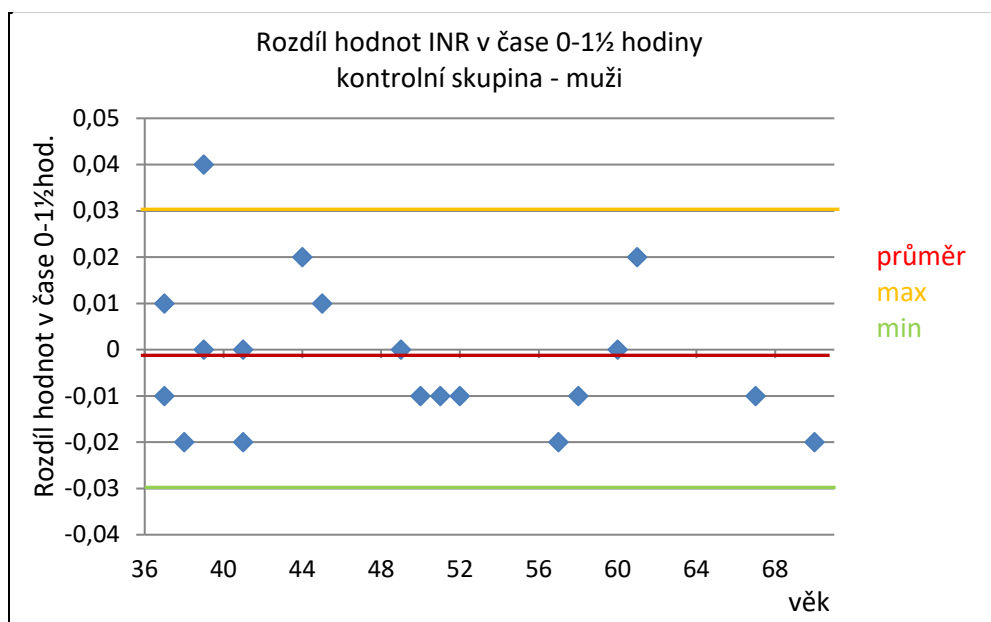
Tab. 3 – Kontrolní skupina ženy, rozdíly hodnot INR a ‰ v čase 1½ a 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu

Kontrolní skupina - ženy					
věk	BMI	INR		‰	
		0-1½	0-3	0-1½	0-3
37	22,6	0,00	0,03	0,74	0,51
39	29,3	0,06	0,09	0,71	0,55
41	25,4	0,03	0,04	0,61	0,32
42	21,9	0,00	0,00	0,74	0,36
45	19,7	0,02	0,00	0,74	0,40
47	23,3	0,01	-0,04	0,74	0,42
47	17,9	0,02	0,04	0,96	0,63
50	18,7	0,03	0,05	0,77	0,47
52	31,2	-0,03	-0,03	0,29	0,07
53	31,2	0,02	0,00	0,56	0,24
53	23,2	0,00	0,00	0,68	0,48
59	29,4	0,00	0,00	0,71	0,44
60	26,4	-0,09	-0,04	0,73	0,57
61	20,3	0,01	0,00	0,84	0,48
65	27,4	0,04	0,01	0,69	0,39

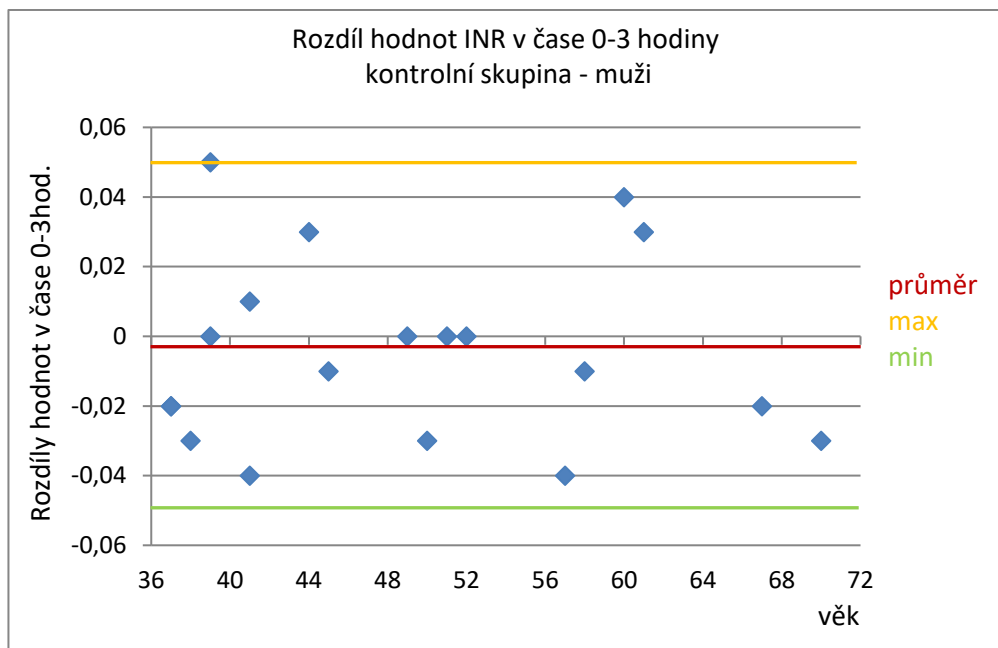
Tab. 4 – Skupina s léčbou ženy, rozdíly hodnot INR a ‰ v čase 1½ a 3 hodiny po požití standardní dávky alkoholu

Skupina léčena kumarinovými preparáty - ženy					
věk	BMI	INR		‰	
		0-1½	0-3	0-½	0-3
36	20,6	-0,17	-0,11	0,60	0,29
40	26,2	-0,03	-0,02	0,30	0,18
41	20,7	-0,18	-0,15	0,78	0,56
42	26,0	-0,07	-0,06	0,57	0,24
43	21,6	-0,18	-0,09	0,62	0,22
46	25,6	-0,36	-0,18	0,57	0,20
50	30,8	-0,34	-0,10	0,56	0,28
53	26,1	-0,18	-0,09	0,62	0,22
55	23,9	-0,10	-0,08	0,58	0,19
58	25,2	-0,15	-0,02	0,83	0,57
61	20,3	-0,14	-0,04	0,78	0,42
63	29,3	-0,02	0,01	0,48	0,15
68	28,3	-0,13	-0,06	0,83	0,57

