

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Toxické účinky methanolu na lidský organismus

Veronika Kratochvilová

Bakalářská práce

2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Kratochvilová**  
Osobní číslo: **C10406**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Toxické účinky methanolu na lidský organismus**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji zabývajícími se toxickými účinky methanolu na lidský organismus.
2. Využijte databázi, jako jsou Medline, Current Contents apod.
3. Vypracujte přehlednou práci zabývající se problematikou toxického účinku methanolu na organismus. Zaměřte se na poškození jater, CNS a zraku.
4. Podrobně diskutujte mechanismus toxického účinku methanolu na molekulární úrovni, úlohu hepatocytů při jeho odbourávání a možnosti léčby otrávených pacientů.

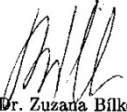
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 24. 6. 2014

Veronika Kratochvilová

### **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D za spolupráci, konzultace a čas, který mi věnoval.

Dále bych ráda poděkovala celému oddělení klinické biochemie ve Zlíně za poskytnutí informací k tomuto tématu.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá toxickými účinky methanolu a působením jeho metabolitů na lidský organismus. Zaměřuje se též na vlastnosti methanolu a na jeho přeměnu v těle. Dále se v práci nachází informace o nedávné „methanolové“ kauze, která proběhla v České republice. Také se věnuje příznakům intoxikace a způsobu léčby otravy methanolem.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

methanol, toxicita, metabolismus, formaldehyd, kyselina mravenčí, játra

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with toxic effects of methanol and its metabolites effects on the human body. It target also the properties of methanol and its biotransformation in the human body. There are also information about a recent "methanol" cause in the Czech Republic. It also deals with the symptoms of intoxication and way of treatment of methanol poisoning.

## **KEYWORDS**

methanol, toxicity, metabolism, formaldehyde, formic acid, liver

## OBSAH

0	ÚVOD.....	13
1	Methanol.....	14
1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti methanolu .....	14
1.2	Toxické vlastnosti methanolu .....	15
1.3	Zdroje, výskyt a využití methanolu.....	15
2	Otrava methanolem.....	16
2.1	Metabolismus methanolu .....	17
2.1.1	Oxidace methanolu .....	17
2.1.2	Oxidace formaldehydu.....	18
2.1.3	Oxidace mravenčanu.....	21
3	Patofyziologie toxicity methanolu.....	24
3.1	Eliminace methanolu.....	25
4	Příznaky otravy methanolem .....	27
4.1	Akutní intoxikace methanolem .....	27
4.2	Chronická intoxikace methanolem.....	27
4.3	Trvalé následky po intoxikaci methanolem .....	28
4.4	Vliv methanolu na centrální nervový systém.....	28
4.5	Vliv methanolu na zrak .....	29
4.6	Vliv methanolu na játra.....	29
4.6.1	Volné radikály.....	30
4.6.2	Mechanismy poškození jater .....	31
4.6.3	Antioxidační ochrana .....	34
4.6.4	Histologie jaterní tkáně.....	34
4.6.5	Jaterní onemocnění .....	35
5	Kinetika methanolu.....	36

5.1	Distribuce .....	36
5.2	První pomoc při otravě.....	37
6	Vyšetření.....	38
6.1	Plynová chromatografie .....	38
6.2	Počítačová tomografie.....	39
6.3	Stanovení kyseliny mravenčí .....	39
7	Terapie .....	40
7.1	Ethanol .....	40
7.2	Fomepizol (4-methylpyrazol).....	41
7.3	Leukovorin (kyselina folinová).....	41
7.4	Hemodialýza .....	42
8	Informace o otravě methanolem v České republice .....	43
9	ZÁVĚR.....	44
10	Seznam použité literatury .....	45



## Seznam ilustrací

<b>Obrázek 1</b> <i>Strukturní vzorec methanolu.</i> .....	14
<b>Obrázek 2</b> <i>Inhibice přeměny methanolu ethanolem nebo fomepizolem.</i> .....	17
<b>Obrázek 3</b> <i>Metabolismus methanolu na formaldehyd</i> .....	18
<b>Obrázek 4</b> <i>Schéma přeměny methanolu na oxid uhličitý</i> .....	20
<b>Obrázek 5</b> <i>Oxidace mravenčanu.</i> .....	21
<b>Obrázek 6</b> <i>Rozdíly v přeměně methanolu na oxid uhličitý u hlodavců a primátů.</i> .....	22
<b>Obrázek 7</b> <i>Mechanismus toxicity kyseliny mravenčí.</i> .....	24
<b>Obrázek 8</b> <i>Schéma eliminace methanolu.</i> .....	26
<b>Obrázek 9</b> <i>Vliv alkoholu na vznik zánětu jater.</i> .....	32
<b>Obrázek 10</b> <i>Účinky volných kyslíkových radikálů na strukturu proteinů.</i> .....	33
<b>Obrázek 11</b> <i>Princip metody stanovení mravenčanu.</i> .....	39

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> <i>Fyzikální vlastnosti methanolu.</i> .....	14
<b>Tabulka 2</b> <i>Odhady hladiny methanolu ve vybraných nápojích a potravinách.</i> .....	15

## Seznam zkratek

MTBE - terc-butylmethylether

DMDC - dimethyldikarbonát

CNS – centrální nervový systém

ADH - alkoholdehydrogenasa

CYP2E1 - cytochrom P-450 2E1

MEOS - mikrosomální ethanolový oxidační systém

FDH – formaldehyddehydrogenasa

ATP - adenosintrifosfát

F-THF-S - 10-formyltetrahydrofolátsyntethasa

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukována forma

GSH – glutathion

NAD<sup>+</sup> - nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma

DNA - deoxyribonukleová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

AST – aspartátaminotrasferasa

ALT – alaninaminotrasferasa

SAM - S-adenosylmethionin

ROS - reaktivní sloučeniny kyslíku

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa - sodno-draselná pumpa

RNS - reaktivní sloučeniny dusíku

mtDNA - mitochondriální DNA

NOX - nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidasa

NOS - oxidu dusnatý synthasa

TNF $\alpha$  - tumor nekrotizující faktor  $\alpha$

LPS - lipopolysacharidy

TLR-4 - Toll-like receptor 4

IL-6 – interleukin 6

IL-1 - interleukin 1

IL-10 - interleukin 10

AMPK - adenosylmonofosfátproteinkinasa

TGF $\beta$  - transformující růstový faktor  $\beta$

IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$

IL-17 – interleukin 17

IL-8 - interleukin 8

OPN – osteopontin

AFLD – alkoholická steatóza jater

NF- $\kappa$ B - transkripční faktor

CT - počítačová tomografie

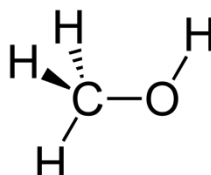
## 0 ÚVOD

Tématem bakalářské práce jsou toxické účinky methanolu na lidský organismus. Chemické, fyzikální a biologické vlastnosti jsou základem poznání jeho toxického účinku. Otrava, kterou methanol způsobuje, je dána hlavně jeho metabolity. Metabolity tedy hrají významnější úlohu v intoxikaci než samotný methanol. Seznámení se s jeho metabolismem napomáhá pochopit jeho nepříznivé účinky na různé orgány v těle. Znalosti první pomoci při intoxikaci methanolem mohou zachránit život mnoha lidem. V současné době je otrava methanolem velmi diskutovaným tématem vzhledem k nedávným událostem v České republice.

Cílem práce je popsat toxické účinky methanolu na zrak, centrální nervový systém a játra a popsat mechanismy vedoucí k jejich poškození, informovat počtu obětí intoxikace methanolem v ČR a poukázat na možnosti terapie postižených jedinců.

# 1 Methanol

Methanol je nejjednodušší sloučeninou ze skupiny alifatických alkoholů. Jeho racionální vzorec je CH<sub>3</sub>OH. Strukturální vzorec je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 Strukturální vzorec methanolu.

## 1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti methanolu

Methanol je bezbarvá, těkavá, hořlavá a alkoholicky páchnoucí kapalina, která je neomezeně mísitelná s vodou, alkoholy a ketony. Bod varu je 64,65 °C. Jeho páry tvoří se vzduchem výbušnou směs. Methanol dobře rozpouští tuky a je významným organickým rozpouštědlem. Jde o silně jedovatou látku, která je důvodem mnoha otrav kvůli časté záměně ethanolu za methanol. Jejich vůně jsou velmi podobné, proto je lze od sebe jen stěží rozlišit. V tabulce 1 jsou uvedeny další vlastnosti methanolu. [1, 2]

Tabulka 1 Fyzikální vlastnosti methanolu. Upraveno podle [2, 3]

Vlastnosti methanolu	Hodnoty
Molekulová hmotnost	32,04 g/mol
Bod tání	- 97,5 °C
Bod varu	64,7 °C
Vodivost	1 μS/cm
Minimální zápalná energie	0,14 mJ
Hustota relativní	0,79 g/cm <sup>3</sup>
Tenze par při 20 °C	12,8 kPa
Teplota samovznícení	455-470 °C

## 1.2 Toxické vlastnosti methanolu

Methanol se řadí podle zákona 356/2003 a vyhlášky 232/2004 do skupiny toxických látek. Jde tedy o jed, který se stává nebezpečným po jeho požití, nadýchání se, či po zasažení pokožky nebo očí. Sám o sobě není toxický, ale metabolizuje se na látky, které jsou pro organismus jedovaté. Neexistuje žádný přesvědčivý důkaz o tom, že by byl methanol genotoxický. [1, 2] Též není klasifikován ani jako karcinogen. [4]

Smrtná dávka methanolu pro člověka je asi 20 g. Jelikož je ale vůní i chutí podobný ethanolu, dochází jejich záměnou ke smrtelné otravě. Smrtná dávka ethanolu po jednorázovém požití je 500 g. [5]

## 1.3 Zdroje, výskyt a využití methanolu

V roce 2008 byla světová produkce methanolu asi 50 milionů tun za rok. Vyrábí se z něj formaldehyd, kyselina mravenčí, kyselina octová, terc-butylmethylether (MTBE), glykolether nebo slouží jako palivo. Také je složkou v mnoha průmyslových produktech, jako jsou barvy, čisticí prostředky, nebo jej nalezneme v ilegálně vyrobeném alkoholu. [2, 6, 7] Vyskytuje se i v rozpouštědlech, nemrznoucí směsi na autoskla, lepidlech, cigaretovém kouři (180 µg na jednu cigaretu) i kapalinách používaných do kopírek. [8, 9] Methanol produkují i některé mikroorganismy. V lidském těle se může vyskytovat přirozeně. Koncentrace methanolu v krvi se obvykle pohybuje okolo 1,0 až 2,5 mg/l. [2] Zdrojem methanolu, jak vidíme v tabulce 2, může být čerstvé ovoce, zelenina, ovocné džusy, piva, vína, destilované lihoviny nebo potravinářské přídatné látky, jako je aspartam a dimethyldikarbonát (DMDC). Aspartam je umělé sladidlo a DMDC je kvasinkový inhibitor používaný v čajích, sportovních nápojích nebo užíván jako náhražka ve víně. Obě přísady se po konzumaci metabolizují na methanol. [9]

**Tabulka 2** Odhady hladiny methanolu ve vybraných nápojích a potravinách. Upraveno podle [2, 9]

Potraviny a nápoje	Koncentrace methanolu
Čerstvé ovocné džusy	12-640 mg/l
Pivo	6-27 mg/l
Víno	96-329 mg/l
Bourbon	40-55 mg/l
Fazole	1,5-7,9 mg/kg

## 2 Otrava methanolem

Otrava methanolem je celosvětový problém. Alkohol je totiž návyková látka a jeho konzumace je odpovědná za některé zdravotní, sociální a hospodářské problémy. Mírné pití alkoholu obvykle nepřináší žádná zdravotní rizika, ale chronická spotřeba alkoholu vede k fyzickým i duševním poruchám a způsobuje poškození různých orgánů včetně mozku, srdce, jater, plic, kosterního svalstva i kostí. [10] Methanol může způsobit těžká onemocnění až smrt, zejména v rozvojových zemích. Jelikož jeho výroba je levná a snadná, stal se methanol běžnou složkou mnoha ilegálně vyrobených nápojů. Pití takovýchto alkoholických nápojů vede k těžkým otravám, které pokud se neléčí, jsou spojeny s významnou mortalitou a vizuálními deficity. [6, 11]

