

Alternativní materiály v toxikologii

M. Balíková

Ústav soudního lékařství a toxikologie

1. LF UK a VFN

Různé možnosti expozice člověka noxám:

- úmyslná či náhodná konzumace
- podání jiné osobě
- expozice plodu během těhotenství
- pasivní expozice z okolí

Cíle toxikologického zkoumání

Okolnosti případu

Volba vzorku

Důležité faktory vlivu pro transport a setrvání nox či metabolitů v jednotlivých částech těla a možnosti detekce:

- fyzikálně chemické vlastnosti noxy/metabolitu
- velikost dávky, trvání a frekvence expozice
- způsob aplikace, rychlost a efektivita absorpce
- distribuční a metabolické procesy
- parametry individua (tělesná hmotnost....)
- doba uplynulá mezi dávkou a odběrem vzorku
- analytická metoda (citlivost, specificita ...)

Volba vzorku a detekční okna po dávce

Tradiční materiály

- krev
- moč
- žaludeční obsah
- střevní obsah
- pitevní materiály

Alternativní materiály

- sliny
- pot
- mekonium (smolka)
- mateřské mléko
- vlasy



Využití alternativních vzorků při zjišťování abuzu drog

- Sliny, pot - zájem dopravní policie, pomocné terénní testy
- Mekonium - zájem neonatologů
- Vlasy - zkoumání historie abuzu - testy chronického abuzu - kriminální vyšetřování, občansko-právní spory (rozvodová a opatrovnická řízení), testy pracovní spolehlivost (řidičská oprávnění) klinická zkoumání patologických stavů (neonatologie)

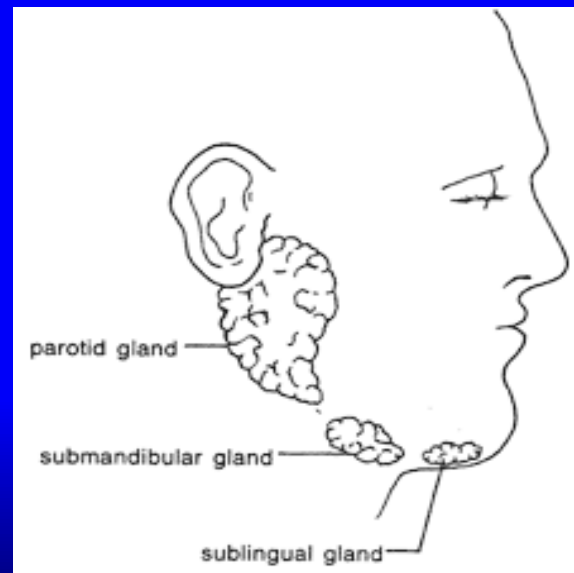
Přednosti odběru alternativních vzorků:

- neinvazivnost (srov. sliny a krev)
- nevyžaduje intimní prostředí (srov. sliny a moč)
- pod dohledem (záruka autentického vzorku, vyloučení nežádoucích manipulací se vzorkem)
- **Odběr vzorků altern. vzorků (zejm. vlasů) - správným způsobem**

Testování drog ve slinách

Produkce slin ve žlázách:
podčelistní (submandibulární) 65%
příušní (parotidální) 23%
podjazykové (sublinguální) 4%
aj.

Bohaté zásobení krví z krčních artérií



Sliny

<u>Složení:</u>	99-98% voda
	elektrolyty
	proteiny (mucin)
	enzymy (amyláza)

Variabilita toku slin - variabilita pH - variabilita koncentrací

Rychlost tvorby slin stimulací ovlivňuje složení - ředící efekt !

Zvýšením toku klesá viskozita, stoupá pH

(např. žvýkání zvyšuje produkci slin)

Klidová tvorba 0,5 ml/min

Po stimulaci 3-5 ml/min - ředění vzorku až 10 x (!)

pH 5,7 až 7 - po stimulaci cca 8 (ovlivňuje transport do slin)

Transport drog z krve do slin

- ✓ Pasivní difuze (lipofilní molekuly, přednostně baze)
- ✓ Aktivní sekrece (elektrolyty)
- ✓ Ultrafiltrace (polární molekuly, cukry)

Dvojí faktory ovlivňující pasivní difuzi z krve do slin:

Sliny:

- * rychlost toku, pH
- * vazba na proteiny slin
- * výskyt enzymů

Droga:

- * ionizovatelnost, pK_a
- * polarita
- * MW, konformace izomerů
- * plazmatická volná frakce
- * výše plazmatické hladiny

Hladiny ve slinách jsou odrazem volného podílu v krvi

přibližně kopírují stejný časový průběh

(ale variabilita toku slin, variabilita pH a míry přestupu)

Šíře detekčního okna řádově podobná krvi

Parentní drogy > metabolity (pasivní difuze)

$\text{pH slin} < \text{pH plazmy} = \underline{\text{usnadněn transport bází do slin}}$

$C_{\text{bází-sliny}} > C_{\text{bází-plazma}}$

Praktické aspekty:

Odběr - volným tokem

- odsátím vakuem

- adsorpcí na vatový tampon

Problémy v praxi:

