

Studijní obor Zdravotní laborant

Vyšetřovací metody v toxikologii

FN u sv. Anny v Brně, Ústav soudního lékařství

Doporučená literatura

- M. Balíková: Forenzní a klinická toxikologie, Galén 2004
- J. Prokeš a kol.: Úvod do toxikologie, Praha 2005
- Základy toxikologie II. Karolinum, Praha 1998
- Clarke's Analysis of drugs and poisons, The Pharmaceutical Press, London 2004
- R.C. Baselt: Disposition of Drugs and Chemicals in Man, Foster City California, 1995
- Lüllman H. a kol: Farmakologie a toxikologie, Grada 2002
- Kolektiv autorů: Vybrané kapitoly z toxikologie, IPVSZ Brno, 1986
- O. Horáková a kol.: Materia pharmaceutica 5, Osveta, 1987

Literatura pokračování

O. Riedl, V. Vondráček: Klinická toxikologie, Avicenum Praha, 1980

Kolektiv autorů: Soudní lékařství, Avicenum Praha, 1999

J. Večerková: Postupy při záchytu drog a identifikaci léčiv a metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách, SPN Praha, 1983

V. Doležalová: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, IPVZS Brno 1995

J. Marhold: Přehled průmyslové toxikologie – organické látky, svazek 1 a 2, Avicenum Praha, 1986

J. Marhold: Přehled průmyslové toxikologie – anorganické látky, Avicenum Praha, 1980

Důležité adresy

KU Praha, Ústav soudního lékařství a toxikologie,
<http://dec52.lf1.cuni.cz/fakulta/ustavy/ustavy.php?ustav=sltox>

1LFUK - úvod do toxikologie, pregraduál. vzdělávání
autor Prokeš - materiál ke stažení

Jihočeská univerzita, Jiří Patočka

www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/radio/ucebni_texty

Obsah předmětu

1. Předmět toxikologie, historie oboru, rozdělení
2. Obecná toxikologie (jed, otrava, cesty vstupu do organismu)
3. Speciální toxikologie – klasifikace jedů
4. Osud látky v organismu
5. Problematika intoxikací v praxi
6. Toxikologicko-chemické vyšetřovací metody
7. Izolace tox z biologického materiálu
8. Analýza těkavých látek a analýza neextraktivních látek
9. Analýza extraktivních látek – izolační techniky
10. Imunochemické metody v toxikologii
11. Instrumentální metody v toxikologii
12. Alkohol – průkaz a stanovení; vliv alkoholu na organismus
13. Problematika toxikomanie a záchytu drog

1. Úvod do toxikologie

- Toxikologie mezi ostatními vědními disciplínami
- Vymezení klinické a forenzní toxikologie
- Vyšetřovaný materiál
- Použité laboratorní techniky
- Interpretace nálezů
- Vývojové trendy

Obecná toxikologie

- Samostatný vědní obor studující nepříznivé (toxické) účinky cizorodých chemických látek (xenobiotik) nebo jejich směsí na živé organizmy

TOXIKOLOGIE – nauka o účincích jedů na lidský organismus
(z řečtiny „to toxikon“ značí jed, jímž se napouštějí šípy)

- **toxikologie v nynější podobě je poměrně mladá věda vyvíjející se z prostého pozorování do současného statusu jako analytické vědy**
- **jako otce moderní toxikologie je možno považovat Mathieua Josepha Bonaventuru Orfila (1787-1853)**
- **velký rozmach v posledních desetiletích – velké objevy a rozvoj metod v oblasti biologie, genetiky, molekulární biologie, velký rozmach v oblasti analytické instrumentální techniky,...**
- **poznatky o účincích jedů a možnosti využití či spíše zneužití jsou známy několik tisíciletí (jak lidstvo samo)**

OBEČNÁ TOXIKOLOGIE

- **JED** - taková látka, která po vniknutí do organismu v poměrně malém množství ohrožuje organismus buď těžkým poškozením zdraví, nebo ukončením života;
 - každá látka organismu kvalitativně nebo kvantitativně cizí, která poškozuje organismus chemicky nebo fyzikálně-chemicky, je **JED**.
 - **chemická škodlivina (noxa)** - látka schopná zapříčinit poškození zdraví, které lze odhalit: - v průběhu styku se škodlivinou;
 - v návaznosti na něm;
 - v pozdějších obdobích života organismu;
 - u budoucích generací
 - **xenobiotika** - látky kvalitativně nebo kvantitativně organismu cizí
 - **účinek** - biologická změna vyvolaná nebo související s působením škodliviny;
 - projev interakce látky s organismem
- účinek nespecifický** - daný obecnou fyzikálně-chemickou vlastností látky málo závislou na struktuře škodliviny (př. kyseliny, zásady,...)

DĚLENÍ TOXIKOLOGIE

- z hlediska didaktického: - **toxikologie obecná** (zobecňuje poznatky speciální t. a zabývá se vlastnostmi, které jsou společné pro všechny jedy nebo jejich velké skupiny)
 - **toxikologie speciální** (uvádí poznatky o jednotlivých jedech, jejich skupinách)
- jiné dělení:
 - t. experimentální
 - t. klinická
 - t. forenzní
 - t. průmyslová
 - t. vojenská
 - t. životního prostředí
 - nauka o průkazu jedů
 - toxikologická patologie
- multidisciplinarita toxikologie - otravami se zabývá mnoho vědních oborů - veterinární lékařství, farmakologie, chemie,...
- mnoho medicínských oborů se setkává s intoxikacemi (interna, hygiena, psychiatrie, patologie, soudní lék., pracovní lékařství, dětské lék.,...)

