

*Aktuelne teme/
Current topics*

ANALIZA KOSE GOVORI ISTINU O VAMA

HAIR ANALYSIS IS TELLING THE TRUTH
ABOUT YOU

Correspondence to:

Doc. Dr sc. pharm. **Snežana Dorđević**,
Docent na Medicinskoj hemiji Visoke
medicinske škole, akademskih studija,
VMA
Vojnomedicinska akademija
Crnotravska 13
11000 Beograd
Tel. 011/36-09-481
Mob.tel. 060-336-70-38
E-mail: ivezicnela@yahoo.com

**Snežana Dorđević, Vesna Kilibarda, Branislava Rusić,
Kristina Denić, Vladimir Nešić**

Centar za kontrolu trovanja, VMA

Ključne reči

analiza kose, analitičke metode,
prikupljanje uzoraka

Key words

hair analysis, analytical methods,
sampling

Sažetak

Analiza kose je veoma korisna kada je nepoznata istorija uzimanja lekova ili je nemoguće dobiti. U literaturi su opisani brojni forenzički slučajevi kada je analiza kose korišćena da bi se utvrdile razlike između prodavca i korisnika droge, zločini pod uticajem psihoaktivnih supstanci, sumnjive smrti, dobijanja vozačke dozvole i doping kontrole. Lek se u dlaku inkorporira u toku sinteze proteina kose, vezivanjem za funkcionalne grupe aminokiselina. To znači da je ispitivano jedinstvenje u uzorku kose veoma stabilno. Analitičke metode koje se koriste u analizi kose su tačna hromatografija ili gasna hromatografija sa maseno-spektrometrijskim detektorom.

UVOD

Analiza kose prvi put je rađena šezdesetih godina prošlog veka da bi se potvrdilo da li je došlo do intoksikacije teškim metalima (arsen, olovo i živa). Za određivanje ovih metala primenjena je atomska apsorpciona spektroskopija. U to vreme određivanje organskih supstanci, posebno lekova i sredstava zloupotrebe nije bilo moguće zbog nedovoljne osetljivosti dostupnih analitičkih tehnika.

Prvi rezultati dobijeni su nakon primene lekova označenih radioaktivnim izotopima, pri čemu je dokazano da lekovi mogu preći iz krvi u kosu. Deset godina od prvog istraživanja dokazano je prisustvo različitih organskih jedinjenja u kosi primenom radio-imuno tehnika.

1979. Baumgartner i saradnici ⁽¹⁾ objavili su prve rezultate o detekciji morfina kod heroinskih konzumenata primenom RIA metode. Oni su pokazali da postoje razlike u koncentraciji morfina duž dlake, što je u korelaciji sa vremenom proteklom od zloupotrebe. Danas su gasna hromatografija sa maseno spektrometrijskim detektorom i tačna hromatografija sa maseno spektrometrijskim detektorom metode izbora u analizi kose.

Najveća praktična prednost analize kose u odnosu na krv ili urin je u tome što se lekovi i sredstva zloupotrebe mogu detektovati više nedelja i meseci nakon upotrebe, za razliku od krvi i urina gde je taj period 2-4 dana za većinu lekova. U praksi ova dva testa se međusobno dopunjuju. Analiza urina i krvi daju kratkoročnu informaciju o upotrebi lekova, dok kosa daje podatke nakon dužeg vremenskog perioda od ingestije.

Dlaka je proizvod diferenciranih organa u koži sisara. U zavisnosti od vrste razlikuje se po boji, kvantitetu i teksturi. Dlaka je sagrađena od proteina (65 do 95 % keratina), vode (15 do 35 %) i lipida (1 do 9 %). Sadržaj mineralnih materija se kreće od 0,25 do 0,95 %. Ukupan broj folikula dlake kod odraslih osoba je oko 5 miliona, od čega se oko 1 milion nalazi na glavi ⁽²⁾.

Kosa ne raste kontinuirano, već ciklično (period rasta i period mirovanja). Za folikul koji aktivno proizvodi kosu se kaže da je u anagenoj fazi.