Methanol se rychle absorbuje po požití, inhalaci nebo kontaktu s pokožkou a rychle se šíří do tkání. Přestože náhodná nebo úmyslná konzumace methanolu je nejběžnějším způsobem otravy, vdechování jeho par a kožní absorpce nesou také podíl na vzniku akutních toxických efektů. [7] Hromadění toxických metabolitů methanolu je hlavní příčinou vzniku patologických stavů. Metabolity jsou nebezpečné pro centrální nervový systém (CNS), gastrointestinální trakt a zrak. Vyvolávají metabolickou acidosu a buněčnou dysfunkci. [12] Toxické příznaky se objevují až po latentním období trvajícím 8 až 24 hodin po požití methanolu. [11] Příčinou tohoto zpoždění je tvorba toxických metabolitů. [13] Po latentním období obvykle nastává metabolická acidosa a útlum CNS doprovázený známkami zhoršeného vidění, slepoty až smrti. [14] Potenciální účinky vyplývají z inhibice cytochromoxidasy. Jde o mitochondriální enzym, který je nezbytný pro oxidativní fosforylaci. Jeho inhibicí dochází k nedostatečnému okysličení tkání, buněčnému edému až buněčné smrti. [13] Toxická a letální dávka není dosud jednoznačně stanovena. Individuální odlišnosti v citlivosti na množství požitého methanolu závisí na konzumaci ethanolu, hladině folátů nebo na odlišné aktivitě enzymů v metabolickém systému methanolu. [14]

Otrava methanolem tedy vzniká po jeho biotransformaci na vysoce toxické metabolity, jako jsou formaldehyd a kyselina mravenčí. Míra oxidace methanolu je spojena s aktivitou alkoholdehydrogenasy (ADH), která je závislá na genetických faktorech a faktorech životního prostředí, jako jsou kouření, strava, předchozí konzumace alkoholu, atd. [6, 14]

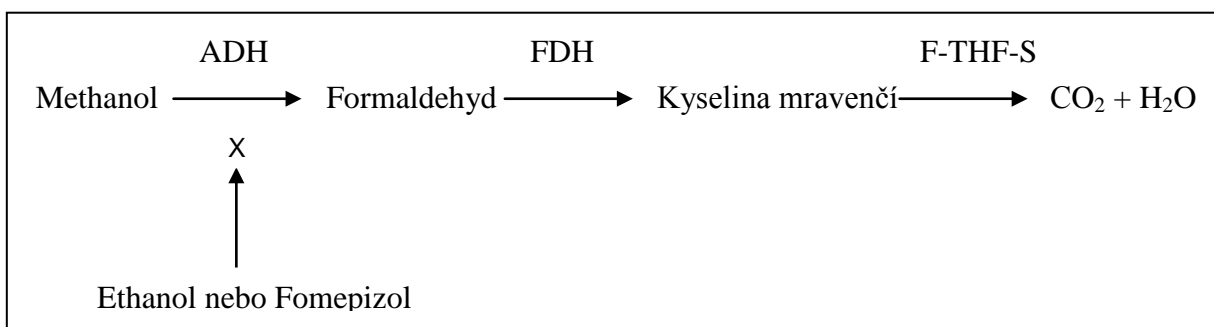


## 2.1 Metabolismus methanolu

Methanol se dostává do těla požitím, vdechnutím nebo rychlou absorpcí přes kůži. V těle je rozšířen krví do všech orgánů a tkání v závislosti na obsahu vody. Koncentrace methanolu v krvi je přímo úměrná jeho přijatému množství. Tedy míra toxického účinku methanolu na játra je přímo úměrná jeho koncentraci v krvi. Vstřebává se rychle ze zažívacího traktu (25 mg/kg za hodinu) a většina ho je metabolizována v játrech na oxid uhličitý. Míra přeměny methanolu je 7krát nižší než u ethanolu. Jen malá část odchází z těla močí nebo plícemi v nezměněné formě. Samotný methanol působí tlumivě na CNS. Toxicky působí až jeho metabolity, formaldehyd a kyselina mravenčí. [2, 9, 10, 14, 15]

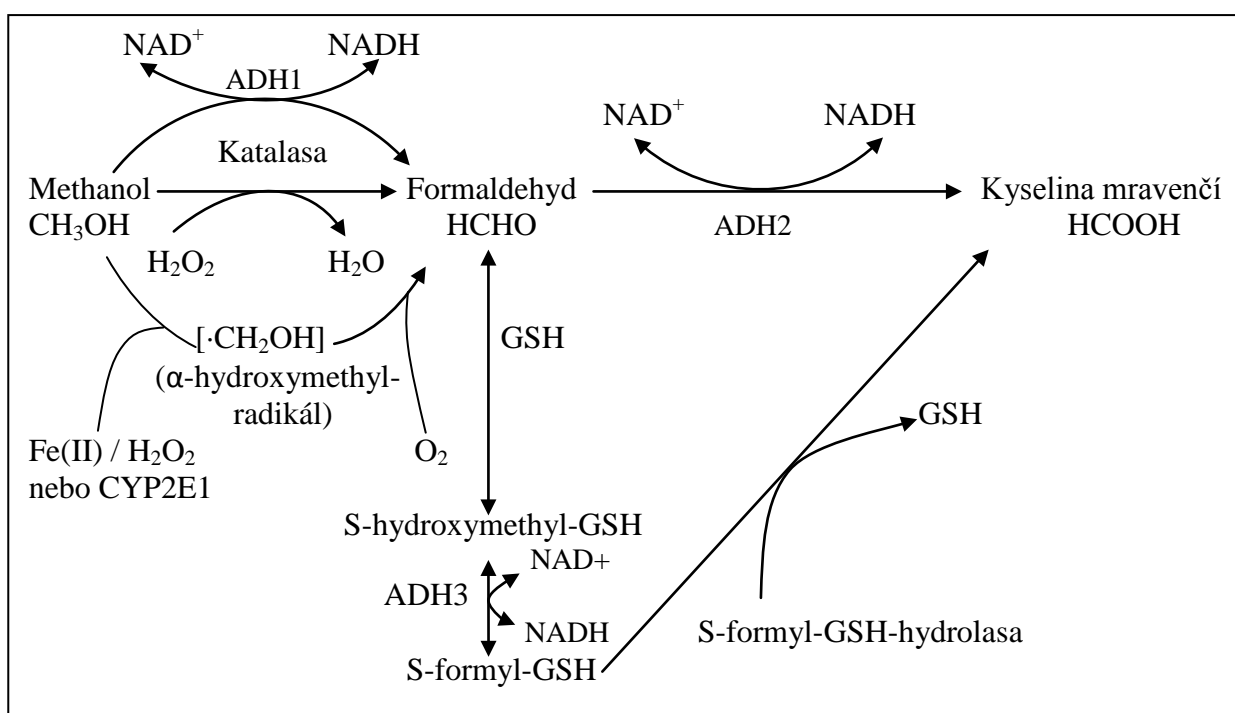
### 2.1.1 Oxidace methanolu

Oxidací methanolu v játrech, běžně za katalýzy enzymem ADH, vzniká formaldehyd. U lidí ale také existuje alternativní cesta, tzv. mikrosomální ethanolový oxidační systém (MEOS) závislý na cytochromu P-450 2E1 (CYP2E1), produktem je též formaldehyd. Alternativní cesta spočívá v oxidaci methanolu přes folátovou metabolickou dráhu, která je pomalejší a závislá na kyselině folinové. Jedná se o redukovanou formu kyseliny listové. Oxidace methanolu může být inhibována ethanolem, který je kompetitivním substrátem, jak lze vidět na obrázku 2. U lidí se methanol oxiduje jiným mechanismem, než u hlodavců. Transformace methanolu na formaldehyd je u hlodavců uskutečněna katalasa-peroxidasovým systémem v přítomnosti peroxidu vodíku. [2, 4, 14, 16]



**Obrázek 2** Inhibice přeměny methanolu ethanolem nebo fomepizolem na oxid uhličitý a vodu za katalýzy enzymy alkoholdehydrogenasy (ADH), formaldehyddehydrogenasy (FDH) a 10-formyltetrahydrofolátsynthetasy (F-THF-S). Upraveno podle [17]

Přeměna methanolu na formaldehyd prochází jednou ze tří samostatných drah, jak je znázorněno na obrázku 3. První a druhá dráha zahrnuje společný meziprodukt peroxid vodíku. Ten může vycházet z nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH)-dependentního elektronového přenosu a může přispět k přímé oxidaci methanolu, která je katalyzována katalasou nebo Fentonovou reakcí. Fentonovou reakcí se tvoří hydroxylové radikály. Tyto radikály mohou spontánně reagovat s methanolem za vzniku formaldehydu. Třetí významná dráha zahrnuje oxidaci přes nikotinamidadeninukleotid ( $\text{NAD}^+$ ), katalyzovanou cytosolovým isoenzymem alkoholdehydrogenasou (ADH1). [7]



**Obrázek 3** Metabolismus methanolu na formaldehyd procházející jednou ze tří samostatných drah.

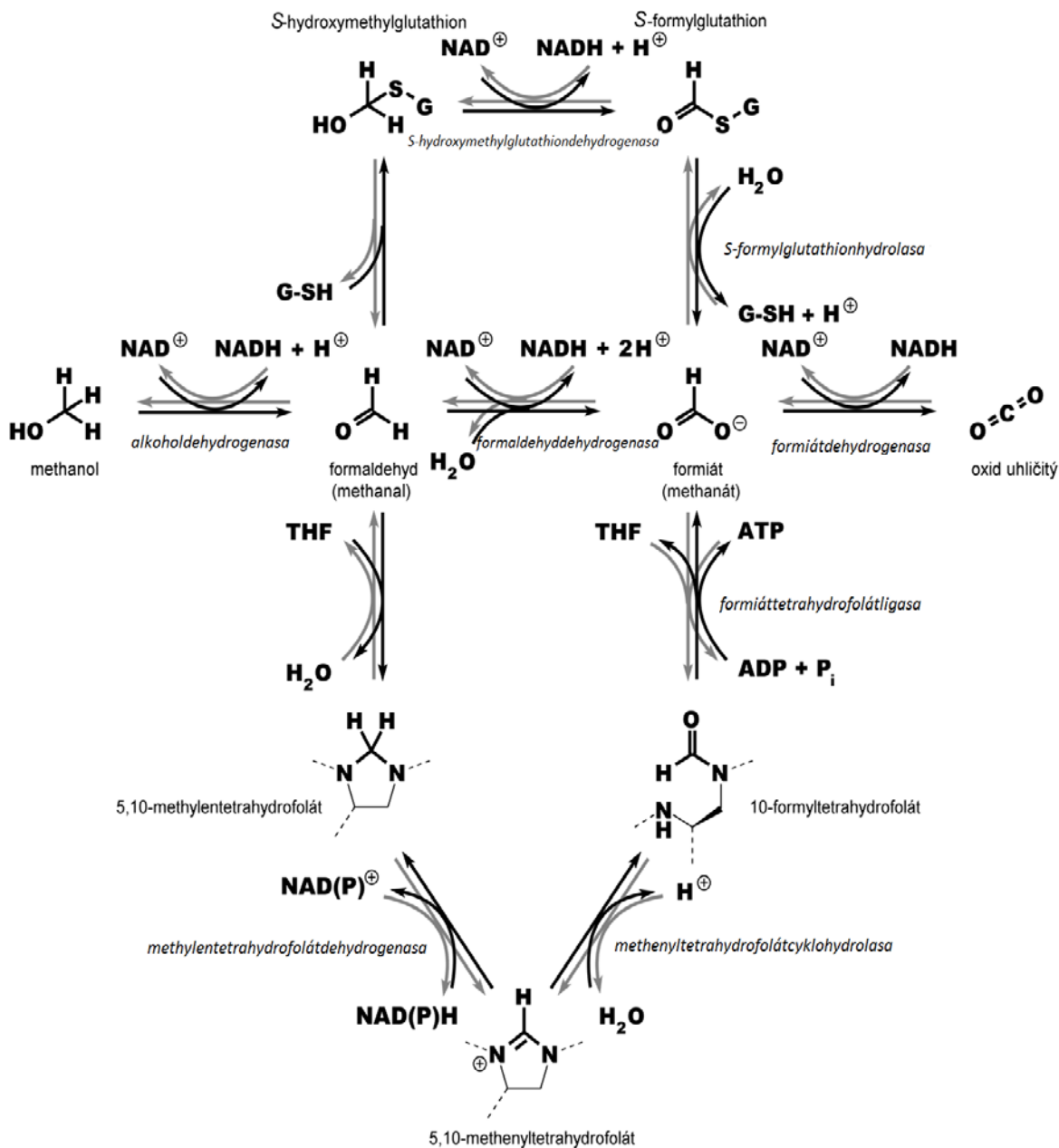
Nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma ( $\text{NAD}^+$ ), nikotinamidadeninukleotid, redukovaná forma ( $\text{NADH}$ ), alkoholdehydrogenasa (ADH), cytochrom P-450 2E1 (CYP2E1), glutathion (GSH). Upraveno podle

