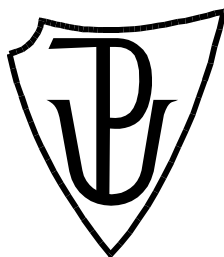


**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium metabolických změn při popáleninovém
úrazu pomocí kapilární elektroforézy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Palyzová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D. a všechny použité a prostudované literární a odborné zdroje jsem uvedla v seznamu literatury.

V Olomouci dne 20. 7. 2015

.....

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a trpělivost při plnění této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Radimu Knobovi, Ph.D. za cenné rady a pracovníkům Popáleninového centra Fakultní nemocnice Ostrava za poskytnutí vzorků a možnost zpracovat toto téma. Děkuji také své rodině za podporu po celou dobu studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Palyzová
Název práce	Studium metabolických změn při popáleninovém úrazu pomocí kapilární elektroforézy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie, Laboratoř elektromigračních metod
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Tato diplomová práce je zaměřená na studium metabolitů odrážející energetický metabolismus organismu pomocí kapilární elektroforézy. V teoretické části práce je pozornost věnována popáleninám obecně, dále potom metabolismu a výživě při těchto traumatických stavech. Jedna z kapitol je věnována kapilární elektroforéze, která byla použita jako metoda pro analýzu vzorků. V praktické části byly analyzovány, identifikovány a vyhodnoceny krevní vzorky od 57 dárců. Byl studován vliv pohlaví, věku, hmotnosti, rozsahu popálení, místa popálení a přítomnosti diabetu na stav pacienta.
Klíčová slova	Popáleniny, metabolismus, výživa, kapilární elektroforéza
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Palyzová
Title	Study of metabolic changes within a burn injury by capillary electrophoresis
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Analytical Chemistry, Laboratory of electromigration methods
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	The diploma thesis is focused on metabolic response of the body to burn injury. The theoretical part is devoted to description of the burn injuries in general, then metabolism and nutrition in postburn stage. One of the chapters is devoted to capillary electrophoresis which is used as method for analysis of samples. In the experimental part, blood samples from 57 donor were analysed, evaluated and identified. The influence of gender, age, weight, extent of burns, site burns and the presence of diabetes in a patients's condition were studied.
Keywords	Burn, metabolism, nutrition, capillary electrophoresis
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	POPÁLENINY	10
2.2	STAVBA KŮŽE	10
2.2.1	Klasifikace popálení:	11
2.3	NUKLEOTIDY	13
2.3.1	Metabolismus purinů	14
2.3.2	Metabolismus pyrimidinů	15
2.4	METABOLISMUS	16
2.4.1	Metabolismu cukrů	17
2.4.2	Metabolismus proteinů	17
2.4.3	Metabolismus tuků	17
2.5	VÝŽIVA	18
2.6	METODY	22
2.6.1	Kapilární elektroforéza	22
2.6.1.1	Obrácený elektroosmotický tok	23
2.6.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	CHEMIKÁLIE	26
3.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	26
3.3	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26
3.4	PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	27
3.5	SMĚS STANDARDŮ	27
3.5.1	Příprava standardů	27
3.6	PŘÍPRAVA ELEKTROLYTŮ	27
3.7	INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY	28
4	VÝSLEDKY	29
4.1	POPIS VZORKŮ	29
4.2	ANALÝZA SMĚSI NUKLEOTIDŮ	33
4.3	ANALÝZA VZORKŮ A IDENTIFIKACE LÁTEK	33
4.4	KONCENTRACE NUKLEOTIDŮ V ERYTROCYTECH U ZDRAVÝCH JEDINCŮ	34
4.5	STANOVENÍ OPAKOVATELNOSTI METODY	35
4.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	38
4.6.1	Vliv pohlaví	39
4.6.2	Vliv přítomnosti diabetu	41
4.6.3	Vliv rozsahu popálení na koncentraci jednotlivých nukleotidů	43
4.6.4	Vliv hmotnosti pacienta	46
4.6.5	Vliv věku	48
4.6.6	Vliv zasažené oblasti těla	51
4.7	ANALÝZA VZORKŮ V ČASE	53

5	DISKUSE	57
6	ZÁVĚR.....	59
7	SEZNAM LITERATURY	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64

CÍLE PRÁCE

- Vypracování přehledné rešerše na téma:
 - Podstaty popálenin
 - Metabolismu
 - Výživy u popáleninových traumat
 - Teorie a praxe kapilární elektroforézy, vysokoúčinné kapalinové chromatografie
- Vývoj metod pro studium obsahu vybraných biologicky aktivních látek při popáleninovém úrazu, zejména látek odrážejících energetický metabolismus (nukleotidy), analýza klinických vzorků, porovnání výsledků pacientů se zdravými jedinci
- Zhodnocení studia a zpracování diskuse k výsledkům z pohledu současných poznatky v odborné literatuře

1 ÚVOD

Popáleninové trauma se řadí k nejstarším zraněním vůbec. V současné době se díky rozvoji techniky jejich četnost zvýšila. I přes lékařskou vyspělost a zvednutí úrovně poskytované péče je léčení popálenin komplikované a časově velice náročné. Pacienti se po úrazu potýkají nejen s fyzickými, ale i psychickými problémy. To vyžaduje vysoce sofistikovaný přístup, který je zajištěn vysoce kvalifikovanými a proškolenými lékaři a zdravotnímu sestrám.

Každý rok je postiženo okolo 1 % populace. Většina těchto úrazů je léčena ambulantně. 3 % postižených musí být hospitalizována a popáleniny pro ně představují přímé ohrožení života. Tito pacienti jsou léčeni na specializovaných pracovištích, které jim poskytují komplexní péči jak po celou dobu hospitalizace, tak v době, kdy do zařízení dochází na rehabilitaci.

V teoretické části této práce jsou uvedeny základní poznatky o popáleninách, metabolických změnách při popáleninovém úrazu, možných způsobech výživy a metodách, které byly využity k analýze reálných vzorků.

V praktické části jsou uvedeny základní informace o pacientech, jsou vyhodnoceny a statisticky zpracovány výsledky jednotlivých analýz.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 POPÁLENINY

„Popáleninové trauma se řadí mezi nejstarší úrazy, které postihly lidstvo.“ (Königová, 2010). Představují významný problém na celém světě. (Keck, 2009) Přestože popáleniny nepatří mezi nejčastější zranění, svou komplikovanou léčbou a následky, které mohou být nejen fyzické (jizvy) ale i psychické se řadí k nejtěžším úrazům lidské traumatologie. Celková závažnost poranění je dána 5 faktory: hloubkou, velikostí a umístěním popálení, věkem a zdravotním stavem pacienta.(Dokter, 2014)

Úmrtnost pacientů se závažnými popáleninami se výrazně snížila díky zlepšení kontroly infekce, výživy, snížení hypermetabolické odpovědi, novým a zlepšeným chirurgickým přístupům. (Pruitt, 2012)

Léčba popálenin je velice zdoluhavá, náročná a závislá na mnoha faktorech. Jeden z hlavních problémů zde hraje fakt, že neexistuje jednotný postup pro léčbu popálenin. Každý pacient vyžaduje individuální přístup podle rozsahu a hloubky poranění. (Mager, 2005).

V České republice je každoročně léčeno přibližně 1% populace s popáleninovým úrazem. Přibližně 3 % se řadí mezi těžké případy a jsou hospitalizováni, zbytek je léčen ambulantně. (www.epomed.cz) V roce 2009 bylo v České republice hospitalizováno 3362 pacientů (1606 dětí, 738 mladých dospělých a 1018 starších dospělých). Nejčastějším způsobem poranění bylo opaření a popálení. (Saffle, 2012)

V České republice existují tři pracoviště specializující se na popáleniny – tzv. popáleninová centra, jsou to Klinika popáleninové medicíny v Praze, Klinika popálenin a rekonstrukční chirurgie v Brně a Popáleninové centrum v Ostravě. Činnost popáleninových center upravuje věstník MZ ČR částka 6 z roku 2008 (Traumatologická péče v ČR).

2.2 STAVBA KŮŽE

Kůže je největším orgánem lidského těla. Zaujímá přibližně 1.8 m². Skládá se ze tří hlavních částí: vnější tenčí epitelové části – pokožky, vnitřní, silnější vazivové tkáně – škály a podkožního vaziva (Obr. 1). (Cook, 2003)

Pokožka se skládá ze 4 typů buněk. Keratinocyty, v základní vrstvě mají charakter kmenových buněk, se neustále dělí a posouvají směrem nahoru. Nahrazují odumřelé, rohovatějící buňky, které se odlupují. Melanocyty neboli pigmentové buňky způsobují zbarvení kůže. Buňky, jež chrání kůži proti pronikání mikroorganismů, jsou imunitní (Langerhansovy) buňky. Posledním typem buněk jsou Merkelovy buňky – receptory dotyku.

Škára je složená ze dvou vrstev obsahující kolagenní a elastické vlákna. Nachází se zde receptory kožního cití, tukové a vazivové buňky, mazivové a potní žlázy. Škára je bohatě prostoupena cévami a nervy a vyrůstají z ní vlasy a chlupy. Elastická vlákna jsou zodpovědná za pružnost, kolagenní vlákna dávají kůži pevnost. Podle anatomické lokalizace se šířka škáry mění v rozmezí od 0,5 mm (oční víčka) až po 3 mm (záda).

Podkožní vazivo tvoří síť elastických a vazivových vláken, mezi něž jsou vmezeřeny vazivové buňky. (Novotný, 2008; Stockleyová, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012; Cook 2003; Merkunová, 2008). Tloušťka je individuální podle stavu výživy, věku a pohlaví. (Štětinský, 2014)

Nejdůležitější funkcí kůže je ochrana lidského těla před vnějšími vlivy. Dále zprostředkovává kožní cití, podílí se na udržení tělesné teploty, je zásobárnou krve, řadí se k vylučovací soustavě, má vstřebávací schopnost. (Merkunová, 2008)

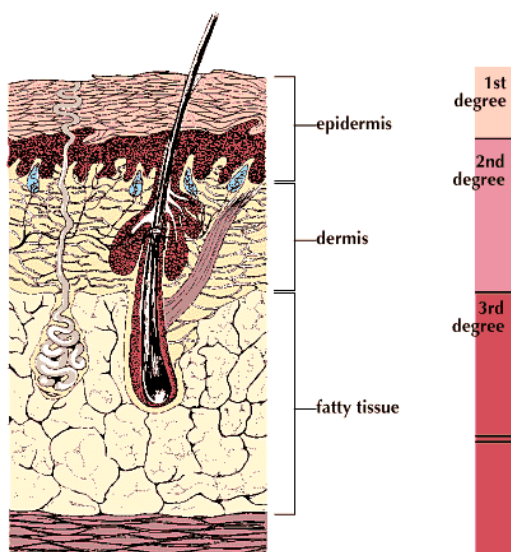
2.2.1 Klasifikace popálení:

- Hlavním faktorem úmrtnosti je hloubka popálení po tepelném zranění. Stejně tak určuje pacientův vzhled a stav do budoucna. (Heimbach, 1992) Hloubka popálení závisí na době a intenzitě působení tepelného zdroje a dělíme ji na popáleniny I. II. a III. stupně (Obr. 1).
- Popáleniny mohou být způsobeny elektrickým proudem, zářením, třením, ohněm, opařením, působením chemikálií.

Tab. 1: Klasifikace popálení dle hloubky a její charakteristika.

popálenina	příčina	vzhled	přítomnost puchýřů	citlivost	léčba
I. Stupeň	opalování bez použití ochranných prostředků	zarudnutí, otok	bez puchýřů	bolestivé	7 dní
II. Stupeň	opaření	sytě červená s prokrvením	s puchýři	bolestivé	14 dní
III. Stupeň	kontakt s vysokou teplotou, chemikáliemi nebo elektrickým proudem	hnědočervená až voskovitě bílá	bez puchýřů	bez bolesti	chirurgicky

- Rozsah popálení se vyjadřuje procentuálně. U většího rozsahu popálení se využívá pravidlo devíti: hlava, pravá a levá ruka představují 9 % celkové plochy těla, pravá a levá noha, záda a trup 18 %. Popáleniny menšího rozsahu se měří podle dlaně pacienta, která zaujímá 1 % celkové plochy těla.



Obr. 1.: Stavba kůže a klasifikace hloubky popálení (převzato z <http://kids.britannica.com/>)

2.3 NUKLEOTIDY

Nukleotidy jsou organické molekuly, jež se skládají z purinové či pyrimidinové báze, cukru a zbytku kyseliny fosforečné. (Szitányi, 2007) Tyto látky a jejich báze hrají důležitou roli u spousty biologických procesů. (Carver, 1995; Moffatt, 2002) Mezi hlavní patří syntéza DNA a RNA, přenos energie a regulace metabolismu. (Friedecký a kol., 2007).

Pyrimidinové báze jsou součástí struktury mnoha koenzymů (NAD, NADP, NADPH). (Szitányi, 2007) Jsou zapojeny do mnoha katabolických a anabolických cest v živém organismu. (Carver, 1995) NAD a NADP jsou v pentosafosfátové dráze hlavními akceptory elektronů. Jejich redukované formy NADH a NADPH jsou hlavními donory elektronů k tvorbě ATP a snížení tvorby NADPH. (Markuszewski, 2003)

Adeninové nukleotidy (ATP, ADP, AMP) působí jako donory volné energie pro procesy, které jsou energeticky náročné. Energie získaná z hydrolýzy ATP a ADP je využita pro mechanickou práci, jako činnost svalů, aktivní přenos molekul a iontů a pro biosyntézu molekul z jednoduchých prekurzorů. ATP a ADP hrají také důležitou roli při fyziologické signalizaci molekul, které se váží na purinové membránové receptory. (Ralevic, 1998) ADP je důležité pro shlukování krevních destiček. (Carver, 1995) Nejvýznamnější signální molekulou je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). cAMP je označován jako sekundární přenašeč, který vzniká z ATP. (Benda, 2006) ATP je důležitým neurotransmiterem a AMP neuromodulátorem v centrální nervové soustavě. (Ralevic, 1998) Extracelulární adenosin a nukleotidy adeninu ovlivňují vazodilataci a správnou funkci krevních destiček. Koncentrace adenosinu je za běžných podmínek nízká, hladina stoupá při cvičení nebo ischemii. (Coade, 1989)

Nukleotidy jsou zdrojem fosfátu, který umožňuje napojení nukleotidů na karboxyly aminokyselin a hydroxyly sacharidů a tím vytvořit reaktivní meziprodukty při syntéze proteinů, sacharidů a lipidů. (Benda, 2006)

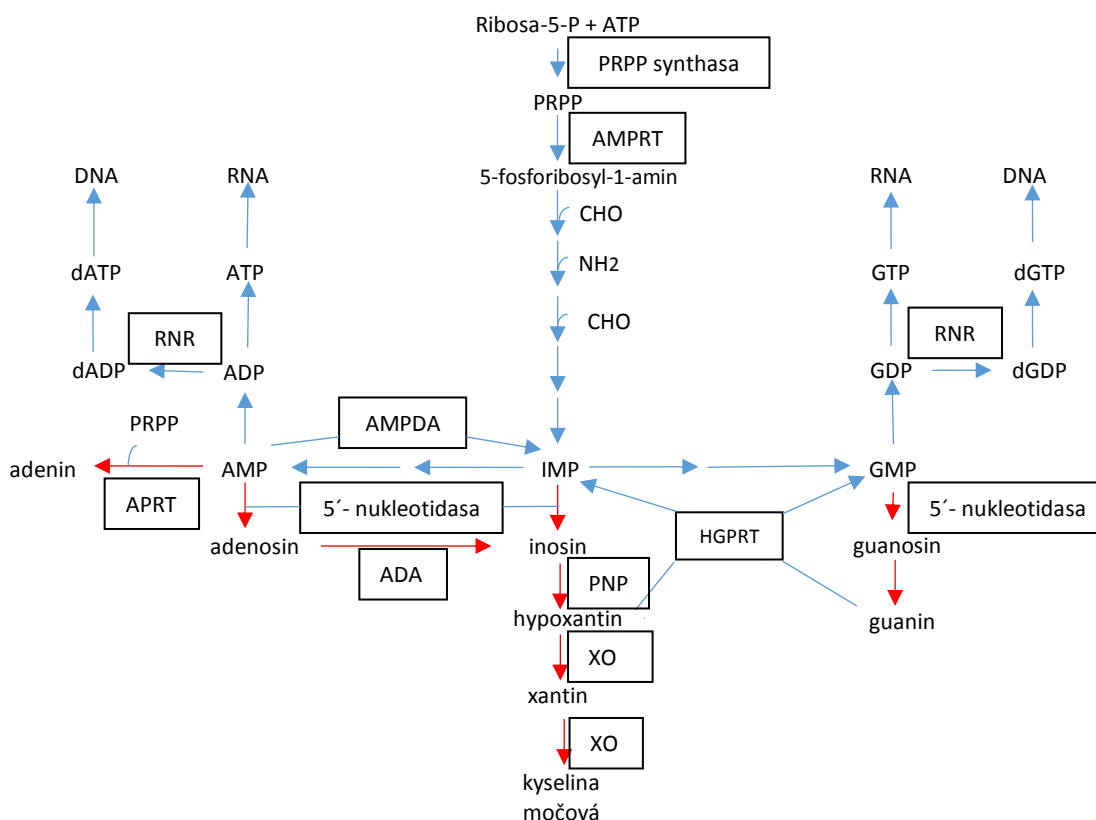
Nukleotidy kontrolují vývoj buňky během buněčného cyklu. (Shao, 1994) Slouží jako přenašeči aktivovaných meziproduktů. Například UDP- glukosa je meziproduktem pro syntézu glukogenu a glykoproteinu. GDP-mannosa, GDP-fukosa, UDP-galaktosa jsou meziprodukty při syntéze glykoproteinu, do fosfolipidového metabolismu jsou

zapojení CDP-cholin a CDP-etanolamin a S-adenosylmethionin a slouží jako zdroj methylu. (Carver, 1995)

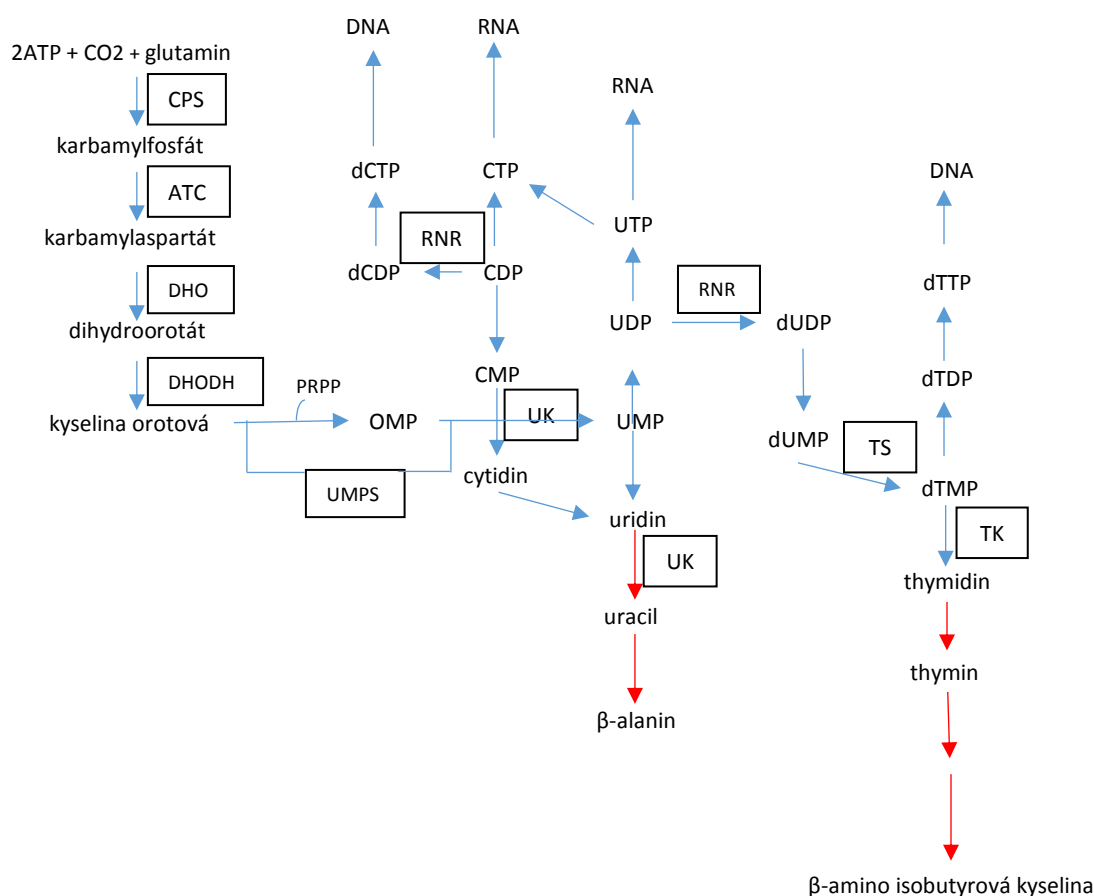
Analýza nukleotidů v lidské tkáni a buňkách je důležitá v biochemickém, klinickém a farmaceutickém výzkumu. (Geldart, 1998; Grob, 2003) Je také významná z hlediska správného nastavení léčivé terapie a k diagnostice dědičných metabolických poruch. (Barešová, 2011)

2.3.1 Metabolismus purinů

Buňky jsou schopné sami syntetizovat nukleotidy (Obr. 2), ale jejich tvorba je energeticky velmi náročná.