Kosa raste u toku 4-8 godina aproksimativno 0,22-0,52 mm na dan ili 0,6-1,4 cm mesečno. Nakon tog perioda folikul ulazi u relativno kratak period tranzicije (traje oko 2 nedelje) poznat kao katagena faza, u toku koje prestaje ćelijska deoba i folikul počinje da se degeneriše. Zatim, folikul ulazi u period mirovanja poznat kao telogena faza (10 nedelja) u toku koje potpuno prestaje da raste i dlake počinju da opadaju. Faktori kao što su rasa, oboljenja, nutritivni status i godine su faktori za koje se zna da utiču i na period rasta i na period mirovanja. Na koži glave odraslih osoba oko 85 % dlaka je u fazi rasta, a 15 % u fazi mirovanja. U fiziološkim uslovima dnevno može da se izgubi do 100 dlaka.

Pubične dlake, dlake sa ruku i potpazušne dlake su preporučljive kao alternativan uzorak kada dlake skalpa nisu dostupne. Ispitivanja su pokazala da postoje razlike u koncentracijama lekova između pubičnih i potpazušnih dlaka. Ovi rezultati se objašnjavaju razlikama u cirkulaciji, broju apokrinih žlezda, razlikama u telogen/anagen odnosu i različitoj brzini rasta dlaka (0,40 mm na dan za potpazušne i

0.30 mm na dan za pubične dlake). Dlake na bradi rastu oko 0,27 mm/dan i mogu biti prihvatljiva alternativa, i mogu se sakupljati svakodnevno nakon brijanja i koristiti za određivanje stepena inkorporacije leka u dlaku (3).

Mehanizmi inkorporacije lekova u dlaku

Smatra se da postoje dva procesa ulaska lekova u dlaku:

1. adsorpcija iz spoljašnje sredine
2. inkorporacija u koren rastuće dlake iz krvi preko folikula.

Lekovi mogu ući u dlaku pri ekspoziciji hemikalijama u vidu aerosola, pušenjem ili sekrecijom znojnih i lojnih žlezda. Poznato je da znoj sadrži lekove koji se nalaze u krvi. Pošto je kosa veoma porozna i može da poveća svoju masu do 18 % preko apsorpcije tečnosti, lekovi se mogu lako preneti u dlaku preko znoja. Osim toga, hemikalije prisutne u vazduhu (dim, isparenja i sl.) mogu se takođe deponovati u kosi.

Inkorporiranje lekova u kosu vrši se preko tri mehanizma:

1. iz krvi u toku formiranja dlake
2. iz znoja i sebuma
3. iz spoljašnje sredine

Na ovaj način se objašnjavaju razlike u odnosima leka i metabolita u krvi u odnosu na kosu i koncentracije leka i metabolita kod osoba koje primaju istu dozu leka. Dokazi o prelasku lekova preko znoja i sebuma u dlaku se mogu objasniti time da su koncentracije lekova i metabolita u njima veće i da se mogu detektovati duže nego u krvi (4-5).

Tačni mehanizmi preko kojih lekovi prelaze i inkorporiraju se u dlaku nisu poznati. Pretpostavlja se da pasivna difuzija može biti povećana vezivanjem lekova za intracelularne komponente ćelija dlake, kao što je pigment melanin. Na primer koncentracija kodeina u dlaci posle oralne primene zavisi od sadržaja melanina(6). Međutim, ovo verovatno nije jedini mehanizam pošto se lekovi inkorporiraju u dlake albino životinja koje ne sadrže melanin. Drugi mehanizmi pretpostavljaju da dolazi do vezivanja lekova za sulfhidrilne grupe aminokiselina koje se nalaze u dlaci. Postoji mnoštvo aminokiselina u dlaci, kao što je cistin, koji gradi ukrštene S-S veze da bi stabilisao proteinsku mrežu dlake. Lekovi koji difunduju u ćelije dlake mogu da se vežu na ovaj način.

Različita ispitivanja pokazuju da nakon primene iste doze tamna kosa inkorporira više leka nego plava(3).

Prikupljanje uzoraka

Procedura prukupljanja uzoraka kose nije standardizovana. Najčešće se uzorkuje sa različitih delova skalpa. Najbolje je uzorkovati kosu sa zadnjeg dela glave poznatog kao *vertex posterior*. U poređenju sa drugim delovima glave ova površina ima manje varijabilnosti u brzini rasta, broj dlaka u fazi rasta je konstantniji i manje su razlike u zavisnosti od godina i pola. Pramen kose treba da se iseče što bliže koži i da se zapiše sa kog dela glave je uzorkovano. Nakon uzorkovanja uzorak se čuva na sobnoj temperaturi u aluminijumskoj foliji, koverti ili plastičnoj epruveti. Količina uzorka zavisi od vrste leka koji će se određivati i primenjene analitičke metode. Najčešće se uzorkuje do 200 mg kose (2).



