

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**

mgr farm. Monika Seńczuk-Przybyłowska

*Ocena narażenia prenatalnego
na benzodiazepiny –
ciąża pojedyncza i bliźniacza*

Poznań – 2012

Dziękuję

Pani prof. dr hab. Jadwidze Jodynis-Liebert

za umożliwienie napisania pracy w Katedrze i Zakładzie Toksykologii

Dziękuję

Pani prof. dr hab. Ewie Florek

*za patronat naukowy wykraczający poza granice obowiązków służbowych
oraz ogromną wyrozumiałość i życzliwość w dotychczasowej pracy*

Dziękuję

Zespołowi Katedry i Zakładu Toksykologii, a w szczególności

Doktorowi Maksymilianowi Kulzie i Magister Annie Woźniak

za serdeczną atmosferę i pomoc podczas prowadzenia badań

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	3
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	5
2.1. Włosy	5
2.1.1. Anatomia i fizjologia włosa	5
2.1.1.1. Budowa	5
2.1.1.2. Rozwój owłosienia	9
2.1.1.3. Barwa	10
2.1.1.4. Cykl włosowy	11
2.1.1.5. Unerwienie i unaczynienie	13
2.1.2. Dystrybucja i inkorporacja ksenobiotyków we włosie	14
2.1.3. Analiza włosa	19
2.1.3.1. Historia	19
2.1.3.2. Zastosowanie	22
2.1.3.3. Zbieranie próbek włosów	23
2.2. Benzodiazepiny	26
2.2.1. Historia	26
2.2.2. Budowa	26
2.2.3. Mechanizm działania	28
2.2.4. Losy leków w ustroju	30
2.2.5. Zastosowanie	32
2.2.6. Charakterystyka wybranych leków	37
2.2.7. Przeciwwskazania i środki ostrożności	46
2.2.8. Skutki uboczne	47
2.2.9. Interakcje	49
2.2.10. Epidemiologia	50
2.3. Cięża	52
2.3.1. Stosowanie leków w czasie ciąży i laktacji	52
2.3.1.1. Losy leków w układzie matczyno – płodowo – łożyskowym	53
2.3.1.2. Transport przezłożyskowy	55

2.3.1.3.	Wpływ leków na rozwój płodu	58
2.3.1.4.	System klasyfikacji leków stosowanych w ciąży	59
2.3.2.	Zaburzenia ciąży leczone benzodiazepinami	63
2.3.2.1.	Zaburzenia lękowe	63
2.3.2.2.	Nadciśnienie i stan przedrzucawkowy	64
2.3.3.	Ciąża wielopłodowa	66
3.	CEL PRACY	69
4.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	70
4.1.	Materiał i metody	70
4.1.1.	Grupa badana	70
4.1.2.	Materiał biologiczny do badań	70
4.1.3.	Metodyka oznaczania benzodiazepin we włosach	71
4.2.	Analiza statystyczna	77
5.	WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	78
5.1.	Wyniki dla ciąży pojedynczej	78
5.2.	Wyniki dla ciąży bliźniaczej	87
6.	DYSKUSJA	98
7.	WNIOSKI	118
8.	STRESZCZENIE	119
9.	SUMMARY	122
10.	PIŚMIENNICTWO	125
11.	OŚWIADCZENIA AUTORA	137