Toxikologie :

- **Klinická** - popisuje a analyzuje příznaky otravy, hledá nejúčinnější léčbu
- **Forenzní** analýza tělních tkání a tekutin při podezření na otravu, průkaz nevhodných a zakázaných látek, znalectví pro orgány činné v trestním řízení
- **Analytická** průkaz a stanovení jedů v biol.materiálu
- **Experimentální** studuje účinky jedů pokusy na zvířatech

Průmyslová expoziční testy, toxické působení chem. látek na člověka v pracovním procesu, vyš. moči a krve.

Léčiv nežádoucí účinky specifikovaného léčiva

Ekotoxikologie chronické působení nox v ovzduší, ve vodě, půdě (hygienická služba), vliv toxických látek na dynamiku populace uvnitř specifických ekosystémů

Potravinářská a veterinární rezidua škodlivin v potravinách (hygienické obory, mikrobiologie)

Vojenská bojové látky a jejich účinky

Doping sportovní medicína

Klinická toxikologie – vyš. při
ohrožení života

Časový faktor !!

Zjištění či vyloučení intoxikace

Omezené množství biologického
materiálu

Forenzní toxikologie – pro objasnění
okolností

Přesnost v určení chem. individuí

Kvantitativní stanovení, průběh

Přestávka

Toxicita látek :

Všechny látky jsou jedy a závisí jen na dávce, kdy látka přestává být jedem

(Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim, 1493-1548)

Toxický účinek je v širokém rozpětí ng/kg – g/kg

Chemické vlastnosti = reaktivita – schopnost vstupovat do reakcí s jinými látkami

Fyzikální vlastnosti = skupenství, struktura, b.v., b.t., rozpustnost, rozdělovací koeficienty

Biologické vlastnosti = schopnost vstupovat do reakcí s látkami, které jsou součástí živých organismů

Toxicita = biologická odpověď

Nebezpečnost chemické látky > toxicita

Expozice = vystavení živého org. účinkům CHL

Brána vstupu = způsob kontaktu s CHL

Zdravotní rizika

Riziko = pravděpodobnost s jakou se při definované expozici organismu CHL projeví její toxicita

CHL = chemická látka

ŽO = živý organizmus

Klasifikace toxických látek podle velikosti střední smrtelné dávky LD_{50}

Chemická látka	LD_{50}
supertoxická	5 mg . kg ⁻¹ a méně
Extrémě toxická	5 -50 mg.kg ⁻¹
Vysoce toxická	50 -500 mg.kg ⁻¹
Středně toxická	0,5 – 5 g. kg ⁻¹
Málo toxická	5 – 15 g. kg ⁻¹

Chemická látka	LD₅₀ (mg/kg)
ethanol	7000
NaCl	3000
morfin	900
fenobarbital	150
strychnin	2
nikotin	1
dioxin (TCDD)	0,01
batrachotoxin	0,005
botulotoxin	0,00001

OTRAVA (intoxikace)

- patologický stav organismu zapříčiněný vstřebanou škodlivinou;
- projevuje se příznaky (symptomy) nebo skupinou příznaků (syndrom), které mohou být charakteristické pro určitou látku nebo neurčité
- **akutní o.** - důsledek jednorázové nebo krátkodobé expozice s klinickými projevy;
- **chronická o.** - následek dlouhodobé (měsíce, roky) expozice malými dávkami škodliviny

Škodliviny s pozdními účinky

- látky, jejichž účinky se projeví po velmi dlouhé expozici (roky, desítky let)
- **mutageny, karcinogeny, alergeny**
- mutageny - látky schopné vyvolat změnu dědičných vlastností; změnu v genetickém materiálu buňky
- karcinogeny - látky, které mohou vyvolat zhoubné bujení tkání
(kokarcinogeny - látky zesilující účinek karcinogenů)
- selektivní toxicita - schopnost látky působit pouze na některé biologické druhy
- orgánová toxicita - chemická látka působí na některé orgány více toxicky než na jiné
- systémová toxicita - látka, která vyvolává poškození všech orgánů
- idiosynkratické reakce - geneticky podmíněná citlivost vůči některým chemickým látkám (MHT)
- mithridatismus - odolnost vůči jedům
- latence, opožděná toxicita - schopnost některých škodlivin vyvolávat toxické projevy s určitým časovým odstupem po expozici

Toxicitní parametry

= jsou matematické veličiny, které charakterizují toxické vlastnosti chemické látky ve vztahu k biologickému objektu, na něž působí.

- **dávka**: množství škodliviny (chemické látky, xenobiotika), které pronikne do organismu
- **dávka prahová**: nejmenší dávka, která již vyvolá hodnotitelnou reakci
- **absolutní letální (smrtící) dávka** - nejmenší dávka, po níž dojde vždy ke smrti
- **minimální letální dávka** - nejmenší dávka, po níž došlo ke smrti
- **absolutní toxická dávka** - nejmenší dávka, při níž dojde vždy k otravě
- **minimální toxická dávka** - nejmenší dávka, po níž došlo k otravě
- **střední letální dávka LD₅₀** - dávka, po níž dojde ke smrti u 50% postižených
(= lethal dose, dosis letalis)
- strmost křivky - jak rychle se zvyšuje toxicita s rostoucí dávkou

- **střední účinná doba** (tempus effectivum medium) ET_{50} - časový interval mezi podáním látky a účinkem u 50% pokusných objektů
- **střední letální doba** (tempus lethale medium) LT_{50} - časový interval mezi podáním látky a smrtí 50% pokusných objektů
- **terapeutická šířka** - rozdíl mezi dávkou terapeuticky účinnou a toxickou

Toxicitní parametry jsou ovlivňovány velikostí použitého souboru, druhem pokusného zvířete, pohlavím, stářím zvířete, způsobem aplikace, ročním obdobím (sezónní vlivy), denní dobou,...