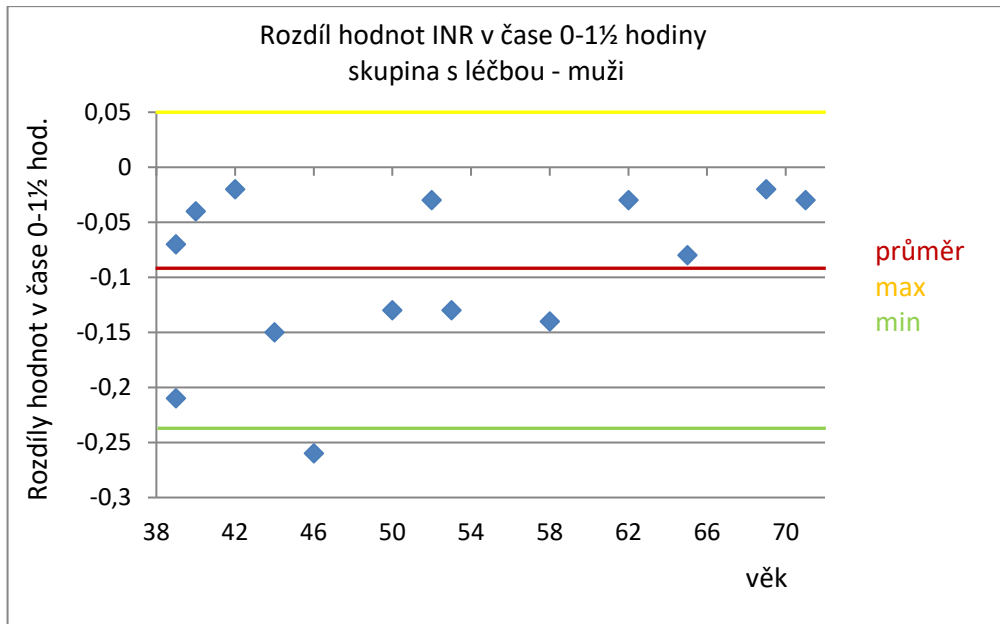
10.2. Grafy naměřených hodnot



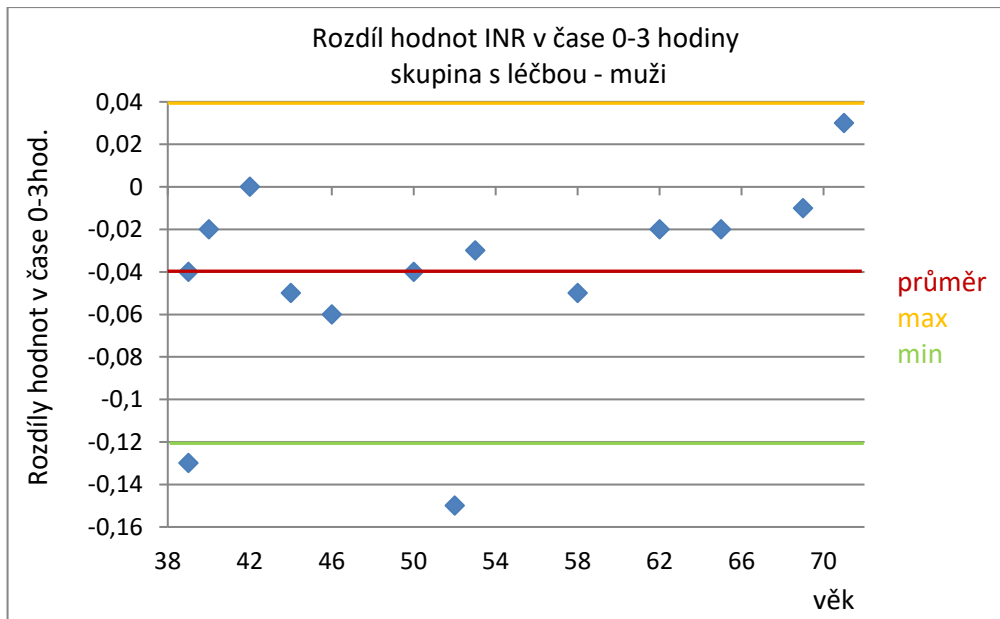
Obr. 9 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina muži



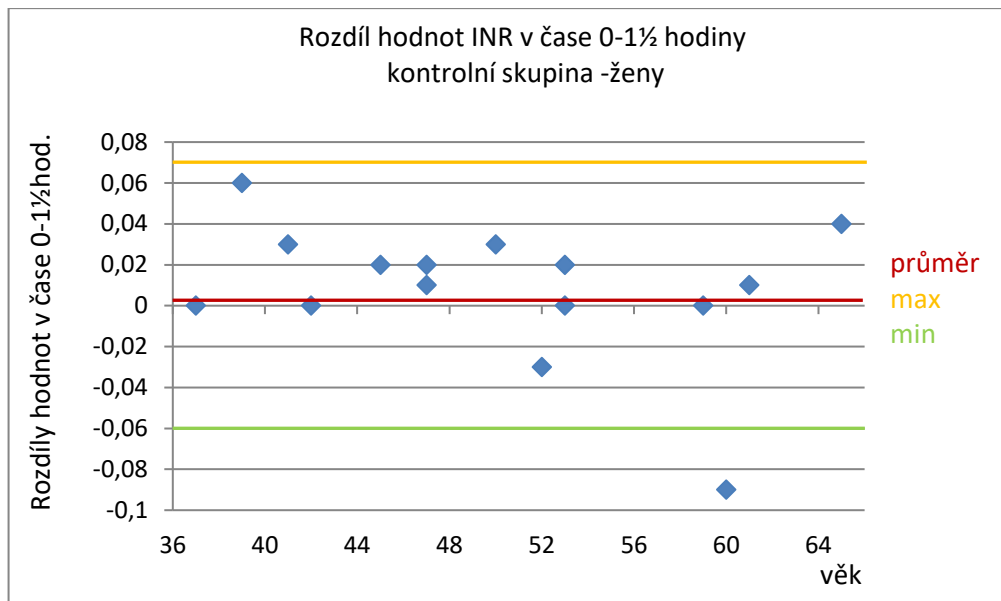
Obr. 10 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina muži



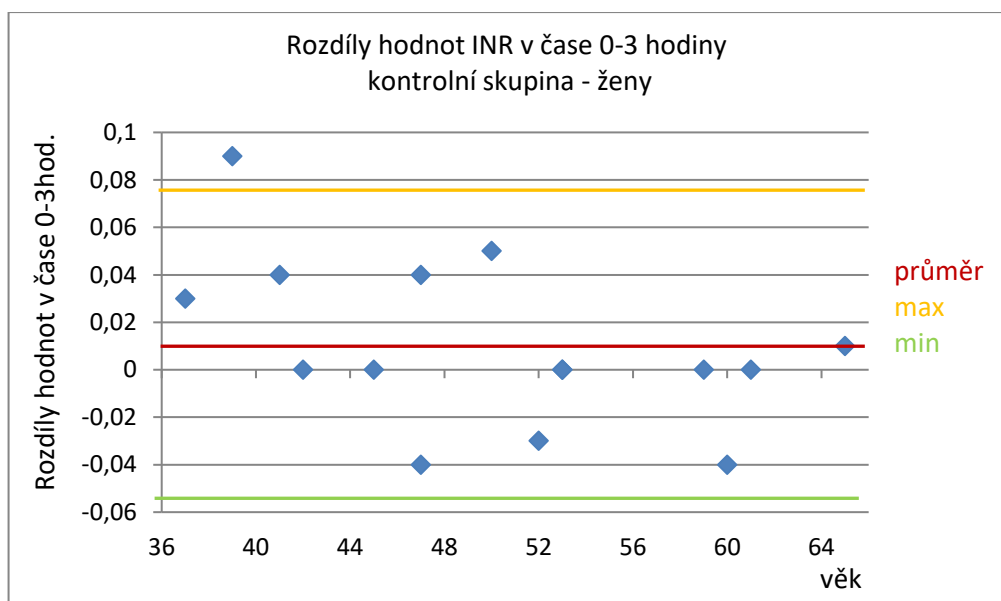
Obr. 11 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou muži



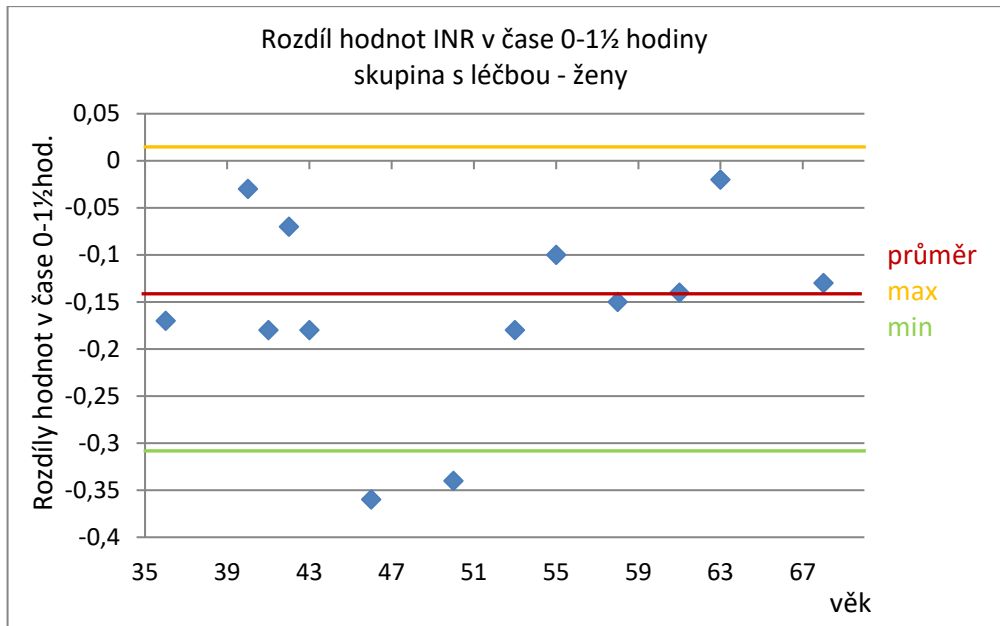
Obr. 12 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou muži