Nedostatečný a nestálý objem vzorku od různých osob

Suchá ústa - nemožnost odběru vzorku

Viskozita slinných vzorků, zbytky potravy, vlivy bakterií

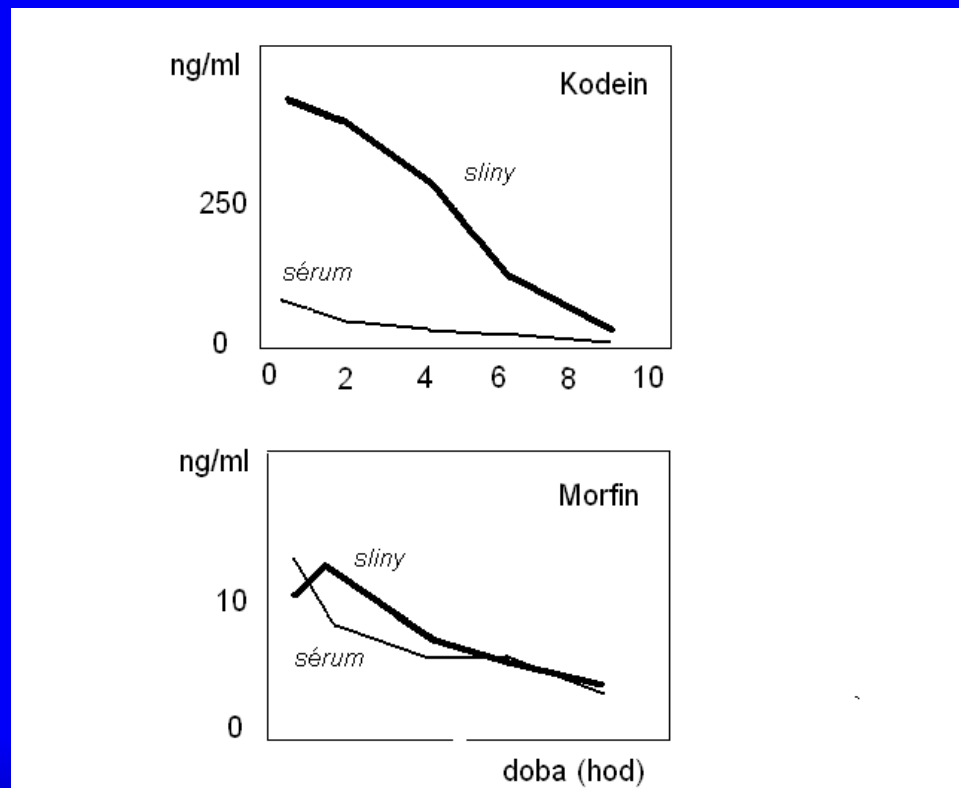
Kontaminace ústní dutiny - pasivní kouření, pasivní expozice

Po odběru je nutno registrovat:

dobu a způsob odběru, pH a objem získaného vzorku, případná konzervace

Příklad opiáty

Porovnání časového průběhu koncentrací kodeinu a morfinu v séru a ve slinách po podání tablet kodeinu fosfátu 60 mg/60 kg p. o.
(Habrdová, Balíková 2003)



Kodein $pK_a = 8,2$ Morfin $pK_a = 8,0$ a $9,9$

Rizika v těhotenství - alkohol, tabák a drogy

Poporodní komplikace a
dokazování konzumace:

- Moč matky a dítěte
- Vlasy matky a dítěte
- Mekonium - smolka



MEKONIUM

Mekonium – novorozenecká smolka – první stolice novorozence.
Tvorba od cca 12 týdne těhotenství

Mekonium – střevní obsah plodu. Tvorba postupně ve vrstvách ze spolykané plodové vody a ze sekretu žluče do střev

Složení: voda, mukopolysacharidy, lipidy, proteiny, enzymy žlučové kyseliny, sole.

Hodnota pH mekonie lehce kyselá (pH 6,8) – hromadění bazí

Medicinské využití analýz: neonatologie. Zjišťování abuzu drog v průběhu těhotenství – transfer drog do embrya placentární bariérou

Široké časové detekční okno: Akumulace drog v těhotenství – srovn. krátkodobá detekce v moči dítěte i matky

Sběr mekonie: z plenky dítěte – neinvazivní, 1-5 dní po porodu

Transfer drog z krve matky do mekonia plodu

Hlavní mechanismus transportu přes membrány - pasivní difuze
neionizovaných lipofilních drog

Vedlejší mechanismus - aktivní transport ionizovaných molekul

Faktory vlivu na míru transferu:

- vlastnosti sloučeniny (velikost molekuly, polarita, pK_a hodnota)
- hodnota pH plazmy
- individuální zdravotní stav matky, schopnost metabolismu

Droga s vazbou na plazmatické bílkoviny a ionizovaná v krvi matky (nízká pK_a) - jen malý díl k dispozici pro pasivní difuzi
Báze o vyšší hodnotě pK_a - báze - přechází snadno z krve matky do kyselejšího prostředí v krvi plodu - depo v mekoniu

Specifické vlivy některých drog na prostup placentou:

Např. vazokonstrikční účinky nikotinu, kokainu brzdí transfer

VLASY

Analýza drog ve vlasech a žádané odpovědi:

- Konzumovala dotyčná osoba drogy a případně jaké?
- Dávka? (jednorázová, příležitostná, pravidelná nebo masivní konzumace?)
- Stupeň expozice, intoxikace?
- Kdy došlo k aplikaci?

Využití vzorku vlasů - proč ?

- Jedinečný materiál pro retrospektivní zkoumání konzumace drog, léčiv a jiných xenobiotik
- Dlouhodobé vázání cizorodých látek uvnitř vlasů podle časové škály, kdy se vyskytovaly v krvi
- Stabilní matrice nepodléhající rozkladu

Využití vzorku vlasů - kdy ?

- diagnostika a terapie abuzu
- podezření na chronické otravy
- neonatologie
- postmortem toxikologie
- pracovní spolehlivost, řidiči
- kriminální a sociální souvislosti
- Terapeutické monitorování hladin léčiv (TDM) - jen hrubě orientačně

Využití vzorku vlasů - jak ?

- Nejde o sériovou rutinní analytiku
- Důležitý je odběr a zpracování vzorku s ohledem na individuální anamnézu, cíle vyšetření
- Znalost fyziologie růstu vlasů a principů inkorporace drog
- Kritické zhodnocení výsledků specialistou