Nutno přísně standardizovat podmínky, za kterých se měření provádí.

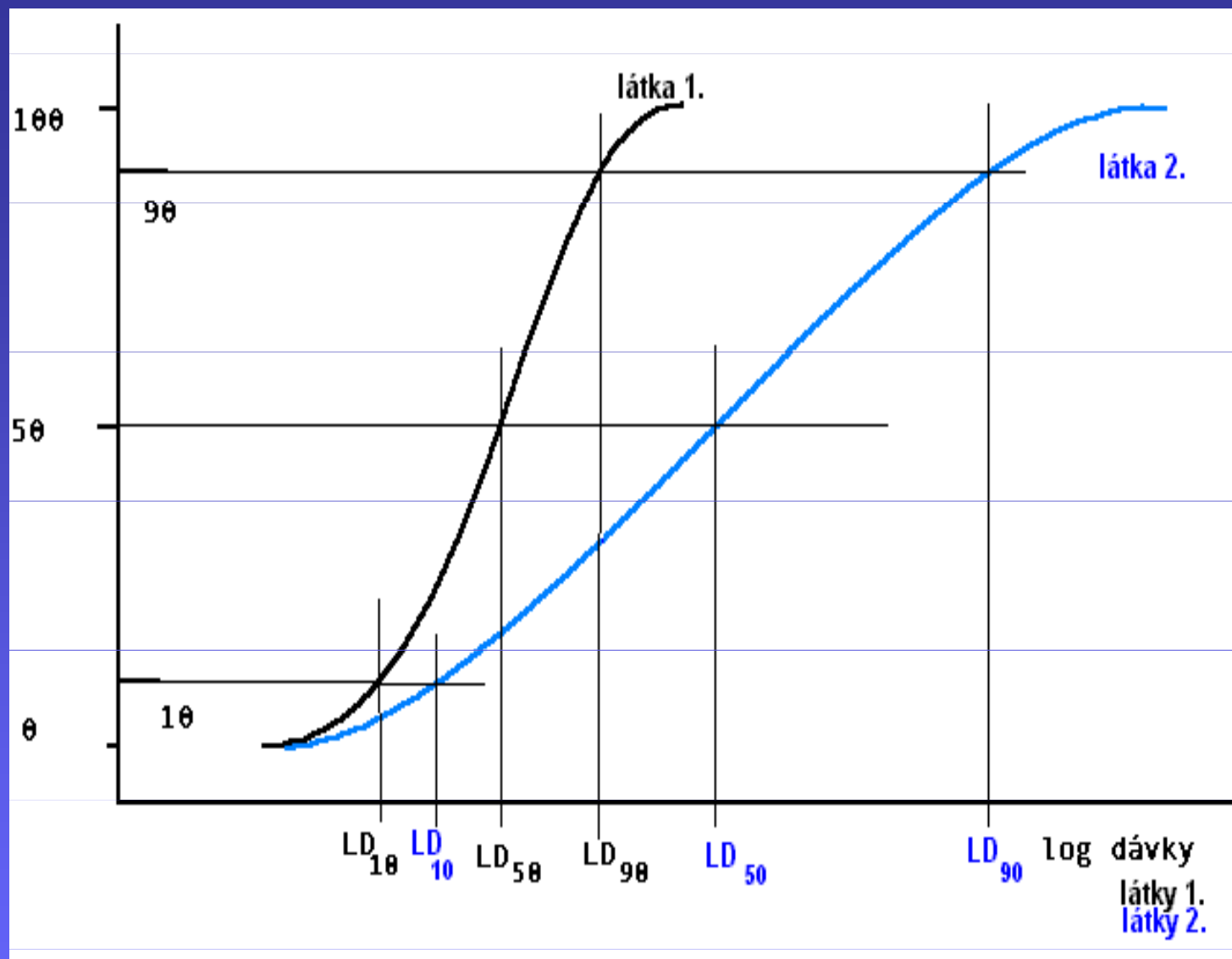
EDúčinná dávka (dosis effectiva)

LD letální dávka (dosis lethalis)

LD₅₀ .. charakterizuje toxicitu, dávka kdy 50%
pokusných zvířat zahyne = střední toxicita