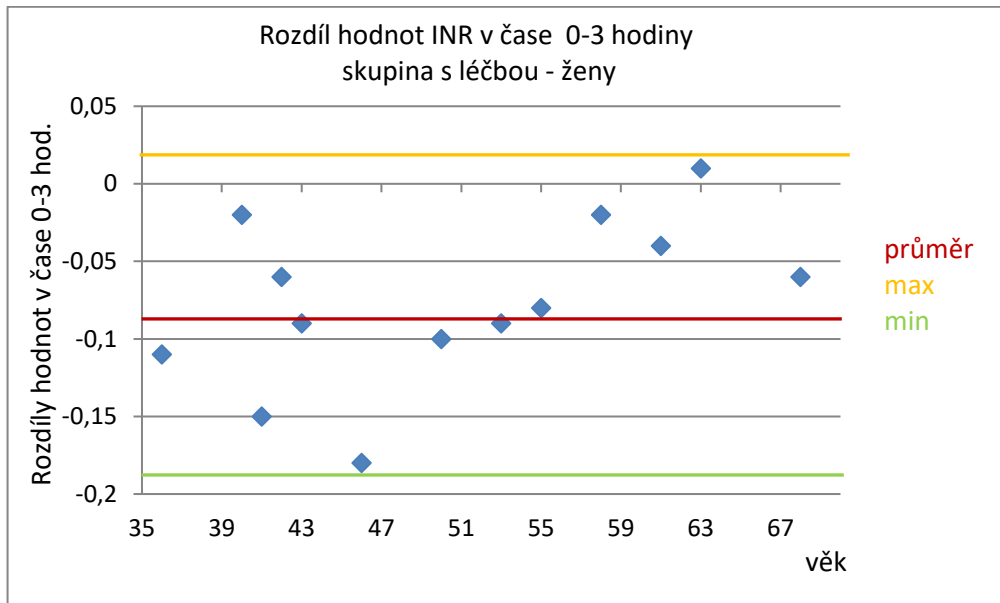
Obr. 13 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina ženy



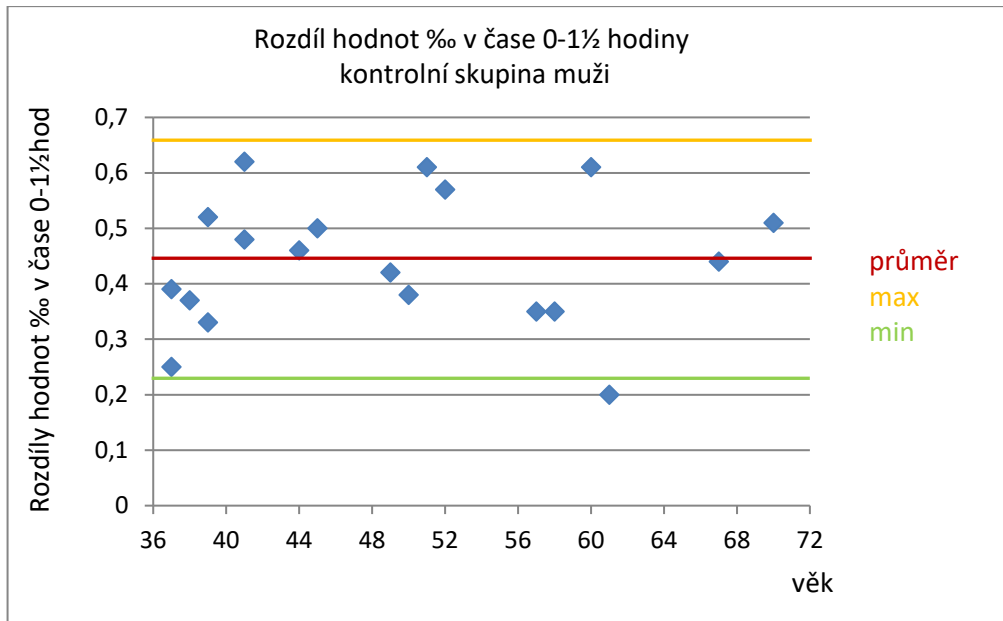
Obr. 14 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina ženy



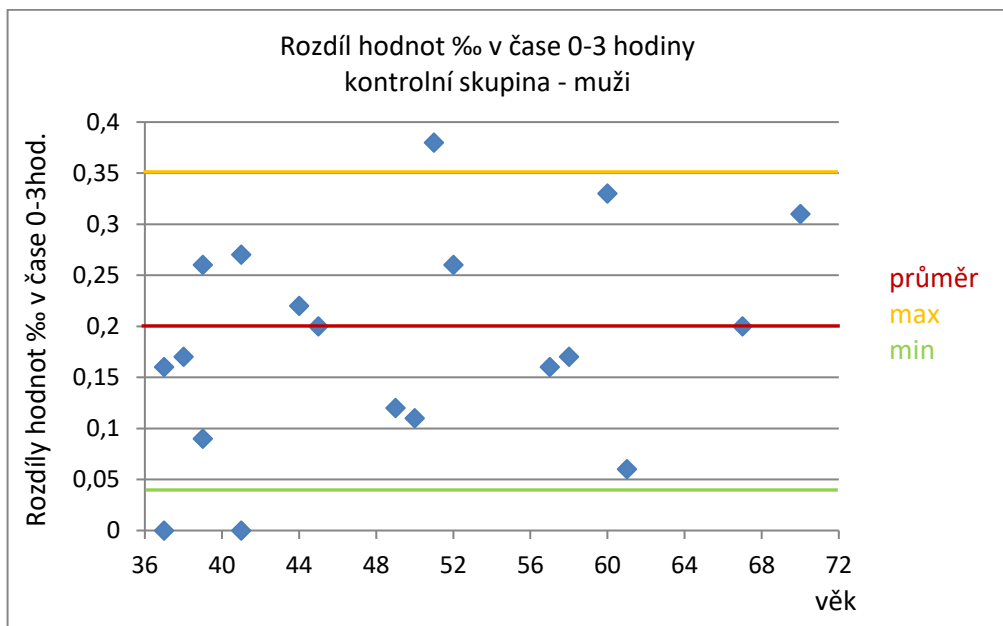
Obr. 15 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou ženy



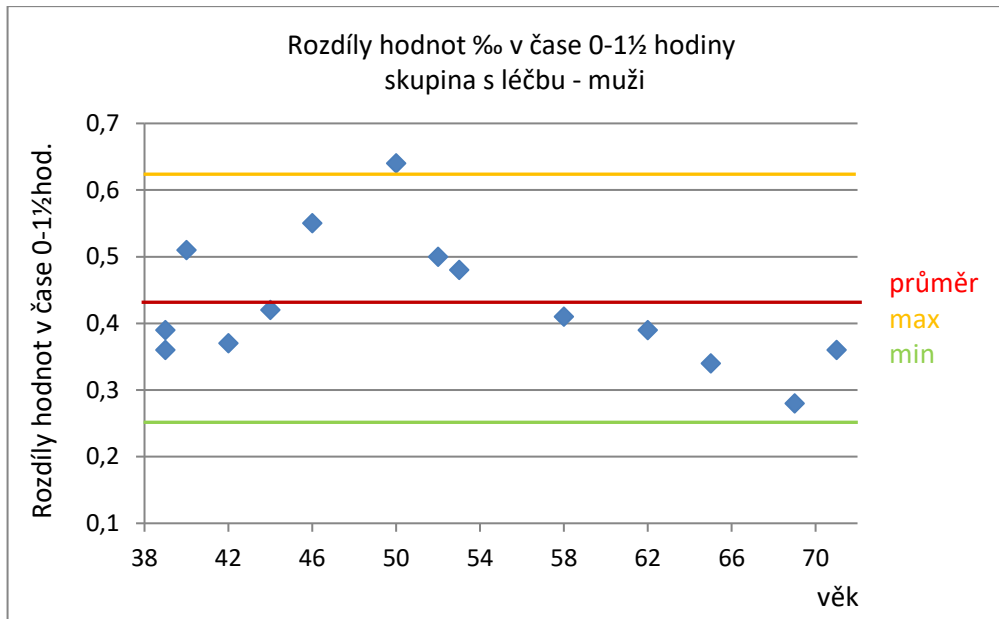
Obr. 16 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou ženy