Obr. 2.: Metabolismus purinů. De novo syntéza (modře) katabolismus (červeně). PRPP = 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát, AMPRT = aminofosforibosyltransferasa, RNR=ribonukleotid reduktasa, APRT = adenin fosforibosyltransferasa, AMPDA = adenylát deaminasa, PNP = purin nukleotid forforylasa, XO = xantin oxidasa, HGPRT = hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferasa (Upraveno dle Carver a Walker, 1995)



Obr. 3.: Metabolismus pyrimidinových nukleotidů. Biosyntéza (modře), degradace (červeně). CPS = karbamylofosfát syntasa, ATC = aspartát transkarbamylna, DHO = dihydroorotasa, UMPS = UMP syntasa, DHODH = dihydroorotát dehydrogenasa, RNR=ribonukleotid reduktasa, UK = uridin kinasa, TS = thymidylát syntasa, TK = thymidin kinasa. (Upraveno dle Carver a Walker, 1995)

Rozdíl mezi metabolismem purinů a pyrimidinů je ve výstavbě heterocyklu. U pyrimidinových nukleotidů jde o výstavbu heterocyklu, který je již zakotven na ribose. Výchozí látkou jsou CO_2 , ATP a glutamin, ze kterých vzniká centrální látka pyrimidinových nukleotidů uridinmonofosfát (UMP). Degradací pyrimidinů vznikají β -alanin a β -amino isobutyrová kyselina, které vstupují do citrátového cyklu a do biosyntézy mastných kyselin jako malonyl-CoA a methylmalonyl-CoA (Obr. 3).

2.4 METABOLISMUS

Vážné popáleninové úrazy jsou spojené s metabolickými změnami a zánětlivým onemocněním. (Königová, 2010) Těžká tepelná poranění vyvolávají hypermetabolickou odpověď organismu (Obr. 4). (Luterman, 2000) Hypermetabolická odpověď na vážné popálení je spojena se zvýšeným energetickým výdejem, zvýšenou tělesnou teplotou, spotřebou kyslíku a glukózy, produkcí CO_2 , úbytkem vody, glukogenolýzou, insulinovou rezistencí, zvýšeným rizikem infekce a multiorgánovým selháním. (Šimko, 1992; Jeschke, 2008; Williams, 2009) Prvními mediátory hypermetabolické odpovědi jsou katecholaminy, kortikosteroidy a zánětlivé cytokiny. (Wilmore, 1974) Katecholaminy jsou vyplavovány synaptickým koncem nervů a dřením nadledvin a v poměru k popálené ploše jsou dvakrát až desetkrát zvýšeny. (Jeschke a kol., 2007)

Metabolická odpověď na popálení sestává ze dvou fází „ebb“ a „flow“ fáze. (Gangemi, 2007) První, kdo popsal a charakterizoval obě fáze, byl D. J. Cuthbertson v roce 1942. „Ebb“ fáze nastává okamžitě po poranění a je charakterizována snížením prokrvení tkání, spotřeby kyslíku, tělesné teploty a metabolismu s cílem snížit posttraumatické energetické vyčerpání. Naproti tomu u „flow“ fáze, která nastává 3 – 5 dní po poranění dochází k zrychlení metabolismu a aktivaci vrozeného imunitního systému. (Stahel, 2010; Herndon 2004)

Od ostatních traumat se popáleninový úraz odlišuje v délce trvání a intenzitě. Energetická potřeba organismu je zvýšena až o 100%. (Königová, 2010). Hypermetabolismus a metabolické změny přetrvávají až 2 roky po poranění. (Rodriguez, 2011)

Jak už bylo zmíněno dříve, ATP tvoří konstantní zásobu energie. Při popáleninovém šoku dochází k hypoperfuzi tkání a nadměrnému využívání metabolických substrátů,

což vede k buněčné dysfunkci. Buněčné funkce selhávají v případě neudržení normálního stavu nitrobuněčné energie. Po popálení se tělo dostává do extrémního stresu.

Popálení pacienti mají nedostatek stopových prvků Fe, Se, Zn a Cu. Jsou vyplavovány přes kožní rány po úrazu. (Berger, 2009)

2.4.1 Metabolismu cukrů

Po popálení je koncentrace krevní glukosy zvýšená. Glukosa se tvoří glukoneogenezí a odbouráváním jaterního glykogenu. (Desborough, 2000) Hladina glukosy v krvi je přímo úměrná rozsahu popálení. Čím větší rozsah popálení, tím je koncentrace glukosy vyšší. (Šimko, 1992) Hyperglykemie představuje pro pacienta závažné komplikace. Snižuje funkci imunitního systému, zpomaluje hojení ran, je spojena se zvýšeným odbouráváním proteinů a inhibuje shlukování krevních destiček. (Gore, 2002) Hormony ovlivňující metabolismus glukosy jsou insulin a glukagon. U pacientů s popáleninovým postižením je snížen poměr insulin/glukagon, tím dochází k inhibici glykolýzy. Taktéž zvýšená sekrece adrenalinu způsobuje poruchu metabolismu glukosy. (Šimko, 1992)

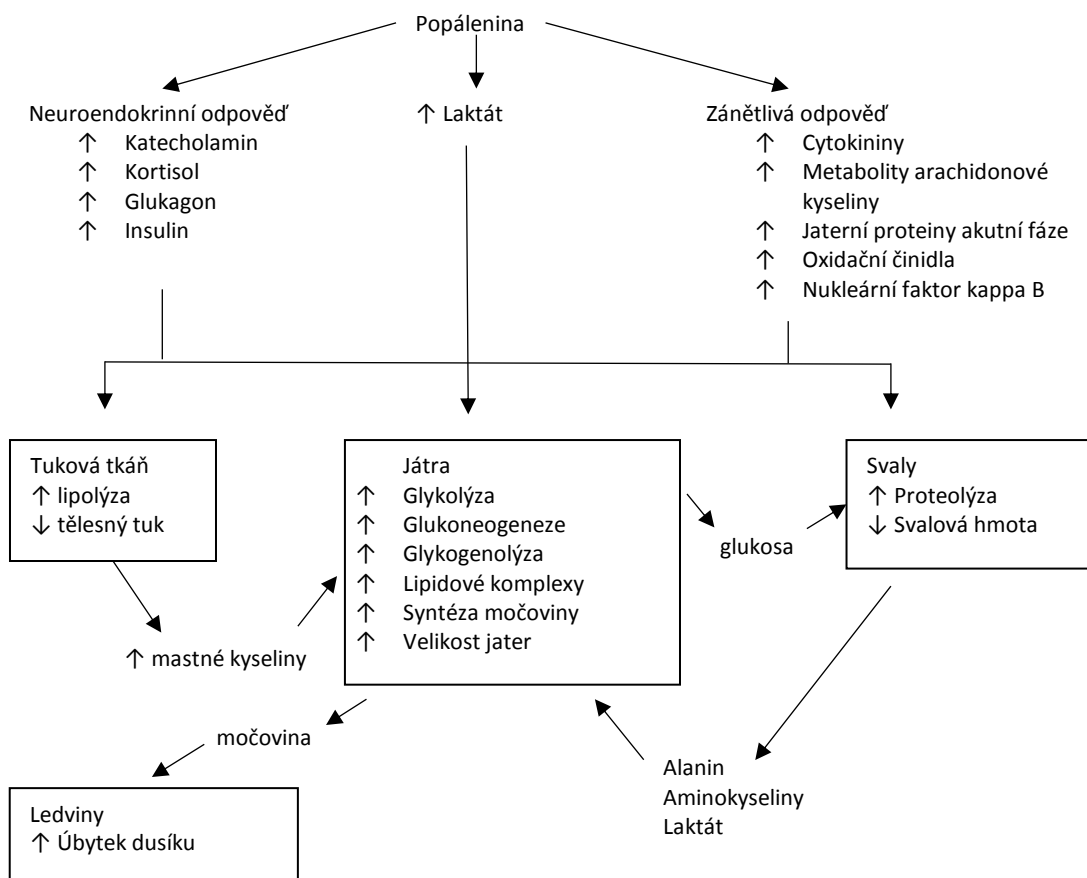
2.4.2 Metabolismus proteinů

Po popálení jsou proteiny degradovány, což vede ke ztrátě svalů a snížení hmotnosti. (Hart, 2000) Katabolismus proteinů je stimulován zvýšenou koncentrací kortisolu. Organismus se dostává do negativní dusíkaté bilance. Zdrojem dusíku je kosterní svalstvo, které se rozpadá na jednotlivé aminokyseliny. (Šimko, 1992) Aminokyseliny mohou být dále katabolizovány pro získání energie nebo přeměněny na další substráty. (Desborough, 2000) Rozpadem funkčních proteinů se zhoršuje imunita. Toto zhoršení může vést až k multiorgánovému selhání. (Königová, 2010)

2.4.3 Metabolismus tuků

Tuky – triacylglyceroly – jsou v důsledku hormonálních změn převáděny lipolýzou na glycerol a mastné kyseliny. Lipolýza je stimulována kortizolem, katecholaminy a

růstovým hormonem, inhibována je přítomností insulinu. Výsledkem je zvýšená mobilizace triacylglyceridů. Lipolýzou vznikající glycerol je substrátem pro glukoneogenezi. (Desborough, 2000)



Obr. 4.: Metabolická odpověď na popálení. Po popálení je zvýšená sekrece hormonů kortisolu, katecholaminů a glukagonu. Tyto hormony jsou mediátory hypermetabolické reakce organismu. (převzato z Rodriguez, 2011)

2.5 VÝŽIVA

Popáleninový úraz klade na tělo unikátní metabolické nároky. (Norman, 2003) V závislosti s rozsahem popálení dochází k přírůstku bazálního metabolismu. Klinické výsledky pacienta a jeho prognóza jsou ovlivněny nutričním stavem pacienta a jeho schopností pohotově využít energii. (Chiarelli, 1990)

Již Hippokrates varoval před podceňováním role výživy. Nutriční terapie hraje klíčovou roli v léčbě pacienta. (Mosier, 2011) Pro přežití pacientů s popáleninami je

zásadní nejen včasná enterální nutriční podpora ale také její složení. (Suri, 2006) Poskytnutí nutriční podpory s vyváženým poměrem makro a mikroživin, antioxidantů a energie je nezbytné ke snížení hypermetabolické odpovědi, optimalizaci hojení ran, zamezení katabolismu, který má devastující účinky na zdraví pacienta a ke snížení morbidity a mortality. (Rodriguez, 2011)

Při léčbě pacienta se snažíme zvolit takovou podpůrnou výživu, která zabrání ztrátě tělesné hmotnosti. 10 % úbytek původní váhy pacienta přináší značné komplikace, jako jsou imunitní dysfunkce, zpomalení hojení ran, výskyt závažných infekcí. Ztráta 40 % hmotnosti je neslučitelná se životem a vede ke smrti. (Hall, 2012; Rodriguez, 2011)

Nutriční podpora se skládá ze tří úzce souvisejících částí: vyhodnocení potřeby živin, plánování a realizace dietního režimu a sledování přiměřenosti živin. (Norman, 2003)

Parentální výživa (TNP) byla doporučována a využívána u pacientů s popáleninami v 60. a 70. letech minulého století. Je prokázáno, že TNP je neúčinná v prevenci katabolické odpovědi na popálení. Zvyšuje stresovou odpověď, endotoxinovou translokaci a vede k zhoršení imunity sliznice. (Andel, 2003) Také zvyšuje riziko vzniku sepse v místě vpichu. (Mochizuki, 1984) V dnešní době je TNP nahrazena enterální výživou z několika důvodů. Enterální výživa přímo vyživuje střevní sliznici a přítomnost i malého množství živin v lumenu střeva stimuluje funkci střevních buněk, udržuje stavbu a normální funkci sliznice, zachovává přívod krve do střeva, snižuje propustnost střeva a chrání imunitní funkce střeva. (Andel, 2003) Aby mohla být podávána výživa enterální cestou je potřeba správná funkce zažívacího traktu. V opačném případě, když pacient není schopen tolerovat enterální způsob podání, se indikuje parentální výživa. (Nguyen, 2011)

Mezi živiny, které mohou ovlivnit hojení ran, patří makronutrienty – sacharidy, proteiny a aminokyseliny, lipidy a mikronutrienty – vitamíny A, C, B komplex, D a minerály Se, Zn, Cu a Fe. (Brown a Phillips, 2010)

Jak uvádí Hall (2012) nejlepším řešením hypermetabolismu je podávání výživy bohaté na sacharidy. Glukosa je preferována jako zdroj energie u těžce zraněných pacientů. Rychlost oxidace glukosy jako zdroj energie je až 5 mg/kg/min. (Watters, 2007) Napomáhá udržet vysokou metabolickou aktivitu potřebnou pro regeneraci

organismu. (Brown, 2010) S vysoce kalorickou výživou je spojena hyperglykemie, která představuje značné komplikace. Sacharidy obvykle představují 50 – 60 % celkového energetického příjmu, tj. 5-7 g/kg/den. (Konigová, 2010)

Ve srovnání se sacharidy jsou tuky dvojnásobně bohatší na energii, avšak u pacientů s popáleninovým zraněním jsou špatným zdrojem energie. Důvodem jsou specifické metabolické změny. Vyšší koncentrace tuků zvyšuje riziko vzniku infekčních komplikací. (Rodriguez, 2011) Doporučená dávka tuků by neměla překročit 30 % energie, 1-1,5 g/kg/den. (Berger, 2009) Podle Bergera (2009) druh mastné kyseliny nehraje významnou roli. Nové poznatky ukazují, že složení podávaného tuku může být důležitější než jeho množství. Omega-3 mastné kyseliny z rybího tuku jsou spojované se zlepšením imunitní odpovědi a redukcí hyperglykémie. Omega-6 mastné kyseliny jsou prekurzorem pro syntézu protizánětlivých cytokinů. (Herndon, 2012b) Tuků poskytují energii pro proliferaci a tvorbu buněk epidermálních a dermálních tkání. Jsou důležité pro syntézu buněčných membrán, epidermálních fosfolipidů, intracelulární matrix a pro zánětlivé reakce. (Brown, 2010)

Štěpení svalových proteinů je hlavním problémem u těžce poraněných pacientů. Během prvních 10 dnů dochází k ztrátě až 2/3 kosterního svalstva. (Berger, 2009) Katabolismus proteinů přesahuje 150 g/den, což je téměř půl kila kosterního svalstva. (Herndon, 2012) Podle Watters (2007) může pacient se sepsí, pokud mu není podávána žádná výživa, ztratit až 250 g svalové hmoty za den. Aktuální doporučení denní dávky proteinů je 1,5 – 2 g/kg pro dospělého člověka, u dětí 2,5 – 3 g/kg/den. (Cunningham, 1990; Elia, 1990; Berger, 2009) Proteiny jsou důležité pro růst tkání, obnovu buněk, hojení ran a imunitu. (Brown, 2010)

Dalšími důležitými živinami u těžce zraněných pacientů jsou aminokyseliny glutamin a arginin. Glutamin, nejhojněji zastoupená aminokyselina v těle (Watters, 2007) je hlavním zdrojem energie pro tvorbu buněk střevní sliznice, která je hlavním místem patofyziologických procesů u závažných onemocnění a je důležitá pro funkci T-lymfocytů a makrofágů. (Peck, 1999; Peng 2005) Glutamin je také prekurzorem glutathionu, nejdůležitějšího antioxidantu v těle. (Peng, 2004) U zdravých jedinců je glutamin považován za neesenciální aminokyselinu, během popálení je syntéza glutaminu nedostatečná a stává se podmíněně esenciální. (Mittendorfer, 1999) Arginin je stejně jako glutamin neesenciální aminokyselinou pro zdravého člověka, ale po

zranění se stává esenciální. (Watters, 2007; Berger, 2009) Arginin zvyšuje tvorbu T-lymfocytů, stimuluje syntézu oxidu dusného a je nezbytný pro adekvátní hojení ran. (Stechmiller, 2004; Popovic, 2007; Herndon, 2012) Doporučená denní dávka argininu je 30g. (Berger, 2009)

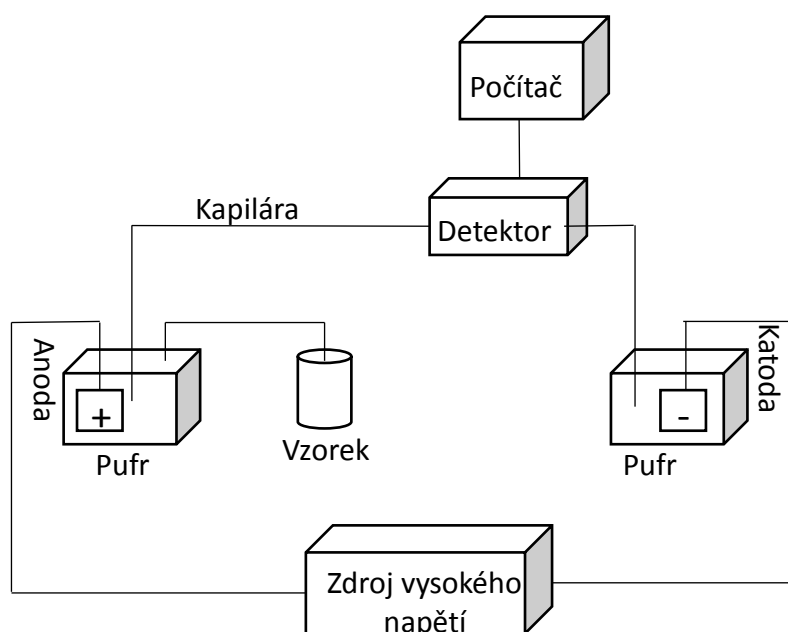
Mezi mikronutrienty řadíme vitamíny a stopové prvky. Vitamín C hraje důležitou roli při hojení ran, usnadňuje syntézu a příčné spojování kolagenu a má antioxidační efekt. (Rodriguez, 2011) Vitamíny rozpustné v tucích D a K jsou uloženy v tukových tkáních. Při popálení jsou vyčerpávány pomalu. (Berger, 2009) Vitamín D se podílí na příjmu a metabolismu vápníku tím, že inhibuje sekreci hormonů podílejících se na remodelaci kostí a chrupavek. V souvislosti s hojením ran není jeho funkce jasná. (Brown a Phillips, 2010) Vitamín A se podílí na obnově tkání. (Berger, 2009) Při jeho nedostatku je zpožděna syntéza kolagenu a snížena jeho stabilita a zvýšena náchylnost k infekcím. (Brown a Phillips, 2010) Vitamíny skupiny B jsou rychle vyčerpány v důsledku změn metabolismu sacharidů. (Berger, 2009) Komplex vitamínu B podporuje proliferaci buněk, udržuje zdravou pleť, zvyšuje funkci imunitního a nervového systému. (Brown Phillips, 2010) Stopové prvky: Železo je důležitým kofaktorem u proteinů zajišťující přenos kyslíku. Měď, je nezbytná pro syntézu kolagenu a hojení ran. Podle Clarka (2000) je zinek důležitou součástí nutriční podpory. Zinek je kofaktorem enzymatických systémů důležitých při hojení ran. Dále je nezbytný pro imunitu, dělení buněk, DNA replikaci a syntézu proteinů. Selen je esenciální pro aktivitu glutathion peroxidasy. Vychytává volné radikály a tím chrání biologické membrány. (Berger, 2009; Brown a Phillips, 2010; Rodriguez, 2011)

2.6 METODY

2.6.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza označována také jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) je moderní elektromigrační separační metoda, která umožňuje rychle a efektivně oddělit, identifikovat a kvantifikovat nabitě i nenabitě složky směsi, neboť zahrnuje několik separačních technik, které se liší mechanismem separace. (Li, 1957; Coufal 2006). Je považována za nejúčinnější, nejcitlivější a nejperspektivnější analytickou metodu, protože dokáže analyzovat vzorky v nano- až pikolitrových objemech. (Kašička, 1997) Díky tomu se stává stále významnější v bioanalytickém výzkumu (biotechnologie a různé forenzní, klinické, diagnostické a genetické aplikace). (Schwartz) Princip kapilární zónové elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které se vytváří po vložení konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. (Klouda, 2003)

K separaci dochází v křemenné kapiláře, která je pokryta polyimidem. Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který zajišťuje elektrickou vodivost v celém systému. Její konce jsou ponořeny do zásobníku s elektrolytem společně s elektrodami. Vzorek se dává do vzdálenějšího konce kapiláry od detektoru (Obr. 5). (Klouda, 2003)



Obr. 5: Schéma zařízení kapilární elektroforézy.