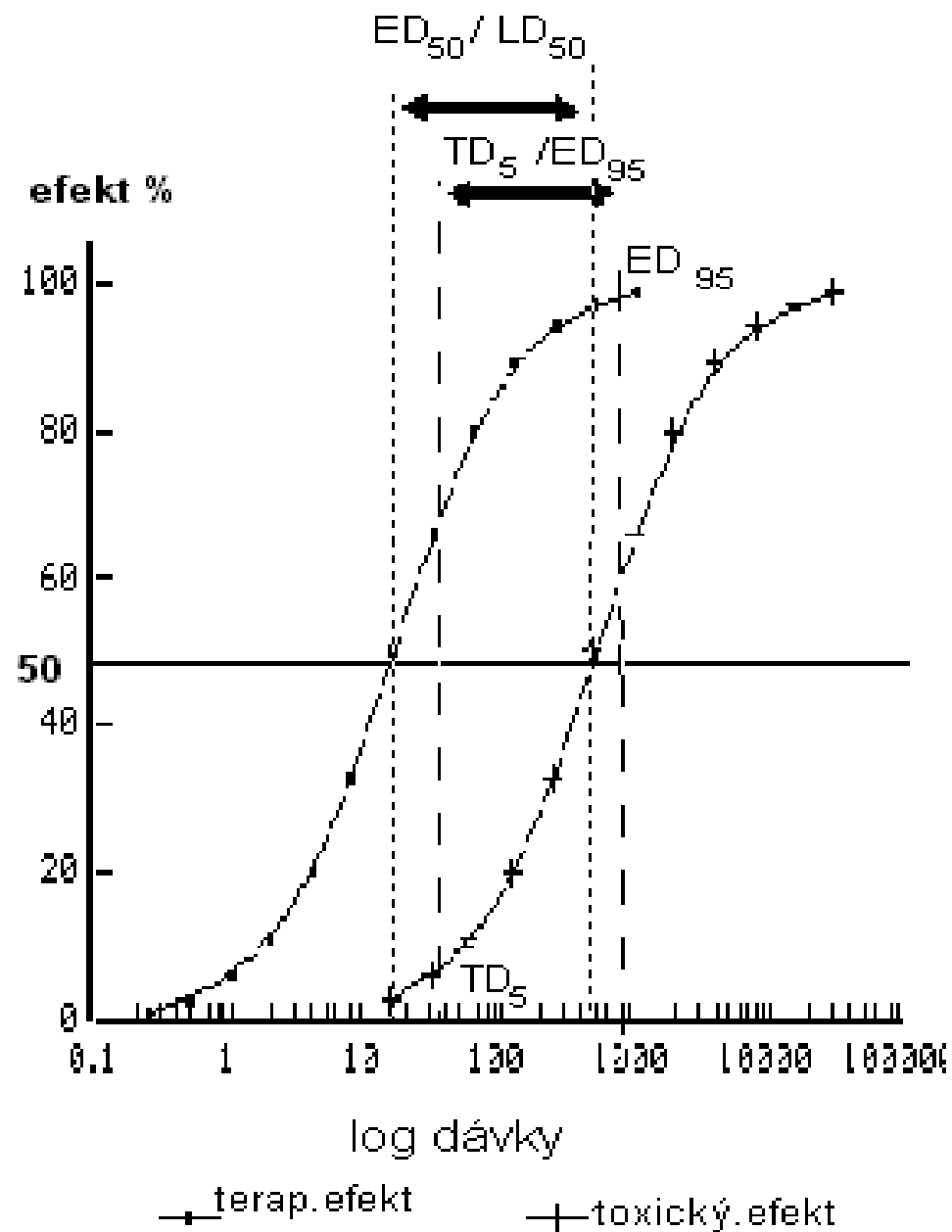
TD toxická dávka

LD₅₀/ED₅₀ .. terapeutický index



LD₁₀ – LD₉₀ pro různé látky

Závislost účinku na dávce



ED₅₀ požadovaný efekt

LD₅₀ dosis letalis

Toxikinetika a biotransformace toxických látek

Toxikinetika - zabývá se osudem toxické látky v organismu

Absorpce - průnik látky do organismu; způsob, jakým chemická látka překonává bariéru mezi biologickým objektem a vnějším prostředím a proniká do organismu

- **a. plícemi** (vdechování par, plynů, aerosolů, toxických látek) - je velmi rychlá - rychlý průnik

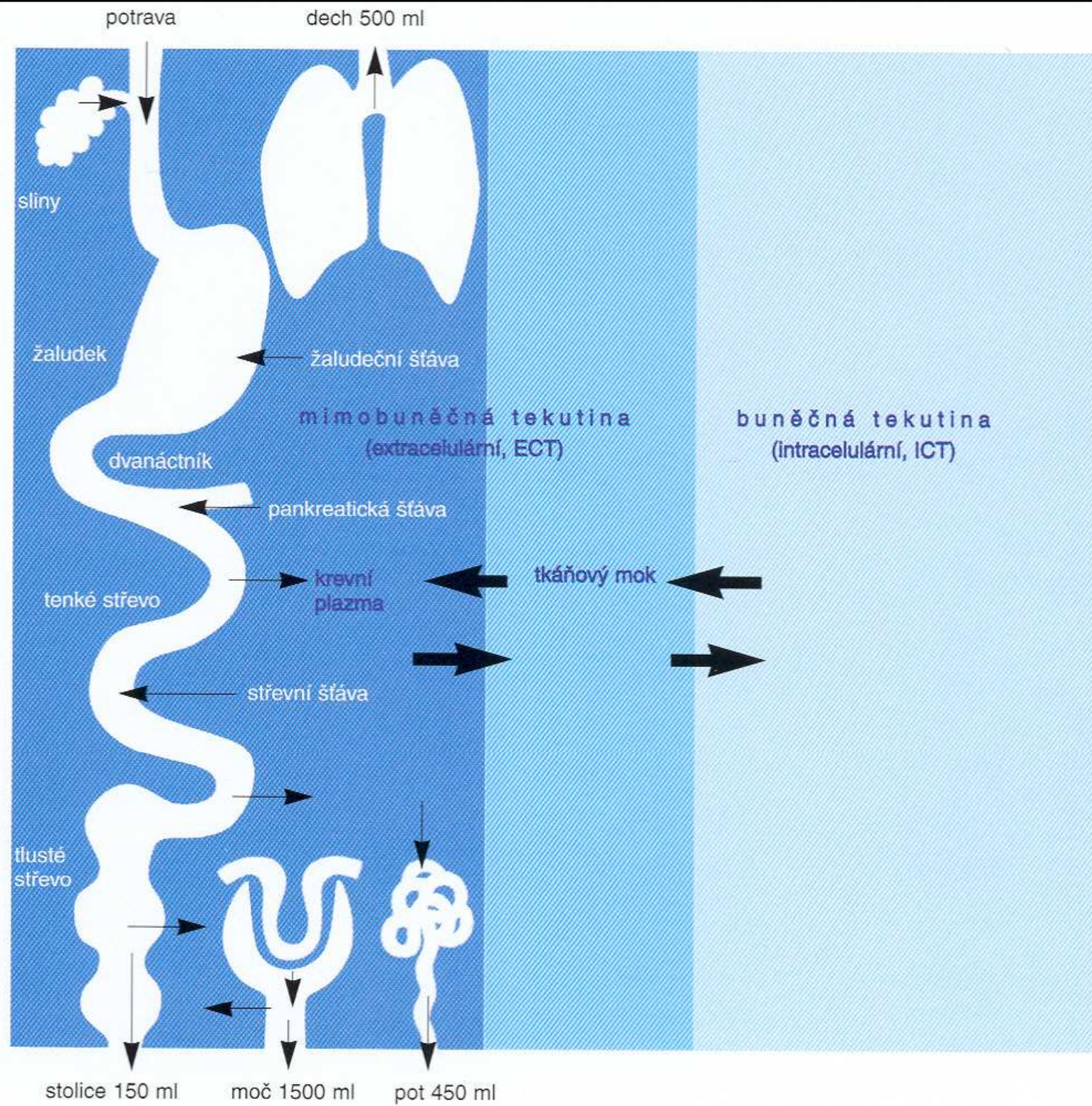
látky do krve; velká efektivní plocha pro absorpci - kolem 140 m²;
možno usmrtit i lokálním působením - edém, bronchopneumonie, nekróza)