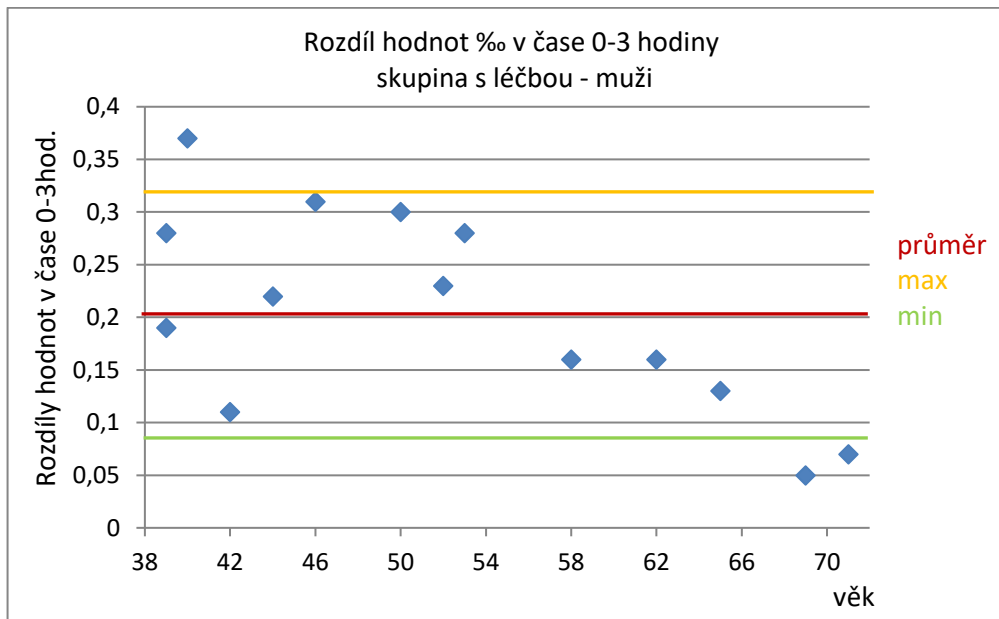
Obr. 17 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina muži



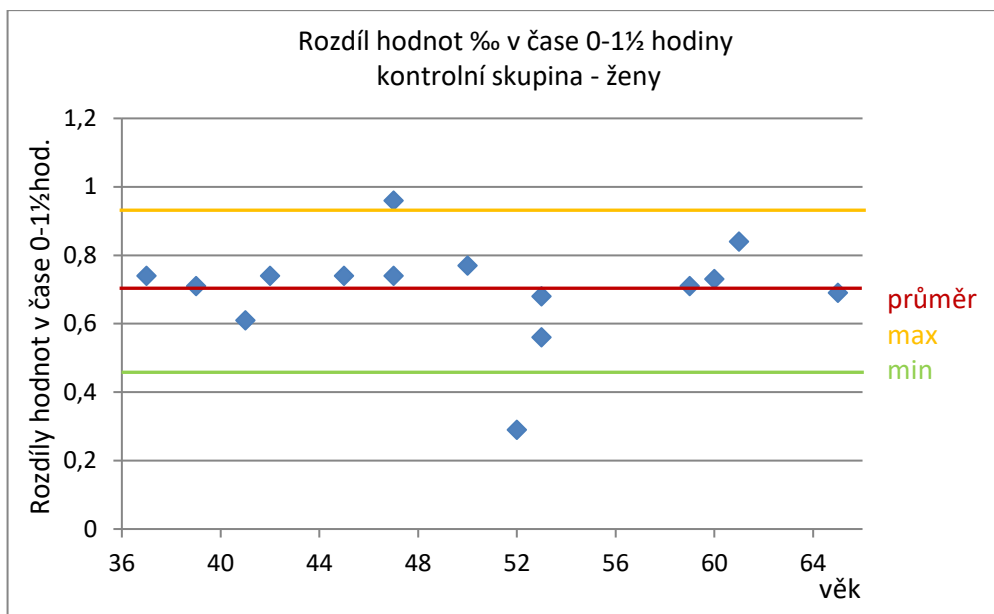
Obr. 18 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina muži



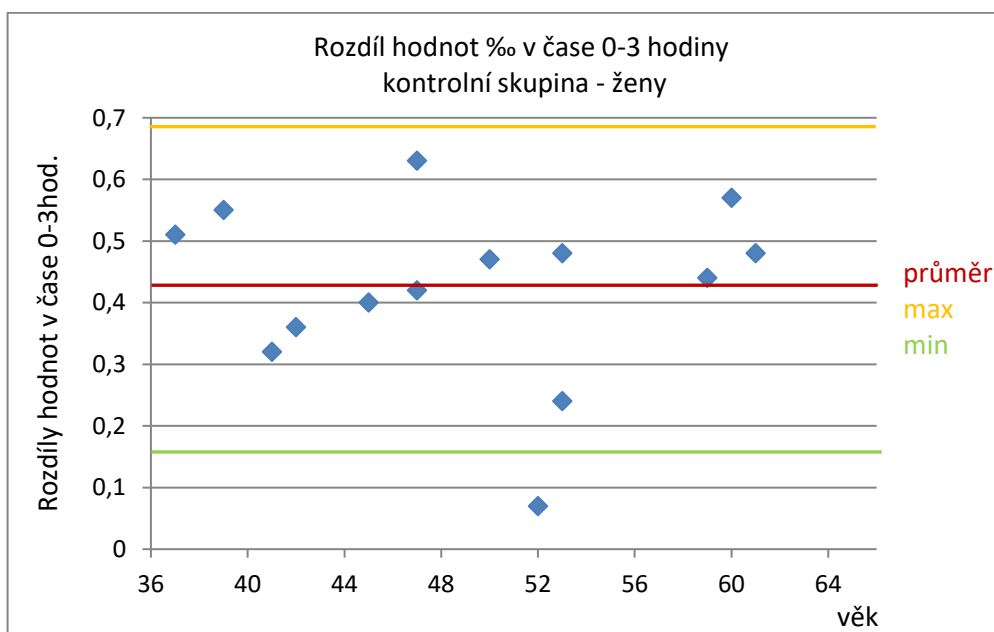
Obr. 19 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou muži



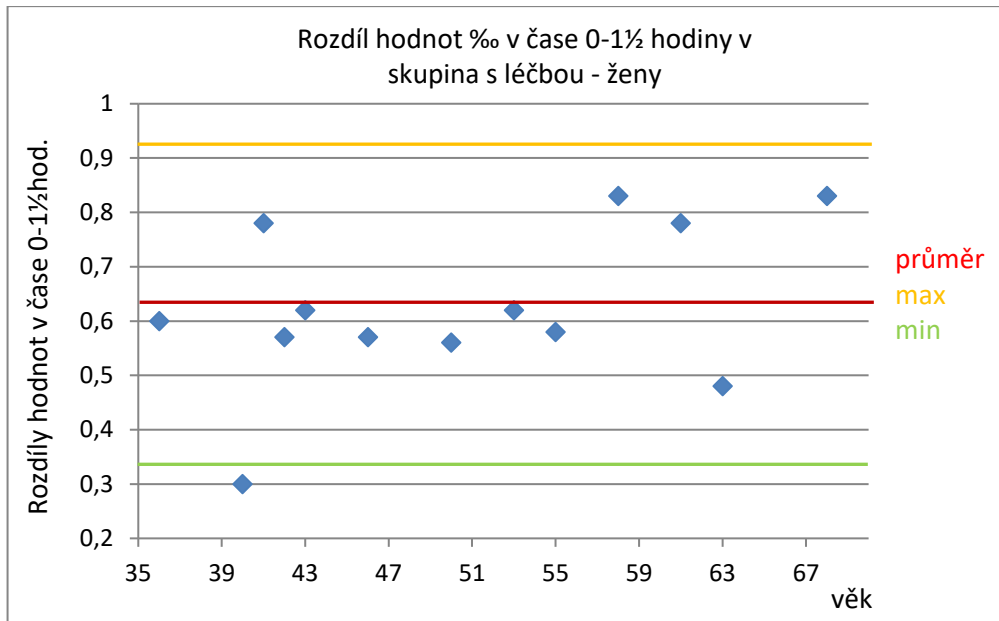
Obr. 20 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou muži