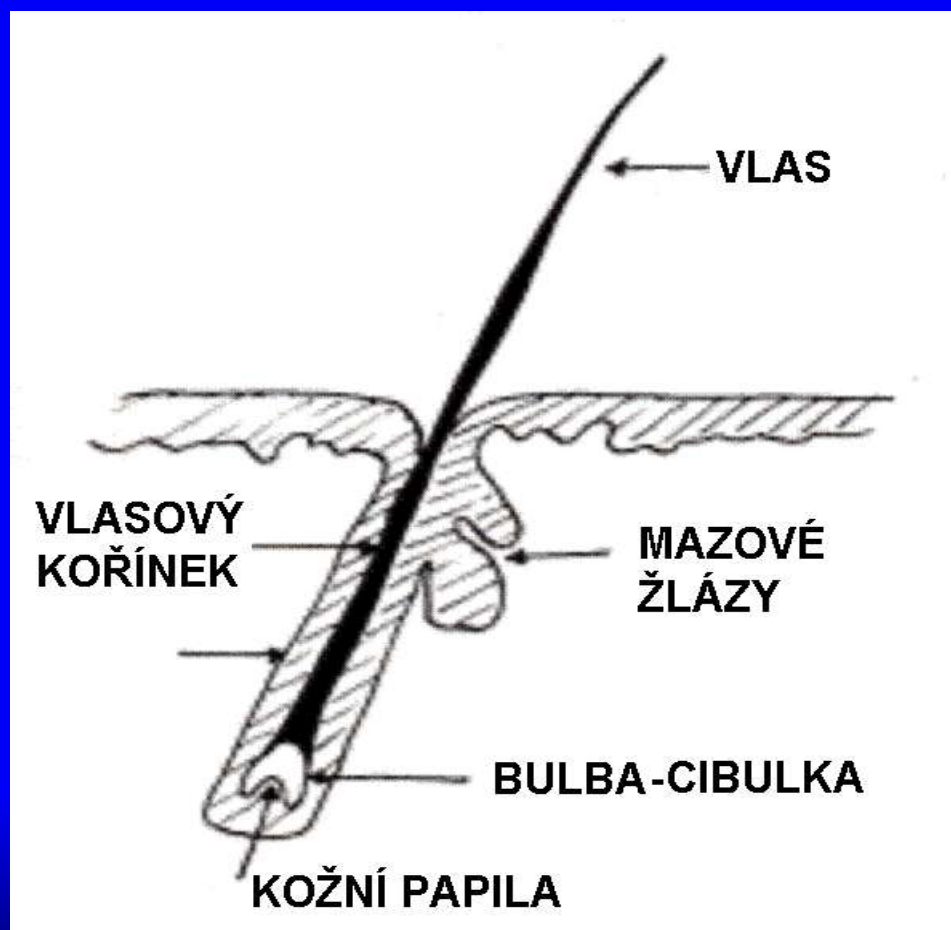
Forenzní důkaz drog ve vlasech - vývoj

- První analýzy nox ve vlasech - těžké kovy už dříve dostupnou metodou AAS
- Soud v USA 1982 - poprvé uznal důkaz kokainu ve vlasech
- Rozvoj analytických technologií - citlivé a specifické metody GC-MS (LC-MS)
- Dnes - vlastní analytická část standardní, snahy detekovat stále nižší kvanta (ng/mg až pg/mg) - nároky na drahé analytické technologie
- Pokračující výzkum - mechanismy řídicí inkorporaci drog do vlasů - zpřesnění interpretace

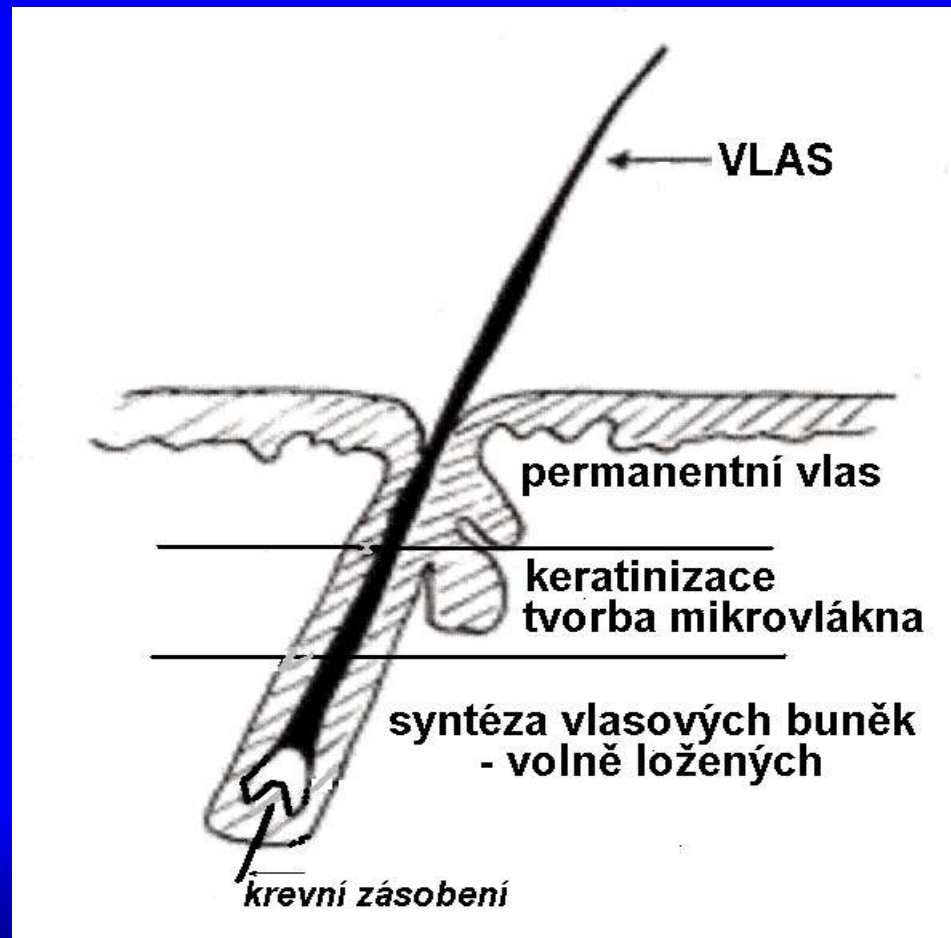
Anatomie a fyziologie vlasu

- Roste z váčku - nástavce kůže
- Umístěn 3 - 4 mm pod povrchem kůže
- Omýván 3 typy žláz
- Vyživován z krevního řečiště
- Vlasový stvol obsahuje:
proteiny - keratin, melanin, tuky,
minerály, vodu

Schéma vlasového váčku



Váček - 3 funkční zóny



Mechanismy vstupu drog do vlasů

IDEÁL: vstup do vlasu pasivní difuzí z krevní cirkulace do rostoucích buněk na základně vlasového váčku

REALITA: vstup do vlasu v různých místech a v různém čase během cyklu růstu - komplikovaná interpretace

Z různých zdrojů:

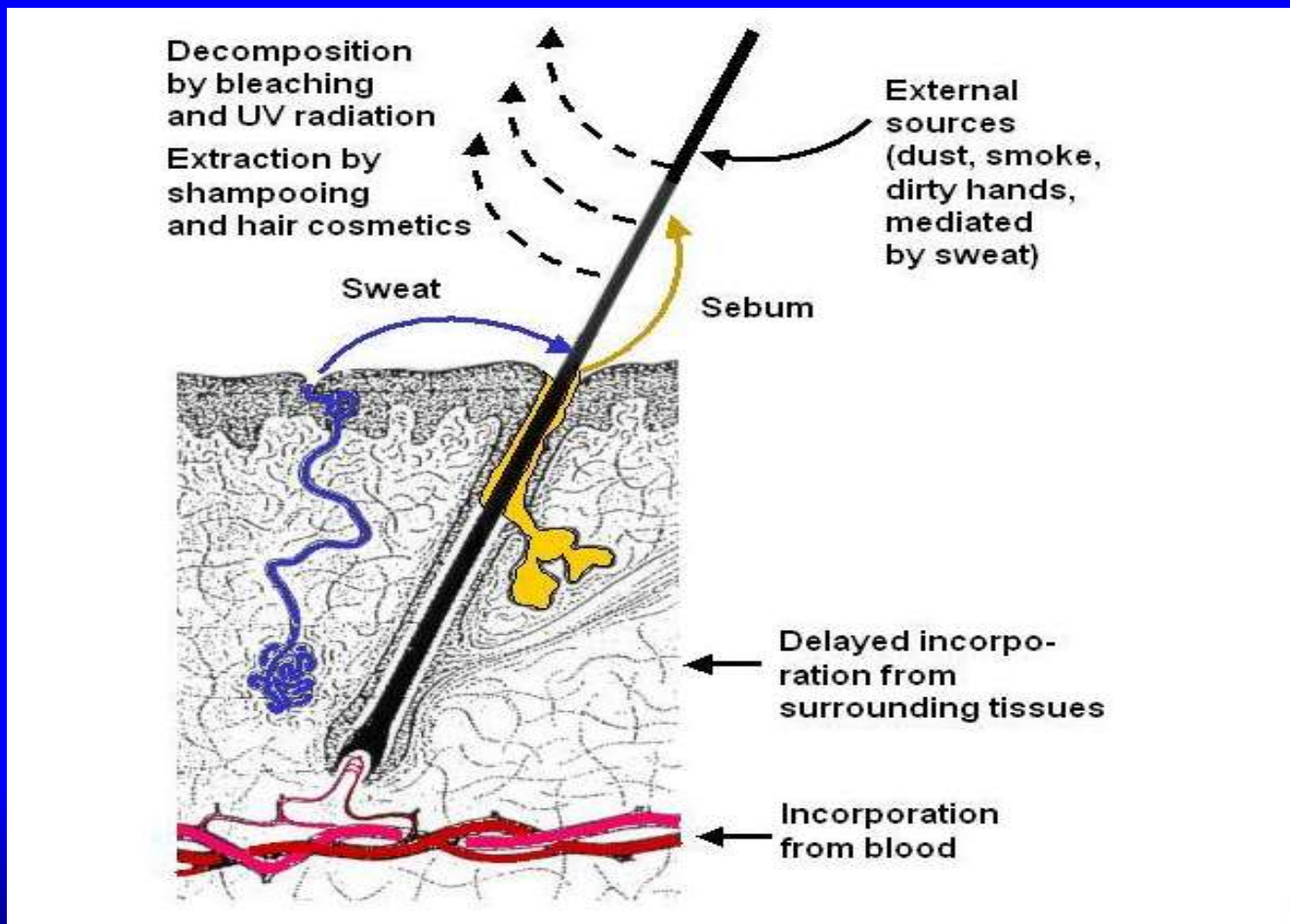
- Z krve pasivní difuzí
- Z potu a mazu
- Z kožní tkáně
- Z vnějšího prostředí

Během 3 fází růstu:

- Během formace
- Po dokončení formace
- Po opuštění kůže

Vstup drog do vlasů a možné ztráty

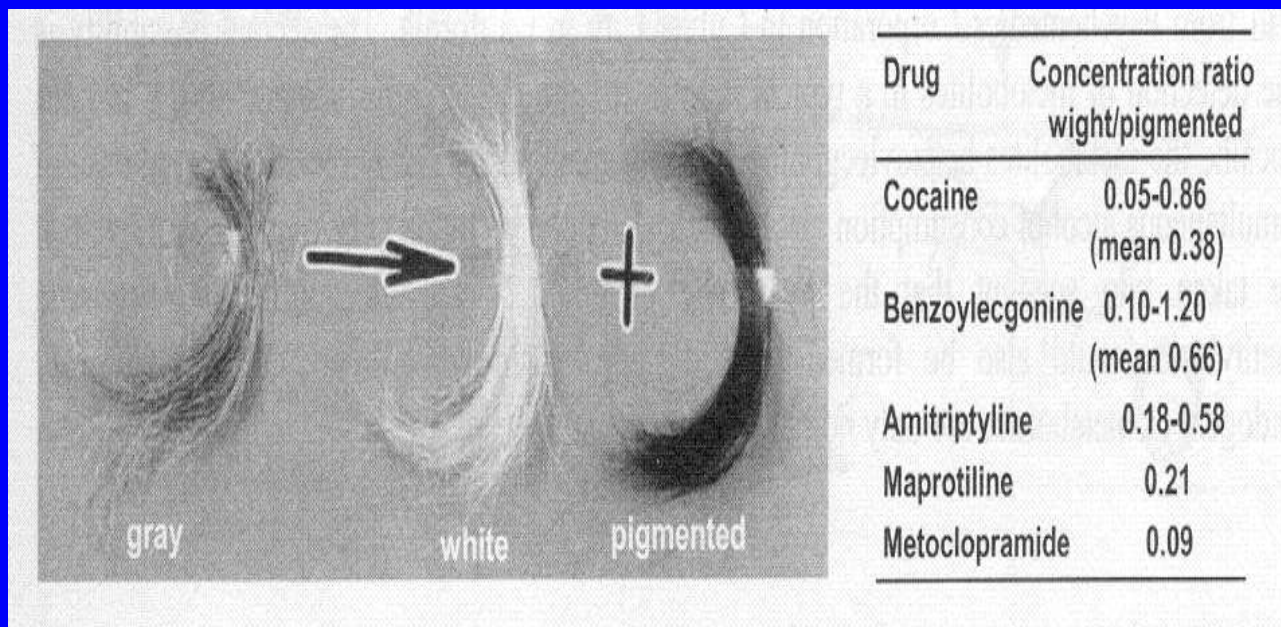
(Pragst -Balíková: CCA 2006)