- **a. gastrointestinálním traktem** (GIT) - požití škodliviny ústy - perorální aplikace (p.o.)

- k absorpci může dojít v ústech, žaludku, tenkém a tlustém střevě, konečníku)

- a. nastává většinou prostou difúzí;

- ovlivnění celou řadou faktorů: fyzikálně-chemické vlastnosti látky (rozpuštěnost ve vodě, v tucích, stabilita při různých pH, velikost částic, funkční stav GIT, přítomnost potravy,...



- **a. kůží** - pro absorpci je rozhodující průnik přes „stratum corneum“
- tj. nejvrchnější, zroho vatělá vrstva buněk; po průniku touto vrstvou je již další absorpce poměrně rychlá

- **a. sliznicí** - často nosní sliznice - poměrně rychlý nástup účinku (silné prokrvení sliznice a rychlý průnik látky do krevního oběhu)

- **injekční aplikace** (i.m. - intramuskulární - do svalu; i.v. - intravenózní - do žíly; s.c. - subkutánně - podkožně) - nejrychlejší je nástup po i.v. podání

- **oční spojivkou** - při podávání očních kapek (osud látky)

biologická dostupnost - podíl látky, která pronikne do systémové cirkulace

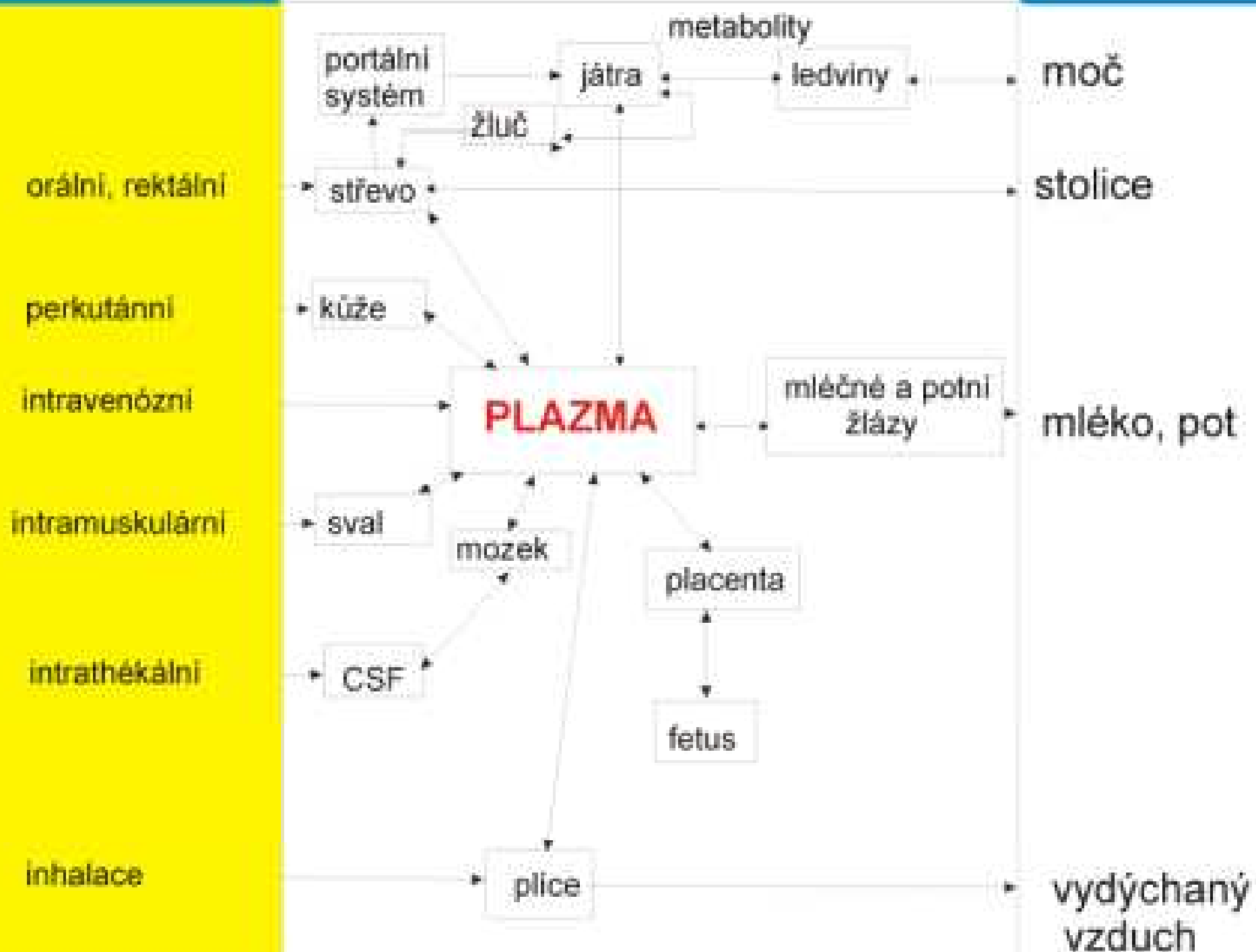
Distribuce

- dynamické rozdělení chemické látky, příp. jejích metabolitů, do buněk, tkání a orgánů
- faktory ovlivňující místo a rozsah distribuce: prokrvení tkání, rozpustnost v tucích, pH, stupeň vazby na plazmatické proteiny;
- časově závislý komplexní jev, který je možno popsat kinetickými rovnicemi a konstantami
- distribuce látky v organismu je v každém časovém okamžiku výsledkem její absorpce a exkrece
- neexistuje univerzální kinetický model aplikovatelný na všechny látky
- d. je ovlivněna zejména velikostí rozdělovacího koeficientu (v jakém poměru se látka rozdělí mezi vodní a tukovou fází)
- kumulace
- specifická depa pro ukládání toxických látek (tuková tkáň)