[7]

### 2.1.2 Oxidace formaldehydu

Formaldehyd, první meziprodukt v přeměně methanolu, je dále přeměněn na další produkty, jak je uvedeno na obrázku 4, nebo reaguje s buněčnými složkami. Formaldehyd se může redukovat na methanol za katalýzy ADH1 nebo oxidovat na kyselinu mravenčí v přítomnosti redukované formy glutathionu (GSH) za katalýzy glutathion-dependentní

alkoholdehydrogenasy (ADH5). Aktivita ADH1 může být detekována při malé koncentraci GSH nebo v jeho nepřítomnosti. Formaldehyd inhibuje glutathion-dependentní enzym ADH. Rychlou oxidací formaldehydu, za katalýzy formaldehyddehydrogenasy (FDH), vzniká mravenčan. Díky rychlosti této reakce nedochází k akumulaci formaldehydu v krevním řečišti. Formaldehyddehydrogenasa je  $\text{NAD}^+$ -dependentní enzym, který je přítomen ve všech tkáních a v krvi. Lze jej izolovat z jater a biochemicky stanovit. Jeho aktivita je inhibována 1,10-fenantrolinem a vysokou koncentrací pyrazolu. Oxidace formaldehydu za katalýzy FDH začíná neenzymatickou reakcí s GSH (kofaktor FDH). Vzniklý S-hydroxymethylglutathion je substrátem pro enzym FDH v přítomnosti  $\text{NAD}^+$ . Substrát je transformován na S-formylglutathion a thioester kyseliny mravenčí. S-formylglutathion je v játrech hydrolyzován na GSH a kyselinu mravenčí za katalýzy S-formylglutathionhydrolasy. Oxidace formaldehydu probíhá v mitochondriích a cytosolu hepatocytů. [2, 4, 7, 14, 16] Endogenní koncentrace formaldehydu v krvi je asi 2,60  $\mu\text{g/l}$ . Je velmi reaktivní a často odpovídá za patologické změny zraku. Formaldehyd snadno reaguje s aminoskupinou a sulfhydrylovou skupinou peptidů, proteinů a nukleových kyselin, za vzniku thiazolidin-4-karboxylové kyseliny a hydroxymethylových derivátů. Padesát až osmdesát procent endogenního formaldehydu se vyskytuje ve formě sloučenin, které obsahují GSH. Nejen toxicita formaldehydu, ale i jeho metabolismus závisí na koncentraci GSH v hepatocytech. Glutathion je tedy zodpovědný za metabolismus formaldehydu. Během intoxikace methanolem, klesá v játrech koncentrace GSH, zatímco aktivita enzymu glutathiontransferasy v séru je beze změny. Tím je metabolismus formaldehydu pomalejší a jeho toxicita vyšší. Glutathiontransferasa katalyzuje tvorbu GSH sloučenin. [14]



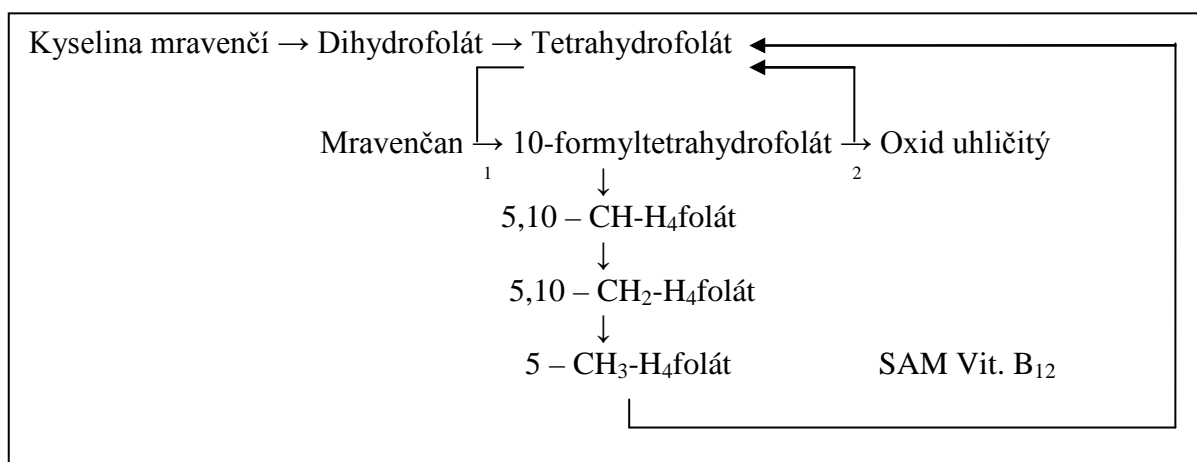
**Obrázek 4** Schéma přeměny methanolu na oxid uhličitý přes řadu meziproduktů. Formaldehyd může být oxidován na mravenčan v přítomnosti glutathionu (GSH) či formaldehyddehydrogenasy (FDH) nebo metabolizován přes tetrahydrofolátovou cestu. Dále nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma ( $\text{NAD}^+$ ), nikotinamidadenindinukleotid, redukováná forma ( $\text{NADH}$ ), nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma ( $\text{NADP}^+$ ), nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukováná forma ( $\text{NADPH}$ ), tetrahydrofolát (THF), adenosintrifosfát (ATP) a adenosindifosfát (ADP). Upraveno podle [16]

Formaldehyd je známý karcinogen způsobující karcinom dlaždicových buněk v nosní tkáni u krys a nazofaryngeální karcinom u lidí. Je považován za mutagenní metabolit methanolu. Je velmi reaktivní sloučeninou, která poškozují deoxyribonukleovou kyselinu

(DNA), ribonukleovou kyselinu (RNA), proteiny a lipidy tím, že s nimi tvoří kovalentní vazby. [4, 7] Methanol a formaldehyd snižují hladiny antioxidantních enzymů především u hlodavců a mohou přispívat k poškození jater, a tím se může zvýšit katalytická koncentrace aspartátaminotrasferasy (AST) a alaninaminotrasferasy (ALT) v séru. Alkohol játra poškozují hlavně v části, která je vystavena nižší koncentraci kyslíku, jedná se o jaterní acinus. [7]

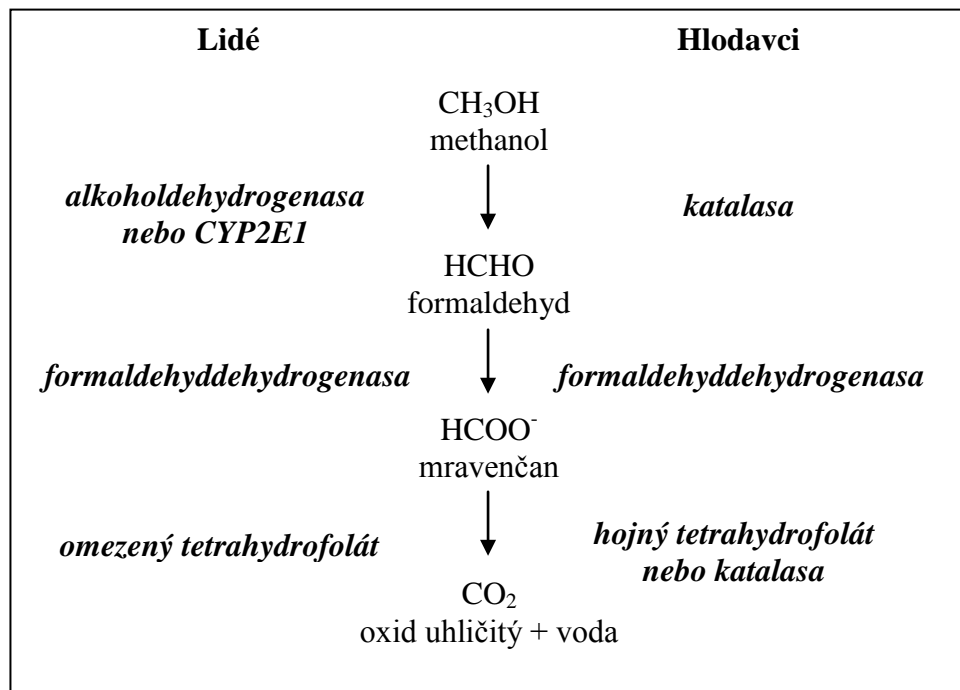
### 2.1.3 Oxidace mravenčanu

Kyselina mravenčí disociuje na mravenčan a vodíkový ion. Mravenčan je dále oxidován, jak je ukázáno na obrázku 5, na oxid uhličitý a vodu za katalýzy enzymem formiátdehydrogenasa v přítomnosti tetrahydrofolátu a dalších dvou enzymů (10-formyltetrahydrofolátsyntetasy a 10-formyltetrahydrofolátdehydrogenasy). U lidí je tato reakce dvakrát pomalejší než u hlodavců, což je důvodem jeho akumulace, jak je znázorněno na obrázku 6. Tetrahydrofolát je odvozen od kyseliny listové. U hlodavců je přeměna methanolu na mravenčan rychlost omezující reakcí a může způsobit akumulaci methanolu. U lidí je rychlost omezující reakcí přeměna mravenčanu na  $\text{CO}_2$ . Pokud rychlost tvorby mravenčanu překročí rychlost přeměny mravenčanu na  $\text{CO}_2$ , může dojít k akumulaci mravenčanu, a tím k vývoji acidosis. Ta je u lidí zapříčiněna i nízkými hladinami tetrahydrofolátu a 10-formyltetrahydrofolátdehydrogenasy. [2, 4, 14]



**Obrázek 5** Oxidace mravenčanu za katalýzy 10-formyltetrahydrofolátsyntetasy (1) a 10-formyltetrahydrofolátdehydrogenasy (2) s využitím S-adenosylmethioninu (SAM) a vitamínu B<sub>12</sub>. Upraveno podle [14]

Metabolismus mravenčanu je tedy závislý na folátu, který je u lidí v nízkých hladinách, proto se mravenčan hromadí v těle a rozvíjí toxicitu. [4, 17, 18] Kyselina mravenčí způsobuje hypoxii v mozku, ledvinách a srdci, tedy u orgánů, které potřebují velké množství kyslíku pro plnění své fyziologické funkce. Hromadění mravenčanu má za následek snížení hladiny kyseliny tetrahydrolistové v játrech, protože folát je kofaktorem enzymu 10-formyltetrahydrogenasy. Vznikající kyselina mravenčí tak nemůže být dále odbourávána. [1] U hlodavců je mravenčan metabolizován jak přes katalasa, tak také folát závislé dráhy, a tím je zabráněno jeho akumulaci. Katalasa poskytuje u všech živočichů ochranu buňky před reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS). Hlodavci jsou odolní vůči akutní toxicitě methanolem, protože nedochází k hromadění kyseliny mravenčí. Methanol u hlodavců zvyšuje peroxidaci lipidů v lymfatických orgánech a v mozku, jakož i snižuje hladinu GSH a aktivitu antioxidačního enzymu superoxiddismutasy. Pro studie byli vybráni i králíci, kteří podobně metabolizují methanol jako lidé, jelikož také využívají jaterní ADH. [19]