Hlavní veličinou pohyblivosti nabitých částic je elektroforetická mobilita, jež je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Na základě rozdílné pohyblivosti dochází k oddělení jednotlivých částic. Pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná velikosti. (Kašička, 1997; Klouda, 2003)

Častým transportním jevem kapilární elektroforézy je elektroosmotický tok (EOF). (Kašička, 1997) Přítomnost tohoto jevu je také jedním z důvodů úspěšnosti této analytické metody. (Valkó, 1999) Elektroosmotický tok je hromadné proudění v kapiláře a je způsoben elektrickou dvojvrstvou vznikající na rozhraní vnitřní stěny kapiláry a elektrolytu po vložení napětí do systému. (Heiger, 2000)

Stěna kapiláry je pokryta silanolovými skupinami. Po naplnění kapiláry vhodným elektrolytem jsou silanolové skupiny disociovány ($\equiv\text{Si-OH} \rightarrow \equiv\text{Si-O}^-$) a v důsledku toho se na vnitřní stěně kapiláry vyskytuje záporný náboj. (Štulík, 2004) Negativní náboj kapiláry poté přitahuje kladné ionty elektrolytu, za účelem dosáhnout elektrické rovnováhy (neutrality). Vzniká elektrická dvojvrstva neboli Sternova vrstva. Kationty, které tvoří difúzní vrstvu, se po vložení separačního napětí pohybují směrem ke katodě a strhávají s sebou celý roztok. (Klouda, 2003)

V blízkosti stěny kapiláry se vytváří rozdílný potenciál, známý jako zeta potenciál (ζ). Je dán velikostí náboje na stěně kapiláry. Náboj je závislý na velikosti pH a iontové síle. Při vysokém pH je elektroosmotický tok větší. Naopak při nízkém pH dochází ke zpomalení elektroosmotického toku, neboť silanolové skupiny na stěně kapiláry nejsou disociovány. Zeta potenciál je nepřímo úměrný iontové síle, čím je iontová síla větší, tím je potenciál menší. (Heiger, 2000)

2.6.1.1 Obrácený elektroosmotický tok

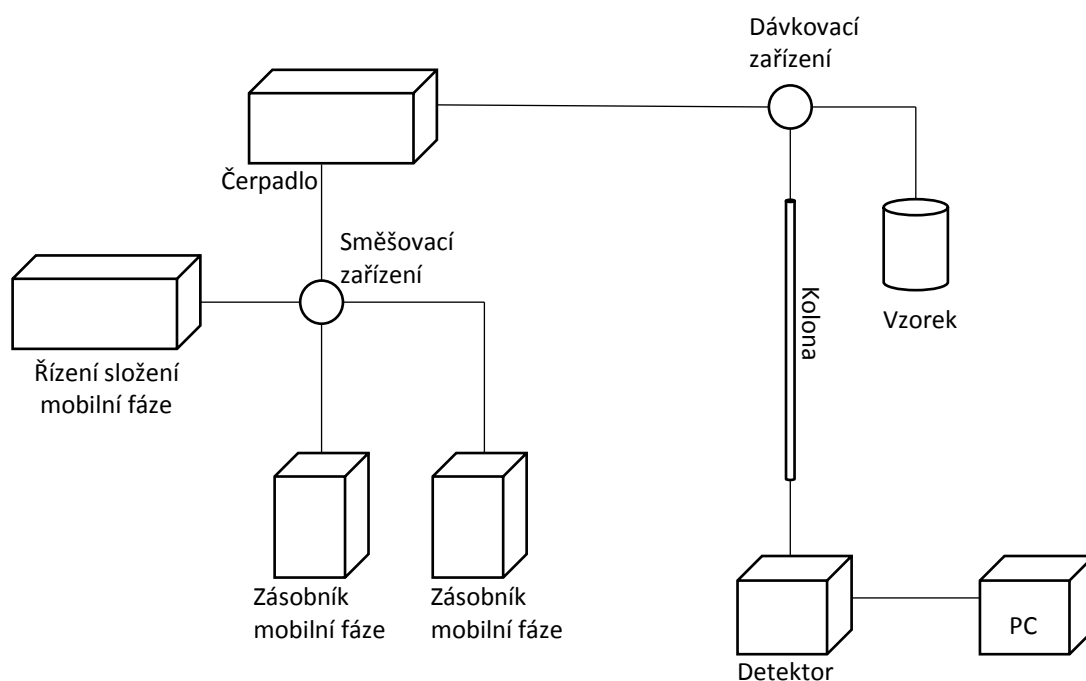
Velikost a směr elektroosmotického toku můžeme změnit pomocí povrchově aktivní látky jakou je CTAB. CTAB je kvartérní amoniová sůl, která se řadí mezi kationtové detergenty. Kladně nabitý konec CTABu interaguje se záporně nabitou silanolovou skupinou na stěně kapiláry. Hydrofobní část CTABu se spojí s hydrofobní částí další molekuly CTAB, takže se na stěně kapiláry vytvoří kladný náboj. Kladně nabitý povrch přitahuje záporně nabitě části elektrolytu. Vzniká elektrická dvojvrstva, jejíž difúzní vrstva se pohybuje spolu s elektrolytem k anodě.

2.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (High-performance liquid chromatography) je v současné době nejpoužívanější separační analytickou metodou v rutinních i vývojových laboratořích. (Nováková, 2013)

Princip spočívá v rozdělení látek mezi stacionární a mobilní fází. O separaci jednotlivých složek směsi nerozhoduje pouze jejich interakce se stacionární fází, ale také použitá mobilní fáze a její správný postup přípravy. (Klouda, 2003; Nováková, 2013)

Existuje celá řada separačních chromatografických technik, kde se využívají různé způsoby separace – adsorpce, iontová výměna, rozdělení na základě různé rozpustnosti, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce. (Klouda, 2003) Podle látek, které budeme separovat, volíme chromatografický systém. Téměř většina nízkomolekulárních látek, jež jsou testovány v klinických laboratořích pomocí kapalinové chromatografie, jsou analyzovány za použití normální nebo reverzní stacionární fáze. Některé malé molekuly s fyziologickým nebo patologickým významem jsou polární nebo nabitě, a proto vyžadují reverzní fází, protože silně interagují s polární fází a jejich eluce by byla velice náročná. (Fanali, 2013)



Obr. 6.: Schéma zařízení HPLC. (Upraveno dle Klouda, 2003)

Pro analýzu nukleotidů byla vyvinuta řada metod. Nejpoužívanější metodou v biochemické praxi je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Obr. 6). V posledních letech se pro separaci látek v biologickém materiálu do popředí dostává kapilární elektroforéza. CE je vhodná pro měření analytů rozpustných ve vodě z několika důvodů: všechny typy sloučenin mohou být analyzovány bez předchozí derivatizace, úprava vzorku je rychlá a jednoduchá. (Sato, 2004) Výhody CE oproti HPLC jsou krátká doba analýzy, potřeba jen malého množství vzorku, málo odpadu, snadná příprava separačního prostředí, snadné odstranění všech látek z předchozí analýzy, účinnost a jednoduchost systému, rychlý vývoj metody. (Wallingford, 1989; Ng, 1992; Iqbal, 2005) Nevýhodou CE jsou menší reprodukovatelnost, opakovatelnost a horší limity detekce. (Geldart, 1998)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHEMIKÁLIE

Kyselina citrónová (99 %), kyselina γ -amino máselná (GABA), methanol, cetyltrimethylamonium bromid (CTAB, 99 %), 1 mol/l hydroxid sodný a kyselina trichloroctová (TCA, 99 %) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diethylether je od firmy Penta (Ing. Petr Švec, Praha, ČR). Voda byla deionizována přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA).

Adenosin 5'-difosfát (AMP), adenosin 5'-trifosfát (ATP), cyklický adenosin 3,5 monofosfát (cAMP), guanosin 5'-monofosfát (GMP), guanosin 5'-difosfát (GDP), guanosin 5'-trifosfát (GTP), inosin 5'-monofosfát (IMP), inosin 5'-difosfát (IDP), inosin 5'-trifosfát (ITP), thymidin 5'-monofosfát (TMP), thymidin 5'-difosfát (TDP), thymidin 5'-trifosfát (TTP), uridin 5'-monofosfát (UMP), uridin 5'-difosfát (UDP), uridin 5'-trifosfát (UTP), cytidin 5'-difosfát (CDP), uridin 5'-trifosfát (UTP), β -nikotinamid adenin dinukleotid redukovaná forma (NADP) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

K analýze byla použita kapilární elektroforéza, vybavená automatickým systémem pro nástřik vzorku a UV-VIS detektorem diodového pole (HP^{3D} CE, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) a HPLC. Dále byly využity běžné přístroje a pomůcky pro chemickou laboratoř jako digitální váhy, ultrazvuk, centrifuga, pH metr.

3.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro analýzu byla použita krev od 57 pacientů. 10 vzorků bylo od zdravých dárců, 47 od pacientů s různým rozsahem popálení. Krev byla odebírána v den úrazu u těch pacientů, kde to jejich stav dovolil. U pacientů s těžším popálením byly vzorky odebrány 3. den po úrazu. Odběr vzorků byl do K2 EDTA zkumavek. Vzorky byly před úpravou zmrazeny na -80°C . Veškeré vzorky pocházely od pacientů z Popáleninového centra Fakultní nemocnice v Ostravě. Se vzorky bylo nakládáno jako s potencionálně

infekčním materiálem a byly dodržovány všechny bezpečnostní postupy a nařízení. Etická komise FN Ostrava udělila souhlas k použití vzorků i celé studii.

3.4 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Biologický materiál byl před analýzou upraven. Bylo provedeno rychlé rozmrazení vzorku a následná deproteinace kyselinou trichloroctovou (TCA). 30 μ l vzorku bylo smícháno se 60 μ l 1mol/l trichloroctové kyseliny a směs byla promíchána na vortexu. Směs byla vložena na 30 s do ultrazvuku a poté centrifugována po dobu 1 minuty při 5000 g. Následovala extrakce. K supernatantu bylo přidáno 1,8 ml diethyletheru, roztok byl promíchán na vortexu a poté byla odstraněna vodná fáze. Extrakce se opakovala dvakrát. Po extrakci byla okamžitě provedena analýza vzorku, protože vzorek se do 30 minut rozkládá.

3.5 SMĚS STANDARDŮ

Jako srovnávací vzorek byla použita směs 18 nukleotidů (adenosin 5'-difosfát, adenosin 5'-trifosfát, cyklický adenosin 3,5 monofosfát, guanosin 5'-monofosfát, guanosin 5'-difosfát, guanosin 5'-trifosfát, inosin 5'-monofosfát, inosin 5'-difosfát, inosin 5'-trifosfát, thymidin 5'-monofosfát, thymidin 5'-difosfát, thymidin 5'-trifosfát, uridin 5'-monofosfát, uridin 5'-difosfát, uridin 5'-trifosfát, cytidin 5'-difosfát, uridin 5'-trifosfát, β -nikotinamid adenin dinukleotid redukovaná forma).

3.5.1 Příprava standardů

Jednotlivé nukleotidy byly naváženy a naředěny destilovanou vodou na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Nukleotidy byly smíchány do roztoku o výsledné koncentraci 0,1mg/ml.

3.6 PŘÍPRAVA ELEKTROLYTŮ

Základní elektrolyt byl připraven smícháním odpovídajícího množství kyseliny citrónové a deionizované vody. Za stálého míchání a měření pH bylo upraveno pH na

požadovanou hodnotu 4,4 postupným přidáváním kyseliny γ -amino máselné (GABA) do roztoku kyseliny citrónové. Následně byl přidán cetyltrimethylammonium bromid (CTAB). Výsledný elektrolyt byl 40 mmol/l citrátový pufr s 0,8 mmol/l CTAB.

3.7 INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY

Analýzy byly prováděny na přístroji HP^{3D} CE s UV-Vis detektorem diodového pole (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) (Obr. 7). Signály byly zpracovány v programu Agilent 35900E dvoukanálovém A/D převodníkem (Agilent Technologies). Byla použita křemenná kapilára (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA) o celkové délce 33 cm s efektivní délkou do UV detektoru 24,5 cm a o vnitřním průměru 50 μ m. (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Kazeta s kapilárou byla temperována na 25 °C. Aplikované separační napětí bylo – 20 kV.

Před každým měřením byla kapilára promyta 1 mol/l NaOH po dobu 2 minut, deionizovanou vodou po dobu 2 minut a poté 3 minuty 40 mmol/l citátovým pufrém s 0,8 mmol/l CTAB. Vzorek byl dávkován 50 bary po dobu 5 sekund.



Obr. 7: Fotografie přístroje HP^{3D} CE, Agilent Technologies.

4 VÝSLEDKY

4.1 POPIS VZORKŮ

Tab. 2: Základní informace o pacientech: pohlaví, věk, hmotnost. Kontroly byly v rozmezí od 25 do 40 let s průměrnou hmotností nevykazující nadváhu ani anorexii.

Vzorek číslo	Popis	Pohlaví	Věk [roky]	Hmotnost [kg]
1	pacient	M	53	84
2	pacient	Ž	67	56
3	pacient	Ž	42	54
4	pacient	M	43	92
5	pacient	M	58	108
6	pacient	Ž	65	58
7	pacient	Ž	44	65
8	pacient	Ž	25	72
9	pacient	Ž	28	54
10	pacient	M	59	74
11	pacient	M	50	89
12	pacient	M	54	80
13	pacient	Ž	41	78
14	pacient	Ž	31	44
15	pacient	Ž	45	65
16	pacient	M	72	87
17	pacient	Ž	48	65
18	pacient	Ž	40	58
19	pacient	M	31	67
20	pacient	M	74	66
21	pacient	M	68	75
22	pacient	Ž	36	59
23	pacient	Ž	40	52
24	pacient	Ž	43	94
25	pacient	M	68	87
26	pacient	Ž	52	63
27	pacient	M	62	95
28	pacient	M	32	85
29	pacient	Ž	29	64
30	pacient	Ž	40	55
31	pacient	M	45	72
32	pacient	M	57	106
33	pacient	M	68	68
34	pacient	M	73	86
35	pacient	Ž	80	51
36	pacient	Ž	65	54
37	pacient	M	52	70
38	pacient	M	79	84

39	pacient	Ž	43	88
40	pacient	Ž	44	104
41	pacient	Ž	51	47
42	pacient	M	50	82
43	pacient	Ž	55	61
44	pacient	Ž	33	52
45	pacient	Ž	69	50
46	pacient	Ž	40	73
47	pacient	M	54	76
48	kontrola	Ž	-	-
49	kontrola	Ž	-	-
50	kontrola	Ž	-	-
51	kontrola	M	-	-
52	kontrola	Ž	-	-
53	kontrola	M	-	-
54	kontrola	M	-	-
55	kontrola	Ž	-	-
56	kontrola	Ž	-	-
57	kontrola	Ž	-	-

Tab. 3: Procentuální rozsah popálení, místo popálení a případné nemoci pacientů. (Sledován byl diabetes z důvodu jiné probíhající studie).

Vzorek číslo	Rozsah popálení (%)	Místo popálení	Zdravotní stav pacienta
1	11	dolní končetiny	
2	8	krk + záda	diabetes
3	15	trup	
4	4	dolní končetiny	
5	15	dolní končetiny	diabetes
6	20	trup	diabetes
7	6	obličej + krk	
8	7	horní končetiny	
9	10	horní končetiny	
10	11	horní končetiny	diabetes
11	7	trup	
12	17	trup + horní končetiny	
13	8	dolní končetiny	
14	10	horní končetiny	
15	6	horní končetiny + trup	diabetes
16	18	trup + horní končetiny	diabetes
17	11	dolní končetiny	
18	7	horní končetiny	
19	5	horní končetiny	
20	25	trup + horní končetiny	diabetes
21	24	trup + horní končetiny	
22	11	dolní končetiny	

23	7	horní končetina + trup	
24	5	horní končetiny	
25	14	horní končetiny + trup	
26	6	horní končetiny	
27	11	trup + dolní končetiny	
28	9	dolní končetiny	
29	8	dolní končetiny	
30	14	trup + dolní končetiny	
31	19	trup + dolní končetiny	
32	10	trup + dolní končetiny	diabetes
33	10	hlava + krk + trup	
34	15	trup + horní končetiny	diabetes, infarkt*
35	17	trup + horní končetiny	diabetes
36	22	trup + horní končetiny	
37	18	dolní končetiny + trup	
38	8	trup + horní končetiny	diabetes
39	7	horní končetiny	
40	14	hlava + krk + trup	
41	17	trup + dolní končetiny	
42	31	trup + dolní končetiny	
43	15	trup + horní končetiny	diabetes
44	13	trup + horní končetiny	
45	13	hlava + krk + trup	
46	14	trup + horní končetiny	
47	6	dolní končetiny	diabetes
48			
49			
50			
51			
52		bez symptomů	
53			
54			
55			
56			
57			

* Infarkt byl příčinou vzniku popálení.