- d. je ovlivněna také existencí různých biologických bariér (hematoencefalická b. - mezi krví a mozkem, placentární b. - mezi krevním oběhem matky a krevním oběhem plodu)

aplikace

Absorpce a distribuce

Eliminace



orální, rektální

perkutánní

intravenózní

intramuskulární

intrathékální

inhalace

moč

stolice

mléko, pot

vydýchaný vzduch

Nespecifické distribuční pochody

- pro distribuci v organismu i pro resorpci a vylučování je rozhodující rozpustnost látky
- a) **látky rozpustné pouze ve vodě** (po p.o. podání se špatně resorbují; po i.v. se dobře resorbují pouze v extracelulárním prostoru; dobře se vylučují ledvinami)
- b) **látky rozpustné pouze v tucích** (hromadí se v tělním tuku)
- c) **amfifilní látky** (látky, které mají v molekule hydrofilní i hydrofobní skupinu, které nejsou od sebe příliš vzdálené) - tyto látky se hromadí v interfázích, kde se vodné prostředí stýká s apolární fází (př. membránová struktura buněk)

Specifické distribuční pochody

- vazba na receptory
- účast v aktivních transportních dějích

Exkrece (eliminace)

- vylučování chemické látky z organismu
- zahrnuje různé způsoby (ex. plícemi, ledvinami, stolicí, potem, slinami, slzami, mateřským mlékem,...)
- ex. ledvinami se uskutečňuje glomerulární filtrací a tubulární sekrecí (ovlivněno změnami pH, průtokem krve, vazbou na krevní proteiny)
- ex. stolicí se děje dvěma mechanismy (vazba chem. látky na nestrávené složky potravy; vylučování žlučí)
- rychlost vylučování látky z organismu je nejčastěji úměrná její koncentraci:

$$c_t = c_o \cdot e^{-kt}$$

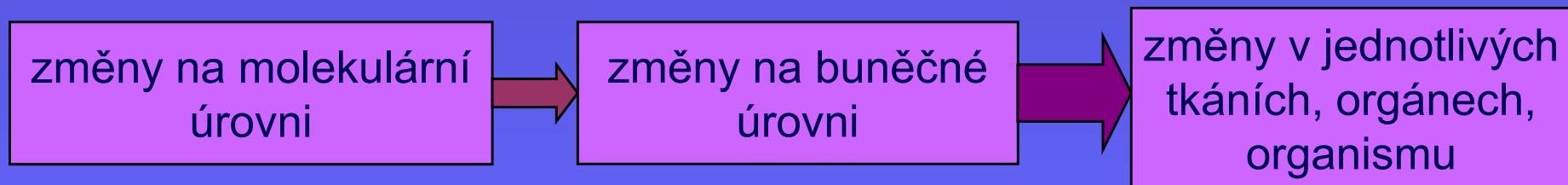
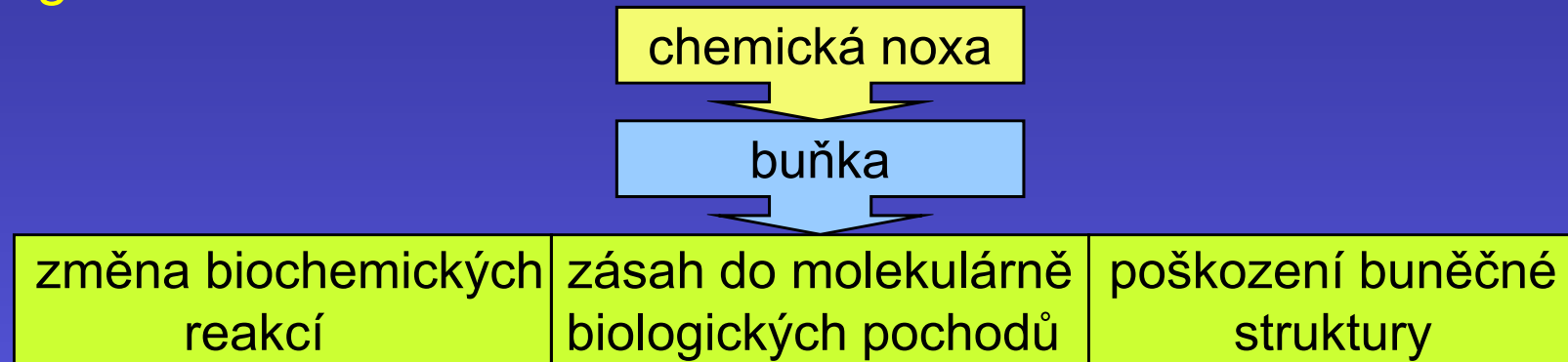
c_o - počáteční koncentrace látky v organismu