Slika 1. Čuvanje uzoraka kose

Stabilnost lekova u kosi

Mnogobrojni radovi pokazuju da je lek inkorporiran u kosu veoma stabilan. Organska jedinjenja mogu da opstanu u kosi nepromenjena hiljadama godina na sobnoj temperaturi i u odsustvu vlage. Ovi podaci potvrđeni su time da je u mumijama nadjenim u Čileu i Peruu, koje datiraju iz perioda od 2000 god. pe n.e. do 1500 god. dokazano prisustvo benzoil ekgonina (7).

Analiza kose uključuje najmanje pet koraka:

1. dekontaminacija kose
2. priprema kose - pulverizacija i segmentacija u kraće delove
3. inkubacija u metanolu, kiselini, natrijum hidroksidu, puferu
4. ekstrakcija - tečno-tečna, čvrsto-fazna i čvrsto-fazna mikroekstrakcija
5. analiza – imunoassay ili hromatografija (gasna ili tečna) sa masenom spektrometrijom



Slika 2. Segmencioniranje kose

Kontaminacija kose može biti problem u interpretaciji rezultata, naročito kada su sredstva zloupotrebe u pitanju. Da bi se izbegli lažno pozitivni rezultati većina laboratorija primenjuje korak pranja uzoraka kose. Kao agensi za pranje uzoraka kose primenjuju se šamponi, hirurški rastvori, surfaktanti (0,1 % natrijum dodecilsulfat), fosfatni pufer i organski rastvarači kao što su aceton, dietiletar, metanol, etanol, dihlormetan, heksan i pentan u različitim zapreminama i vremenima trajanja. Najčešće se primenjuje jednostepeno pranje, mada se ponekad pranje ponavlja još jednom istim rastvaračem. Eksterna kontaminacija se može detektovati analiziranjem rastvora posle pranja uzorka (3).

Uticaj kozmetičkih sredstava i tretmana

Od velikog značaja je i uticaj kozmetičkih sredstava za kosu na koncentraciju lekova. Kosa je kontinuirano izložena prirodnim uticajima kao što su sunce, vetar, zagađenja i sl. što može dovesti do oštećenja kutikula. Frizerski tretmani (ponavljano pranje, feniranje, uvijanje, bojenje kose) mogu dodatno doprineti oštećenju dlake. Ponovljeno pranje nema značajnog uticaja na koncentracije lekova u kosi. Međutim, sredstva za izbeljivanje, bojenje, kovrdžanje ili ispravljanje kose sadrže baze koje mogu oštetiti kosu i uticati na smanjenje koncentracije ili stabilnosti leka (8).

Da bi se odredila koncentracija leka u dlaci, nakon pranja uzorka potrebno je rastvoriti lek iz dlake. Proces solubilizacije mora biti takav da ne dovede do promene koncentracije ispitivanog jedinjenja transformacijom u hemijski slično jedinjenje ili njegovog gubitka razgradnjom. Uzorci se pre testiranja pulverizuju ili seku u segmente.

Tehnike pripreme uzoraka zasnovane su na sledećim procedurama:

- inkubacija uzorka u vodenom puferu i analiza imunološkim tehnikama, najčešće RIA,
- inkubacija u kiselom ili baznom rastvoru, nakon koje sledi tečno-tečna ili čvrsto-fazna ekstrakcija i analiza hromatografskim tehnikama, najčešće GC-MS
- inkubacija u organskom rastvaraču (npr. metanol sa ili bez hlorovodonične kiseline), tečno-tečna ili čvrsto-fazna ekstrakcija i hromatografska analiza (GC-MS)
- digestija u enzimskom rastvoru, tečno-tečna ili čvrsto-fazna ekstrakcija i hromatografska analiza (GC-MS)

Inkubacijom uzorka dlake u natrijum hidroksidu, proteinski matriks se potpuno razgrađuje. Parametar koji treba odrediti je molarnost natrijum-hidroksida, vreme i temperatura inkubacije. Alkalna hidroliza dlake nije pogodna za ekstrakciju hemijski nestabilnih jedinjenja kao što su kokain, 6-MAM ili benzodiazepini koji hidrolizuju pod dejstvom jakih baza.