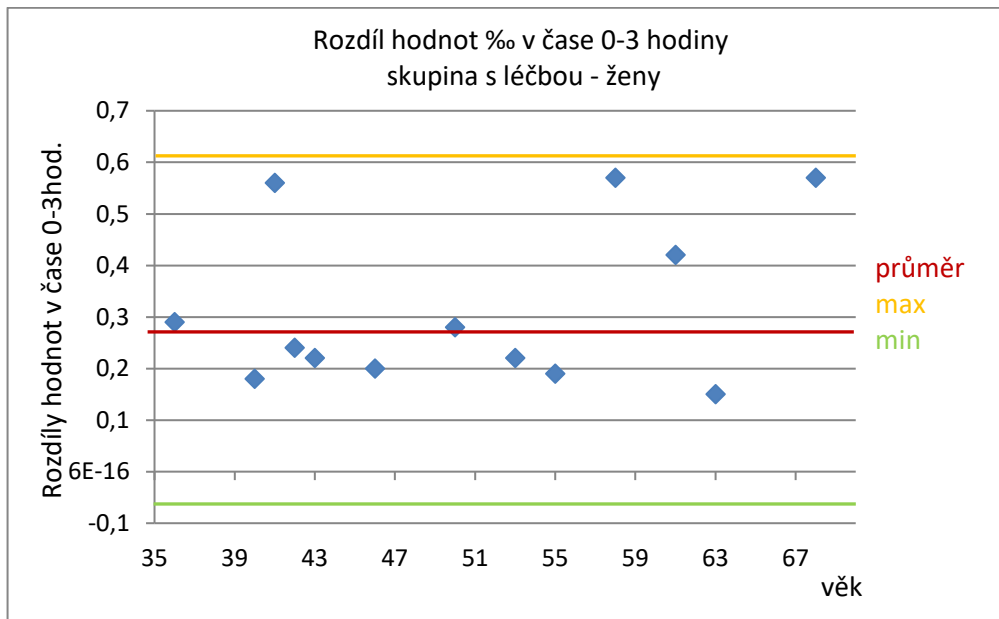
Obr. 21 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina ženy



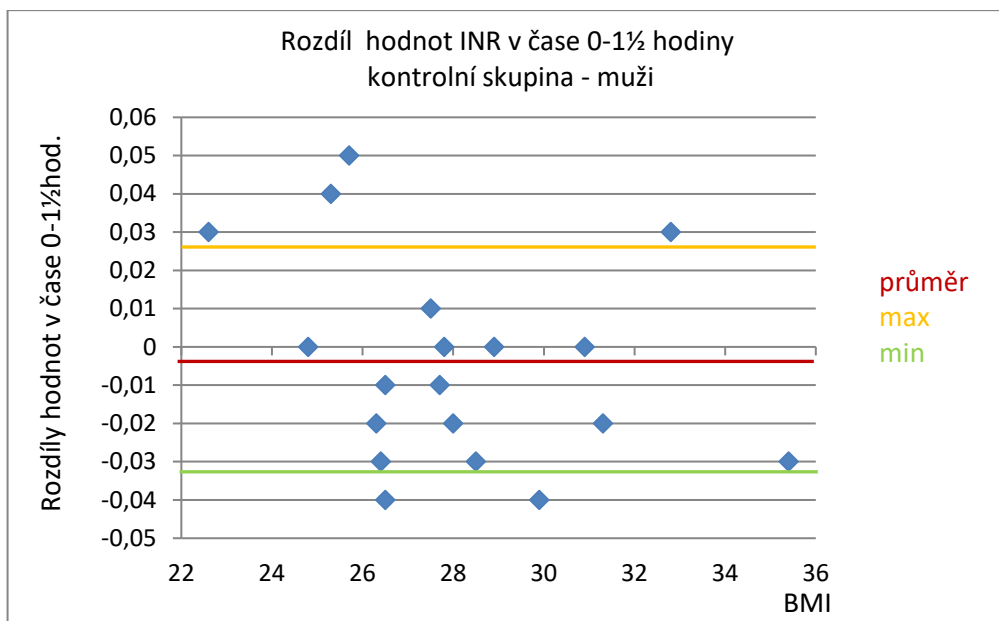
Obr. 22 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; kontrolní skupina ženy



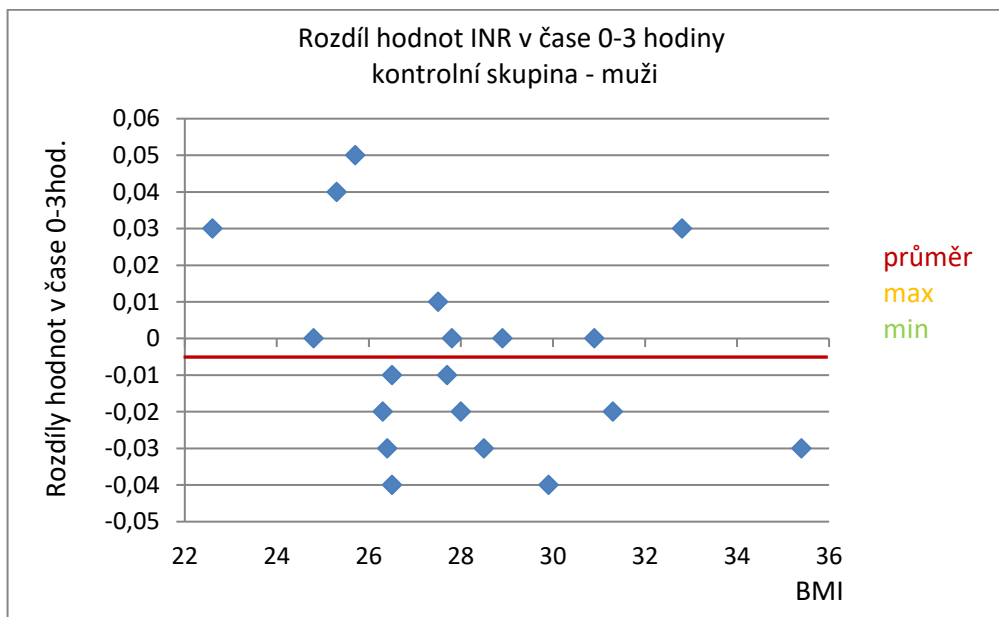
Obr. 23 Rozdíl hodnot % v čase 0-1½ hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou ženy



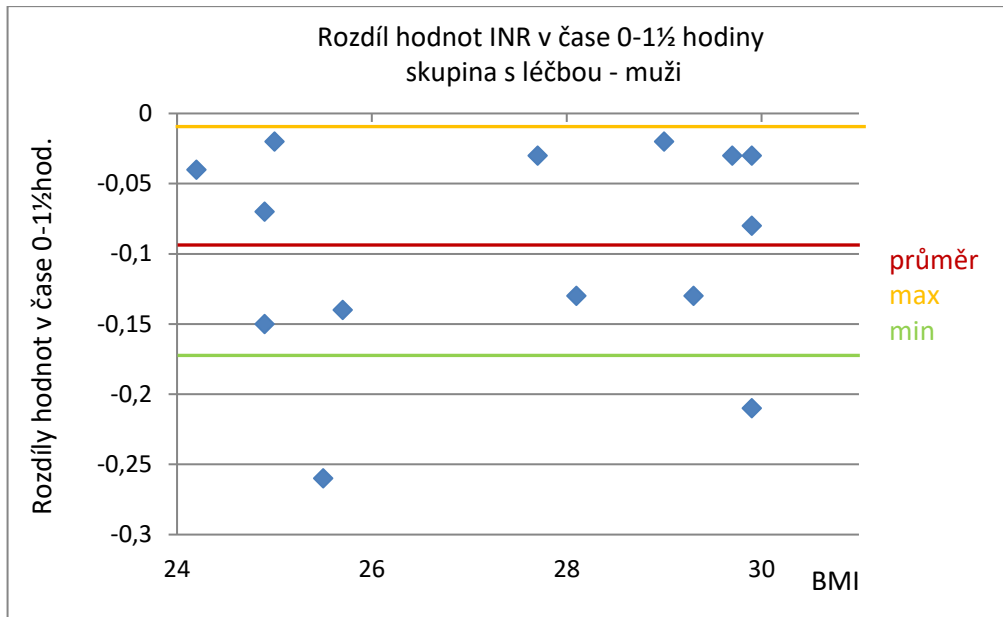
Obr. 24 Rozdíl hodnot % v čase 0-3 hodiny v závislosti na věku; skupina s léčbou ženy



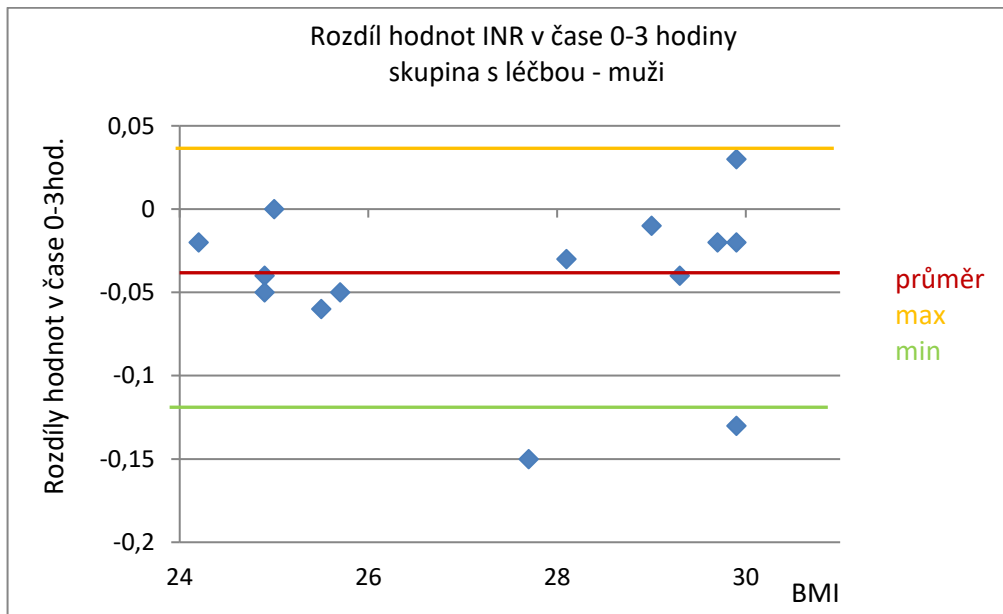
Obr. 26 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina muži