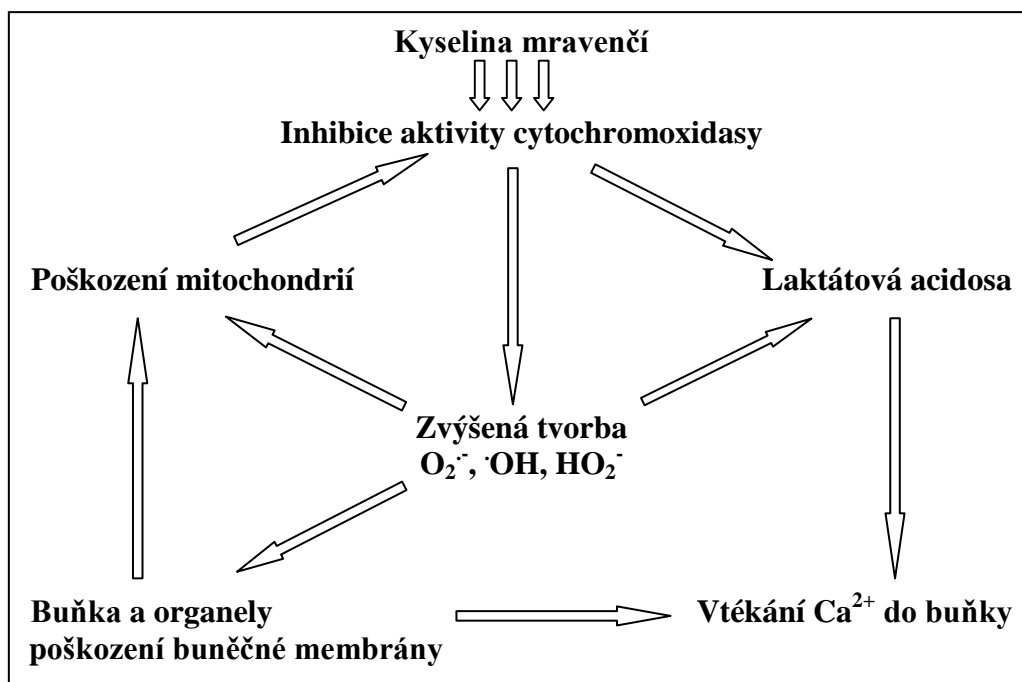


**Obrázek 6** Rozdíly v přeměně methanolu na oxid uhličitý u hlodavců a primátů. U hlodavců je metabolismus rychlejší než u primátů díky velké zásobě tetrahydrofolátu. Oxidace mravenčanu folátem probíhá 2krát pomaleji u lidí než u hlodavců. Katalasa je užívána všemi druhy živočichů v detoxikaci reaktivních sloučenin kyslíku (ROS). Cytochrom P-450 2E1 (CYP2E1). Upraveno podle [2, 19]

Část formaldehydu a mravenčanu může být navázána na endogenní molekuly nebo může vstupovat do endogenních syntetických drah. Endogenní metabolismus mravenčanu se zvyšuje v přítomnosti kyseliny listové. [2, 4, 14, 20]

### 3 Patofyziologie toxicity methanolu

Patofyziologie toxicity methanolu je spojena s jeho přeměnou na kyselinu mravenčí. Tato přeměna má za následek vznik acidosis. Vzniklý mravenčanový aniont inhibuje mitochondriální cytochromoxidasu, jak lze vidět na obrázku 7, což vede k produkci laktátu. S rozvojem acidosis prochází kyselina mravenčí do CNS, a tím se snižuje její eliminace. Mravenčan způsobuje poškození myelinové pochvy zřetkového nervu. Vlákna zřetkového nervu jsou citlivější na nižší hladinu cytochromoxidasy. Též dochází k poškození bazálních ganglií. Částečná kompenzace acidosis je doprovázena zrychlenou dechovou frekvencí. [17]



Obrázek 7 Mechanismus toxicity kyseliny mravenčí. Upraveno podle [14]

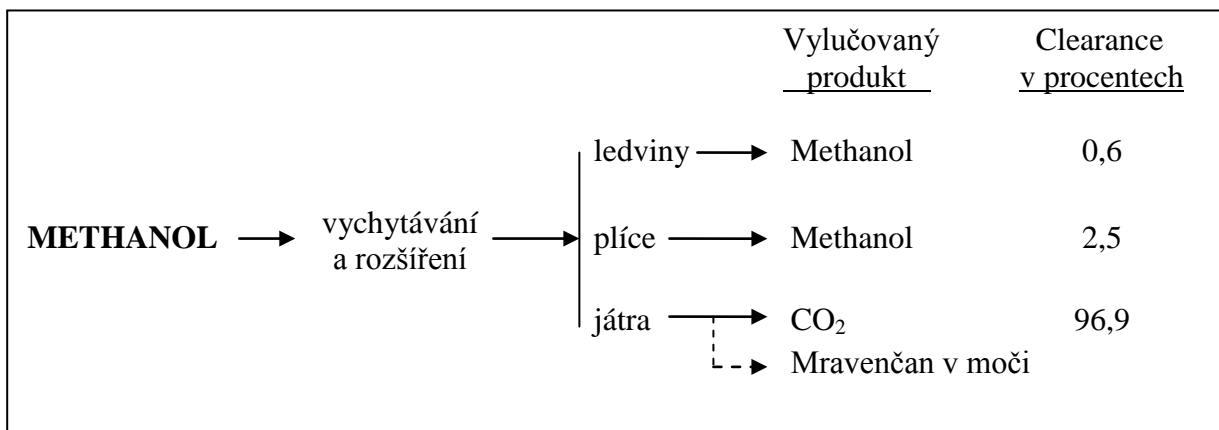
Sám methanol má podíl ve změně struktury membránových proteinů a lipidů. Methanol snižuje hydrataci povrchu membrán, protože jeho molekuly tvoří vodíkovou vazbu mezi proteiny a lipidy, zatímco molekuly vody jsou spojeny s membránovými glykolipidy a  $\text{NH}_3^+$  skupinami receptorových proteinů. Tím molekula methanolu rozruší strukturu fosfolipidové dvouvrstvy. Volné radikály reagují s membránovými fosfolipidy za vzniku hydroperoxidů. Výrazný nárůst koncentrace dvou aldehydů, malondialdehydu a 4-



hydroxynonenalu, způsobuje fragmentaci DNA, aktivaci poly(DNA-riboso)transferasy a akumulaci proteinu p53. To vše přispívá k buněčné apoptóze. [14] Normální buněčné funkce závisí na vyrovnaném redoxním prostředí. Ischemie či hypoxie ukazuje na závažný reduktivní stres, což vede ke zvýšení hladiny NADH, který redukuje železité ionty ve feritinu. Vzniklé železnaté ionty tak mohou reagovat s peroxidem vodíku za vzniku cytotoxických radikálů při Fentonově reakci. [7]

### **3.1 Eliminace methanolu**

Rychlost eliminace methanolu z krve závisí na jeho koncentraci a je pomalejší než u ethanolu. K eliminaci methanolu z organismu dochází především přes metabolické procesy. Ovšem malá část se vyloučí v nezměněné formě močí nebo plícemi, jak můžeme vidět na obrázku 8. Methanol se v játrech oxiduje na oxid uhličitý a vodu. [14] Celková eliminace methanolu je pomalá a odpovídá 1/7 rychlosti odbourávání ethanolu. Jelikož má ethanol vyšší afinitu k ADH než methanol, je preferovanějším substrátem. Vylučování methanolu v nezměněné formě plícemi či močí se děje v důsledku zvýšené hladiny ethanolu, který mu brání v přeměně na toxické formy. [16] Při nízkých koncentracích mravenčanu je jeho poločas přeměny za 1 až 3 hodiny, ale se zvyšující se koncentrací může být prodloužen. Koncentrace methanolu v moči se zvyšuje, pokud dotyčný po požití zvýší svou fyzickou aktivitu (např. cvičením). Methanol je měřen z krve nebo z moči. [2] Výměna chloridových iontů s mravenčanovými iony v proximálním kanálu ledvin má za následek zpětnou resorpci kyseliny mravenčí do krevního oběhu. [14]



**Obrázek 8** Schéma eliminace methanolu. Methanol je oxidován na oxid uhličitý (96,6 %), eliminován močí (0,6 %) nebo vydýchán plícemi (2,5 %). Upraveno podle [14]

## 4 Příznaky otravy methanolem

Tím, že methanol není toxický, ale až jeho metabolismem vznikají toxické produkty, dochází i k postupným projevům příznaků otravy. Příznaky intoxikace jsou většinou specifické. Vyvíjí se s časem a jsou často podceňovány. Řadíme sem např. světloplachost, pokles zrakové ostrosti i slepotu. Nеспецифické klinické projevy otravy znesnadňují diagnózu. [11] Formaldehyd a kyselina mravenčí jsou metabolity methanolu zodpovědné za jeho toxicitu. Akumulace kyseliny mravenčí a v pozdější fázi i kyseliny mléčné, způsobuje metabolickou acidosu se zvýšením tzv. aniontového okna a snížením hladiny bikarbonátů. Acidosa je hlavním rizikem při otravě methanolem. Hromadění kyseliny mravenčí způsobuje křeče, kóma, útlum buněčného dýchání a vede k poškození zrakového nervu, což může způsobit nevidomost. Též vede k neurologickým poruchám. Akumuluje se totiž v očním nervu, sítnici a bazálních gangliích mozku, jejichž poškozením dochází k útlumu centrálního nervového systému. U intoxikace methanolem se objevuje i akutní selhání ledvin. [1, 16, 21]

### 4.1 Akutní intoxikace methanolem

Postižený jedinec prožívá krátké období otravy s mírným útlumem CNS, po kterém následuje období, kde nejsou přítomny žádné známky intoxikace nebo toxicity (běžně 12 až 24 hodin). Následují fyzické symptomy lehké otravy projevující se bolestí hlavy, závratěmi, zmateností, ztrátou rovnováhy, horší artikulací a poruchami paměti. Mohou se přidat též zrakové poruchy, jako jsou mlhavé vidění, rozšířené zorničky či světloplachost. Z metabolických projevů lehké otravy se setkáváme s poklesem pH, hypoventilací a následným zvýšením osmolality a poté i aniontového okna. S otravou methanolem se mohou dostavit rovněž gastrointestinální symptomy s typickými projevy zvracení, průjmu, nevolnosti či bolesti břicha. [8, 9] Methanol prochází i placentou, čímž může poškodit plod. [17]

### 4.2 Chronická intoxikace methanolem

Chronická otrava má symptomy podobné akutní otravě. Těžká otrava se projevuje hlavně v CNS. Má za následek vznik křečí, které se mohou objevit po edému mozku nebo plic. Edém mozku v závažných případech způsobuje záchvaty až kóma. Snižuje se ostrost

a ztráta barevného vidění, objevuje se mydriáza či destrukce retiny a degenerace zrakového nervu. Dochází k prohlubování acidosy a ke zvýšení osmolality následované zvýšením aniontového okna. Při těžké intoxikaci se často objevuje i renální selhání. Otravu doprovází též akutní pankreatitida a porucha jaterní funkce. V oběhovém systému se projevuje intoxikace cyanózou v důsledku sníženého množství kyslíku v krvi, dále sníženým krevním tlakem, zvýšenou tepovou frekvencí a možností srdečního selhání. [8, 17] Poruchy zraku, v podobě rozmazaného, flekatého vidění nebo úplné ztráty zraku, jsou velmi specifické pro intoxikaci methanolem. [17]

### **4.3 Trvalé následky po intoxikaci methanolem**

Při přežití příznaků mohou nastat nevratné trvalé změny, jako je porucha až úplná ztráta zraku (25 až 30 % otrav). Dále se zhorší neurologické poruchy, ke kterým řadíme třes, změny osobnosti či ztuhlost. [16]

### **4.4 Vliv methanolu na centrální nervový systém**

Methanol je pro CNS sedativum, které je potenciálně toxické a může se u každého pacienta projevit jinak (křečemi, strnulostí, apatií až kómatem). Otrava methanolem může poškodit tkáň v některých orgánech. V mozku může způsobit difúzní edém, nekrózu bílé a šedé hmoty, atrofii, mozkové a intraventrikulární krvácení nebo mozečkové a optické nervové léze. Charakteristickými nálezy u pacientů jsou bilaterální putaminální nekróza a subkortikální léze bílé hmoty. Bilaterální putaminální nekróza je vzácná, ale typická pro intoxikaci methanolem. Mechanismus zodpovědný za putaminální nekrózu není znám. Metabolické nároky bazálních ganglií jsou vyšší než u jiných částí mozku. Takto zvýšené poptávky v bazálních gangliích mohou způsobit zvýšenou akumulaci kyseliny mravenčí. Jeden z navrhovaných mechanismů je snížení průtoku krve v bazálních Rosenthalových žilách. Otrava methanolem a pulmonální nekróza může být spojena s Wilsonovou chorobou, Kearns-Sayreovým syndromem, Leighovou nemocí, striatální degenerací spojené s Leberovou optickou atrofií, inhalací oxidu uhelnatého, hypoxicko-ischemickým poškozením a akutní kyanidovou intoxikací. Rozložení patologických nálezů zahrnuje zapojení subkortikální bílé hmoty a centrální šedé hmoty. Účelem je ochrana periferní šedé hmoty. Rozložení je multifaktoriální a vyplývá z mozkové mikrovaskulární anatomie a přímých

toxických účinků metabolitů methanolu. Kyselina mravenčí inhibující cytochromoxidasu, přispívá k difúzním abnormalitám v mozku. Může způsobit anoxii a následné selhání sodno-draselné pumpy ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasy). [13, 15]