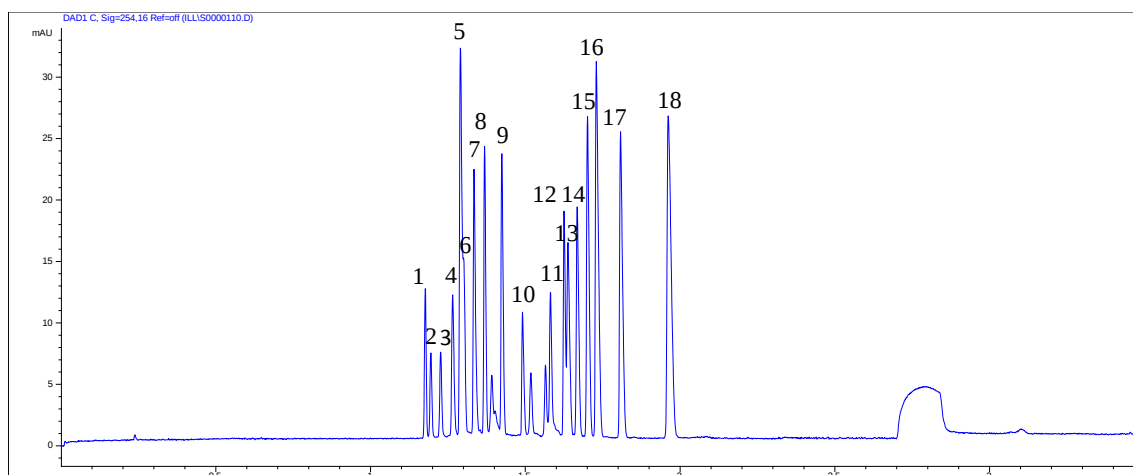
Tab. 4: Příčina vzniku popálenin.

Vzorek číslo	Popis úrazu
1	popálení při pálení listí, zahoření oděvu
2	chycení šátku na krku od ohně při vaření
3	exploze karmy
4	převržení rozpáleného oleje při vaření
5	zahoření postele, usnutí s cigaretou
6	exploze plynu s požárem
7	úraz, vystříknutí rozpáleného oleje

8	převržení vařící vody dítětem na matku
9	spalování odpadu, přidání láhve s neznámým obsahem, která explodovala
10	zahoření oděvu při zapalování svíčky
11	převržení oleje při smažení
12	popálení při pálení odpadu a listí, chycení oděvu
13	popálení při pálení listí, chycení kalhot
14	popálení při neodborné manipulaci s hořlavinou
15	úraz, popálení při přikládání do kotle
16	popálení při pálení odpadu na zahradě, zahoření oděvu
17	požár automobilu při nehodě
18	převržení vařící vody při vaření
19	převržení vařícího oleje při smažení
20	zahoření oděvu při zapalování adventního věnce
21	exploze při manipulaci s otevřeným ohněm a tlakovou lahví
22	popálení při přípravě ohňostroje
23	zahoření oděvu od kamen
24	popálení horkou vodou, převržení hrnce
25	zahoření oděvu od plamene při vaření
26	úraz při vaření, převržení hrnce
27	exploze propan-butanové láhve
28	zahoření oděvu od krbu
29	zahoření oděvu od krbu
30	popálení při manipulaci s vysokoteplotní pecí
31	exploze domácího vyrobené petardy
32	exploze při manipulaci s náplněmi do zapalovačů
33	zahoření oděvu od svíčky
34	vaření na plynu, infarkt, zahoření oblečení
35	požár bytu, zahoření záclon
36	exploze plynu, požár
37	úraz při lakování auta, požár
38	úraz při spalování listí, zahoření oděvu
39	popálení od rozpáleného oleje při vaření
40	zahoření oděvu při přípravě jídla
41	exploze při spalování neznámých věcí
42	exploze plynu s požárem
43	popálení od přímotopu, zahoření oděvu
44	exploze při spalování neznámých věcí
45	zahoření šátku přes hlavu od plamene při vaření
46	zahoření oděvu při manipulaci s otevřeným ohněm
47	zahoření oděvu při rozdělávání ohně

4.2 ANALÝZA SMĚSI NUKLEOTIDŮ

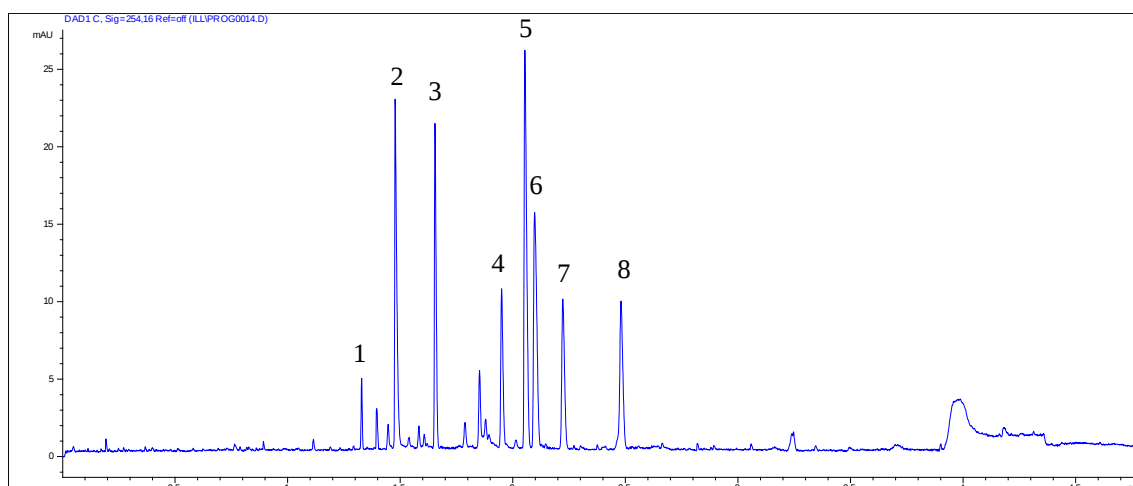
Bylo vybráno 18 nukleotidů mono-, di-, a trifosfátů adeninu, guaninu, cytidinu, uracilu, inosinu a NADP jako cílová skupina testovaných sloučenin. Pořadí nukleotidů bylo určeno na základě porovnání velikosti píků mezi spikovanými a nespikovanými vzorky.



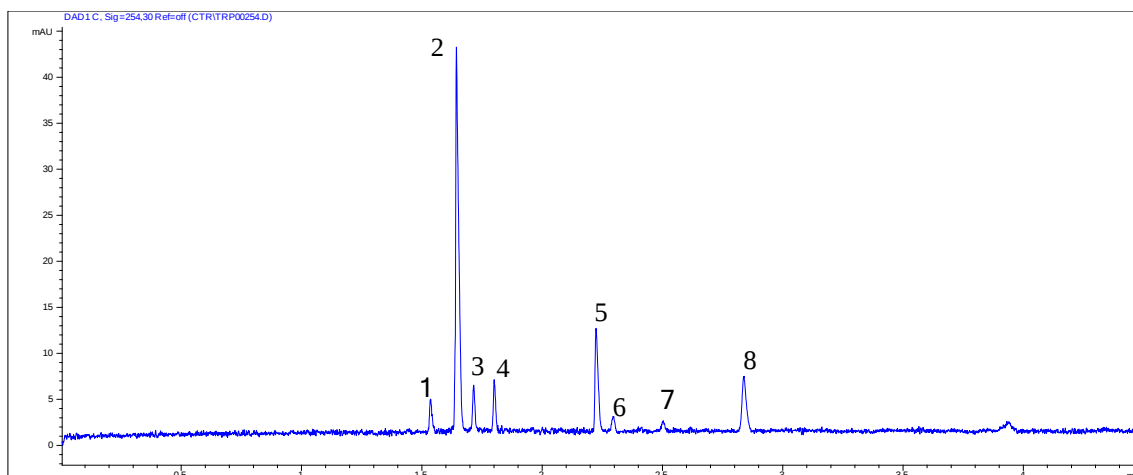
Obr. 8.: Separace směsi standardů 18 nukleotidů. Separační podmínky: 40 mmol/l citrátová pufr, GABA, pH 4, 0,8 mmol/l CTAB, kapilára: 24,5/33 cm, průměr 50 μ m, napětí: -20 kV, UV detekce 254 nm. Píky: 1=TDP, 2=UTP, 3=CTP, 4=TTP, 5= ITP, 6=GTP, 7=UDP, 8=ATP, 9=IDP, 10=ADP, 11=GDP, 12=CDP, 13=UMP, 14=NADP, 15=TMP, 16=cAMP, 17=IMP, 18=GMP.

4.3 ANALÝZA VZORKŮ A IDENTIFIKACE LÁTEK

Celkem bylo analyzováno 57 vzorků. Píky byly identifikovány na základě porovnání migračního času. Před každým vzorkem byl změřen vzorek se směsí standardů a poté byl analyzován reálný vzorek.



Obr. 9.: Příklad analýzy reálného vzorku (vzorek č. 5). Separační podmínky stejné jako u Obr. 8. Píky: 1=TDP, 2=GTP, 3=IDP, 4=GDP, 5=TMP, 6=cAMP, 7=IMP, 8=GMP.



Obr. 10: Příklad analýzy reálného vzorku (vzorek č. 28). Separační podmínky stejné jako u Obr. 8. Píky: 1=UTP, 2=GTP, 3=ATP, 4=IDP, 5=TMP, 6=cAMP, 7=IMP, 8=GMP.

4.4 KONCENTRACE NUKLEOTIDŮ V ERYTROCYTECH U ZDRAVÝCH JEDINCŮ

Koncentrace nukleotidů v erytrocytech zdravých jedinců byla vypočtena na základě přímého porovnání plochy píků daného nukleotidu ve standardu a ve vzorku. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Hladina nukleotidů v erytrocytech zdravých jedinců

analyt	koncentrace (μmol/l)	SD
ATP	55	33
IMP	199	78
GMP	66	19

4.5 STANOVENÍ OPAKOVATELNOSTI METODY

Byla sledována opakovatelnost ploch píků v reálných vzorcích (viz Tab. 6).

Tab. 6: Opakovatelnost ploch píků pro reálné vzorky.

vzorek	1	2	3	4	5	6	7
nukleotid	opakovatelnost ploch píků (% RSD)						
TDP					0,67		
UTP							
CTP							
TTP							0,00
ITP		2,11					1,06
GTP					0,56		
UDP							
ATP	0,79	1,59		2,39		2,70	
IDP		2,70	2,79		2,62		0,66
ADP		0,00					
GDP			1,13		0,84		
CDP							
UMP							
NADP				1,34			2,81
TMP				0,60	1,63		2,78
cAMP	2,19	1,65	1,11	2,18	1,56	2,84	
IMP		3,02	3,41		2,92	1,86	0,09
GMP		0,67	2,09	3,01	2,63		

vzorek	8	9	10	11	12	13	14
nukleotid	opakovatelnost ploch píků (% RSD)						
TDP		2,22	2,34				
UTP							
CTP							
TTP							1,03
ITP		1,54	3,07				
GTP	1,40	2,50	2,95				
UDP	3,02						
ATP	1,99	2,86		0,55	2,39		1,99
IDP	2,24		2,09		1,88		
ADP		1,84	2,38				1,60
GDP			2,82				
CDP							
UMP							
NADP		2,02	1,83				1,94
TMP		2,80		2,53			2,11
cAMP	0,34	1,18		1,67		2,81	1,49
IMP			1,48	2,58		2,92	
GMP	0,66	1,34					

vzorek	15	16	17	18	19	20	21
nukleotid	opakovatelnost ploch píkú (% RSD)						
TDP	1,65						
UTP	2,28			2,57			2,97
CTP							
TTP				2,82			
ITP							
GTP			1,59				0,86
UDP					1,82		2,33
ATP	2,63		2,70	2,06	0,06		
IDP	1,01	0,38	1,89				0,80
ADP					2,77		
GDP			2,94		0,73		
CDP							
UMP	2,37			2,67		1,06	
NADP			1,23	1,72	2,33		
TMP	2,70			3,06			
cAMP	3,07			0,95			2,35
IMP	2,15	2,89		0,00	1,75		1,70
GMP			1,55			1,85	1,37

vzorek	22	23	24	25	26	27	28
nukleotid	opakovatelnost ploch píkú (% RSD)						
TDP			0,42	2,32			
UTP		3,21		1,96		2,63	2,63
CTP							
TTP			1,64				
ITP				2,28		2,00	
GTP		2,94	1,34	2,53			2,89
UDP							
ATP	1,74		1,82		0,57		1,99
IDP							2,57
ADP		2,55	1,23				
GDP			0,94				
CDP							
UMP		2,98			0,89		
NADP	1,48		1,66		1,86		
TMP	0,24	2,70			2,41	2,13	2,04
cAMP	2,12				2,05	0,00	1,57
IMP				2,92		0,01	1,17
GMP		2,17					0,75

vzorek	29	30	31	32	33	34	35
nukleotid	opakovatelnost ploch píkú (% RSD)						
TDP							
UTP					1,13	2,26	
CTP							
TTP							
ITP		2,76	2,56	2,96	0,17		

GTP	1,89	1,75					
UDP							
ATP	2,24						
IDP	2,44	3,01		2,07			
ADP	2,15	2,84					
GDP							
CDP							
UMP							
NADP	2,67				2,18		
TMP							
cAMP	2,65				2,68		
IMP	2,57	2,55		2,58	2,06	0,41	
GMP	3,01						

vzorek	36	37	38	39	40	41	42
nukleotid	opakovatelnost ploch píkú (% RSD)						
TDP							
UTP	1,22						
CTP							2,76
TTP		2,53			2,26		
ITP	2,05						
GTP							
UDP				2,48			
ATP				2,82			
IDP						2,66	
ADP				2,99	2,56		
GDP		1,73		1,23	2,32		
CDP		2,34					
UMP		2,18	0,41	1,57			
NADP		1,69			0,00	2,49	
TMP	2,08		2,81		2,79		
cAMP	2,89		1,59			2,40	
IMP							
GMP		1,87		2,92	2,82		

vzorek	43	44	45	46	47	48	49
nukleotid	opakovatelnost ploch píkú (% RSD)						
TDP	0,12		2,23			0,71	
UTP			0,77			3,17	
CTP	2,49	2,26					
TTP			1,14				
ITP							
GTP							2,73
UDP			1,39	2,61			
ATP		3,06		2,55			1,65
IDP		0,84		1,89	2,89		
ADP							
GDP			2,76	3,12			
CDP		2,71		1,11			

UMP								
NADP	2,67					1,82		2,53
TMP								1,47
cAMP		1,15	1,70					
IMP	2,36	0,79	2,86	1,27	2,80			2,83
GMP	2,48			1,32		2,87		2,76

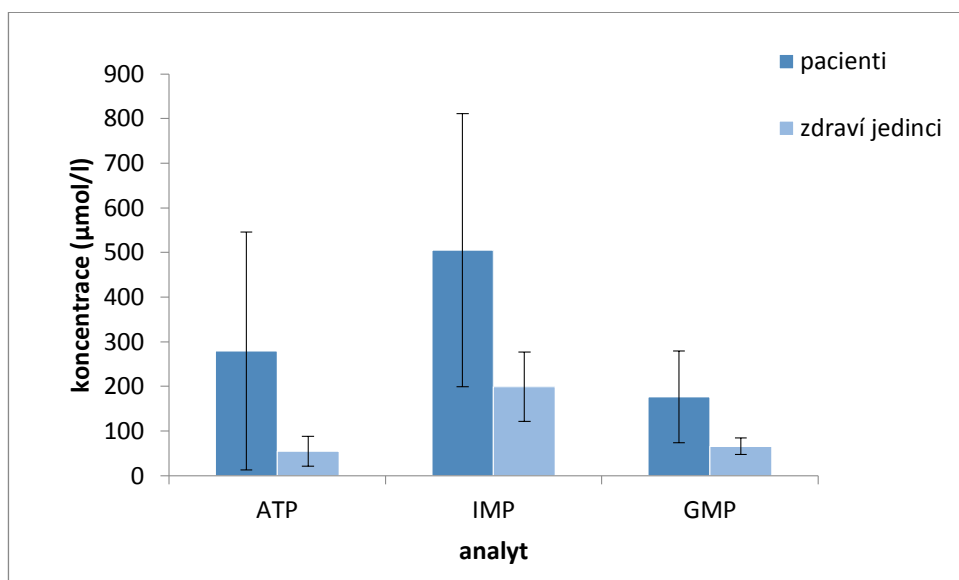
vzorek	50	51	52	53	54	55	56	57
nukleotid	opakovatelnost ploch píků (% RSD)							
TDP								
UTP								
CTP								
TTP								
ITP								
GTP	2,25							
UDP	2,26							
ATP	1,25	3,02	2,36	2,09	2,37	2,87	2,84	2,07
IDP	1,18		1,51		0,75			
ADP						1,71		2,58
GDP								
CDP								
UMP								
NADP						1,64	2,08	
TMP					1,26			
cAMP								
IMP	2,63	2,80	1,86	2,36	2,01	2,92	1,14	2,29
GMP	1,51	2,08		1,66	1,86	1,55	2,00	1,57

Opakovatelnost ploch píků byla stanovena na základě čtyř měření jednotlivých vzorků. Ze získaných dat můžeme usoudit, že kapilární elektroforéza vykazuje dobrou opakovatelnost pro stanovení koncentrace vybraných nukleotidů v reálných vzorcích. Opakovatelnost ploch píků byla ve většině případů nižší než 3 % RSD. Pouze u jednoho ze vzorků dosahovala RSD 3,41 %.

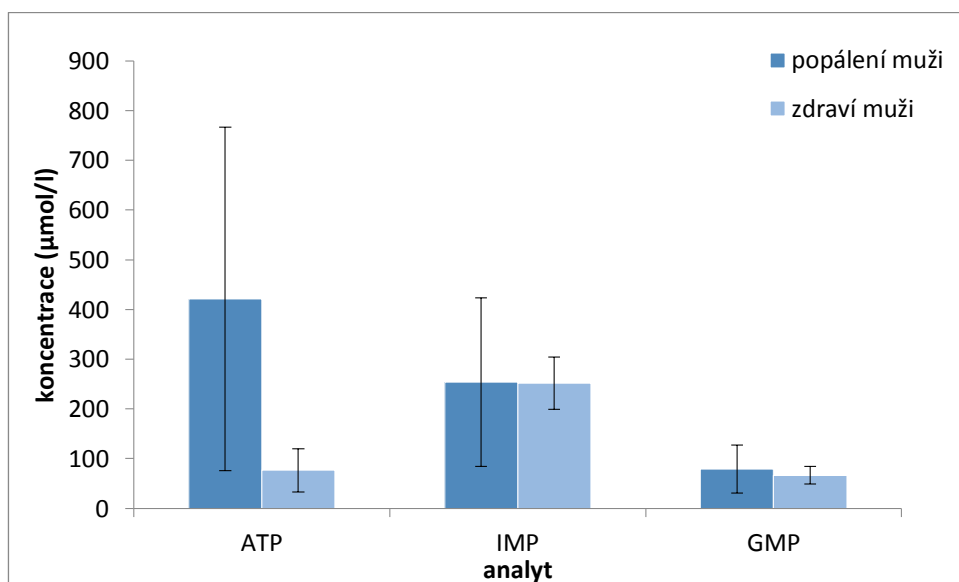
4.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Bylo analyzováno 57 vzorků, 47 pacientů, z nichž bylo 26 žen a 21 mužů a 10 kontrol. Byly porovnávány přítomnost a koncentrace jednotlivých nukleotidů u zdravých jedinců a pacientů. Dále se zjišťovalo, zda má na koncentraci nukleotidů u popálených pacientů vliv pohlaví, věk, hmotnost, rozsah popálení, místo poranění, přítomnost diabetu nebo jiného onemocnění. Porovnávány byly pouze ty nukleotidy, které byly v daných skupinách minimálně ve čtyřech opakováních. V některých případech nebylo moc vzorků od různých skupin, proto je variabilita hodnot tak velká.