Inkubacija organskim rastvaračem je jednostavnija metoda. Ona uključuje dodavanje metanola ili etanola u uzorak i zagrevanje na 45 °C u ultrazvučnom kupatilu nekoliko sati. GC-MS analiza se zatim vrši nakon uparavanja organskog rastvarača (2).

Hidroliza keratinskog matriksa enzimskom digestijom je još jedan od načina pripreme uzorka. Uzorci se mogu tretirati rastvorom pronaze, glukuronidaze, arilsulfataze ili proteinaze K. Enzimi deluju isključivo na razgradnju keratina, bez uticaja na hemijsku strukturu jedinjenja koje se određuje. Ovo je od velikog značaja u analizi hemijski nestabilnih jedinjenja (9).

Novija tehnika pripreme je superkritična tečna ekstrakcija ugljen dioksidom. Dodavanjem polarnog modifikatora kao što je voda, metanol ili trietanolamin dobija se subkritična tečnost sa visokim ekstraktabilnim svojstvima. Velika brzina ekstrakcije (oko 30 min.) i mogućnost vezivanja online za GC-MS su prednosti ove metode (10).

Analitičke metode za analizu kose

Prva publikacija o analizi morfina u kosi primenila je RIA metodu⁽¹⁾. Sledeća istraživanja su osim RIA uključivale i GC-MS metodu. Hromatografske metode su veoma moćne u identifikaciji i kvantifikaciji lekova i sredstava zloupotrebe

u kosi zahvaljujući njihovoj sposobnosti razdvajanja, specifičnosti i osetljivosti, posebno kada su u sprezi sa masenom spektrometrijom.

Imunološke metode se primenjuju kao „screening” testovi zahvaljujući njihovoj osetljivosti, brzini i jednostavnosti pripreme. Procedura pripreme mora biti kompatibilna sa testom koji će se primeniti (sredstva za pranje uzoraka i sredstva za digestiju ne smeju da interferiraju sa imunitestom). U slučaju hemijske hidrolize obavezno je uraditi neutralizaciju. Razaranje organskog proteinskog matriksa dlake mora biti urađena pod uslovima dovoljno blagim da ne dođe do oštećenja proteinskih antitela koja će naknadno biti dodata u iminotestu. Kvantifikacija imunitestom nije pouzdana s obzirom na to da se reakcija odvija i sa lekom i njegovim metabolitima koji su slične hemijske strukture.

Najčešće primenjivane imunološke metode su radioimunitest (RIA), enzimski imunitestovi (EMIT), fluorescentni polarizacioni imunitest (FPIA) (2).

Hromatografske metode se primenjuju kao „screening” i potvrđne tehnike u analizi uzoraka kose. Osim toga, one omogućavaju i kvantifikaciju leka i njegovih metabolita.

Tankoslojna hromatografija je prvi put primenjena u detekciji morfina u kosi heroinskih zavisnika. Potvrda i kvantifikacija su urađene primenom HPLC sa fluorimetrijskim detektorom (11).

HPLC metode u analizi različitih grupa jedinjenja su upotrebljene uz primenu UV, fluorimetrijskog i kulometrijskog detektora. U poslednje vreme se primenjuje LC-MS tehnika za identifikaciju i kvantifikaciju lekova i droga zloupotrebe iz uzoraka kose.

Gasna hromatografija u sprezi sa plameno-jonizacionim (FI) ili azot-fosforom (NP) detektorima se retko primenjuje u analizi uzoraka kose zbog mnogobrojnih interferencija. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom je najmoćnija metoda u analizi kose i najčešće se primenjuje za detekciju i kvantifikaciju sredstava zloupotrebe (2).

Od drugih metoda primenjuju se kapilarna zonska elektroforeza (CZE) i infracrvena mikroskopija (12).