Transport drog do vlasu - faktory vlivu

- Povaha individuálního vlasu
- Krevní tok, hnací koncentrační gradient pro inkorporaci
- Vlastnosti drogy, lipofilnost, ionizovatelnost, vazba na bílkoviny aj.
- pH gradient (izoelektrický bod keratinizovaného vlasu pH 6)
- Afinita bazí k melaninu (pH melanocytů 3-5)
- Velikost a geometrie molekuly drogy

Vliv pigmentu na inkorporaci (Pragst T + K 2004)



Vyšší inkorporace bází do tmavých vlasů (např. kokain)

Cyklus růstu vlasů

- ANAGEN - tvorba nových buněk na dně váčku, metabolická aktivita, růstová fáze, trvá 2-6 roků
- CATAGEN - ustává dělení buněk, degenerace bulby, váček se zkracuje, přechodná fáze, trvá 2-3 týdny
- TELOGEN - zástava růstu, odumřelý vlas snadno vypadává, klidová fáze, trvá 2-6 měsíců

Dospělý člověk: cca 85 % vlasů ve fázi růstu
 cca 15 % ve fázi klidu

Důsledek: individuální nehomogenita pramene vlasů - difuzní koncentrační rozhraní zóny lokalizované drogy

Rychlost růstu vlasů u člověka


- Zjednodušeně na skalpu 1 cm/měsíc
- Reálně 0,6 až 1,4 cm/měsíc
- Záleží na:
 - a) typu vlasů (jemné, silné, šedivé, barva tmavá aj.)
 - b) věku (vliv hormonů)
 - c) pohlaví (vliv hormonů)
 - d) anatomické místo (skalp, vousy, podpaží, pubická oblast...)
 - e) rasové rozdíly (běloši, asiati, černoši...)

Interpretaci v relaci k času dávek komplikuje:

- Nerovné odstřížení vlasů, vzájemný posun vlasů v odstříženém prameni
- Nerovnoměrný růst vláken, podíl anagen/telogen
- Vstup deponovaných drog z dřívějších dávek - např. chronický abuzus marihuany
- Vstup drog do vlasu nad povrchem kůže z potu a mazu, potencionální kontaminace distální části
- Částečná podélná difuze uvnitř vlasu

Odběr vzorku vlasů

(Pragst T+K 2004)



Collection of the hair sample

Identification of the person:
Passport, comparison with photograph, signature

Protocol:
Personal data, date and site of collection, weight of sample, hair lengths, residual length on scalp, colour, special characteristics (dyeing, bleaching etc.)

Place of sampling:
Hair sampling and hair analysis are not allowed in laboratories and departments where the drugs themselves are handled

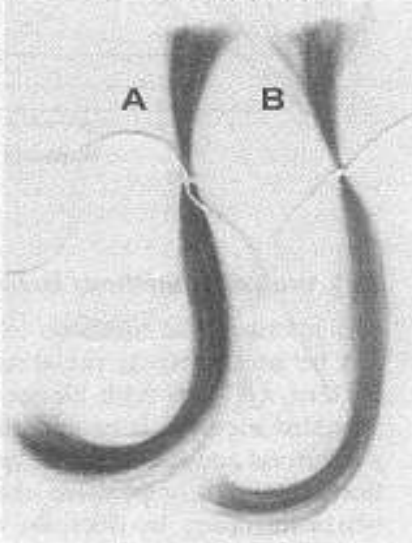
Practical performance:
Tuft of hair fixed by a string, cutting directly above skin, \varnothing 3-4 mm, marking of the proximal end

Collection of two samples A and B:

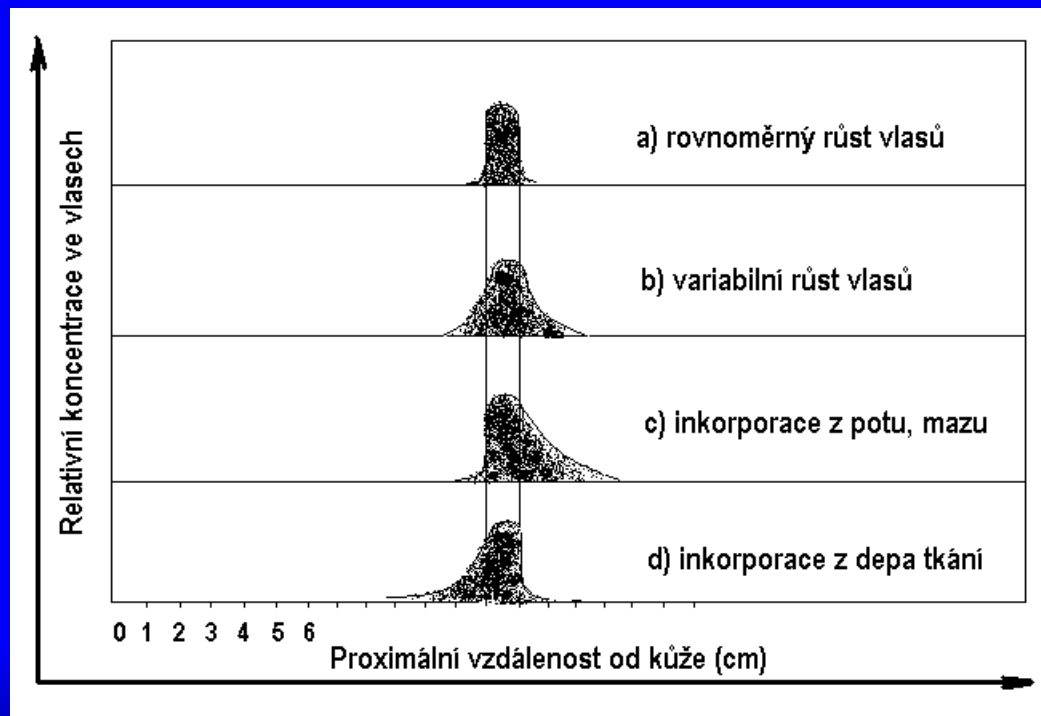
A: Analysis sample, sufficient for the whole analysis including confirmation or repetition