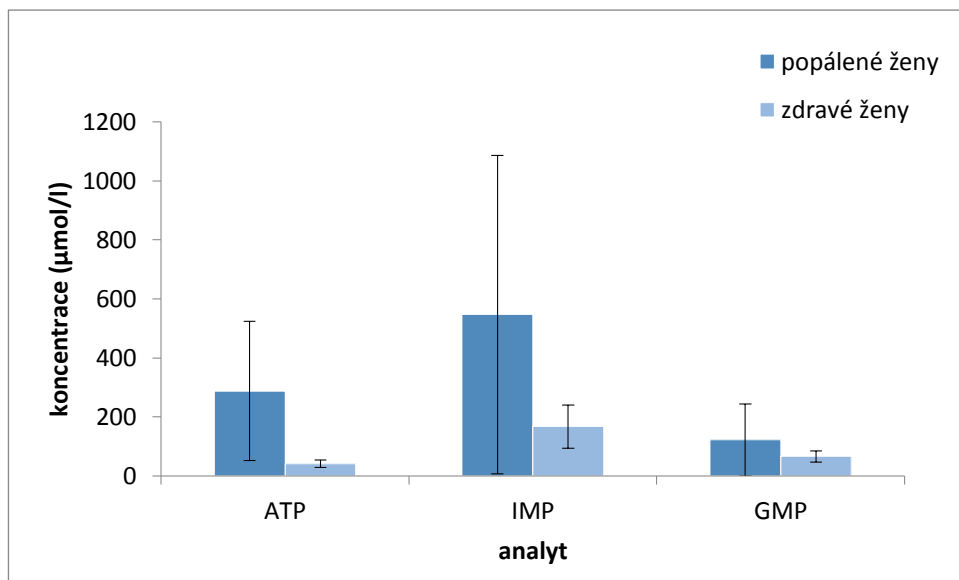
4.6.1 Vliv pohlaví



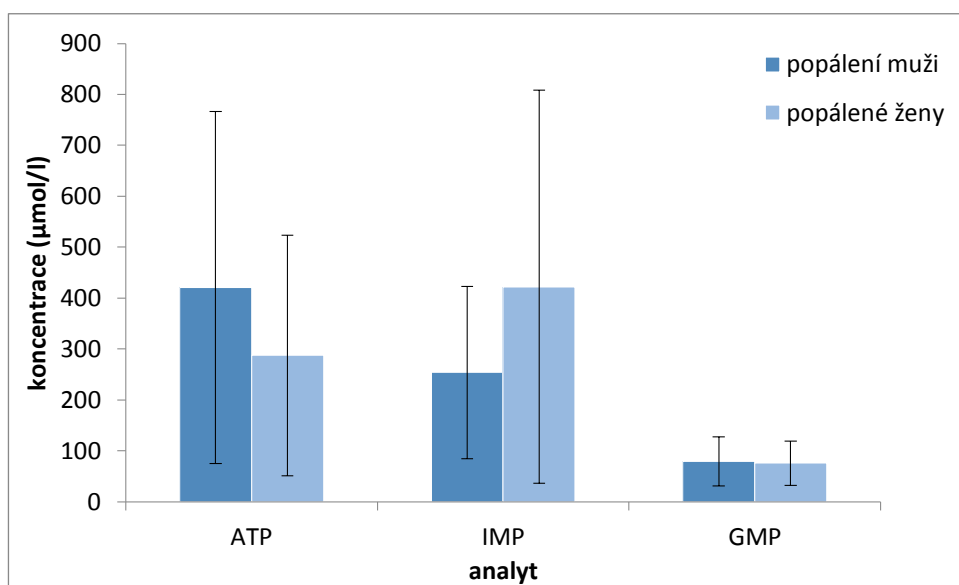
Obr. 11: Koncentrace nukleotidů ATP, IMP, GMP u všech pacientů a zdravých jedinců.



Obr. 12: Porovnání koncentrace nukleotidů ATP, IMP a GMP u popálených mužů a zdravých mužů.



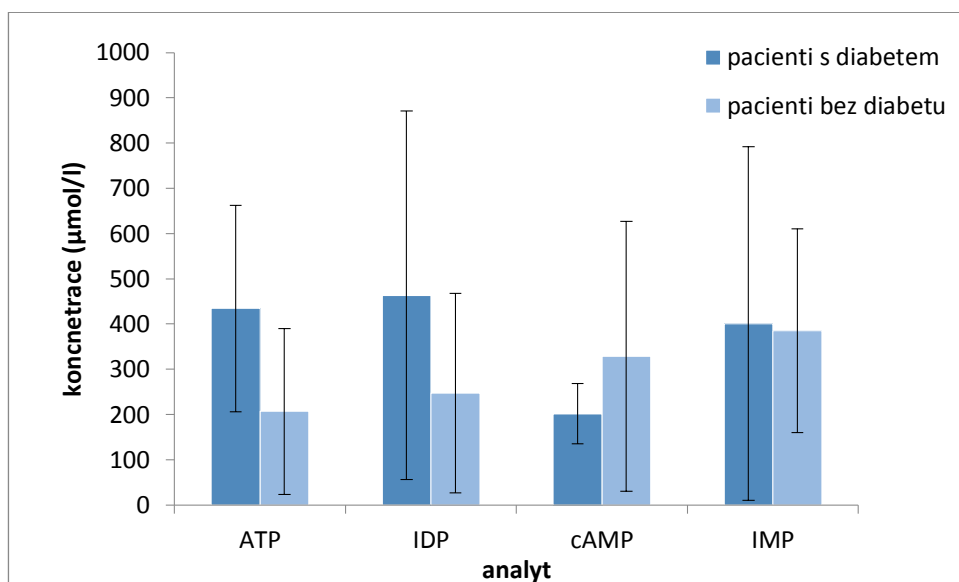
Obr. 13: Porovnání koncentrace nukleotidů ATP, IMP a GMP u popálených žen a zdravých žen.



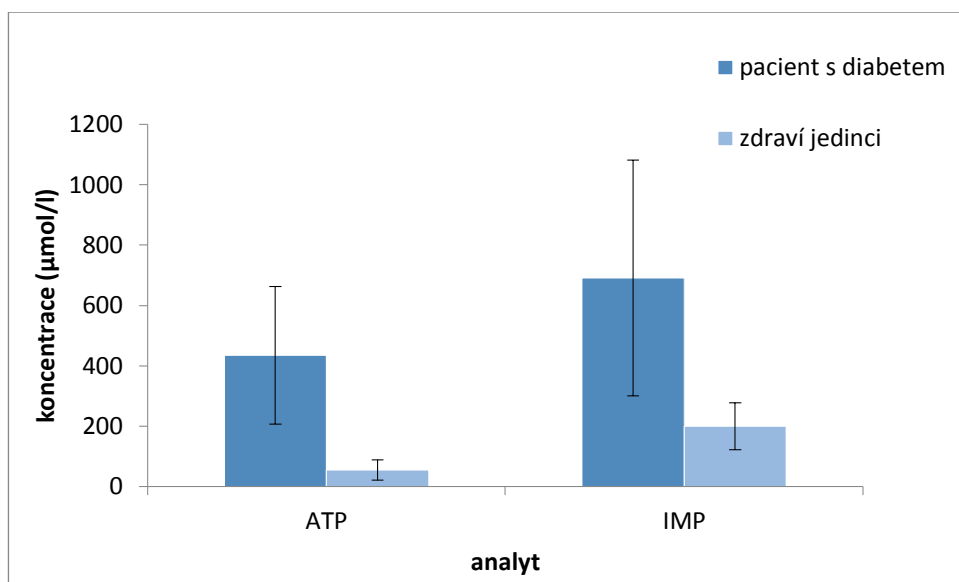
Obr. 14: Porovnání koncentrace nukleotidů ATP, IMP a GMP u popálených mužů a popálených žen.

Jak obrázky 11, 12, 13 ukazují, koncentrace nukleotidů u pacientů je ve většině případů několikrát vyšší než u zdravých jedinců. To může být dáno tím, že tyto stavy jsou energeticky velice náročné, a proto je hladina ATP bezprostředně po poranění vyšší u pacientů než u zdravých jedinců. Na grafu 14 vidíme, že pohlaví pacienta nemá na koncentraci nukleotidů větší vliv.

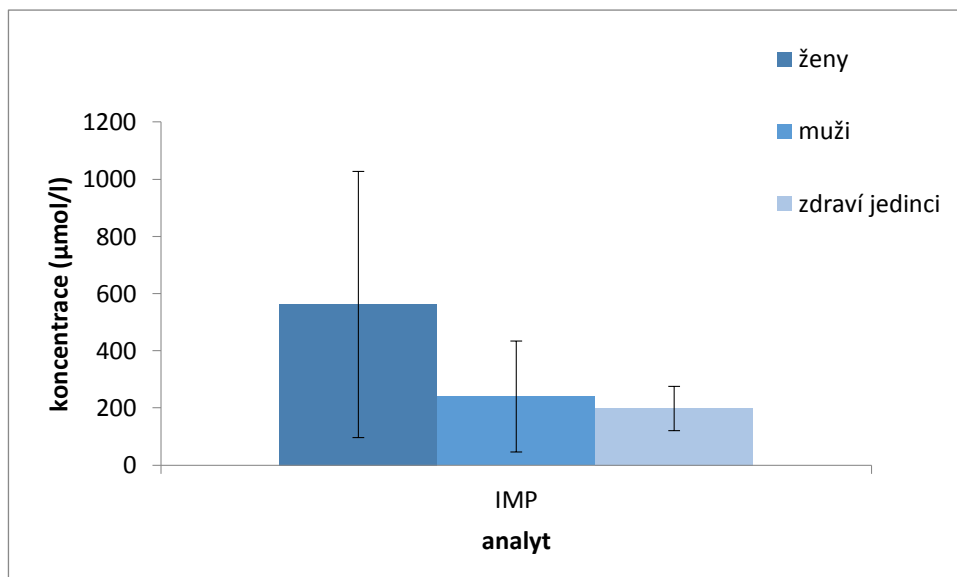
4.6.2 Vliv přítomnosti diabetu



Obr. 15: Porovnání koncentrace vybraných nukleotidů mezi pacienty s diabetem a pacienty bez diabetu.



Obr. 16: Rozdílná koncentrace nukleotidů ATP a IMP mezi pacienty s diabetem a kontrolou.

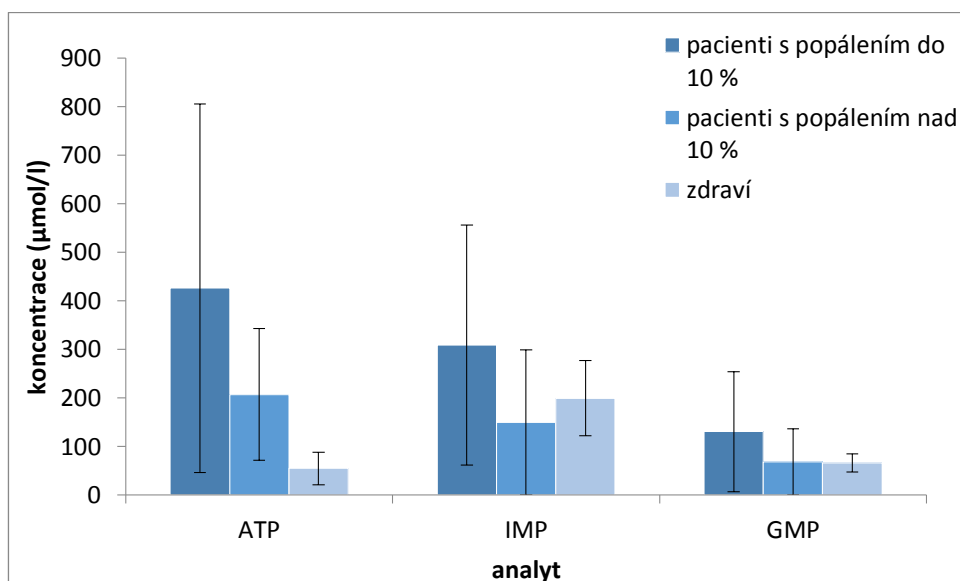


Obr. 17: Rozdílná koncentrace IMP u popálených mužů s diabetem, popálených žen s diabetem a zdravých jedinců.

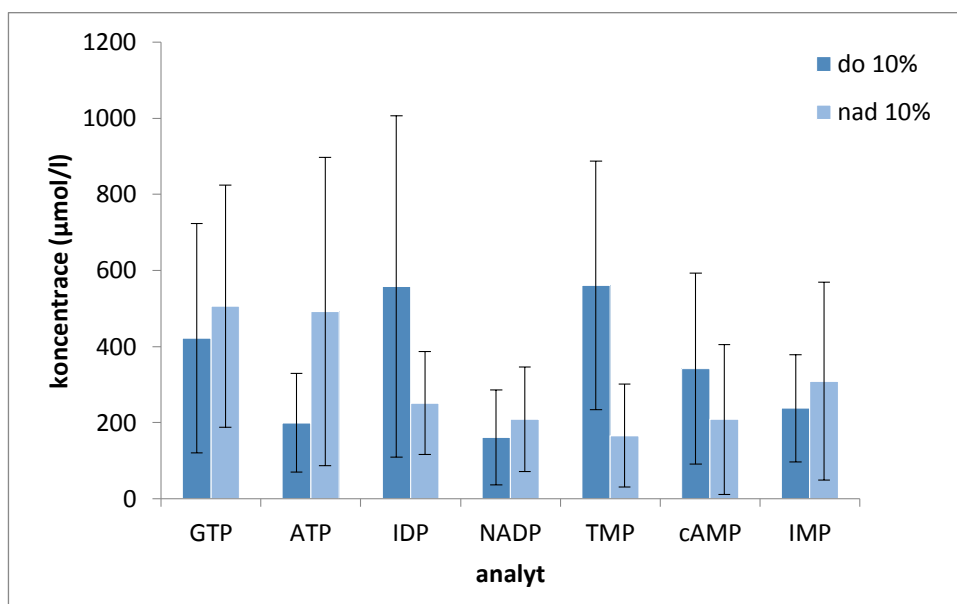
Celkem 13 pacientů, z toho 5 žen a 8 mužů, mělo diabetes melitus. Na obr. 15, kde byli porovnáváni pacienti s diabetem a pacienti bez diabetu, můžeme vidět vyšší koncentraci ATP u popálených pacientů s diabetem než u pacientů bez diabetu. Stejně tak je tomu v případě, kdy byli porovnáváni pacienti a zdraví jedinci, obr. 16. V případě porovnávání žen s diabetem x žen bez diabetu a mužů s diabetem x mužů bez diabetu nebyly pozorovány významné rozdíly. Můžeme říci, že diabetes melitus ovlivňuje koncentraci nukleotidů. Obr. 17, porovnání zdravých jedinců vůči popáleným ženám s diabetem a popáleným mužům s diabetem bylo možné pouze u nukleotidu IMP, u ostatních nukleotidů porovnání nešla provést z důvodu nedostatku hodnot.

Jeden z pacientů, který měl diabetes melitus utrpěl popáleninový úraz v důsledku infarktu. Infarkt společně s diabetem a popálením vyčerpalo organismus natolik, že u něj nebyly analyzovány žádné nukleotidy. Vzhledem k tomu, že se jednalo pouze o jednoho pacienta, nemůžeme brát tento výsledek za statisticky významný a nemůžeme provést obecné závěry o vztahu infarkt – popálení - koncentrace nukleotidů.

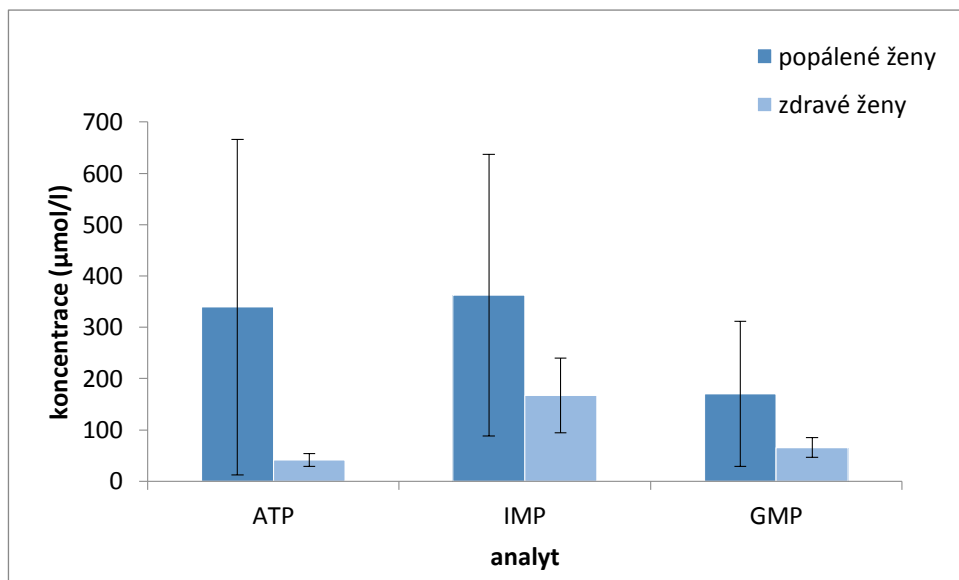
4.6.3 Vliv rozsahu popálení na koncentraci jednotlivých nukleotidů



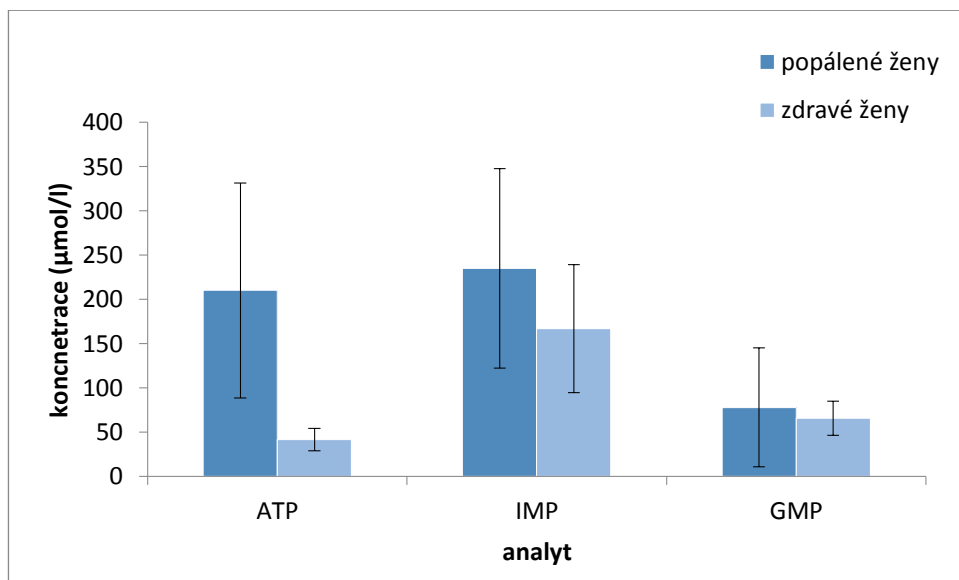
Obr. 18: Koncentrace nukleotidů ATP, IMP a GMP u pacientů s popálením v rozmezí od 4 – 10 % těla, pacientů s popálením nad 10 % povrchu těla a zdravých jedinců.



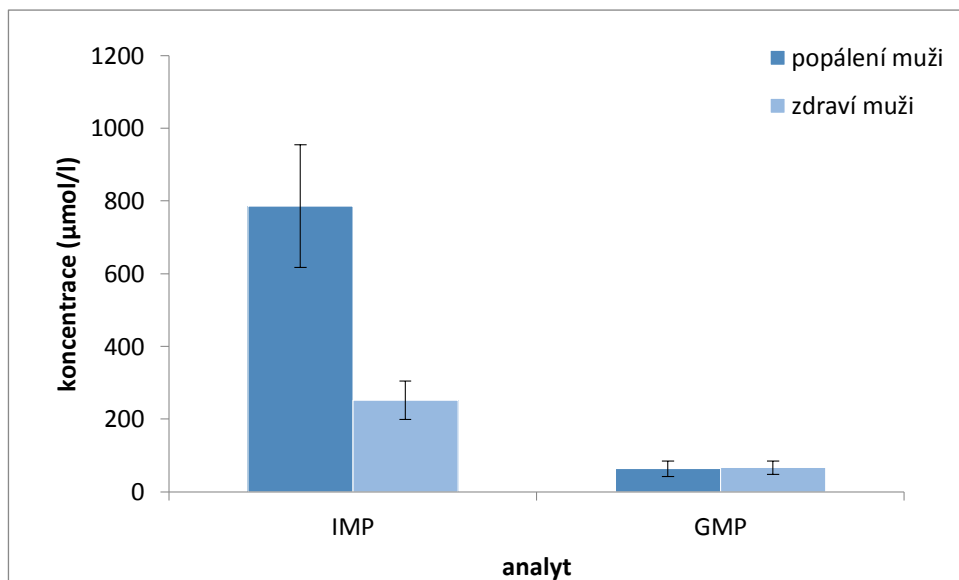
Obr. 19: Koncentrace nukleotidů u pacientů s popálením do 10 % a pacientů s popálením nad 10 %.