c_t - koncentrace látky v čase t

k - konstanta charakteristická pro danou látku

Molekulární a buněčná toxikologie

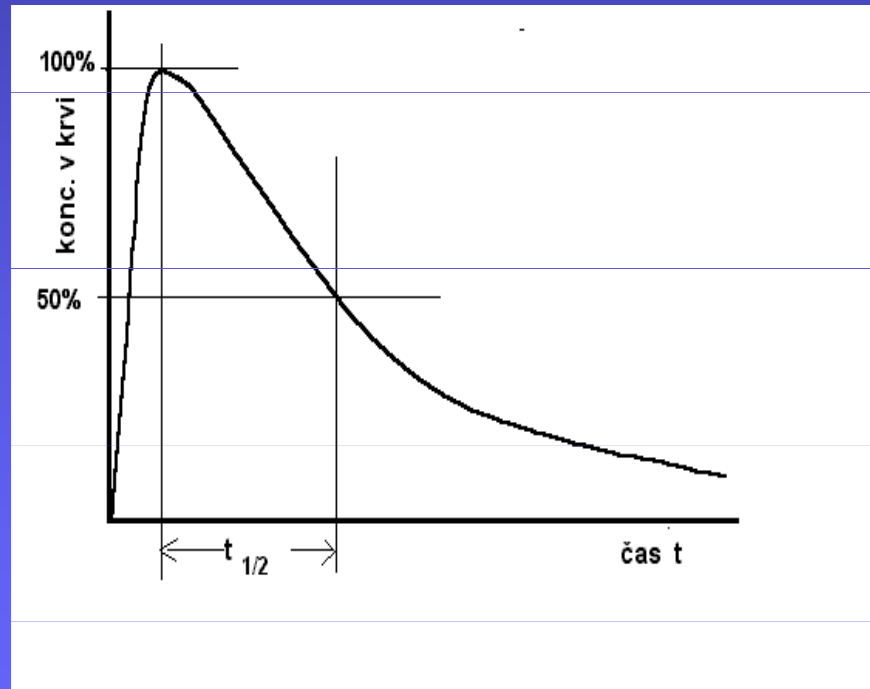
- **buňka** = primární místo zásahu chemických škodlivin poškozujících organismus



Průběh hodnot koncentrací látek v organismu.

Při jednorázové expozici noxy jde o dva protichůdné děje :
resorpce - exponenciálně probíhající vzestup
eliminace - exponenciálně probíhající pokles

Pro průběh hladiny je rozhodující poměr rychlosti obou dějů.



obr.1. poločas

Obr.1. Průběh hodnot koncentrací látek v organismu.

Výsledný efekt intoxikace závisí :

- vstupní bráně (způsob podání):

- GIT – p.o.
- kůže
- plíce
- parenterálně – injekčně i.v., i.m., s.c.; rektálně; vaginálně; uretrálně; uretrálně; spojivkový vak, zevní zvukovod při porušení bubínku

- **expozici** – na dávce, době a podmínkách kontaktu ⇒ hloubka účinku a reversibilita

- akutní otrava → vysoká dávka po krátkou dobu
- chronická otrava → nízké dávky po dlouhou dobu (opakovaně)
- reversibilní - typu interakce a délce působení
- irreversibilní

- **prostupnosti buněčnou membránou**, tj, způsobu resorpce

- **vazbě na proteiny**

- **organismu** – druh, věk, pohlaví, vlastnosti (zděděné a získané), nutriční a funkční stav

Přestávka

PŘEHLED BIOLOGICKÝCH A TOXIKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ PRVKŮ A ANORGANICKÝCH SLOUČENIN

- Chemická reaktivita prvků a jejich biologický účinek závisí na stavbě atomu

1. Vlastnosti prvků ve skupinách :

body tání, varu - skupenství,
rostou s protonovým číslem

- 2. Oxidační číslo (OČ): číslo skupiny odpovídá maximálnímu oxidačnímu číslu prvku, vyjma prvků ležících v podskupině I. b, kde může být oxidační číslo vyšší (měď, zlato)

3. Slučivost dána rozdílem elektronegativit

- a) Afinita k vodíku ve skupině směrem dolů klesá, ale stoupá s číslem skupiny
- b) Afinita ke kyslíku ve skupině směrem dolů stoupá, ale klesá s číslem skupiny