B: Reserve sample, left untouched for cases of any objections

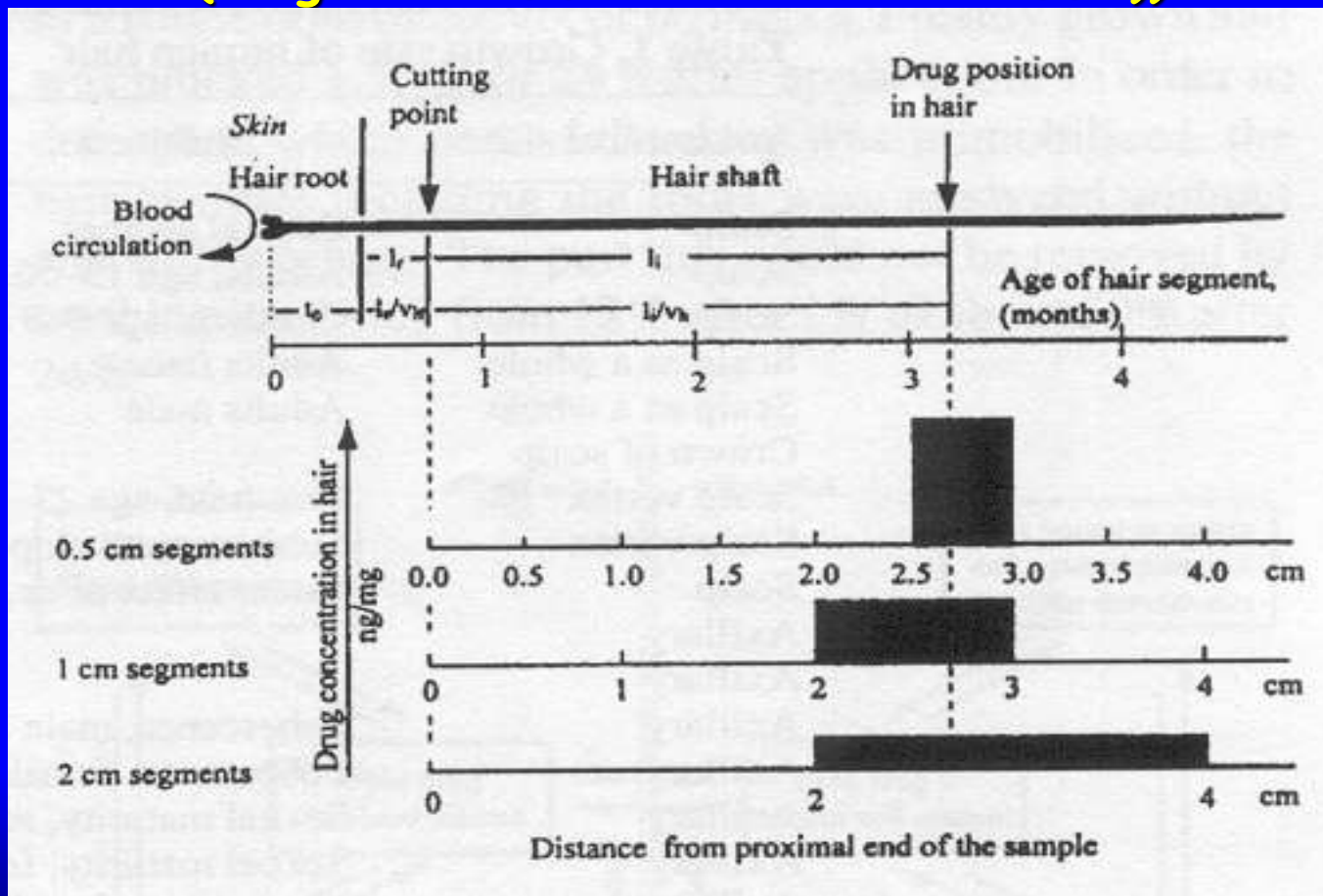
Separate storage in different covers, labelled with name, date of collection and sample No.



Modely rozložení koncentrací podél vlasu po měsíční konzumaci drogy zhruba před rokem



Neznámá lokalizace drogy podél vlasu - potřebná anamnestická data (Pragst et al. Forensic Sci Rev 1998)



Obecné problémy kvantifikace u pevných matric

- Výsledky semikvantitativní, v sérii segmentů spíše trendy v konzumaci
- Chybí referenční vlasové materiály pro kalibrace
- Vlasy - Dodržování doporučených odborných pravidel operačních, interpretačních (www.sohr.org)

Doporučené operační standardy „Society of Hair Testing“

- Odběr vzorku a zpracování
- Povrchová dekontaminace, extrakce
- Správnost identifikace analytů (MS)
- Kriteria positivity, cut off hodnoty
- Vyžadované metabolity pro průkaz
- Vyžadovaný poměr metabolitů a parentních látek