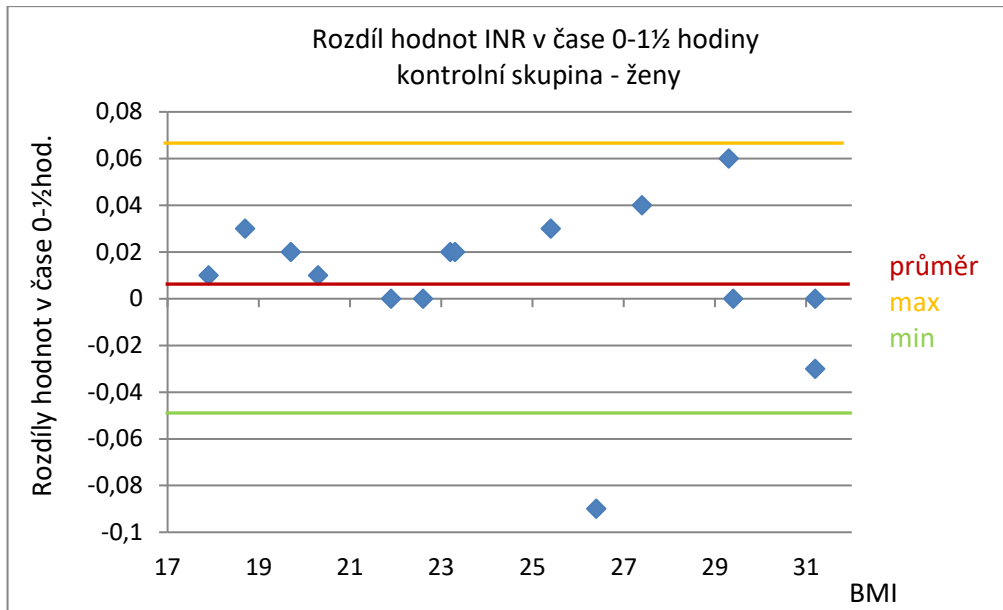
Obr. 27 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina muži



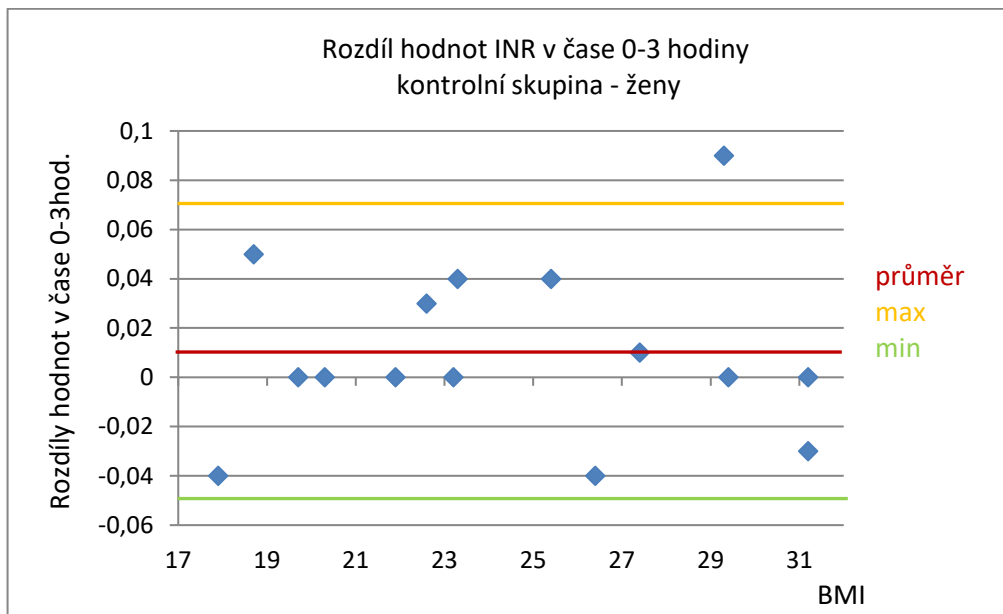
Obr. 28 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou muži



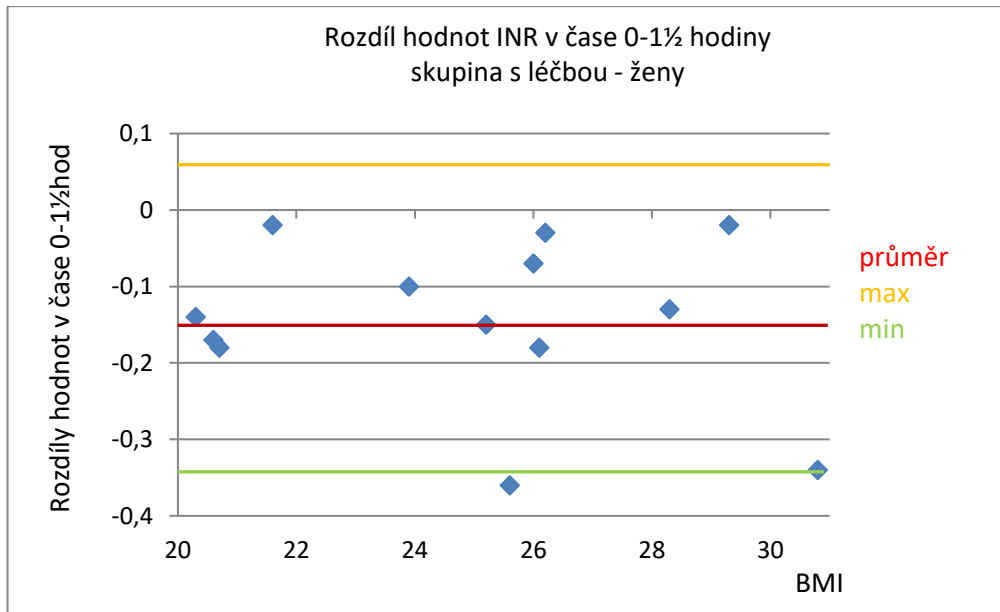
Obr. 29 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou muži



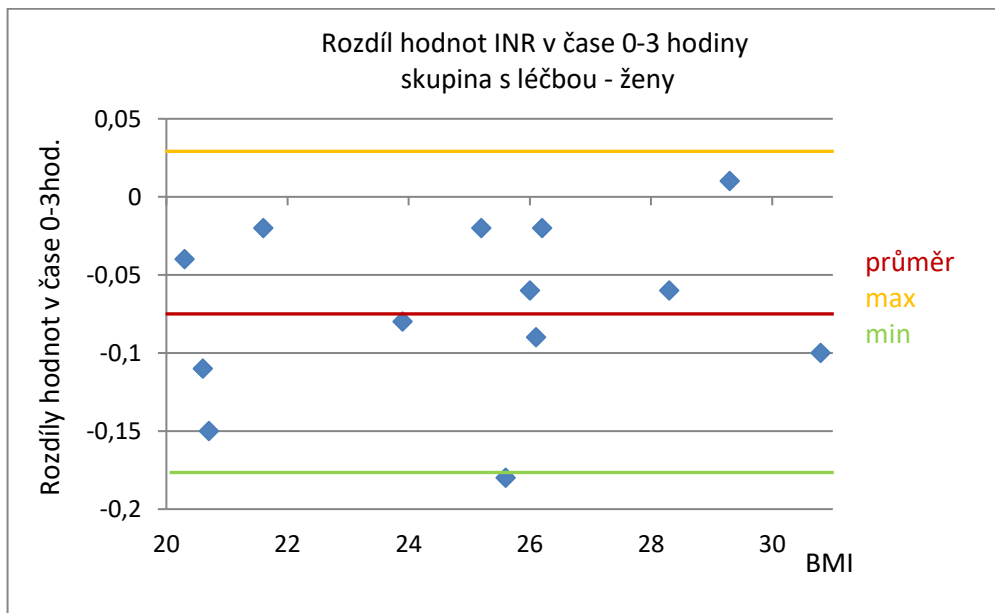
Obr. 30 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina ženy