#### **4.5 Vliv methanolu na zrak**

I malé množství požitého methanolu způsobuje vážné problémy očí až zničení části CNS nebo vede k trvalým neurologickým dysfunkcím či slepotě. Čtyři ml čistého methanolu vedou k oslepnutí. [12] Mechanismus účinku, kterým působí methanol na zrak, je dán toxickými účinky kyseliny mravenčí. Ta působí toxicky na sítnici a optický nerv, a tím přerušuje produkci mitochondriální energie. Inhibuje enzym cytochromoxidasu, který je součástí mitochondriálního elektronového transportního řetězce zapojeného do tvorby adenosintrifosfátu (ATP). Inhibicí dochází k navázání kyseliny mravenčí na trojmocné železo v molekule hemu cytochromoxidasy. Porušením mitochondriální funkce a snížením tvorby ATP dojde k narušení axoplasmatického toku, k otoku axonů v optickém disku a k edému sítnicového nervového vlákna. Inhibicí mitochondriální cytochromoxidasy mravenčanem se aktivuje anaerobní glykolýza, čímž dojde k rozvoji laktátové acidosis způsobené akumulací kyseliny mléčné. Acidosa má vliv na zvýšenou tvorbu superoxidových aniontů a hydroxylových radikálů, což vede k peroxidaci lipidů a k poškození mitochondrií, buněčných membrán a membrán buněčných organel, jak lze vidět na obrázku 7. Výsledné narušení sítnicového energetického metabolismu je základem vizuální dysfunkce. Sítnice má velmi omezenou metabolickou schopnost oxidovat mravenčan. Tím má tedy i nižší schopnost jej detoxikovat. [2, 14, 21] Dochází k zúžení zorného pole, ale i k úplné ztrátě zraku. Pro vizuální dysfunkci je typická dilatace zornice až ztráta jejího reflexu. Mezi známky poškození zraku patří prokrvení optického disku, bledost disku nebo jeho otok. Poškození sítnice způsobuje formaldehyd, který inhibuje enzym hexokinasu v oční sítnici. [12]

#### **4.6 Vliv methanolu na játra**

Játra jsou hlavním orgánem, který metabolizuje alkohol. Poškození jater alkoholem je příčinou celé řady onemocnění. Ukládání tuku v játrech, tzv. steatóza jater, vede k zánětlivému stavu, steatohepatitidě. Steatóza je jednou z nejběžnějších a nejčastějších reakcí objevujících se v časně fázi poruchy jater, ať alkoholického či nealkoholického původu.

Steatóza má vliv na rozvoj fibrózy a cirhózy jater nebo na vznik hepatocelulárního karcinomu a bývá doprovázena apoptózou hepatocytů a zánětlivými infiltráty. Vznik nádoru a jaterní fibrogeneze, vedoucí k cirhóze, představují konečný stupeň poškození jater. Základní mechanismy přispívající k rozvoji onemocnění jater způsobené alkoholem zůstávají stále neobjasněné. K lepšímu pochopení účinků methanolu na organismus mohou přispět experimenty na zvířatech (hlodavcích). Tyto pokusy mají celou řadu nevýhod, jako např. přirozený odpor zvířat k alkoholu. Osvědčilo se podání alkoholu v tekuté stravě. Tento model slouží pro studium předčasné fáze onemocnění jater způsobené alkoholem. Pro zkoumání vývoje steatózy, nekrózy, fibrózy a cirhózy jater se využívá intragastrický model krmení. [22, 23, 24]

#### **4.6.1 Volné radikály**

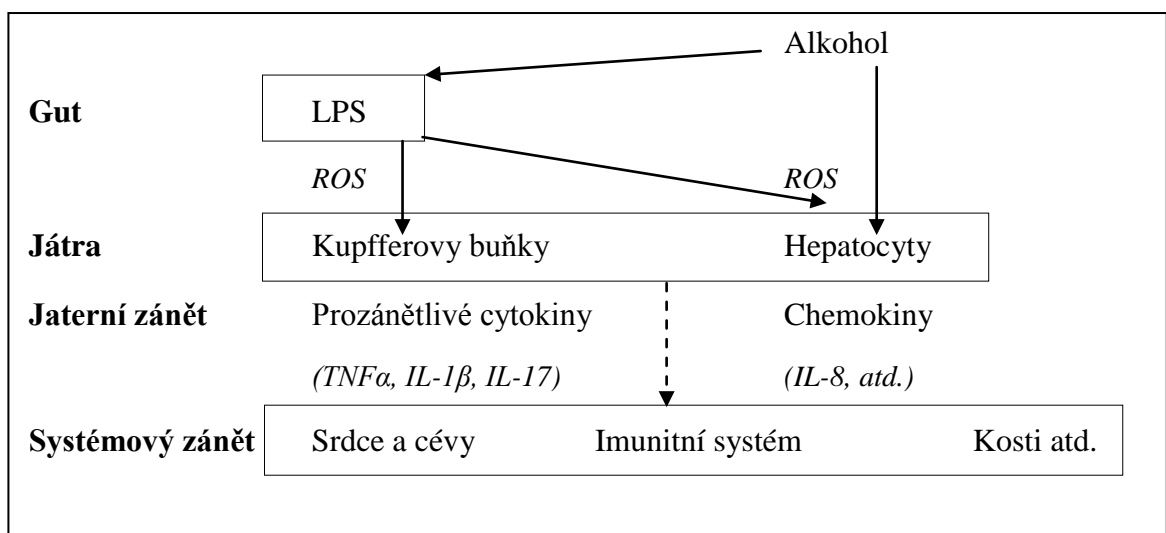
Volné radikály se tvoří při různých biologických procesech. Jde o molekuly s nepárovými elektrony. Reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) jsou odvozené, jak sám název napovídá, od kyslíku a patří sem superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a kyselina chlorná. Mezi reaktivní sloučeniny dusíku (RNS) se řadí oxid dusnatý, peroxydusitan a oxid dusičitý. Reaktivní sloučeniny kyslíku poškozují mitochondrie. Dochází ke změnám morfologie mitochondrií v podobě jejich zvětšení. Změnou jejich struktury je ovlivněno buněčné dýchání, snižuje se oxidace mastných kyselin nebo zvyšuje syntéza lipidů. Změna oxidativní fosforylace inhibuje tvorbu proteinů respiračních komplexů. Nižší oxidační kapacita vytváří podmínky pro tvorbu ROS, která je ještě více podpořena poškozením mitochondriální DNA (mtDNA), což vede k poklesu energetického metabolismu buňky. Vysoká aktivita mikrosomálního isoenzymu cytochrom P-450-dependentní nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidasa (NOX) má za následek tvorbu velkého množství superoxidových radikálů a peroxidu vodíku. Ty lze považovat za klíčový faktor přispívající k oxidačnímu stresu. Léčba ethanolem má rovněž za následek aktivaci NOX v hepatocytech. Hlavním zdrojem ROS jsou Kupfferovy buňky obsahující NOX. Reaktivní sloučeniny dusíku jsou tvořeny působením synthasy oxidu dusnatého (NOS), tento enzym je exprimován ve všech jaterních buňkách. Z oxidu dusnatého může vzniknout peroxydusitanový aniont, který nitrosyluje proteiny nebo reaguje s ionty přechodných kovů. [10, 25] Přeměna methanolu na jeho metabolity je spojena s tvorbou volných radikálů (např. superoxidový aniont zapojený do peroxidace lipidů). Methanol a formaldehyd snižují hladiny antioxidantních enzymů a přispívají k poškození jater spojeného se zvýšenou katalytickou koncentrací

aspartátaminotransferasy (AST) a alaninaminotransferasy (ALT) v séru. Jsou to biochemické ukazatelé velikosti poškození jater. Poškození jater alkoholem se prvně rozvíjí v jaterním acinu, části jater, která je více citlivá k nižší koncentraci kyslíku. Vysoce reaktivní formaldehyd a volné radikály mohou poškodit většinu buněčných organel, zejména pak buněčnou membránu, dochází tak ke změnám jejich funkce. To se projevuje v aktivitě proteolytických enzymů a jejich inhibitorů. [6, 7, 14, 26] Při otravě methanolem katalyzuje specifický cytochrom P-450 redukci molekulárního kyslíku na volné radikály. K těmto reakcím dochází v buněčných organelách, jako jsou mitochondrie a mikrosomy, a vzniklý peroxid vodíku je odstraněn přes oxidasa-peroxidasový systém. Ke zvýšené tvorbě volných radikálů vede též laktátová acidosa způsobená akumulací kyseliny mravenčí. [14]

#### **4.6.2 Mechanismy poškození jater**

Za poškození jater je zodpovědný zánět, steatóza, nekróza jater a oxidační stres. Hepatocyty mohou být poškozeny chemikáliemi třemi různými způsoby, a to přímou toxicitou, tvorbou toxických metabolitů hepatocyty nebo aktivací imunitních mechanismů. Toxický účinek methanolu na jaterní buňky je dán přímou toxicitou jeho metabolitů. K diagnostice poškození jater chemikáliemi se používají různé laboratorní testy. [6] Pro časnou diagnosu poškození jater chemikáliemi se měří aktivita enzymů karbamoylfosfátsynthasy a ADH. Oxidační stres se podílí na poškození jaterních buněk buď přímým navozením apoptózy nebo přes tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). [22] Na buněčné úrovni převládá aktivace hvězdicových buněk, Kupfferových buněk a makrofágů, zatímco na molekulární úrovni dominují látky zodpovědné za patologickou reakci (např. růstové faktory, chemokiny, cytokiny a ROS). Oxidativní stres se nachází u chronického onemocnění jater různé etiologie. [10] Mechanismy způsobující oxidační stres jsou vyvolané požitím alkoholu a intrahepatocytární tvorbou ROS. Alkohol zvyšuje propustnost střev a přesun bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) do jater. Nadměrné množství alkoholu vede k přemnožení Gram-negativních bakterií a uvolnění endotoxinu. Lipopolysacharidy vstupují do systémového oběhu dvěma způsoby, buď přes portální žílu, nebo přes gastrointestinální lymfatický systém. Chronická konzumace alkoholu má za následek změny střevní mikroflóry doprovázené dysbiózou (nerovnováha bakterií se ztrátou symbiotického vztahu mezi hostitelem a bakteriemi ve střevech). Alkoholem indukovaná dysbióza vyvolává zánět střev a vede k narušení integrity buněk střevního epitelu. V Kupfferových buňkách interagují LPS s „Toll-like“ receptory 4 (TLR-4), a tím generují oxidační stres a produkci prozánětlivých cytokinů