Obvyklé poměry parentních drog a metabolitů (ng/mg) nalézané u uživatelů

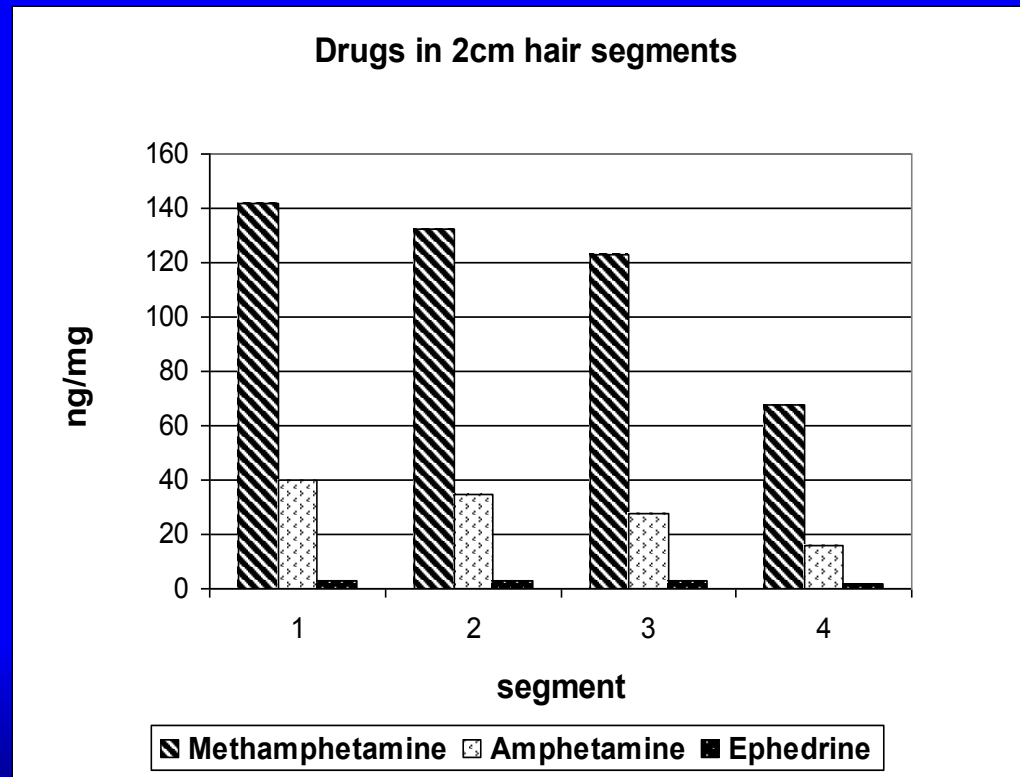
	1 (Cassani)	2 (Madea)	2 - Mean
Kokain	0,1-28,9	0,5-216,5	12,9
Benzoylekgonin	0-4,4	0,1-33,7	3,7
6-acetylmorfin	0,1-67	0-64,8	7,2
Morfin	0,1-10	0-53,7	3,7
Methamfetamin	3,1-126	0,87-56,4	18,3
Amfetamin	0,8-12	0,02-6,52	0,84

Vliv melaninu na inkorporaci bází do vlasů

Case No.	Colour of hair	Blood morphine (ng/ml)	Hair-SGI morphine (ng/mg)	Hair-SGI acetylmorphine (ng/mg)
307	Light brown	n.d.	0.93	0.39
332	<u>Brown</u>	<u>1013</u>	<u>6.28</u>	<u>7.63</u>
355	Dark brown	430	0.10	0.09
396	Brown-grey	7	0,5	3.0
423	<u>Black (Asiatic)</u>	<u>1006</u>	<u>62.9</u>	<u>25.2</u>
454	Brown-grey	220	3.2	9.6
500	Coloured black	528	3.5	4.9

Chronický abuzus methamfetaminu s fatálním zakončením, segmenty 2 cm

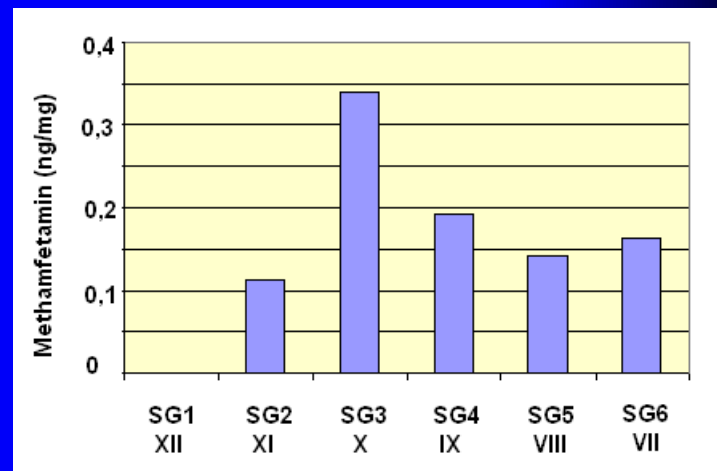
(K.Beránková, V. Habrdová, M. Balíková*, P. Strejc: FSI 2005)



Sexuální zneužívání mladistvého. Určení období podávání methamfetaminu

13 letý chovanec DD až do listopadu 2006, v prosinci přemístěn do jiného zařízení

Vlasy: 8 cm dlouhé, odběr 16/1
Sledované období září-listopad 2006
SG 5 x 1cm, zbylý distální 3 cm



Interpretace:

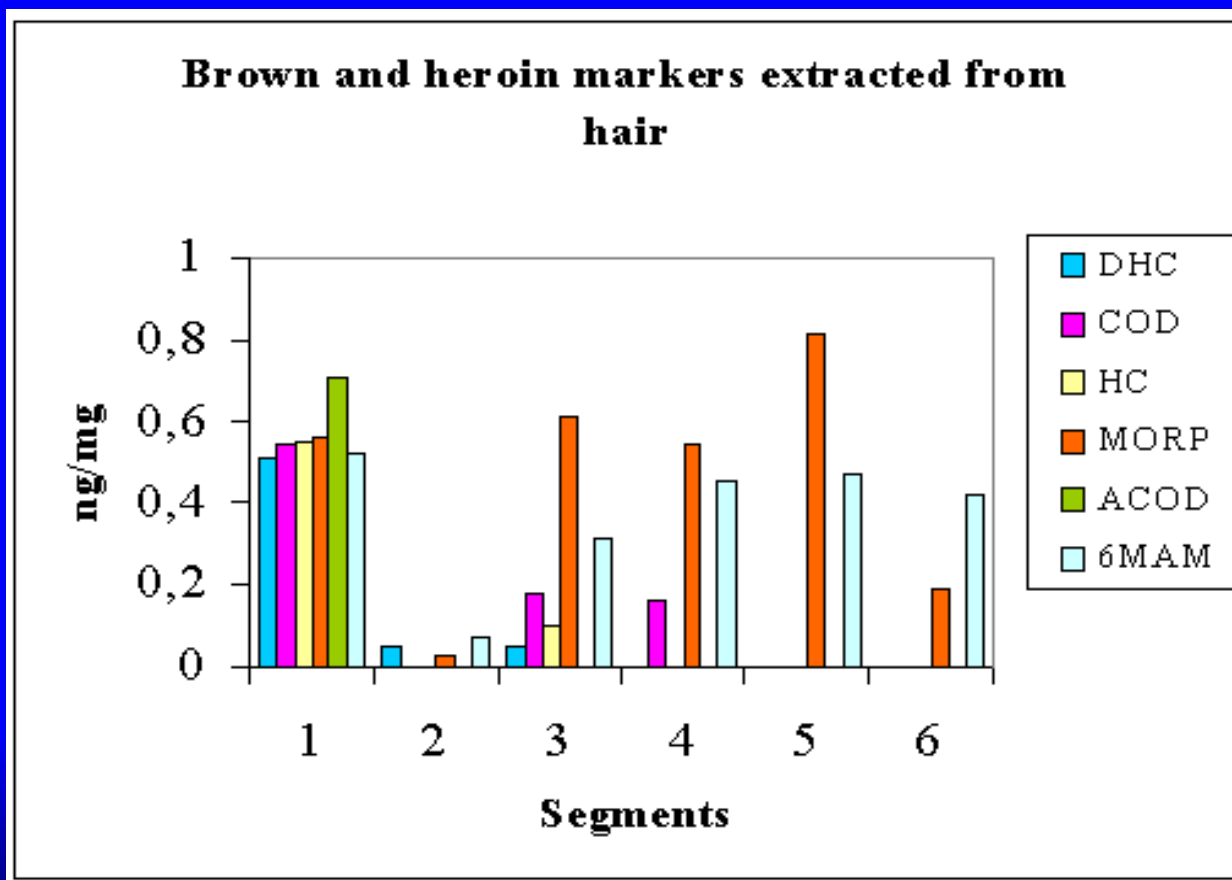
Negativní nález v SG1 - absence konzumace v prosinci