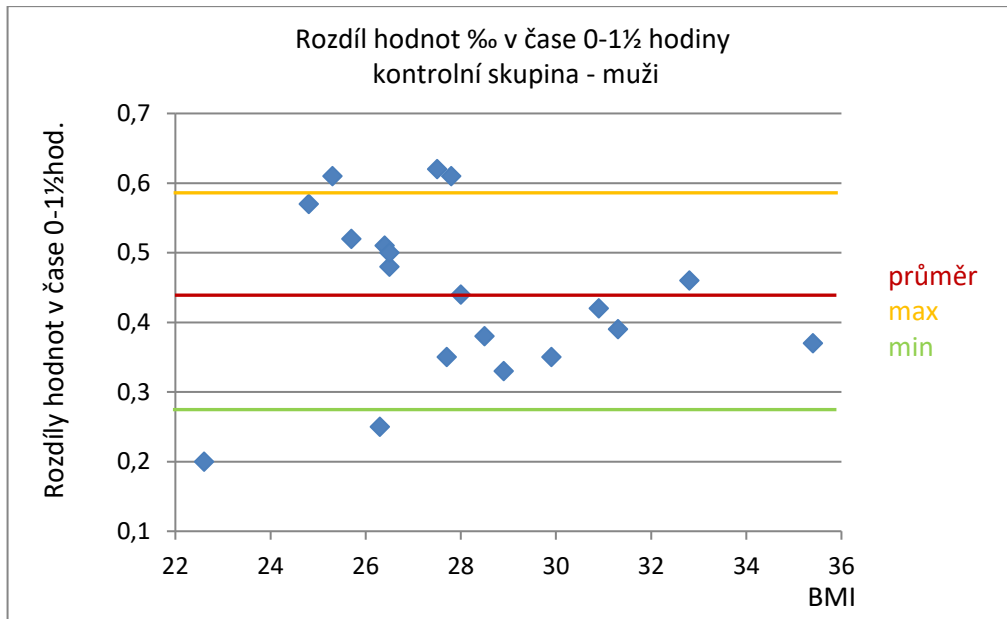
Obr. 31 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina ženy



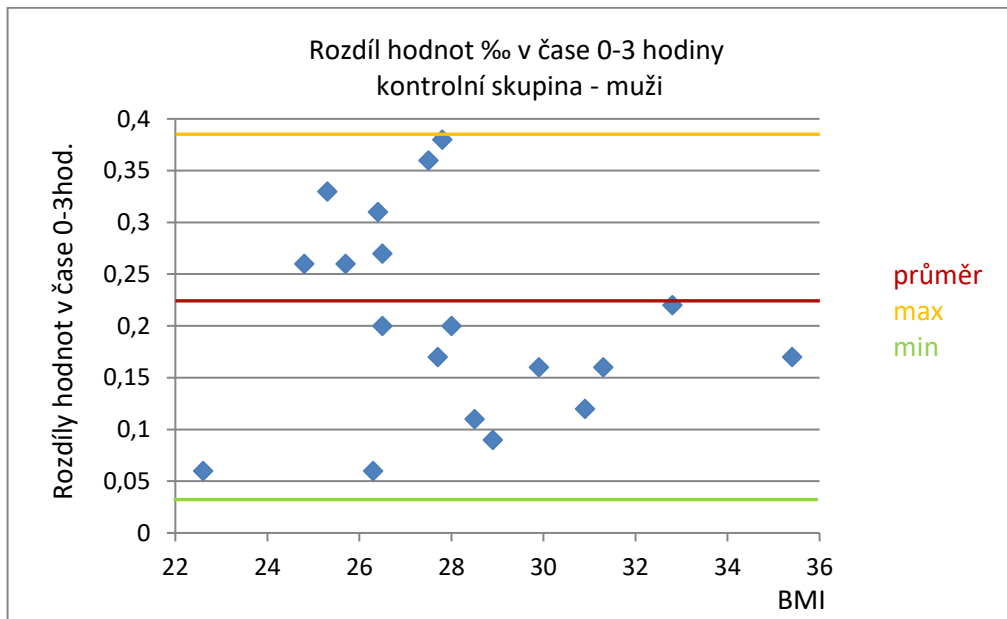
Obr. 32 Rozdíl hodnot INR v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou ženy



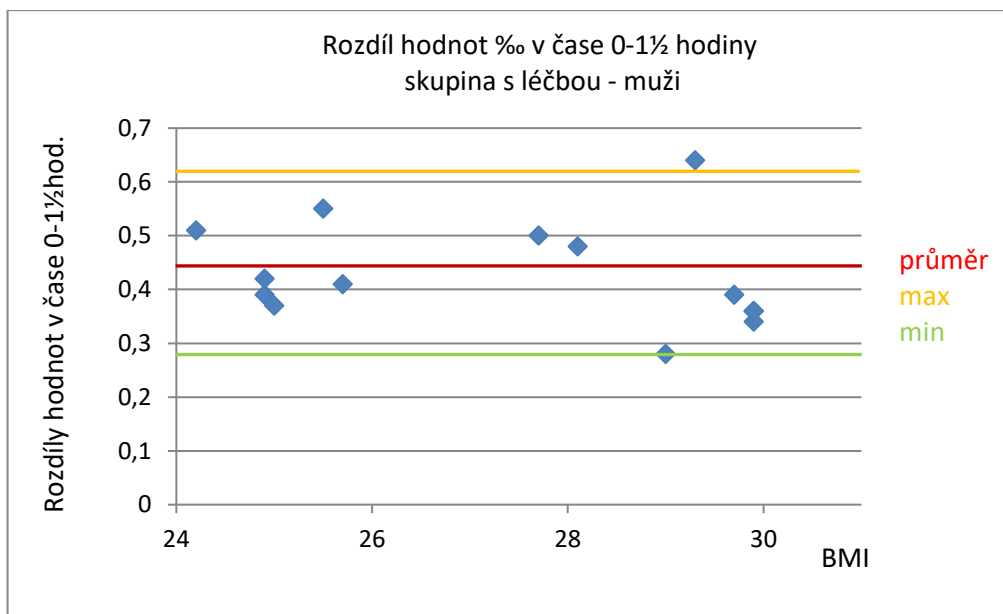
Obr. 33 Rozdíl hodnot INR v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou ženy



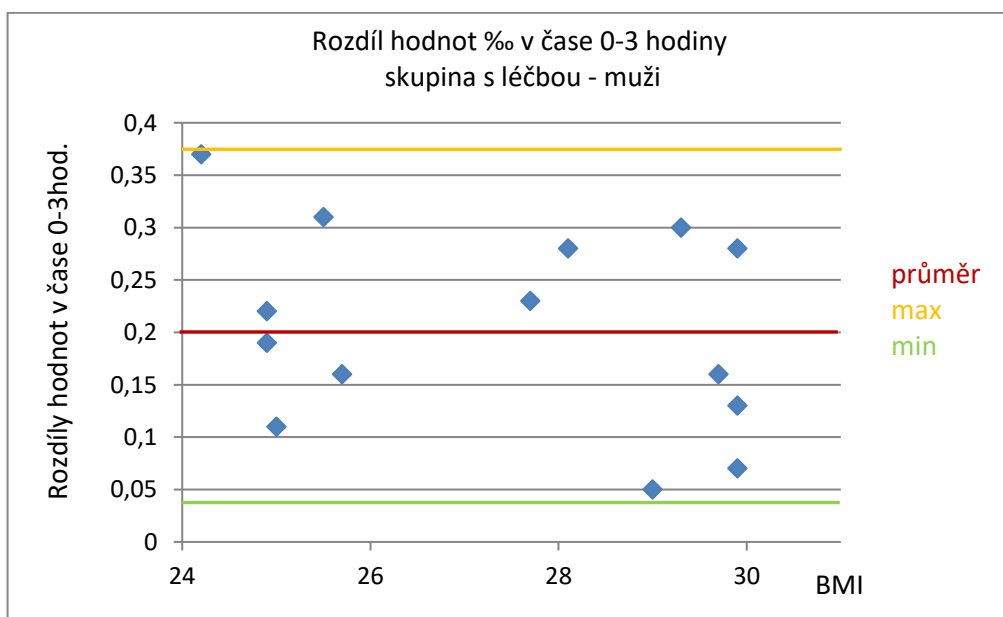
Obr. 34 Rozdíl hodnot % v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina muži