4. Chemická povaha:

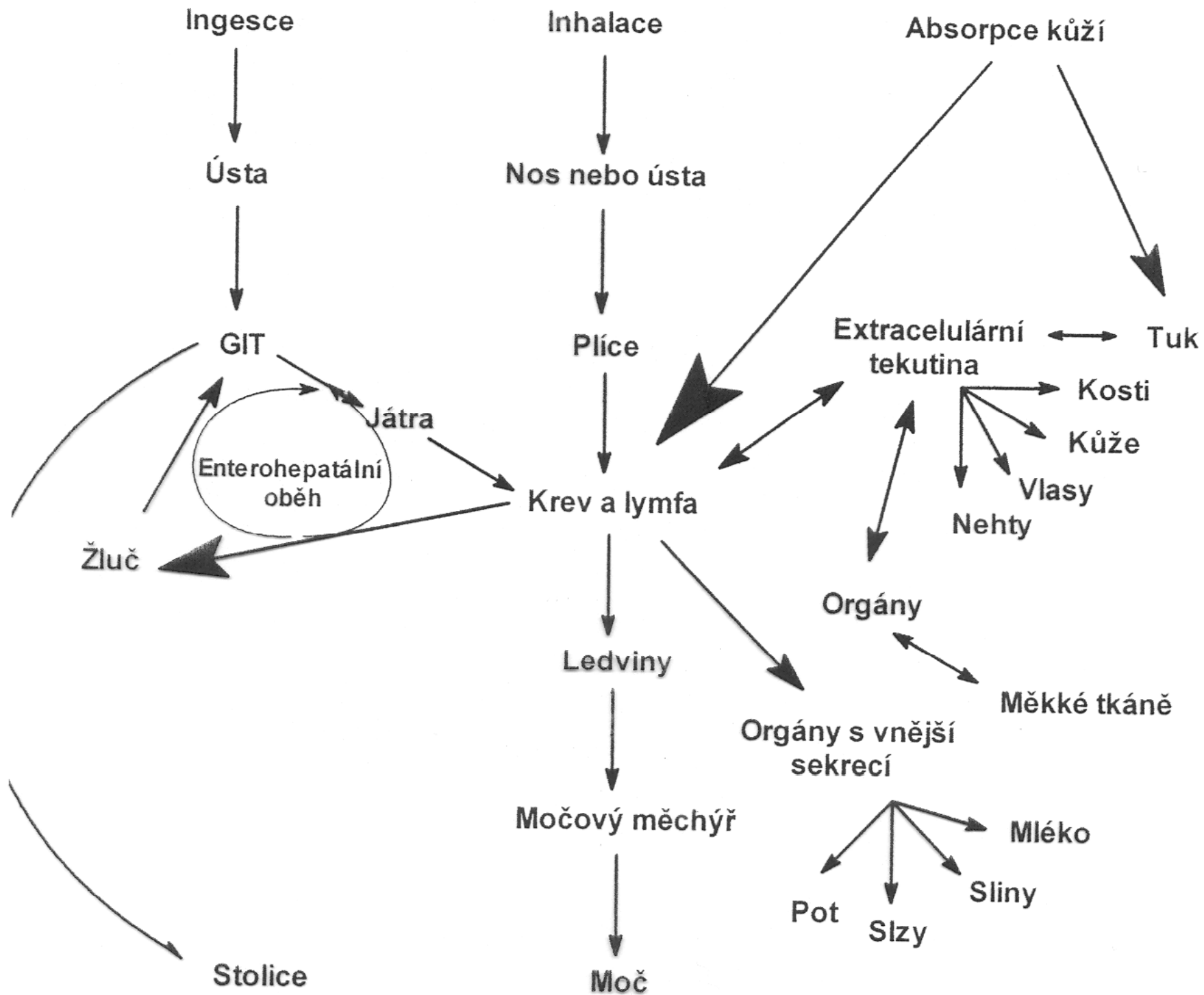
- a) Elektronegativita směrem dolů ve skupině klesá a stoupá s číslem skupiny
- b) Zásadotvornost směrem dolů stoupá a klesá s číslem skupiny
- c) Kyselinotvornost směrem dolů klesá a stoupá s číslem skupiny

BIOGENNÍ PRVKY

- **Hlavní biogenní prvky:** H, C, O, N, P, S,
- **Makrobiogenní prvky:** Na, K, Mg, Ca, Cl, Fe,
- **Mikrobiogenní prvky:** Cu, Zn, Mo, Mn, Co, F, I
- **Stopové prvky:** B, Br, Se, As, Si, Al, Li, Ti, V, Ni, Au, Cr

Biologická aktivita i toxicita anorganických sloučenin závisí na:

- chemické struktury látky → fyzikálně-chemické vlastnosti:
 - typ disperse → rozpustnost a disociabilita
 - typ a počet funkčních skupin
 - těkavost



Toxikologicko-chemické vyšetřovací metody

- průkaz jedu při otravě = stejný význam jako rentgenový snímek u zlomeniny
- otravy - často náhlé, bez znalosti příčiny nebo původu otravy
- nelze bez provedení toxikologického vyšetření zavést optimální cílenou terapii
- při úmrtích - potvrzení podezření na otravu; někdy nalezena příčina smrti při jinak necharakteristických pitevních nálezech

Důležité předpoklady:

1. správný odběr biologického materiálu (kvalita, kvantita)
2. správné uchování BM
3. vhodný výběr izolačních postupů
4. správná volba metod průkazu a stanovení
5. správná interpretace výsledků

Tělní tkáně a tekutiny

Krev, moč, žaludeční obsah, zvratky

Mozková, plicní tkáň, játra, ledviny, žluč, sklivec,
Střevní obsah,

Vlasy, nehty, pot, sliny

novorozenecká smolka

HODINY
←→
(krev, pot, sliny)

DNY
←→
(moč, stolice)

TÝDNY a MĚSÍCE

←→
(vlasy, nehty, novorozenecká smolka)

Detekční časové okno, mezi poslední dávkou noxy a dobou odběru vzorku

Metodický vývoj technik v toxikologii v letech 1950 – 2004

Dekáda od roku

1950

1960

1970

1980

1990

2000

2004

Počátek aplikací v toxikologii

TLC

GC

GC, HPLC, imunometody

GC-MS, SPE, SPME

GC-MS, **GC-MS-MS** atd.

GC-MS-MS, LC-MS-MS

On-site technologie

Průběh koncentrace v krvi a moči