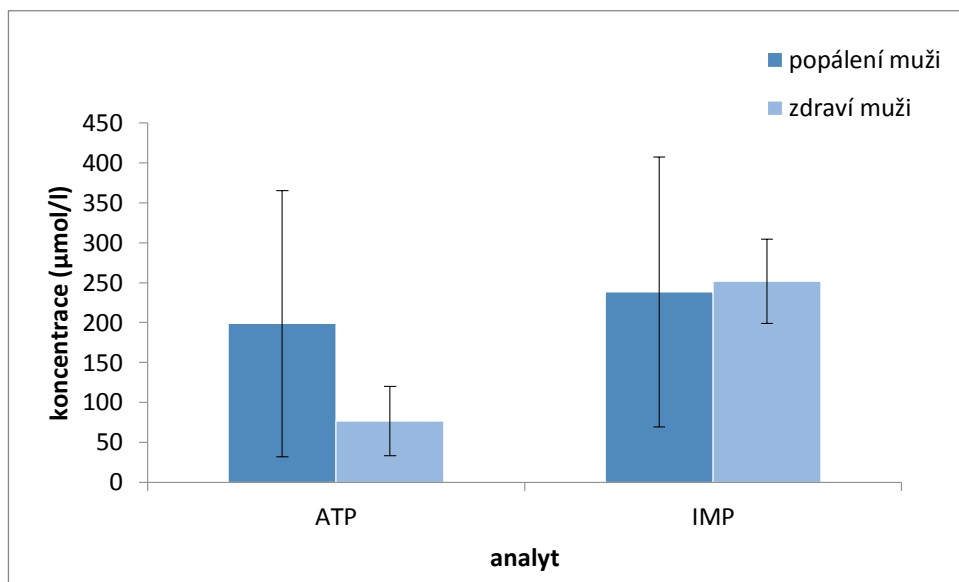
Obr. 20: Rozdílná koncentrace ATP, IMP a GMP u žen popálených nad 10 % celkového povrchu těla a zdravých žen.



Obr. 21: Rozdílná koncentrace ATP, IMP a GMP u popálených žen do 10 % celkového povrchu těla a zdravých žen.



Obr. 22: Porovnání koncentrace IMP a GMP mezi popálenými muži nad 10 % celkového povrchu těla a zdravými jedinci.

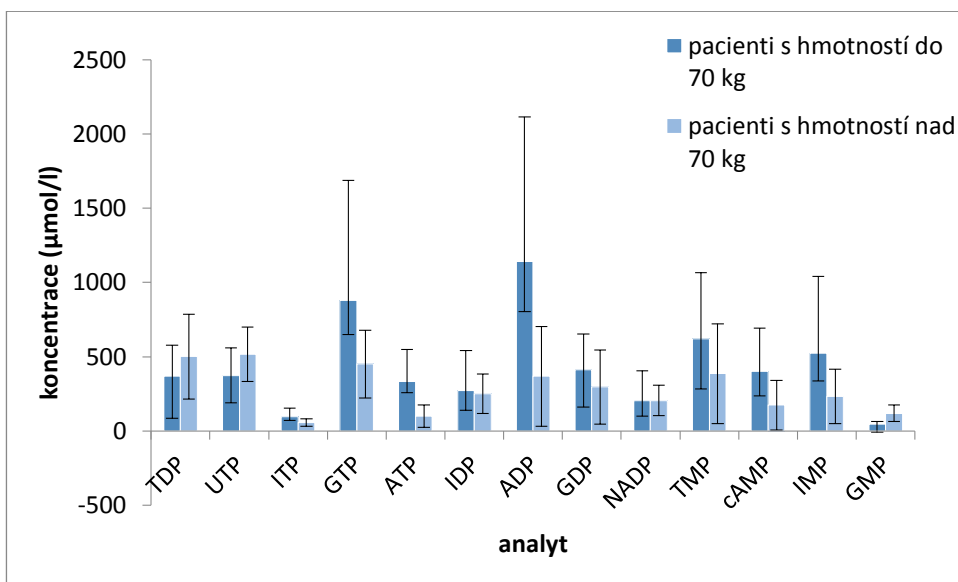


Obr. 23: Porovnání koncentrace ATP a IMP mezi popálenými muži pod 10 % celkového povrchu těla a zdravými jedinci.

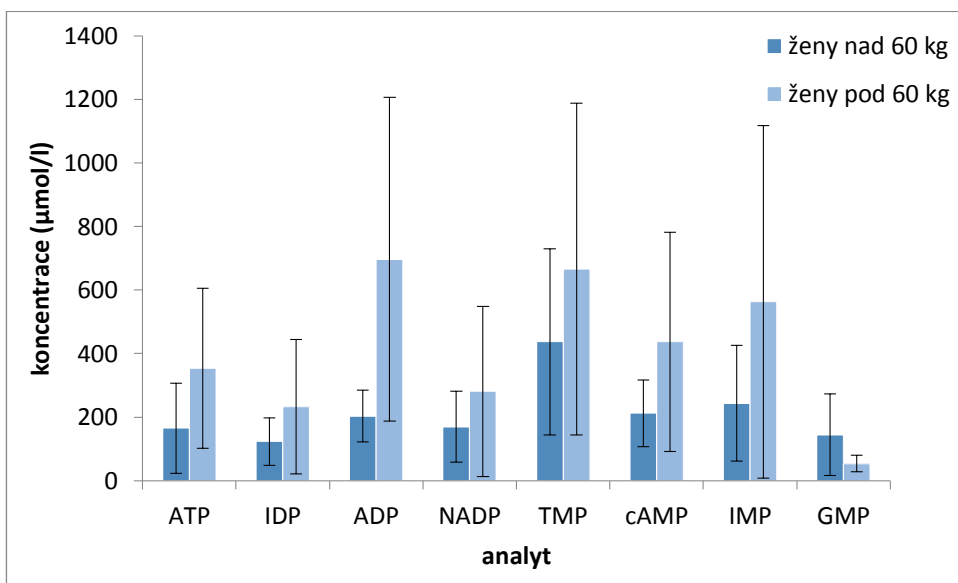
Na obr. 18 jsou porovnávány koncentrace pacientů popálených do 10 % celkového povrchu těla, pacientů popálených nad 10 % celkového povrchu těla a zdravých jedinců. Na obrázku vidíme, že nejvyšší koncentrace porovnávaných analytů je u pacientů s popálením pod 10 % celkového povrchu těla. Pokud bereme v úvahu pohlaví pacientů, výraznější změny koncentrace nukleotidů jsou u popálených žen nad 10 % a pod 10 %. U mužů popálených nad 10 % celkového povrchu těla je vůči

zdravím jedincům koncentrace IMP zhruba čtyřnásobná, kdežto u mužských pacientů popálených do 10 % je koncentrace IMP vůči zdravím jedincům téměř totožná jak dokazuje obr. 22 a 23.

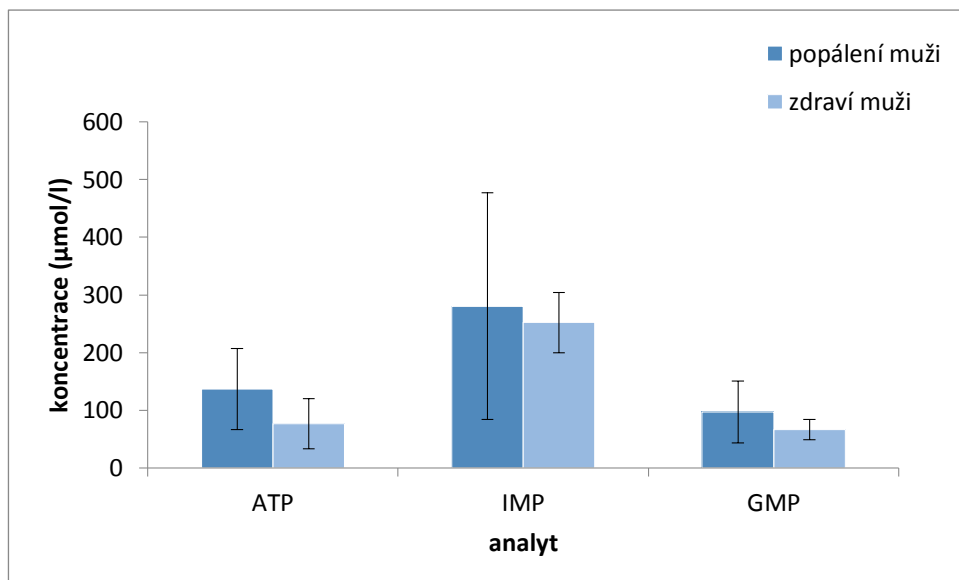
4.6.4 Vliv hmotnosti pacienta



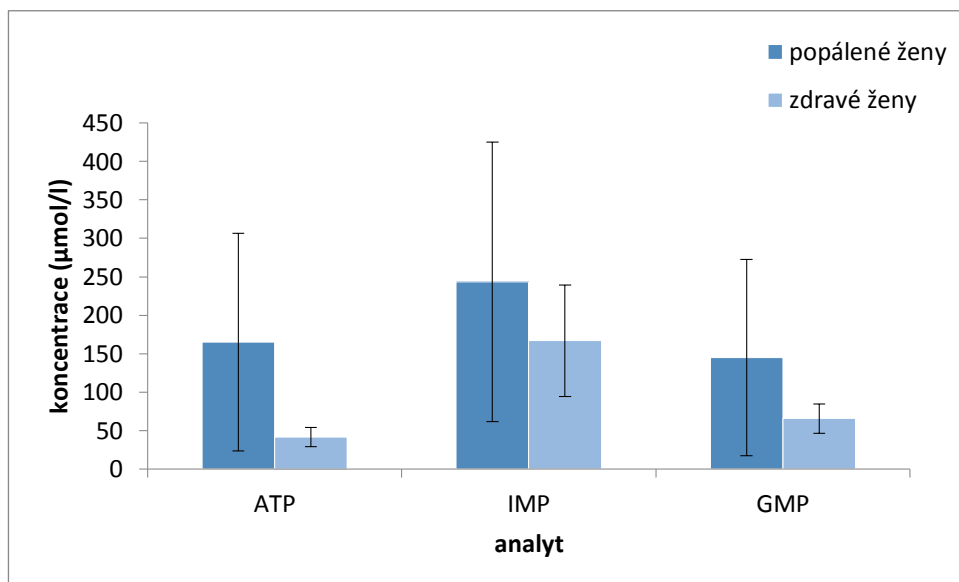
Obr. 24: Porovnání koncentrací nukleotidů u pacientů s hmotností do 70 kg a pacientů s hmotností nad 70 kg bez rozdílu pohlaví.



Obr. 25: Koncentrace nukleotidů u popálených žen s hmotností pod 60 kg a nad 60 kg.



Obr. 26: Porovnání koncentrací nukleotidů mezi popálenými muži s hmotností nad 80 kg a zdravými muži.

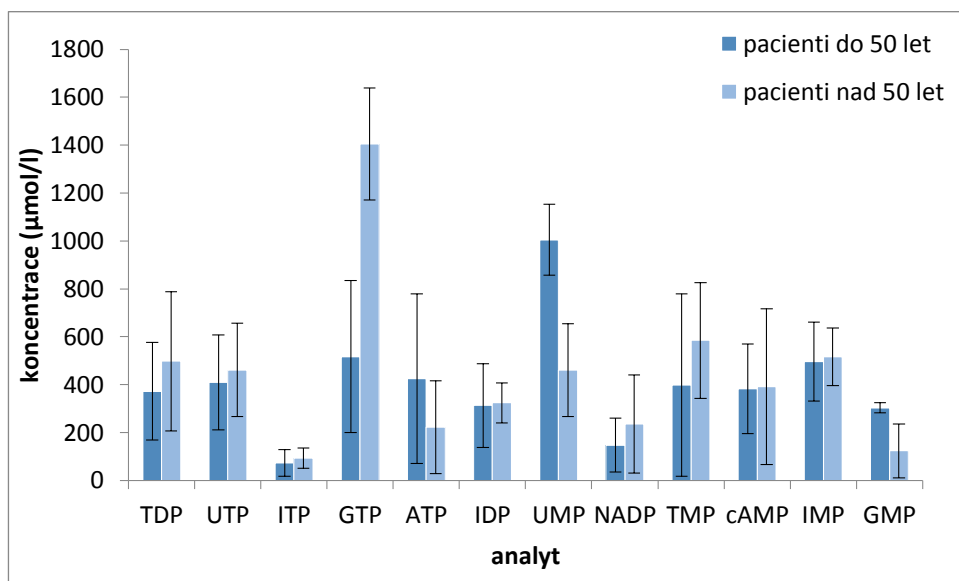


Obr. 27: Porovnání koncentrací nukleotidů mezi popálenými ženami s hmotností nad 60 kg a zdravými ženami.

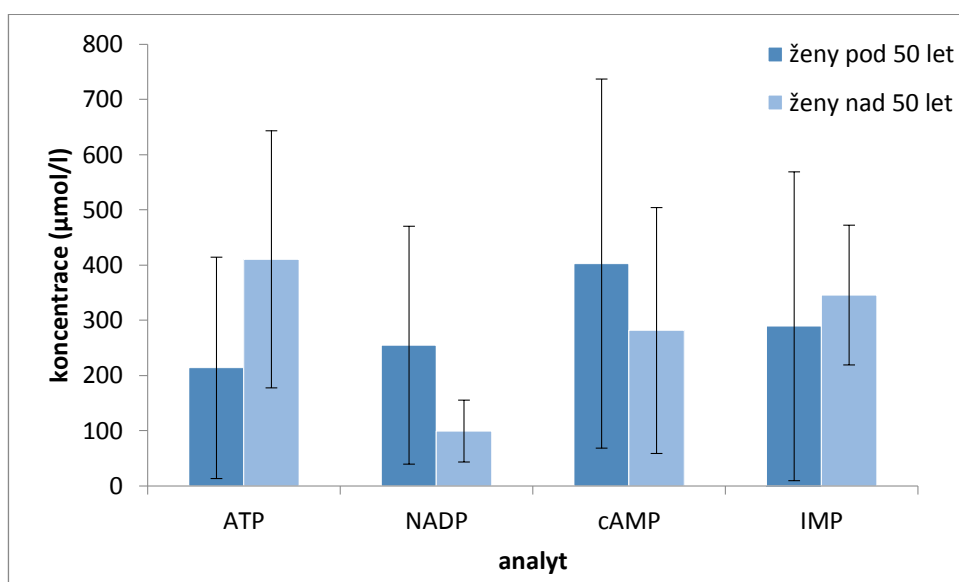
Dalším možným činitelem ovlivňující koncentraci nukleotidů u popálených osob je hmotnost pacienta. Na obr. 24 jsou porovnání pacienti s hmotností nad 70 kg a pod 70 kg. Zde můžeme vidět, že pacienti s hmotností vyšší jak 80 kg vykazují koncentrace nukleotidů nižší než pacienti s hmotností nižší než 80 kg. Stejně tak je tomu u porovnání popálených žen s hmotností pod 60 kg a nad 60 kg, jak můžeme vidět na obr. 25. U žen s hmotností pod 60 kg je koncentrace analytů vyšší. Pokud porovnáváme

pacienty se zdravými jedinci vyšší koncentrace jednotlivých nukleotidů je u popálených osob, obr. 26 a 27.

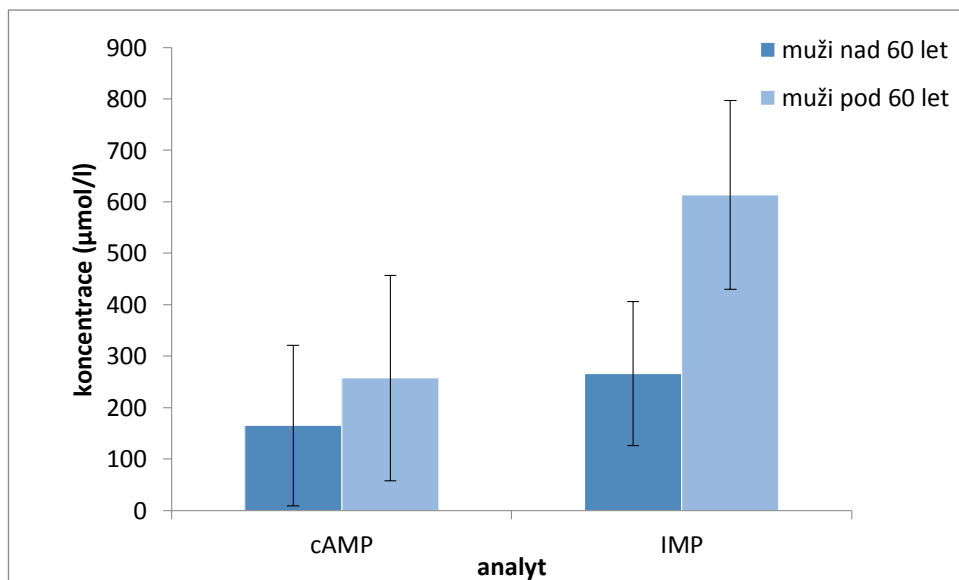
4.6.5 Vliv věku



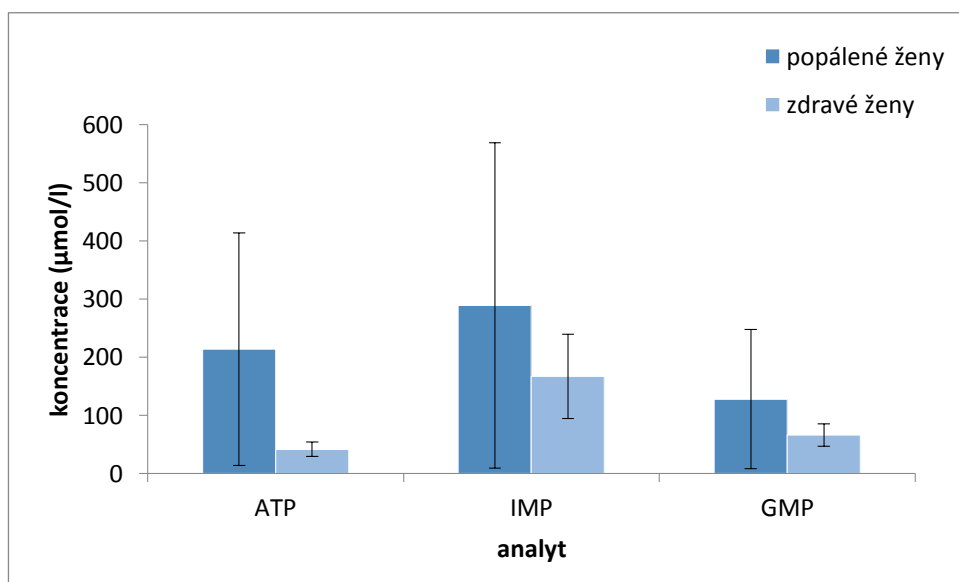
Obr. 28: Porovnání koncentrací nukleotidů u pacientů mladších 50 let a pacientů starších 50 let bez rozdílu pohlaví.