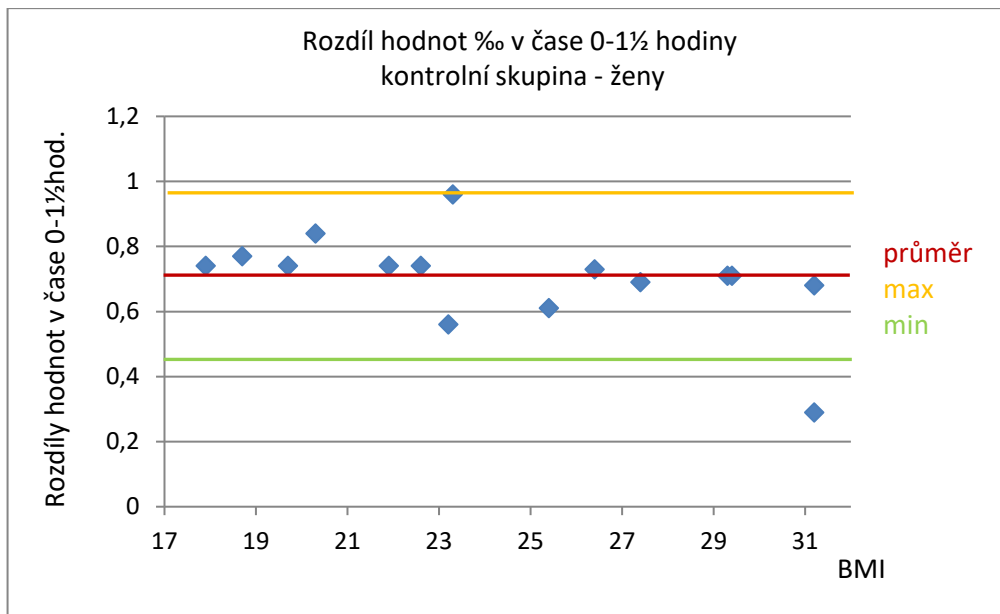
Obr. 35 Rozdíl hodnot % v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina muži



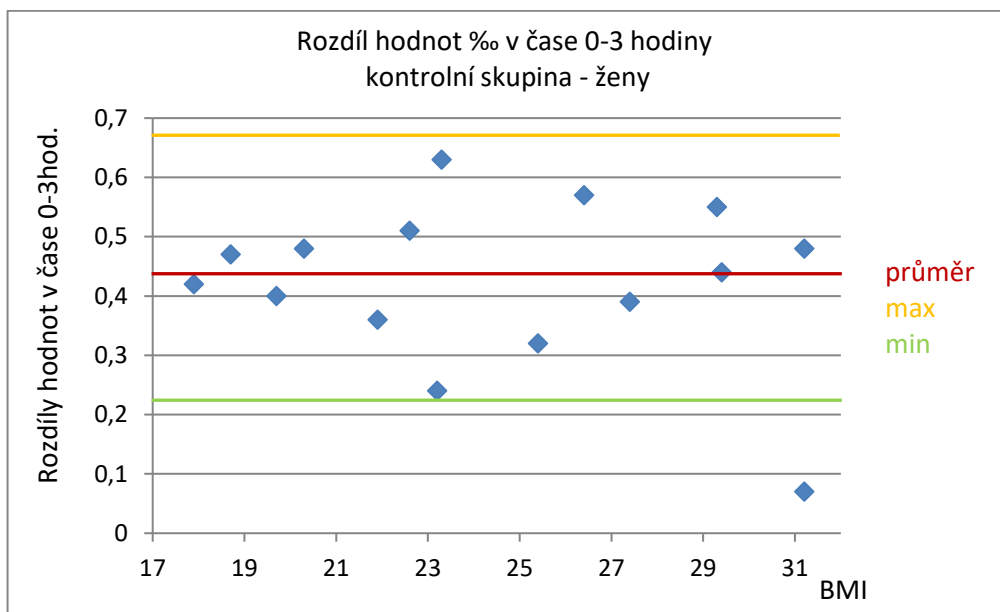
Obr. 36 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou muži



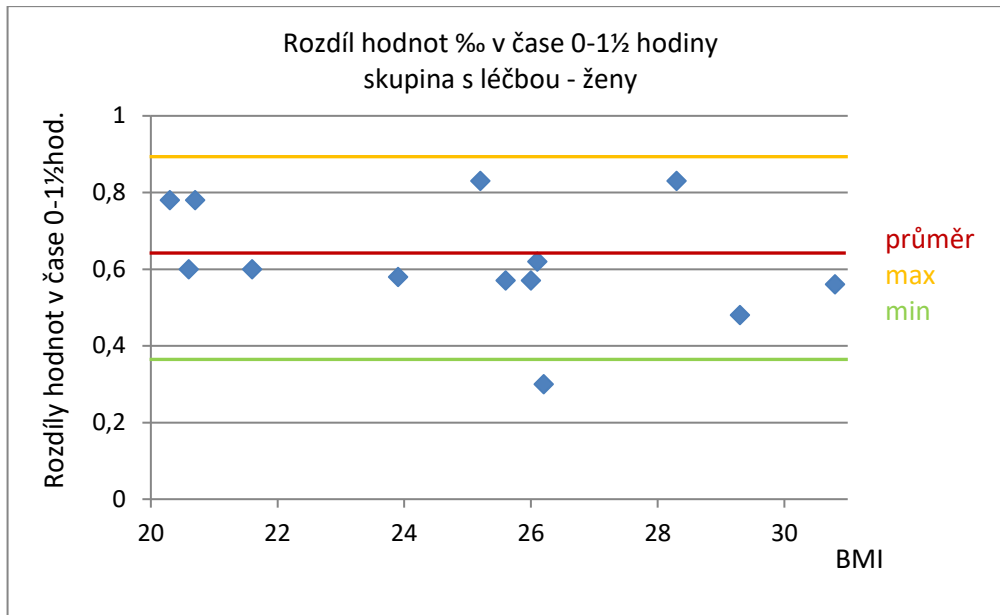
Obr. 37 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou muži



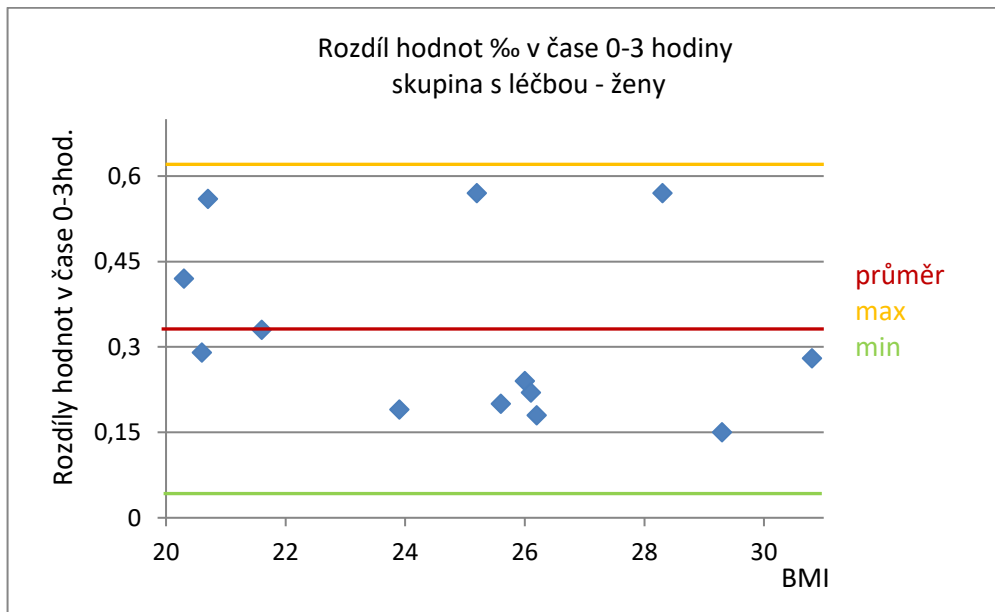
Obr. 38 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina ženy



Obr. 39 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; kontrolní skupina ženy



Obr. 40 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-1½ hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou muži



Obr. 41 Rozdíl hodnot ‰ v čase 0-3 hodiny v závislosti na BMI; skupina s léčbou ženy