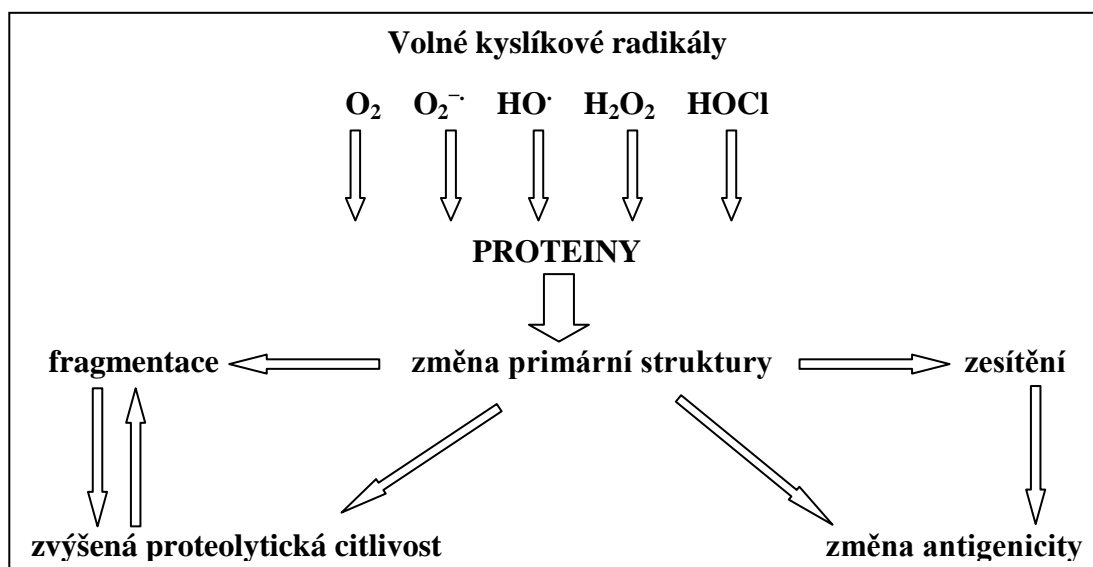
(TNF $\alpha$ ) přispívajících k poškození jater, jak vidíme na obrázku 9. Zajímavé je, že aktivací TLR-4 se také indukuje tvorba hepatoprotektivních cytokinů (interleukinů 6; IL-6) tlumících zánět. Jedním z hlavních faktorů oxidačního stresu během konzumace alkoholu je indukce 2E1 izoformy cytochromu P450 v hepatocytech a v Kupfferových buňkách. Tato indukce je důležitá pro metabolismus alkoholu, ale též zvyšuje náchylnost k poškození jater vyvolané léky, anestetiky nebo průmyslovými rozpouštědly. Činností CYP2E1 a NOX se tvoří ROS a zhoršuje se reakce Kupfferových buněk k endotoxinu. To má opět za následek zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$  a interleukinu 1; IL-1) a protizánětlivých cytokinů (IL-6 a interleukinu 10; IL-10). Tyto chemokiny přitahují i leukocyty. Proto Kupfferovy buňky a infiltrované neutrofilové v játrech přispívají k oxidačnímu poškození tvorbou ROS, které se podílejí na senzibilizaci hepatocytů. Dalším způsobem poškození jater je aktivace adenosylmonofosfátproteinkinasy (AMPK). Ta je přítomna v různých typech buněk (např. v neuronech, buňkách srdce, hladkého i kosterního svalu či buňkách pankreatu) a je důležitá pro udržení homeostázy buněk během metabolického stresu. Řídí funkci mitochondrií a její inhibicí se zvyšuje lipogeneze a tlumí oxidace mastných kyselin. Aktivace AMPK vede ke ztučnění jater a rozvoji steatózy. Peroxidací lipidů může vzniknout fibróza spojená se zvýšenou produkcí fibrogenních cytokinů, jako je transformující růstový faktor (TGF). [10, 24, 27, 28]



**Obrázek 9** Vliv alkoholu na vznik zánětu jater. Alkohol způsobí zvýšení hladiny bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) ve střevě, na které jsou citlivé Kupfferovy buňky, které produkují prozánětlivé cytokiny, tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a interleukin 17 (IL-17); a chemokiny, interleukin 8 (IL-8). Zároveň alkohol vede k tvorbě reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) v hepatocytech. Celá kaskáda je příčinou systémového zánětu. Upraveno podle [28]



Pro onemocnění jater způsobené alkoholem je typické narušení lipidového metabolismu. Špatná funkce lipidového metabolismu je zapříčiněna několika mechanismy, jako jsou poruchy buněčné homeostázy lipidů, zvýšená produkce cytokinů a oxidační stres. Výsledkem je jaterní steatóza. [29] Vysoce reaktivní molekuly ROS poškozují fosfolipidy, nukleové kyseliny, sacharidy i proteiny. Změny v primární struktuře proteinů vedou ke změnám ve struktuře sekundární i terciární, což může mít za následek denaturaci, agregaci nebo fragmentaci molekul bílkovin, jak vidíme na obrázku 10. Modifikace proteinů závisí na druhu a koncentraci volných radikálů, které na ně působí. [14] Díky biologickým testům a pokročilé technice, jako je lipidomika a proteomika, můžeme určit stadia poškození jater. Proteomika studuje změny v expresi, regulaci a funkci proteinů. Změny v expresi proteinů se podílejí na metabolismu aminokyselin, alkoholů a lipidů. Methanol nebo jeho metabolity ovlivňující aktivitu, stabilitu, expresi, lokalizaci i strukturu některých proteinů, mohou změnit jejich interakce s jinými molekulami. Expresie proteinů se liší v různých fázích onemocnění. Identifikace, charakterizace a funkční změny v těchto proteinech vedou k tvorbě biomarkerů pro včasné definování steatózy jater. Včasná detekce a schopnost rozlišovat mezi etiologií a různými stadii poškození jater jsou důležité pro terapeutickou léčbu. [22] V místech organismu kde byl prokázán zánět, steatóza nebo tvorba nádoru, lze nalézt bílkovinu osteopontin (OPN), což je protein extracelulární matrix vylučovaný různými tkáněmi. Přispívá k poškození jater způsobené alkoholem a také se objevuje u fibrózy či rakoviny jater. [23]



**Obrázek 10** Účinky volných kyslíkových radikálů na strukturu proteinů. Upraveno podle [14]

### 4.6.3 Antioxidační ochrana

Nadměrná produkce ROS přesahující kapacitu antioxidační obrany vyvolává oxidační stres. Proto se podávají antioxidanty (např. vitamín E, superoxid-dismutasa, atd) jako látky zabráňující poškození jater. [10] Antioxidanty jsou schopny snižovat apoptózu hepatocytů. Při současných možnostech léčby, jež jsou poměrně omezené, mají slibné využití. Bylo prokázáno, že  $\beta$ -karoten snižuje poškození jater a peroxidaci lipidů. Zároveň tlumí zánět a snižuje hladinu TNF v séru. Antiapoptické a antioxidační účinky  $\beta$ -karotenu jsou využívány u pacientů s chronickým onemocněním jater. Tyto povzbudivé výsledky by mohly podpořit další výzkum  $\beta$ -karotenu, zejména pro jeho vliv na fibrózu a vznik nádorů nebo pro jeho specifické buněčné účinky. [24] Dalšími ochrannými látkami jsou zeaxanthin a luteiny. Jde o běžné karotenoidy zabráňující rozvoji karcinomu či poškození jater. Zeaxanthin zabráňuje oxidačnímu stresu a zastavuje zánět a fibrózu. Jinými léčivy jsou zelený čaj, silibinin či kustovnice čínská, tedy preparáty dostupné a s nízkými vedlejšími účinky. [26]

### 4.6.4 Histologie jaterní tkáně

Biopsie jater nebo vyšetření vzorků po pitvě jsou preferované metody pro interpretaci morfologické funkce a stanovení rozsahu poškození. Průkaz působení methanolu na jaterní tkáň vychází z poškození jaterních buněk, které jsou zkoumány histologicky. Řezy jaterní tkáně jsou fixované formalínem, zalité parafínem a barvené hematoxylinem a eosinem pro lepší popis morfologie a lepší pozorování poškozených hepatocytů pod mikroskopem. Tyto vzorky ukazují hlavní morfologické změny hepatocytů, ke kterým patří steatóza a buněčné zduření, hepatocytární nekróza, žlučová stáza v hepatocytech a vakuolární degenerace. Buněčné zduření způsobuje nepravidelně nahromaděná cytoplasma. Lze vidět i poničené jaterní buňky v podobě koagulační nekrózy okolo centrální žíly v jaterním lalůčku a také přítomnost eozinofilní cytoplasmatické inkluze a fibrózy. Steatóza v jaterních buňkách je nejběžnější histologický nález. K morfologickým a funkčním změnám buněk vedou vratné a nevratné změny hepatocytů. Za nevratné poškození buněk se považuje nekróza hepatocytů. Játra jsou sice první orgán, který je vystaven působení methanolu, ale přesto nejzávažnější až smrtící účinky jsou způsobeny poškozením CNS. [6]

#### 4.6.5 Jaterní onemocnění

Alkohol má na funkci jater velmi škodlivé účinky a byl uznán jako hepatotoxin. Je příčinou hepatocelulárního karcinomu. Methanol a jeho metabolity poškozují játra v průběhu času. Jedno z nejvýznamnějších onemocnění jater je alkoholická steatóza jater (AFLD). Je způsobená nadměrnou konzumací alkoholu nebo genetickými defekty. Zahrnuje široké spektrum onemocnění v podobě jednoduché steatózy bez zánětlivé infiltrace, alkoholové steatohepatitidy (se zánětlivými ložisky) a chronické hepatitidy (jaterní fibrózy a cirhózy). Steatóza je většinou asymptomatická a vymizí po pár týdnech abstinence, ale nepřetržitou konzumací alkoholu, dochází k rozvoji alkoholové steatohepatitidy a cirhózy. Alkoholem vyvolaná cirhóza je charakterizována oběma typy steatózy a hepatitidou spojenou s fibrózou. Fibróza jater je pak výsledkem akumulace kolagenu a jiných proteinů, které brání normální funkci jater. Děje jsou spojené s produkcí ROS. Proto účinná ochrana před zánětem probíhá buď přímo, inhibicí aktivace Kupfferových buněk, nebo nepřímo, potlačením transkripčního faktoru (NF- $\kappa$ B). Alkoholové onemocnění jater může vyústit v zánět poškozující stěny arterií. Dojde k ovlivnění tonu arteriální stěny a uvolňování NO společně s endotelinem-1. Ty pak způsobí endoteliální dysfunkci a změnu elasticity cévy, což vede k arteriální ztuhlosti. Poškozením jaterní hvězdicovité buňky se do krve uvolňuje angiotensin II (proaterogenní a vasokonstrikční peptid působící na stěny arterie). Onemocnění jater může vést k imunodeficitu. Pacienti jsou pak náchylnější na bakteriální pneumonie a septikémie. V souvislosti s chronickým onemocněním jater je identifikována i osteodystrofie včetně osteoporózy, osteomalacie nebo osteopénie. Včasná léčba jaterní osteodystrofie je důležitá pro minimalizaci rizika zlomenin. [25, 26, 28]

## 5 Kinetika methanolu

### 5.1 Distribuce

Rozšíření methanolu v organismu je závislé na vodě. Koncentrace methanolu v moči a v krvi souvisí s dávkou, dobou expozice a se současným požitím ethanolu. U zvířat vystavených vysokým koncentracím methanolu se jeho přítomnost prokázala v krvi, žluči, moči, játrech, gastrointestinálním traktu a sklivci. Nižší hladiny byly prokázány i v kostní dřeni, tukové a svalové tkáni a v mozku. U lidí se po pitvě analyzovala hladina methanolu v tělních tekutinách a tkáních. V tělních tekutinách, jako jsou mozkomíšní mok, sklivec a žluč, byly zjištěny vyšší hladiny methanolu oproti jeho koncentraci v krvi. Ve tkáních se nejvíce methanolu nacházelo v mozku, ledvinách, slezině a plicích. Naopak nižší množství bylo v kosterním svalu, slinivce břišní, srdci a játrech. [2]

Po rychlém vstřebání methanolu ze zažívacího traktu se rychle šíří do těla a jeho maximální koncentrace v séru se objeví za 30 až 90 minut v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti stravy v gastrointestinálním traktu. Biologický poločas, tedy doba, za kterou se vyloučí z organismu polovina množství přijatého methanolu, je 8 až 28 hodin. [2, 8] Průměrný biologický poločas je asi 12 hodin, ale při současné léčbě ethanolem je možné ho prodloužit až na 30 hodin. Během hemodialýzy se podstatně zkracuje na 2 až 3 hodiny. [16] V játrech se methanol přeměňuje na formaldehyd za asi 1 až 2 minuty a následně na kyselinu mravenčí, které je v krvi a v moči maximum po 2 až 3 dnech po požití. [2, 8]

Za minimální toxickou dávku methanolu pro dospělého člověka se považuje požití 10 ml, což je hladina methanolu v krvi v průměru asi 100 mg/l. Pokud hladina methanolu dosáhne 200 mg/l, zahájí se léčba protijedem. Za těžkou otravu methanolem se pokládá koncentrace 400 mg/l a za smrtelnou pak 1000 až 2500 mg/l. Sleduje se i hladina kyseliny mravenčí, jejíž koncentrace v krvi vyšší než 200 mg/l způsobuje metabolickou acidosu a též problémy se zrakem. Stoupne-li její hladina nad 500 mg/l, pak mluvíme o těžké otravě methanolem. [16] Minimální smrtelná dávka methanolu je 1 g na kg tělesné hmotnosti. [14]