Maximum konzumace odpovídá říjnu (růst 1cm/měs).

Při růstu 0,6 až 1,4 cm/měs - širší období prokázané konzumace - září až listopad. Podíl potu a mazu na inkorporaci v distálních segmentech nelze vyloučit.

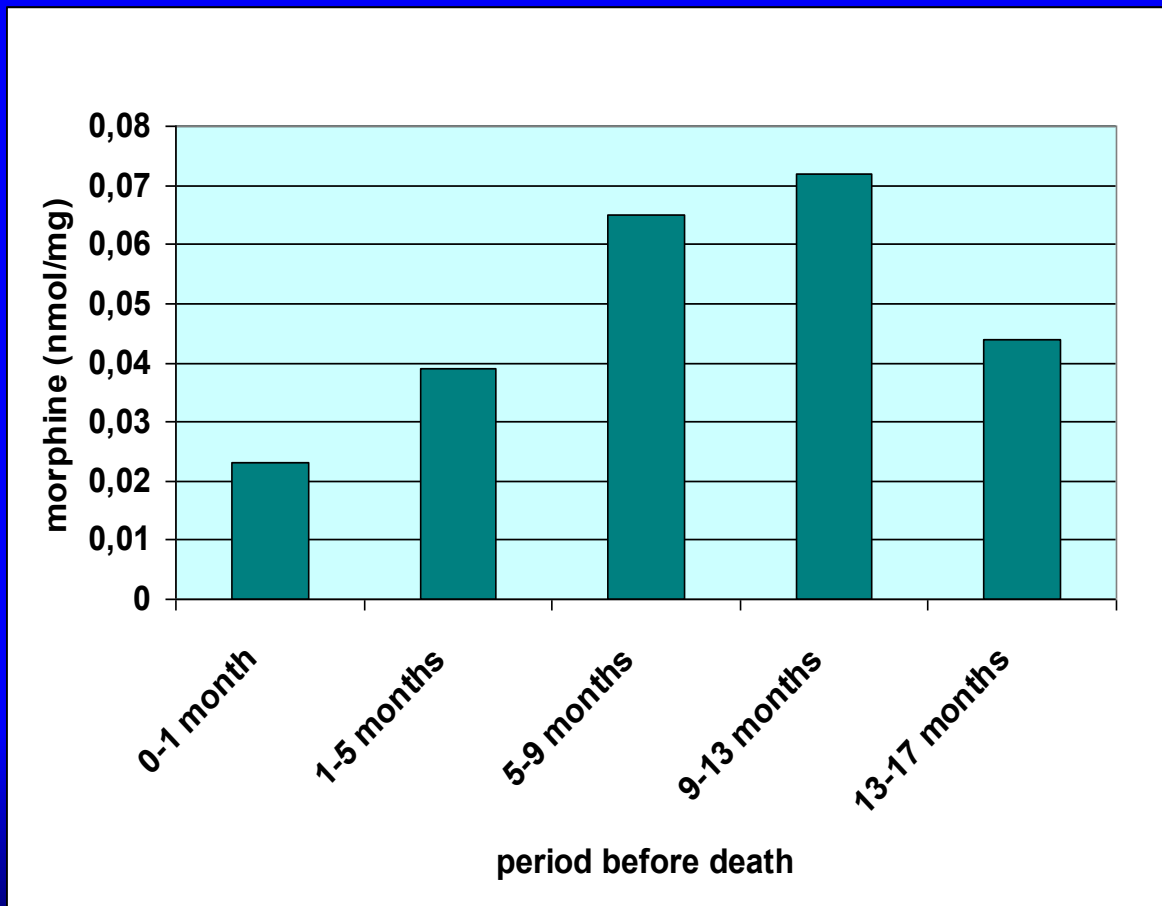
Fatální předávkování opiáty, známky střídání drog, 6 x segmenty 1,5 cm

(M. A. Balíková*, V. Habrdová: JCB 2003)



Fatální předávkování opiáty, znaky klesající tolerance v průběhu těhotenství

(M. Balíková: Biomed. Papers 2005)



Analýza drog ve vlasech - souhrn

- Segmentová vlasová analýza - unikátní nástroj pro semikvantitativní retrospektivní důkaz chronické konzumace drog v širokém časovém rozmezí
- Méně vhodná pro hodnocení stupně expozice, spíše časové trendy v konzumaci
- Analýza drog ve vlasech není sériová procedura, ale vyžaduje individuální odborný přístup od odběru vzorku až po interpretaci nálezů
- Odborná interpretace s ohledem na okolnosti případu, variabilitu růstu vlasů a inkorporace drog, parametry použité analytické metody

Vybraná literatura:

M. Balíková: Forenzní a klinická toxikologie. Laboratorní toxikologická vyšetření. Galén 2004, ISBN 80-7262-284-6

F. Pragst, M. Balíková: State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. Clinica Chimica Acta, 370 (2006) 17-49