Analiza segmenata kose

Višesegmencionalna analiza kose uključuje uzimanje uzorka čitave dužine kose što bliže koži glave i sečenje u delove odgovarajuće dužine da bi se odredila koncentracija leka koja je uzeta u određenom vremenskom periodu. Na ovaj način može se dobiti retrospektiva uzimanja lekova i droga zloupotrebe u nekoliko poslednjih meseci, s obzirom na to da kosa raste u proseku oko 1 cm mesečno (2). Ova analiza je od posebnog značaja u sudskoj medicini.

Značajno pitanje u analizi kose je odnos između unete doze leka i njegove koncentracije u kosi. Ovaj odnos kod zavisnika od droga zloupotrebe zavisi od unete doze koja je često nepoznata, čistoće droge i prelaska droge iz krvi u kosu koja varira od osobe do osobe. Međutim, izvesni radovi su pokazali da postoji značajna zavisnost doze i koncentracije u kosi za digoksin, kokain, fenciklidin, kanabinoide, meprobamat, haloperidol i amitriptilin (13).

Još uvek se proučava uticaj genetskih razlika u koncentraciji melanina ili poroznosti i boje dlake. Dva tipa melanina su prisutna u dlaci: eumelanin sa malim sadržajem sum-

pora i feomelanin sa visokim sadržajem sumpora. Crna i braon kosa sadrže više eumelanina nego crvena i plava. Osim toga i mnogi drugi faktori utiču na inkorporaciju leka u dlaku, kao što su pKa vrednost, rastvorljivost u lipidima, metabolizam i varijacije u ciklusima rasta dlake (2).

Zaključak

Analiza kose je od velikog značaja u sudskoj medicini i kliničkoj praksi. Posebno je korisna u toksikologiji. Uzorkovanje je jednostavnije, a analizom se može dobiti precizna istorija uzimanja lekova i sredstava zloupotrebe.

Uzorak kose daje mogućnost da se napravi razlika između hronične i pojedinačne ekspozicije nakon segmentacione analize. Takođe, analiza kose je od posebnog značaja kada se ne zna ili je nemoguće dobiti podatke o istoriji uzimanja lekova naročito kod psihijatrijskih pacijenata.

Abstract

Hair analysis is very useful when history of taking drugs is unknown, or if it is impossible to obtain. The literature describes numerous forensic cases when the hair analysis used to determine the difference between a seller and drugs abuser, crimes under the influence of psychoactive substances, suspicious death, obtaining a driver's license, and Doping Control. The drug is incorporated into the hair during the hair protein synthesis, by binding to the amino acids functional groups. That means that the analite in the hair sample is very stable. Analytical methods which are used in the analysis of hair are liquid chromatography or gas chromatography with mass-spectrometric detection.

LITERATURA

1. A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W. Baumgartner, C.T. Black, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories, *J. Nuclear Med.* 20 (1979) 748–752
2. Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, 3rd edition, Pharmaceutical Press, London 2004.
3. Kintz P, Value of hair analysis in post-mortem toxicology, 2004, *Forensic Sci Int*, 142: 127-143
4. E. Cone, Mechanisms of drug incorporation into hair, *Ther. Drug Monit.* 18 (1996) 438–443
5. G.L. Henderson, Mechanisms of drug incorporation into hair, *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 19–29
6. R. Kronstrand, S. Fořstberg-Peterson, B. Kagedal, J. Ahlner, G. Larson, Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1485–1494
7. L.W. Cartmell, A. Aufderhide, C. Weems, Cocaine metabolites in pre-columbian mummy hair, *J. Okla. State Med. Assoc.* 84 (1991) 11–12
8. V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Drug concentrations in human hair after bleaching, *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 331–332
9. Sachs and Kintz, Testing for drug in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992, *J. Chromatogr. B*, 1998;713:147-161
10. Edder i sar Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts, *J. Chromatogr. B*, 1994;658:75-83
11. Jeger et al Morphin-determination in human hair by instrumental HP-TLC in TIAFT Proceedings, B. Kaempe (Ed.), Copenhagen, Mackenzie, 1991, 250-256
12. Tagliaro et al, Hair analysis, a novel tool in forensic and biomedical sciences: new chromatographic and electrophoretic/electrokinetic analytical strategies, *J. Chromatogr. B* 1997;689:261-271
13. P. Kintz, Clinical application of hair analysis in Drug testing in hair, P. Kintz (ed.), Boca Raton, CRC Press, 1996, 267-277