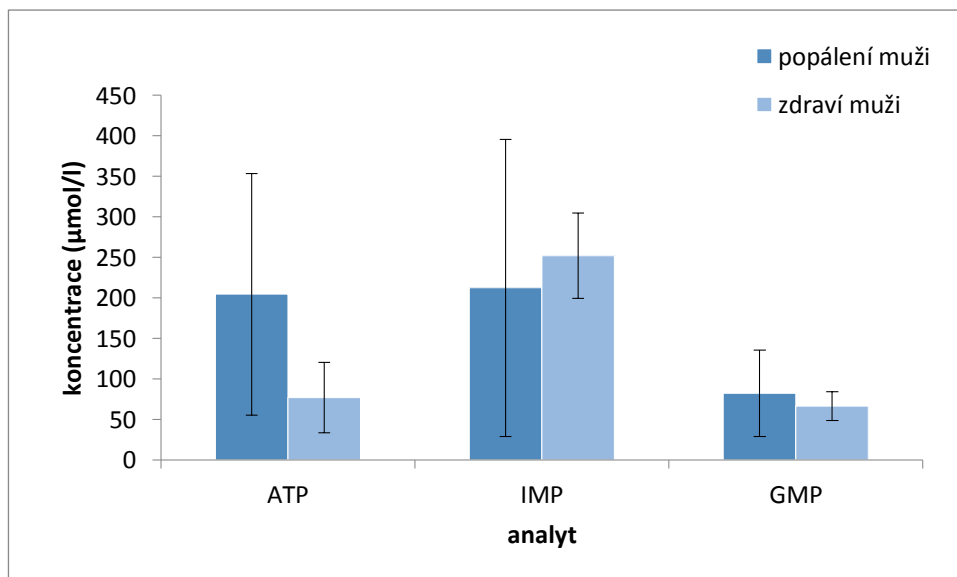
Obr. 29: Rozdílná koncentrace nukleotidů u popálených žen mladších 50 let a popálených žen starších 50 let.



Obr. 30: Porovnání koncentrace jednotlivých nukleotidů mezi popálenými muži mladšími 60 let a popálenými muži staršími 60 let.



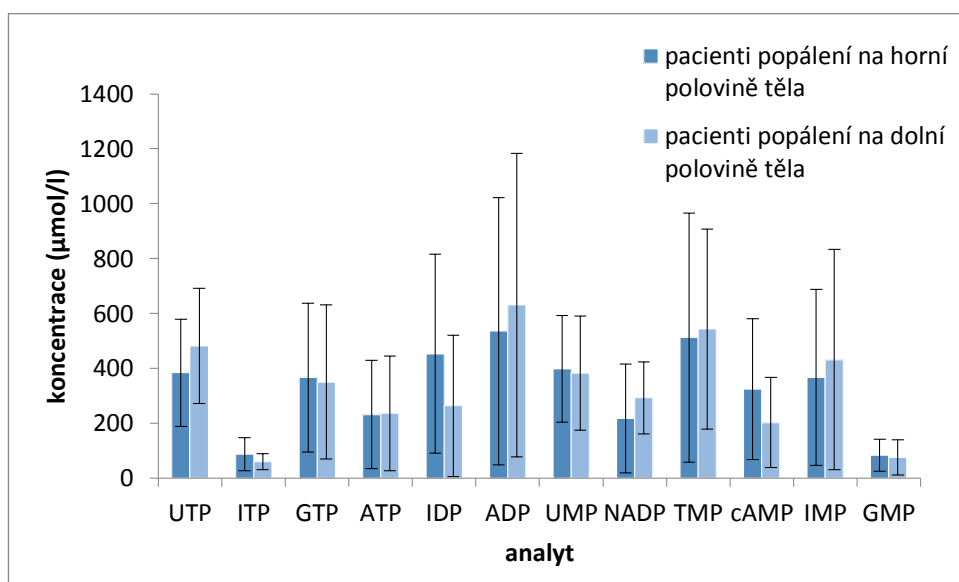
Obr. 31: Porovnání koncentrace nukleotidů u popálených žen starších 60 let a zdravých jedinců.



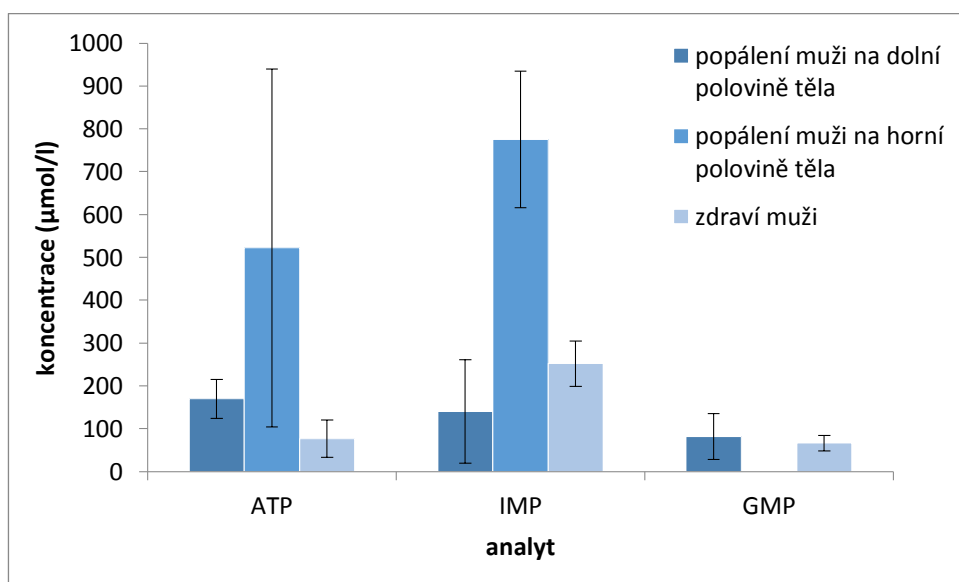
Obr. 32: Porovnání koncentrace nukleotidů u popálených mužů mladších 60 let a zdravých jedinců.

Zjišťovali jsme, zda-li věk pacienta ovlivňuje koncentraci nukleotidů při popáleninovém úrazu. Na obr. 28 je porovnání pacientů mladších 50 let a pacientů starších 50 let. Z obrázku je patrné, že pacienti starší 50 let mají koncentraci nukleotidů vyšší, než pacienti mladší 50 let. Výjimku tvoří ATP a GMP. Jejich koncentrace je vyšší u mladších pacientů. V případě, že porovnáváme popálené ženy pod 50 let a popálené ženy nad 50 let obr. 29, jsou koncentrace ATP a IMP vyšší u starších žen, koncentrace cAMP je vyšší u žen mladších. Obr. 30, muži byli rozděleni na skupinu pod 60 let a nad 60 let. Koncentrace IMP a cAMP byly vyšší u pacientů pod 60 let. Pokud porovnáváme pacienty se zdravými jedinci, zjistíme, že koncentrace jednotlivých nukleotidů jsou vyšší u popálených pacientů, obr. 31 a 32.

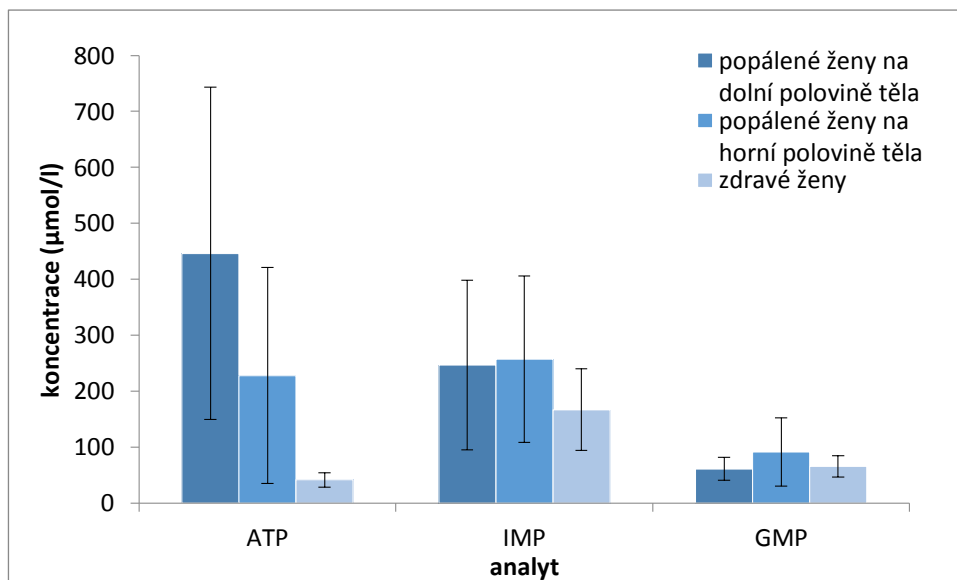
4.6.6 Vliv zasažené oblasti těla



Obr. 33: Srovnání koncentrace nukleotidů u popálených pacientů na horní polovině těla a dolní polovině těla



Obr. 34: Porovnání koncentrace nukleotidů ATP a IMP a GMP u mužů popálených na horní polovině těla, dolní polovině těla a zdravých mužů.

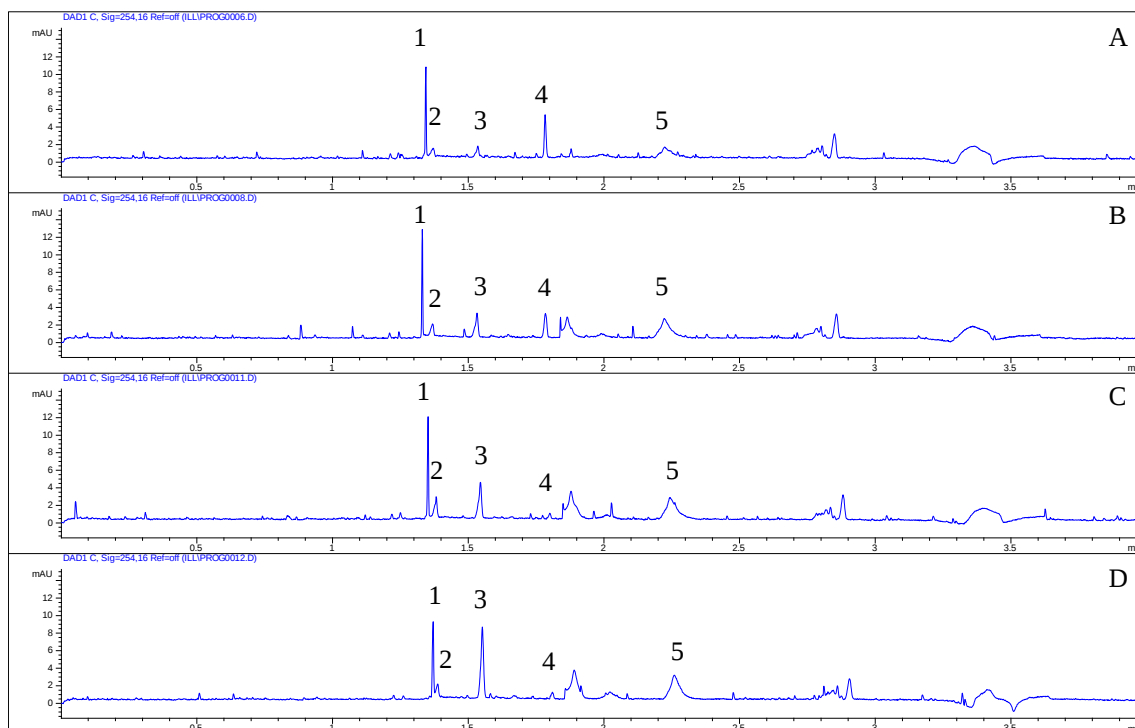


Obr. 35: Rozdílná koncentrace analytů ATP, IMP a GMP u žen popálených na dolní polovině těla, žen popálených na horní polovině těla a zdravých žen.

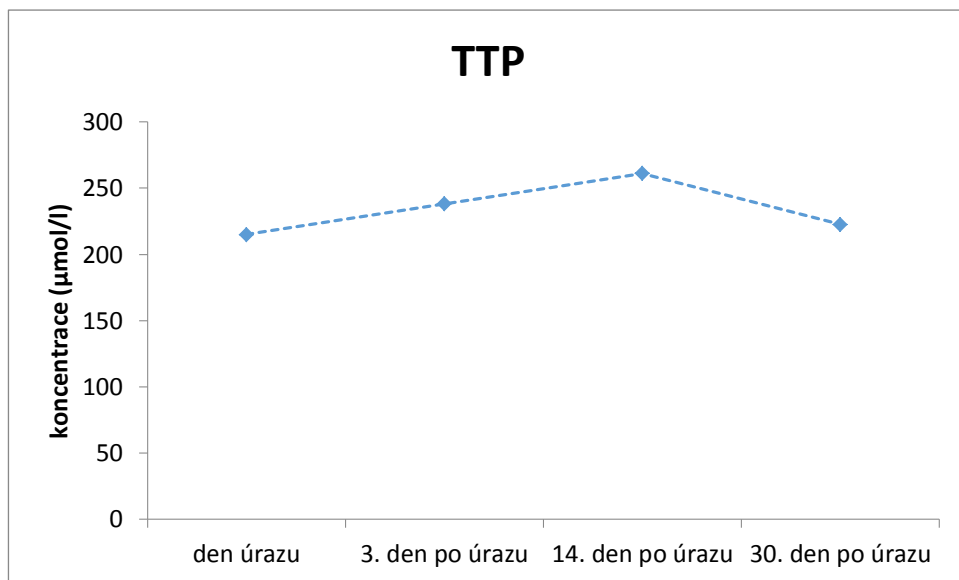
Pacienti byli popálení na různých částech těla: krk, dolní končetiny, horní končetiny, záda, trup a obličej. Pacienty jsme rozdělili do dvou skupin na pacienty popálené na dolní polovině těla a pacienty popálené na horní polovině těla. Z obr. 34 je patrné, že pacienti mužského pohlaví popálení na horní polovině těla mají výrazně vyšší koncentraci nukleotidy ATP a IMP jak oproti mužským pacientům popálených na dolní polovině těla tak zdravím mužům. Na obr. 35 jsou ukázány data, kdy byly mezi sebou porovnávány popálené ženy na dolní polovině těla, popálené ženy na horní polovině těla a zdravé ženy. Můžeme říci, že se zde nevyskytují významnější změny koncentrace nukleotidů vyjma analytu ATP, kdy byla nejvyšší koncentrace u žen popálených na dolní polovině těla. Jak dokazuje obr. 33 koncentrace nukleotidů u obou posuzovaných skupin je velice podobné. Můžeme tedy říci, že místo zasažené části těla nemá žádný vliv na koncentraci nukleotidů.

4.7 ANALÝZA VZORKŮ V ČASE

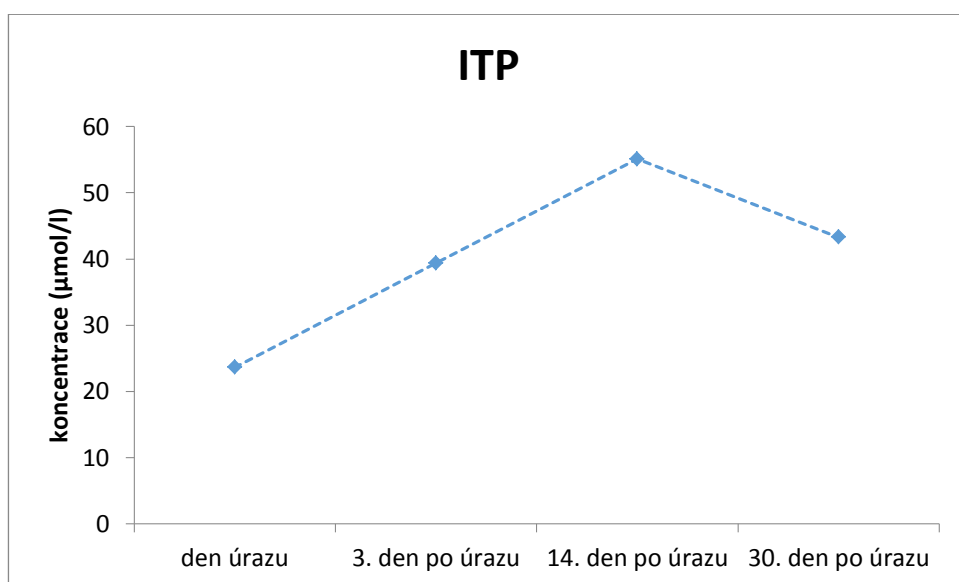
Na závěr byly analyzovány krevní vzorky od 52 letého muže s popáleninami na 12% těla. Muž, vážící 83 kg, byl popálen především na trupu a ruce. Popáleniny byly způsobeny explozí nádoby s hořlavinou. Pacient byl na popáleninovém centru standardně ošetřen a hospitalizován na 14 dní. Poté byl propuštěn do domácí péče, odkud docházel na pravidelné kontroly.



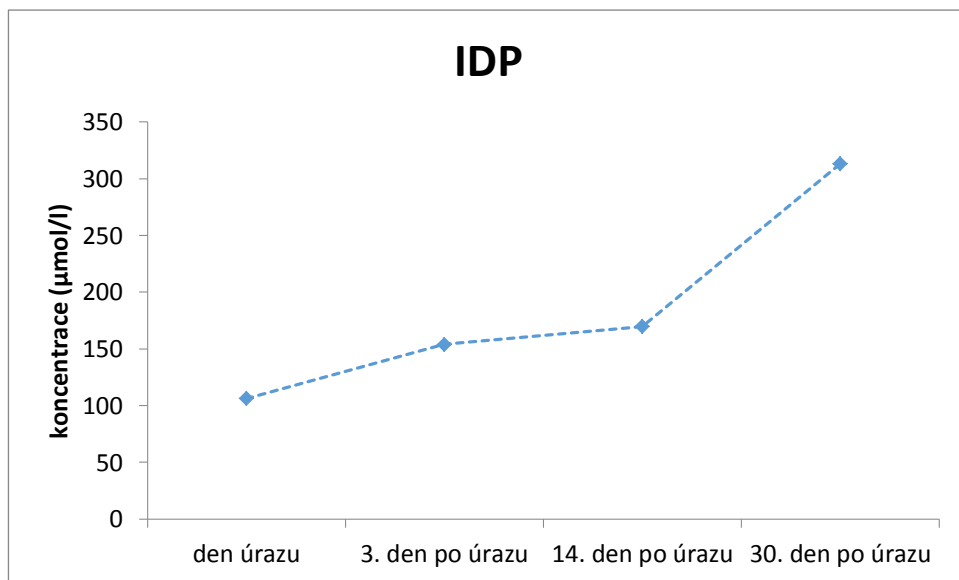
Obr. 36: Změna koncentrace nukleotidů v čase. Odběr vzorku A) v den úrazu, B) 3. den, C) 14. den a D) 30. den po úrazu. Separační podmínky: 40 mmol/l citrátová pufr, GABA, pH 4, 0,8 mmol/l CTAB, kapilára: 24,5/33 cm, průměr 50 μ m, napětí: -20 kV, UV detekce 254 nm. Píky: 1=TTP, 2=ITP, 3=IDP, 4=UMP, 5=GMP



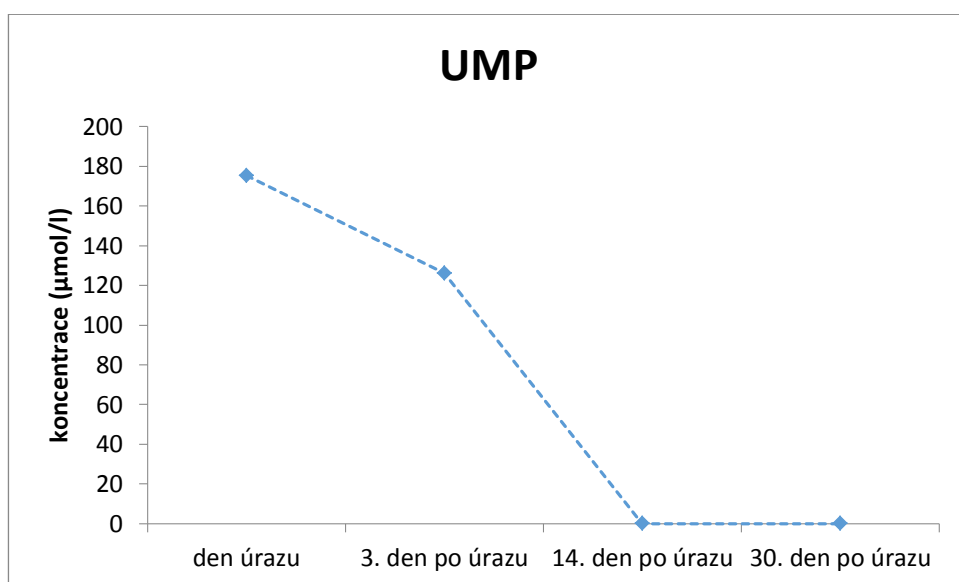
Obr. 37: Změna koncentrace TTP během prvních 30 dnů po úrazu.