Rychle se vstřebává po požití a vdechnutí, ale při dermální expozici je absorpce pomalejší. Hladina methanolu v krvi po inhalaci nemusí záviset jen na jeho množství a době působení, ale záleží i na pohybové aktivitě jedince. [17]

## 5.2 První pomoc při otravě

Pokud dojde k nadýchání par methanolu, je nutné postiženého vyvést na čerstvý vzduch. Jestliže dojde k zástavě dechu, musí se zahájit umělé dýchání nebo kardiopulmonální resuscitace. [3] Při styku methanolu s pokožkou je postižené místo citlivé a zarudlé. Kontaminované oblečení by mělo být odstraněno, proto je postiženého třeba svléknout na zasaženém místě a oplachovat pokožku dostatečným množstvím vlažné vody nejméně 15 minut. [1, 9] Při kontaktu s očima je nutno vypláchnout je velkým množstvím vody po dobu asi 15 minut a následně se poradit s lékařem. [3] Požitím methanolu nastupují příznaky v závislosti na jeho vypitém množství. U postiženého kontrolujeme, pokud je v bezvědomí, dech a tep a popřípadě zahájíme umělé dýchání či nepřímou masáž srdce. V případě, že je při vědomí, snažíme se vyvolat zvracení. Nejčastější pomocí bývá podání asi 40 ml čistého ethanolu a zavázání očí pro zábranu styku se světlem. Odbornější pomocí je výplach žaludku roztokem hydrouhličitanu sodného a vody (asi 5 lžiček na 1 litr vody). [1] Výplach žaludku či vyvolat zvracení je účinné pouze do 30 až 60 minut po požití, jelikož po jeho vstřebání z gastrointestinálního traktu se objevuje v krvi za 30 až 90 minut. [16]

## 6 Vyšetření

Diagnóza intoxikace methanolem je založena na klinickém obraze, vyšetření zraku, zvýšeném aniontovém a osmolálním okně, přítomnosti methanolu v krvi a na nepřítomnosti jiných toxinů v krevním obraze. Laboratorní důkaz metabolické acidosisy spolu s výší aniontového a osmolálního okna (rozdíl mezi hodnotou osmolality naměřené v séru a vypočítanou hodnotou) se používají běžně při podezření na toxickou otravu methanolem. Brzy po požití methanolu dochází k poklesu koncentrace hydrogenuhličitanů v séru a k maximálnímu zvýšení osmolálního okna. Tento rozdíl je časným ukazatelem toxické otravy. V pozdějších fázích otravy se osmolalita snižuje až na normální hladinu, zatímco míra aniontového okna se v průběhu intoxikace zvyšuje. Důvodem je degradace produktů methanolu. Výši aniontového okna má na svědomí kyselina mravenčí, jako primární toxin způsobující metabolickou acidosu a oční toxicitu. Se stupněm acidosisy souvisí i míra poškození zraku. Velikost osmolálního okna se u jednotlivců liší (tedy jeho normální hladina nevyklučuje toxicitu). Pro diagnózu je důležité měření koncentrace methanolu v séru plynovou chromatografií. Intoxikaci potvrzuje hladina methanolu v séru nad 6 mmol/l (20 mg/dl). [11, 12, 17]

### 6.1 Plynová chromatografie

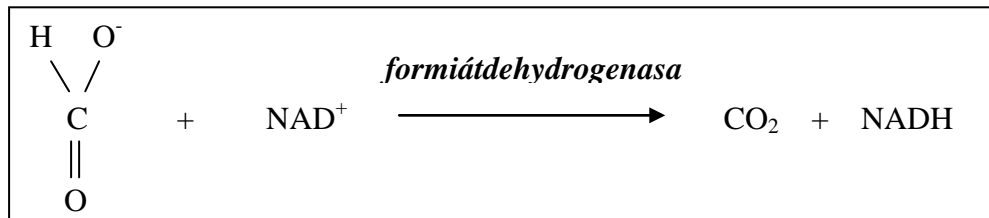
Existují různé metody plynové chromatografie pro stanovení methanolu v biologických vzorcích. Nejčastějším vyšetřovaným materiálem je krev, moč a vydechovaný vzduch. Stanovení methanolu v krvi a moči se provádí metodou kapilární plynové chromatografie využívající plamenový ionizační detektor a techniku headspace. To se využívá i při detekci methanolu v moči metodou přímého vstřikování. [2, 16]

## 6.2 Počítačová tomografie

Počítačová tomografie (CT) může prokázat léze o vysoké hustotě po obou stranách bazálních ganglií. Tyto léze potvrzuje magnetická rezonance mozku. Typické oboustranné nálezy s oslabenými lézemi v putaminální a hloubkové bílé mozkové hmotě jsou pozorovány pouze u pacientů, kteří žijí déle než 24 hodin. V akutní fázi opilosti jsou tyto nálezy normální. U pacientů, kteří přežijí akutní fázi intoxikace, se můžou vyvinout extrapyramidové příznaky a projevy zahrnující tuhost, třes a monotónní řeč. [13]

## 6.3 Stanovení kyseliny mravenčí

Při metabolismu je mravenčan oxidován na oxid uhličitý. Reakce je katalyzovaná formiátdehydrogenasou, jak vidíme na obrázku 11, a zároveň dochází k redukci  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ . Ten se stanovuje spektrofotometricky při 340 nm. Negativní výsledky testu pro stanovení mravenčanu v séru jsou v hodnotách 0 až 17 mg/l. Naopak za pozitivní se považují výsledky vyšší než 17 mg/l. [16]



Obrázek 11 Princip metody stanovení mravenčanu. Upraveno podle [16]

## 7 Terapie

Existují tři základní postupy v léčbě intoxikace methanolem. Jedná se o léčbu metabolické acidosis, inhibici metabolismu methanolu a zvýšenou eliminaci nemetabolizovaných sloučenin, které se stávají později toxickými. Léčba pacientů otrávených methanolem má mnoho podob. Například podávání pufru při terapii acidosis, podávání protijedů k zábraně přeměně methanolu na toxickou kyselinu mravenčí, podání kyseliny listové pro zvýšení eliminace mravenčanu, alkalizace, výplach žaludku či hemodialýza k úpravě acidosis a odstranění toxických látek. Optimální protijed pro léčbu methanolové intoxikace není znám. Proto také užití pouze jednoho z antidot není zcela nejvhodnějším způsobem léčby. Z tohoto důvodu jsou doporučena další vyšetření. Základem terapie je podání antidot, které blokuje funkci ADH, jako jsou ethanol nebo fomepizol. Oba zabraňují vzniku kyseliny mravenčí. Někteří pacienti bývají léčeni i steroidy. Intravenózní vysoké dávky steroidů (methylprednisolu) vykazují zlepšení zraku v 87,5 % případů. Dobré výsledky závisí na stupni metabolické acidosis, proto tato léčba musí být zahájena krátce po požití methanolu. Steroidní léčba bývá většinou nasazena, pokud není k dispozici fomepizol. [12, 15, 16, 18, 30] Otrava methanolem je klasický příklad život ohrožujícího stavu. Pro experimentální studie se ale nemohou používat takové živočišné druhy, u nichž otravou methanolem nedochází k metabolické acidose. Proto jsou pokusy na zvířatech velmi omezené. [31]

### 7.1 Ethanol

Jde o základní léčbu otravy methanolem. V požitém destilátu záleží především na poměru koncentrací methanolu a ethanolu. Pokud je množství ethanolu vyšší než methanolu, dochází k potlačení jeho oxidace. To znamená, že ethanol je metabolizován ADH stejně jako methanol. Oba alkoholy soutěží o vazbu na tento enzym, ovšem ethanol má k němu asi 20krát vyšší afinitu a je tedy preferovanějším substrátem. Ethanol je protijedem při otravě methanolem, ale zároveň se jedná o psychotropní návykovou látku, která má též řadu negativních účinků (např. útlum CNS). Toto vyšší množství antidota způsobuje vylučování methanolu z těla v nezměněné podobě močí či plícemi. [5, 16]



Ethanol se využívá k léčbě otravy velmi často díky jeho nízké ceně. Nevýhodou jsou časté odběry krevních vzorků ke stanovení koncentrace ethanolu v séru a následné přizpůsobení rychlosti infuze k udržení konstantního terapeutického rozmezí. [18, 30]

## **7.2 Fomepizol (4-methylpyrazol)**

4-Methylpyrazol je inhibitor ADH1 a běžně užívaný jako protijed. [7] Pacienty, kteří byli otráveni methanolem a jsou léčeni fomepizolem, můžeme rozdělit do dvou kategorií. První kategorie zahrnuje kriticky nemocné pacienty s těžkou metabolickou acidosou nebo s poruchami zraku. Proto se jim ihned podává protijed fomepizol a okamžitě poskytuje hemodialýza. Do druhé kategorie se řadí stabilní pacienti s nízkou metabolickou acidosou a bez zrakových vad. Může se jim toto antidotum podat.

Fomepizol je velmi silný inhibitor ADH. Fomepizol má 8000krát vyšší afinitu k ADH než ethanol a 80000krát vyšší afinitu než methanol. Fomepizol poskytuje delší inhibici enzymu ADH a je podáván po 12 hodinách. [16, 18] Množství protijedu se stanovuje v závislosti na hmotnosti pacienta. Dávka je stálá a podává se v pravidelných intervalech. Není nutné sledovat hladiny v séru, jelikož nejsou známy žádné nežádoucí účinky. Fomepizol oproti ethanolu nezpůsobuje opilost ani hypoglykémii, též netlumí CSN. Proto je vhodný pro pacienty s poruchou vědomí, pro těhotné ženy nebo pacienty pod vlivem tlumivých látek. [16, 30] Současné užití fomepizolu a ethanolu je kontraindikováno, protože fomepizol prodlužuje poločas ethanolu. [21] Odstranění ethanolu je tedy asi o 40% pomalejší. Naopak zpomalení eliminace fomepizolu ethanolem je pomalejší o 50%. [8]

## **7.3 Leukovorin (kyselina folinová)**

Podává se všem pacientům, kteří jsou léčeni antidoty inhibujícími ADH nebo také pacientům s podezřením na otravu methanolem. Metabolická acidosa je výsledkem kombinace akumulace mravenčanu a laktátové acidosis. [8, 16] Hemodialýza a intravenózní podání kyseliny folinové nebo kyseliny listové zvyšuje odbourávání kyseliny mravenčí na CO<sub>2</sub>. [11, 31]

## 7.4 Hemodialýza

Pokud je to nutné, je provedena hemodialýza. Upravuje acidosu a slouží k odstranění toxického methanolu i mravenčanu. [20] Tato léčba umožňuje oddálení nebo zmírnění klinických příznaků, pokud jsou podávány hydrogenuhličitan a fomepizol v adekvátních dávkách. Indikací pro hemodialýzu jsou jakékoliv příznaky postižení zraku, křeče, kóma, těžká metabolická acidosa s pH pod 7,20 (deficit bází je větší než 15 mmol/l nebo aniontové okno větší než 30 mmol/l), dále koncentrace methanolu v krvi nad 20 mmol/l (60 mg/dl) nebo přijetí více než 40 ml methanolu. Pokud je pacient léčen fomepizolem, je poločas rozpadu methanolu 52 hodin. Ale pokud je zahájena hemodialýza, je tento poločas výrazně zkrácen na 2,5 hodiny. Důvodem je vyšší průtok krve dialyzátorem (průtok by měl být 250 ml krve za minutu) a velká plocha dialyzátoru. Odstranění mravenčanu je individuální. Variabilitu v eliminaci endogenního mravenčanu vysvětluje jeho rozdílná renální exkrece. Rozdíly v renální exkreci mravenčanu závisí na pH. Čím se stává moč kyselější, tím méně se vyloučí mravenčanu. Dialýza pacientů s acidosou je důležitá pro snížení clearance mravenčanu. Hemodialýzu je třeba zvážit pro jednotlivé případy závažné methanolové intoxikace zvláště, protože i kdyby chyběla metabolická acidosa, methanol sám o sobě může přispět k toxicitě. [18, 32] Během hemodialýzy by měla být dávka fomepizolu zvýšena, protože je během ní eliminován. [21] Podává se až do té doby, než klesne hladina methanolu a sníží se acidosa. [8]