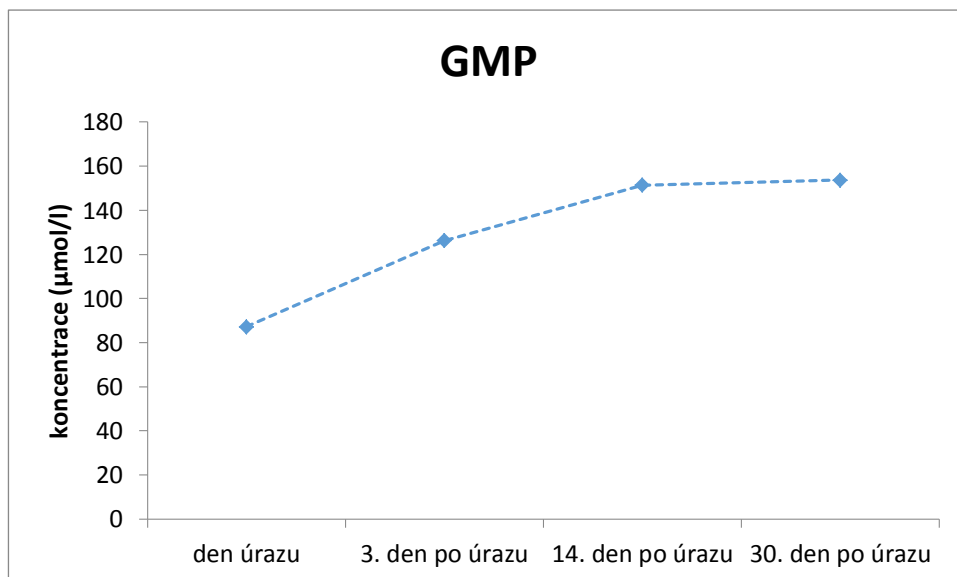
Obr. 38: Změna koncentrace ITP během prvních 30 dnů po úrazu.



Obr. 39: Změna koncentrace IDP během prvních 30 dnů po úrazu.



Obr. 40: Změna koncentrace UMP během prvních 30 dnů po úrazu.



Obr. 41: Změna koncentrace GMP během prvních 30 dnů po úrazu.

Na Obr. 36 jsou elektroforegramy vzorků odebraných v různé době od úrazu. Na obrázcích č. 37, 38, 39, 40 a 41, můžeme vidět změnu koncentrace nukleotidů v průběhu regenerace. 30 den po úrazu došlo k výraznému nárůstu koncentrace IDP a GMP, kdežto koncentrace UMP výrazně poklesla. Můžeme říci, že koncentrace TTP se časem nezměnila.

5 DISKUSE

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro studium vybraných nukleotidů při popáleninovém úrazu, analyzovat klinické vzorky a porovnat výsledky pacientů se zdravými jedinci. Snahou bylo získat informace o úrovni nukleotidů v krvi pacientů a změně jejich koncentrace a zastoupení při popáleninovém zranění.

Jak už bylo řečeno, nukleotidy odrážejí energetický metabolismus buňky a tento význam by mohl hrát důležitou roli při studiu metabolických změn při popáleninovém úrazu.

Nukleotidy byly již dříve analyzovány pomocí kapilární elektroforézy (Markuszewski et al. (2003) nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Gill, 2007), avšak dosud nebyly analyzovány nukleotidy ve vztahu k popáleninám.

Pro analýzu jsem použila kapilární elektroforézu, která se jeví jako vysoce efektivní metoda pro studium daných látek. Metoda, kterou jsme použili pro měření nukleotidů, vychází z již publikované metody (Friedecký et al. (2007). Ve srovnání s kapalinovou chromatografií (Ericson et al. (1983) je doba analýzy u kapilární elektroforézy o několik řádu nižší.

Průměrná koncentrace nukleotidu ATP izolovaných z erytrocytů zdravých jedinců byla oproti dříve publikovaným výsledkům značně odlišná. (Friedecký et al. (2007)

Podle Doktera (2014), celková závažnost popáleninového úrazu je dána hloubkou, velikostí a umístěním popálení, věkem a zdravotním stavem pacienta. Z vyhodnocených dat vyplývá, že diabetes melitus, vyšší hmotnost a věk významně zatěžují metabolismus organismu a tím ovlivňují stav pacienta. Místo popálení a pohlaví pacienta nemají významný vliv na úroveň nukleotidů popáleného pacienta.

Srovnání koncentrací nukleotidů mezi pacienty a zdravými jedinci ukazují, že koncentrace nukleotidů u popálených osob jsou vyšší. Zajímavé je pozorovat koncentraci nukleotidu ATP. Předpokládala jsem, že jeho hladina bude u popálených pacientů nižší ve srovnání se zdravými osobami. Výsledky však ukazují zvýšenou hladinu ATP u pacientů. Důvodem může být fakt, že po popálení je metabolismus extrémně zatížen, z toho důvodu je potřeba velkého množství energie.

Odpověď organismu na popálení je charakterizována řadou metabolických změn (Chioléro et al. (1997). Jednou z nich je zvýšená hladina glukózy. Studie ukazují (Kraft et al. (2011), že hyperglykémie zhoršuje průběh regenerace a je spojena se zvýšenou úmrtností. Podle našich výsledků i přítomnost diabetu u pacientů má vliv na celkový stav pacienta a ovlivňuje hladinu nukleotidů v krvi.

Jak uvádí Šíma (2008), nukleotidy mají velký význam pro růst a jsou důležité při regeneraci a obnově metabolických a fyziologických funkcí. Agett et al. (2003) dokazuje, že nukleotidy významně ovlivňují imunitní systém. Z těchto důvodů se domnívám, že nukleotidy by mohly být více využity při léčení popáleninových stavů a sledování úrovně nukleotidů by mohlo vést k lepší individuální péči o pacienty s popáleninami.

6 ZÁVĚR

První část diplomové práce je věnována teoretickému úvodu do problematiky. Jsou zde uvedeny základní informace o popáleninách, podstatě popáleninového šoku, výživě a metabolismu při tomto poranění a o nukleotidech. Dále je zde zmínka i metodách, které byly k této práci využity.

V druhé části práce jsou uvedeny a vyhodnoceny data získané analýzou krevních vzorků od pacientů s popáleninovým poraněním pomocí kapilární elektroforézy. Dokázali jsme, že kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro studium nukleotidů, že její parametry jsou velice dobré při analýze reálných vzorků a, že tato metoda umožňuje studovat metabolické změny při popáleninovém úrazu.

7 SEZNAM LITERATURY

- Agett P., Leach J. L., Rueda R., MacLean W. C. (2003): Innovation in Infant Formula Development: A Ressment of Ribonucleotides in 2002. In: *Nutrition* **19**, 375-384.
- Barešová A., Friedecký D., Adam T. (2011): Analýza nukleotidů v krevních skvrnách pomocí kapilární elektroforézy, *Chemické Listy* **105**, 207-211.
- Benda V., Babůrek I., Kotrba P. (2006) Základy biologie, 1. Vyd, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, (online), dostupné na: (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-587-0/pdf/032.pdf) strana 32 (citováno 2015-1-11)
- Carver J. D. Walker W. A. (1995): The role of nucleotides in human nutrition, *The Journal of Nutritional Biochemistry* **6**, 58-72.
- Clark M. A., Plank L. D., Hill G. L. (2000): Wound Healing Associated with Severe Surgical Illness, *World Journal of Surgery* **24**, 648–654.
- Coade S. B. Pearson J. D. (1989): Metabolism of Adenine Nucleotides in Human Blood *Circulation Research* **65**, 531-537.
- Cook D. (2003): Nutritional Care for an Individual following Burn Trauma. In: *Burn Trauma, management and nursing care*. 2nd edition, (Bosworth Bousfield Ch.), Whurr Publishers, London and Philadelphia, England and U.S.A., 13-29.
- Coufal P. (2006), Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek, Praha
- Cunningham J. J., Lydon M. K., Russell W. E. (1990): Calorie and protein provision for recovery from severe burns in infants and young, *The American Journal of Clinical Nutrition* **5**, 553-557.
- Desborough J. P. (2000): The stress response to trauma and surgery, *British Journal of Anaesthesia* **85**, 109-117.
- Dokter J., Felix M., Krijnen P., Jos F. P. M. Vloemans, Margriet E van Baar, Tuinebreijer W. E., Breederveld R. S. (2014): Mortality and causes of death of Dutch burn patients during the period 2006–2011, *Burns* **41**, 235-240.
- Elia M. (1990): Artificial nutritional support, *Medicine International* **82**, 3392-3396.
- Ericson A., Niklasson F., Verdier Carl-H. (1983): A systematic Study of Nucleotide Analysis of Human Erythrocytes Using an Anionic Exchanger and HPLC. In: *Clinica Chimica Acta* **127**, 47-59.
- Fanali A, Haddad P. R., Poole C. F., Schoenmakers P., Lloyd D. (2013), *Liquid chromatography Applications*, Elsevier, USA, ISBN 978-0-12-415806-1, str. 613
- Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janošťáková A., Procházka M., Adam T. (2007): Capillary electrophoretic method for nukleotide analysis in cells: Application on inherited metabolic disorders, *Electrophoresis* **28**, 373-380.
- Gill B. D., Indyk H. V. (2007): Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleotides in milk and infant formulas. In: *International Dairy Journal* **17**, 596-605.
- Grob M. K., O'Brien K., Chu J., Chen D. Y. (2003): Optimization of cellular nucleotide extraction and sample preparation for nucleotide pool analysis using capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, 103–111.
- Hart D. W., Wolf S. E., Mlcak R., Chinkes D. L., Ramzy P. I., Obeng M. K., Ferrando A. A., Wolfe R. R., Herndon D. N. (2000): Persistence of muscle catabolism after severe burn, *Surgery* **128**, 312 – 319.
- Herndon

- <http://kids.britannica.com/comptons/art-53018/Burns-are-classified-according-to-the-depth-to-which-the> (citováno 2015-3-15)
- Hyde J. E. (2007): Targeting Purine and Pyrimidine Metabolism in Human Apicomplexan Parasites, *Current Drug Targets* **8**, 31–47.
- Chiarelli A., Enzi G., Casadei A., Baggio B., Valerio A., Mazzoleni F. (1990): Very early nutrition supplementation in burned, *The American Journal of Clinical Nutrition* **51**, 1035-1039.
- Chioléro R., Revelly Jean-P., Tappy L. (1997): Energy Metabolism in Sepsis and Injury. In: *Nutrition* **13**, 45-51.
- Iqbal J., Vollmayer P., Braun N., Zimmermann H., Müller Ch. (2005): A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary microreaction, *Purinergic Signalling* **1**, 349-358.
- Jeschke M. G., Chinkes D. L., Finnerty C. C., Kulp G., Suman O. E., Norbury W. B., Branski L. K., Gaulitz G. G., Mlcak R. P., Herndon D. N. (2008): The Pathophysiologic response to severe burn, *Annals of Surgery* **3**, 387 – 401.
- Khym J. X., (1975): An Analytical System for Rapid Separation of Tissue Nucleotides at Low Pressures on Conventional Anion Exchangers, *Clinical Chemistry* **21**, 1245-1252.
- Königová R., J. Bláha a kol. (2010): *Komplexní léčba popáleninového traumatu*. Karolinum, Praha, 432 stran.
- Kraft R., Herndon D. N., Kulp G. A., Mecott G. A., Trentzsch H., Jeschke M. G. (2011): Retinol Binding protein: Marker for Insulin Resistance and Inflammation Postburn?. In: *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **35**, 695-703.
- Lüllmann-Rauch R. (2012): *Histologie*. Grada Publishing, Praha, 576 stran.
- Mager R., Brychta P., Kaloudová Y.: Klinická studie debrase – první zkušenosti, 11. Výroční konference České společnosti popáleninové medicíny, Brno 2005, str. 24
- Markuszewski M. J., Britz-McKibbin P., Terabe S., Matsuda K., Nishioka T. (2003): Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in *Bacillus subtilis* cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **989**, 293–301.
- Merkunová A., Orel M. (2008): *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Grada Publishing, Praha, 302 stran.
- Mittendorfer B., Gore D. C., Herndon D. N., Wolfe R. R. (1999): Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **23**, 243-250.
- Moffatt B. A., Ashihara H. (2002): Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism, *The Arabidopsis Book*.
- Mochizuki H., Trocki O., Dominioni L., Brackett K. A., Joffe S. N., Wesley Alexander J. (1984): Mechanism of Prevention of Postburn Hypermetabolism and Catabolism by Early Enteral Feeding, *Annals of Surgery* **3**, 297-308.
- Mosier M. J., Pham T. N., Klein M. B., Gibran N. S., Arnoldo B. D., Gamelli R. L., Tompkins R. G., Herndon D. N. (2011): Early Enteral Nutrition in Burns: Compliance With Guidelines and Associated Outcomes in a Multicenter Study, *Journal of Burn Care and Research* **32**
- Ng M., Blaschke T. F., Arias A. A., Zare R. N. (1992): Analysis of Free Intracellular Nucleotides Using High-Performance Capillary Electrophoresis, *Analytic Chemistry* **64**, 1682-1684.

- Nguyen N. Q., Swee Lin Chen Yi Mei (2011): Current issues on safety of prokinetics in critically ill patients with feed intolerance, *Therapeutic Advances in Drug Safety* **2**, 197-204.
- Norman L., Anderton D., Hubbard S. (2003): Classification of Burn Trauma. In: *Burn Trauma, management and nursing care*. 2nd edition, (Bosworth Bousfield Ch.), Whurr Publishers, London and Philadelphia, England and U.S.A., 158-177 .
- Nováková L., Douša M. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint a.s., Praha, 299 stran.
- Nováková L., Douša M. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Europrint a.s., Praha, 235 stran.
- Novotný I., Hruška M. (2008): *Biologie člověka*. 4. Vyd., Fortuna, Praha, 239 stran
- Peck M. D., Chang Y. (1999): Nutritional support for burn injuries, *The Journal of Nutritional Biochemistry* **10**, 380–396.
- Peng X., Yan H., You Z., Wang P., Wang S. (2004): Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned, *Burns* **30**, 135–139.
- Peng X., Yan H., You Z., Wang P., Wang S. (2005): Clinical and protein metabolic efficacy of glutamine granules-supplemented enteral nutrition in severely burned patients, *Burns* **31**, 342-346.
- Popovic P. J., Zeh III H. J., Ochoa J. B. (2007): Arginine and immunity, *Journal of Nutrition* **137**, 1681S–1686S.
- Pruitt B. A., Wolf S. E., Mason A. D. (2012): Epidemiological, demographic and outcome characteristics of burn injury. In: *Total burn care*. 4th edition, (Herndon D. N.), Elsevier, China, 15-45.
- Ralevic V., Burnstock G. (1998): Receptors for Purines and Pyrimidines, *Pharmacological Reviews* **50**, 414 – 492.
- Rodriguez A. N., Jeschke M. G., Williams F. N., Kamolz Lars-Peter, Herndon D. N. (2011): Nutrition in Burns: Galveston Contributions, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **35**, 704-714.
- Saffle J. R., Graves C., Cochran A. (2012): Nutritional Support of the Burned Patient. In: *Total burn care*. 4th edition, (Herndon D. N.), Elsevier, China, 333-353.
- Sato S., Soga T., Nishioka T., Tomita M. (2004): Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spektrometry and capillary electrophoresis diode array detection, *The Plant Journal* **40**, 151–163.
- Shao X., O'Neill K., Zhongxi Zhao, Anderson S., Malik A., Milton L. (1994): Analysis of nucleotide pools in human lymphoma cells by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography* **680**, 463-468.
- Schwartz H., Guttman A. Separation of DNA by capillary electrophoresis, dostupné na <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=607397-CEPrimer7.pdf>
- Stahel P. F., Flierl M. A., Moore E. E. (2010): "Metabolic staging" after major trauma - a guide for clinical decision making?, *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency*, 18: 34
- Stechmiller J. K., Childress B., Porter T. (2004): Arginine Immunonutrition in Critically Ill Patients: A Clinical Dilemma, *American Journal of Critical Care* **13**, 17-23.
- Suri M. O., Dhingra V. J. S., Raibagkar S. C., Mehta D. R. (2006) Nutrition in burns: Need for an aggressive dynamic approach, *Burns* **32**, 880-884.
- Szitányi P., Nevoral J. (2007) Nukleotidy ve výživě, Nutricia babyfood, (online) dostupné na: http://nutriciamedical.cz/download/noviny_1_kveten.pdf (citováno 2015-03-8)

- Šíma P. (2008): Význam nukleotidů jako složky výživy pro růst, regeneraci a imunitu. In: *Interní medicína pro praxi* **10**, 555-557.
- Šimko Š., Kollár J. a kol. (1992) *Popáleniny*. Osveta, Martin, 470 stran.
- Štětinský J., Klosová H., Bryjová I. (2014) Využití laserové dopplerometrie v klinické praxi. In: *Pokroky v medicíně a chemii popáleninových stavů*. (Petr J.), UPOL, Olomouc, 5-19.
- Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004, 264 stran.
- Valkón, I. E., Sirén H., Riekkola M. (1999): Characteristics of electroosmotic flow in capillary electrophoresis in water and in organic solvents without added ionic species, *Journal of Microcolumn Separations* **11**, 199-208.
- Wallingford R. A., Ewing A. G. (1989): Capillary electrophoresis, *Advances in chromatography* **29**, 1-76.
- Watters C. A., Trenget E. E., Cooper C. (2007): Nutrition and Wound Healing in Burns, Trauma, and Sepsis. In: *Nutrition and Wound Healing*. (Molnar J. A.), CPC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 219-260.
- Williams F. N., Herndon D. N., Jeschke M. G. (2009): The Hypermetabolic Response to Burn Injury and Interventions to Modify This Response, *Clinics in Plastic Surgery* **36**, 583 – 596.
- Wilmore D. W., Long J. M., Mason A. D., Skreen R. W., Pruitt B., A. (1974): Catecholamines: Mediator of the Hypermetabolic Response to Thermal Injury, *Annals of Surgery* **180**, 653 – 668.
- Yo Y. M., Young V. R., Castillo L., Chapman T. E., Tompkins R. G., Ryan C. M., Burke J. F. (1995): Plasma Arginine and Leucine Kinetics and Urea Production Rates in Burn Patients, *Metabolism-Clinical and Experimental* **44**, 659-666.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPDA	adenylát deaminasa,
AMPRT	aminofosforibosyltransferasa,
APRT	adenin fosforibosyltransferasa,
ATC	aspartát transkarbamylasa,
CPS	karbamylfosfát syntasa,
CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
DHO	dihydroorotasa,
DHODH	dihydroorotát dehydrogenasa,
EOF	elektroosmotický tok
HGPRT	hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferasa
PNP	purin nukleotid forforylasa,
PRPP	5-fosforibosyl-1-pyrofosfát
RNR	ribonukleotid reduktasa,
RNR	ribonukleotid reduktasa,
TK	thymidin kinasa
TS	thymidylát syntasa,
UK	uridin kinasa,
UMPS	UMP syntasa,
XO	xantin oxidasa,