## 8 Informace o otravě methanolem v České republice

V ČR od počátku epidemie otrav methanolem, tedy od 3. září 2012, kdy došlo k prvnímu úmrtí, do 12. března 2014, zemřelo 52 osob. Další desítky osob utrpěli vážné poškození zdraví. Během tohoto mimořádného stavu se konaly soudní procesy s 31 obžalovanými v „methanolové kauze“. Nejvíce případů se vyskytovalo v oblasti na severu Moravy. [33]

Ke dni 31. 1. 2014 bylo v Moravskoslezském kraji provedeno na 39 471 kontrol. Odebráno bylo na 1 276 vzorků, z nichž jedna třetina nebyla vhodná k lidské spotřebě, jelikož obsahovala nebezpečný methanol nebo isopropanol. Celkově bylo intoxikováno 65 lidí. V nemocnicích bylo hospitalizováno na 49 osob, úmrtnost k tomuto dni činí 23 osob, 12 osob má trvalé poškození zdraví. Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje v Ostravě spolupracovala s Policií ČR, Celní správou ČR, Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí, hasičskými záchrannými sbory, Krajským úřadem a Krajským zdravotnickým zařízením, což bylo nezbytné pro včasnou informovanost obyvatelstva a včasné posouzení zdravotních rizik. [34]

Například ve Zlínském kraji bylo evidováno 21 případů otrav methanolem. U 4 osob byla jako příčina úmrtí prokázána otrava methanolem. Jeden z pacientů měl těžké následky po otravě methanolem a jeho hospitalizace trvala 7 týdnů. Trpěl difúzní encefalopatií s postižením bílé hmoty, bazálních ganglií a zrakové dráhy ve smyslu demyelinizace jako následek toxického účinku methanolu. Pouze 3 pacienti z 16 hospitalizovaných nebyli hemodialyzováni. Fomepizol byl nasazen u 3 pacientů. [35]

Policie obvinila v souvislosti s aférou methanol 65 lidí, z toho 30 lidí je stíháno vazebně. Také zajistila skoro 600 tisíc litrů nelegálně vyrobeného lihu. [36]

Byla přijata série opatření pro zábranu šíření pančovaných alkoholických nápojů. Tím i zákaz prodeje a vývozu nápojů s obsahem alkoholu nad 20 %. Povinností bylo dokládat původ lihu. Distribuční síť byla vypátrána a zničena, ale i přesto se na území ČR nachází nebezpečné množství pančovaného alkoholu methanolem. [16]

## 9 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá obecnými vlastnostmi methanolu, které jsou podstatné pro pozdější pochopení jeho toxických účinků. Jelikož se alkohol, a s ním spojená otrava, vyskytuje po celém světě, nejde o zanedbatelný problém. Otrava methanolem má na svědomí spoustu závažných následků, ke kterým řadíme oslepnutí, koma až smrt. To je dáno jeho metabolickou přeměnou na toxické metabolity. Metabolity sebou nesou řadu nepříznivých vlivů nejen na zrak a CNS, ale i na játra. Různé stupně intoxikace způsobují i různé zdravotní problémy, které končí někdy i trvalými následky až úmrtím. Jsou popsány nepříznivé účinky methanolu a jeho metabolitů na různé mechanismy a systémy v těle, které ztrácejí svou přirozenou funkci. Největší dopad má především na CNS, i přesto, že prvním orgánem, který je působením methanolu vystaven, jsou játra. V játrech je schopen indukovat tvorbu řady látek vedoucích k jejich poškození. Při intoxikaci methanolem je důležité včasné a správné laboratorní vyšetření. Bylo navrženo několik způsobů stanovení methanolu nebo jeho metabolitů. Správná a cílená terapie je velmi důležitá při záchraně životů. Včasná první pomoc je tak nezbytnou součástí při otravě methanolem. Na závěr se práce věnuje „methanolové kauze“ v ČR.

## 10 Seznam použité literatury

- [1] ŠIROKÝ, M. Otrava methanolem. *Prevence úrazů, otrav a násilí*. 2006, 2, 141-143.
- [2] Health Council of the Netherlands. *Methanol*. Health-based recommended occupational exposure limit. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2010.
- [3] MACH CHEMIKÁLIE. *Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č. 1907/2006 a č.1272/2008, Methanol*. [online]. ©2013 [cit. 2013-09-22]. Dostupné z: <http://www.mach-chemikalie.cz/?akce=ceniky&kategorie=1>
- [4] LU, K., GUL, H., UPTON, P. B., MOELLER, B. C., SWENBERG, J. A. Formation of hydroxymethyl DNA adducts in rats orally exposed to stable isotope labeled methanol. *Toxicological sciences*. 2011, 126(1), 28-38.
- [5] HORÁK, J., I. LINHART a P. KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Vyd. 1. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2004, 90-91 s.
- [6] AKHGARI, M., PANAHIANPOUR, M. H., BAZMI, E., ETEMADI-ALEAGHA, A., MAHDAVI, A., NAZARI, S. H. Fatal methanol poisoning: features of liver histopathology. *Toxicology and Industrial Health*. 2011, 29(2), 136–141.
- [7] MACALLISTER, S. L., CHOI, J., DEDINA, L., O'BRIEN, P. J. Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. 2011, 191(1-3), 308-314.
- [8] Toxikologické informační středisko. *Klinika pracovního lékařství VFN a 1. LF UK Odborné doporučení pro intoxikaci – metanol (methanol, methylalkohol, dřevní líh, CH<sub>3</sub>OH)*. [online]. ©2012 [cit. 2013-09-22]. Dostupné z: <http://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-odborniky/methylalkohol>
- [9] Methanol Institute. *Methanol Safe Handling Manual* [online]. ©2008 [cit. 2013-09-22]. Dostupné z: <http://methanol.org/Health-And-Safety/Safe-Handling/Methanol-Safe-Hanlding-Manual.aspx>

- [10] GALICIA-MORENO, M., GUTIÉRREZ-REYES, G. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*. 2014, 79(2), 135-144.
- [11] ANYFANTAKIS, D., SYMOULAKIS, E. K., CRISTODOULAKIS, E. V., FRANTZESKAKIS, G. Ruling in the diagnosis of methanol intoxication in a young heavy drinker: a case report. *Journal of Medicine and Life*. 2012, 5(3), 332-334.
- [12] SHARMA, R., MARASINI, S., SHARMA, A. K., SHRESTHA, J. K., NEPAL, B.P. Methanol poisoning: ocular and neurological manifestations. *Optometry & vision science*. 2012, 89(2), 178-182.
- [13] SINGH, A., SAMSON, R., GIRDHAR, A. Portrait of a methanol-intoxicated brain. *The American Journal Of Medicine*. 2011, 124(2), 125-127.
- [14] SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2003, 11, 277-293.
- [15] KARADUMAN, F., ASIL, T., BALCI, K., TEMIZOZ, O., UNLU, E., YILMAZ, A., UTKU, U. Bilateral basal ganglionic lesions due to transdermal methanol intoxication. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009, 16(11), 1504-1506.
- [16] BĚNOVSKÁ, M., WIEWIORKA, O., TŮMOVÁ, J. Intoxikace metanolem a zkušenosti se stanovením jeho metabolitu - kyseliny mravenčí. *Labor Aktuell*. 2013, 1, 8-11.
- [17] KLEIMAN, R., NICKLE, R., SCHWARTZ, M., Medical toxicology and public health-update on research and activities at the Centers for Disease Control and Prevention, and the Agency for Toxic Substances and Disease Registry inhalational methanol toxicity. *Journal Of Medical Toxicology*. 2009, 5(3), 158-164.
- [18] HOVDA, K.E., JACOBSEN, D. Expert opinion: fomepizole may ameliorate the need for hemodialysis in methanol poisoning. *Human & Experimental Toxicology*. 2008, 27(7), 539-546.
- [19] SWEETING, J. N., SIU, M., MCCALLUM, G. P., MILLER, L., WELLS, P. G. Species differences in methanol and formic acid pharmacokinetics in mice, rabbits and primates. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010, 247(1), 28-35.

- [20] PAASMA, R., HOVDA, K. E., JACOBSEN, D. Methanol poisoning and long term sequelae – a six years follow-up after a large methanol outbreak. *BMC Clinical Pharmacology*. 2009, 9, 5.
- [21] SANAEI-ZADEH, H., ZAMANI, N., SHAHMOHAMMADI, F. Can fomepizole be substituted by abacavir in the treatment of methanol poisoning? *J. Med. Toxicol.* 2011, 7(2), 179–180.
- [22] FERNANDO, H., WIKTOROWICZ, J. E., SOMAN, K. V., KAPHALIA, B. S., KHAN, M. F., SHAKEEL ANSARI, G. A. Liver proteomics in progressive alcoholic steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013, 266(3), 470–480.
- [23] MATHEWS, S. XU, M. WANG, H. BERTOLA, A. GAO, B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014, 306(10), 819–823.
- [24] HAMMERICH, L., TACKE, F. Eat more carrots? Dampening cell death in ethanol-induced liver fibrosis by  $\beta$ -carotene. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition.* 2013, 2(5), 248-251.
- [25] NASSIR, F., IBDAH, J. A. Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014, 20(9), 2136-2142.
- [26] XIAO, J., WANG, J., XING, F., HAN, T., JIAO, R., LIONG, E. C., FUNG, M. L., SO, K. F., TIPOE, G. L. Zeaxanthin dipalmitate therapeutically improves hepatic functions in an alcoholic fatty liver disease model through modulating MAPK pathway. *PLoS One.* 2014, 9(4), e95214.
- [27] CHEN, P. SCHNAB, B. Host-microbiome interactions in alcoholic liver disease. *Gut and Liver.* 2014, 8(3), 237-241.
- [28] PARK, B. J., LEE, Y. J., LEE, H. R. Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014, 20(9), 2168-2175.
- [29] CARR, R. M. PERALTA. G. YIN, X. AHIMA, R. S. Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. *PLoS One.* 2014, 9(5), e97118.

- [30] BEATTY, L., GREEN, R., MAGEE, K., ZED, P. A Systematic review of ethanol and fomepizole use in toxic alcohol ingestions. *Emergency Medicine International*. 2013, 31, 14.
- [31] SANAEI-ZADEH, H., ESFEH, S. K., ZAMANI, N., JAMSHIDI, F., SHADNIA, S. Hyperglycemia is a strong prognostic factor of lethality in methanol poisoning. *J. Med. Toxicol.* 2011, 7(3), 189–194.
- [32] HEKMAT, R. SAMINI, F. DADPOUR, B. MAGHSUDLOO, F. MOJAHEDI, M. J. Should guidelines for conventional hemodialysis initiation in acute methanol poisoning, be revised, when no fomepizole is used? *Iran Red Crescent Med J.* 2012, 14(11), 743-745.
- [33] Česká televize. *Ceskatelevize.cz* [online]. ©2014 [cit. 2014-05-16]. Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/domaci/265992-soudce-hleda-dva-tisice-litru-otraveneho-alkoholu/>
- [34] Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje se sídlem v Ostravě. *KHSOVA: Role OOVZ a dalších složek v kauze metanol na území MSK* [online]. KHSOVA, ©2014 [cit. 2014-05-26]. Dostupné z: [http://www.khsova.cz/01/index\\_archiv.php?page=5](http://www.khsova.cz/01/index_archiv.php?page=5)
- [35] Krajská hygienická stanice Zlínského kraje se sídlem ve Zlíně. KHSZK: *Závěrečná zpráva o činnosti Krajské hygienické stanice Zlínského kraje se sídlem ve Zlíně ve věci intoxikací metylalkoholem ve Zlínském kraji* [online]. KHSZK, ©2013 [cit. 2013-09-20]. Dostupné z: <http://www.khszlin.cz/alkohol.htm>
- [36] ČESKO. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. MZČR: *Aféra „metanol“* [online]. MZČR, ©2012 [cit. 2013-09-20]. Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/dokumenty/ministerstvo-zdravotnictvi-reaguje-na-aktualni-vyvoj-v-kauze-metanol-v-predvanoc\\_7055\\_2501\\_1.html](http://www.mzcr.cz/dokumenty/ministerstvo-zdravotnictvi-reaguje-na-aktualni-vyvoj-v-kauze-metanol-v-predvanoc_7055_2501_1.html)