1. WSTĘP

Zaburzenia lękowe, objawy stresu, a także częste schorzenia związane z okresem ciąży – takie jak padaczka, stan przedrzucawkowy i rzucawka – leczone są przy użyciu leków z grupy benzodiazepin. Najczęściej stosowaną substancją stosowaną przez ginekologów i położników w terapii kobiet ciężarnych jest diazepam, który w organizmie przekształcany jest do kilku aktywnych metabolitów, m.in. nordiazepamu i oksazepamu. Podjęcie leczenia benzodiazepinami może być uzasadnione, ponieważ udowodniono, że nieleczony stres wiąże się z ryzykiem przedwczesnego porodu lub niskiej masy urodzeniowej dziecka, a współistniejące poważne stany patologiczne mogą nawet skutkować utratą ciąży. Jednak każda decyzja uwzględniająca terapię benzodiazepinami powinna być przemyślana, ponieważ niesie za sobą niebezpieczeństwo dla rozwijającego się płodu. Leki te przenikają przez barierę łożyskową i osiągają w organizmie płodu stężenia wyższe niż u matki. W ekspozycji płodu na związki benzodiazepinowe bardzo istotną kwestią jest czas jej wystąpienia w okresie ciąży. Nadal dyskutowany w środowisku naukowym jest efekt teratogeny występujący podczas organogenezy. Coraz częściej jednak omawiane są negatywne skutki zdrowotne, które mogą zaistnieć w trzecim trymestrze ciąży. Podane przed porodem mogą być przyczyną zaburzeń oddychania dziecka. Zarówno u płodu, jak i noworodka, benzodiazepiny są metabolizowane bardzo powoli, co prowadzi do ich kumulacji we krwi utrzymującej się nawet 2 tygodnie po przyjściu na świat. Rezultatem może być zespół słabości mięśniowej, nadmiernego uspokojenia, nieumiejętności ssania. Z kolei po tym czasie, może rozwinąć się zespół odstawienny z nadpobudliwością, płaczem i bezsennością. Ich chroniczne zażywanie przez matkę w ciąży może zakłócić wewnątrzmaciczny rozwój płodu i opóźnić rozwój mózgu. Istnieją obawy, że dzieci takie w późniejszym życiu mogą być podatne na zaburzenia skupienia uwagi, nadpobudliwość, trudności w nauce i całe spektrum zaburzeń autystycznych.

Benzodiazepiny stosowane w czasie ciąży zostały zaklasyfikowane przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (z angielskiego Food and Drug Administration, FDA) do kategorii D (a nawet X), czyli substancji, o których wiadomo na podstawie wcześniejszych obserwacji, że wykazują zagrożenie dla płodu. Stosowanie takiego leku podczas ciąży jest dopuszczone jedynie w sytuacji, gdy jest to bezwzględnie konieczne ze względu na dobro matki, a podanie bezpieczniejszego alternatywnego leku jest niemożliwe lub przeciwwskazane. Obawy lekarzy, farmaceutów i pacjentek związane ze stosowaniem

benzodiazepin wywołały potrzebę oceny narażenia matek i ich dzieci na szkodliwe działanie leków. Znane dotychczas procedury obejmują wykorzystanie tradycyjnych materiałów biologicznych. Ponieważ ich wyniki nie są jednak w stanie zagwarantować wyczerpujących informacji na temat przebiegu ekspozycji i jej wielkości, zaistniała konieczność opracowania metody wykorzystującej materiał alternatywny i innowacyjny.

W niniejszej pracy podjęto badania z użyciem włosów matek i ich noworodków, których analiza dostarcza szczegółów dotyczących przebytej terapii. Zebranie takich danych jest niemożliwe przy zastosowaniu standardowych metod, gdyż trwałość leków w moczu czy krwi jest bardzo ograniczona. Do oznaczenia poszczególnych substancji wykorzystano nowoczesną metodę analityczną LC-MS/MS, która umożliwiła niezwykle precyzyjny pomiar bardzo niskich stężeń w wybranej matrycy. Co więcej, uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę dla dalszych badań kontrolnych, obejmujących proces tzw. follow-up, czyli obserwacji zdrowia dzieci narażonych w okresie prenatalnym na benzodiazepiny. Mogą one przyczynić się do określenia szkodliwych efektów odległych utrzymujących się u dzieci, u których stwierdzono wysokie poziomy leków. Potencjalną korzyścią zastosowania niniejszej metody byłoby wykonywanie badań przesiewowych noworodków i szybsze wdrożenie postępowania terapeutycznego u rozwijającego się dziecka.

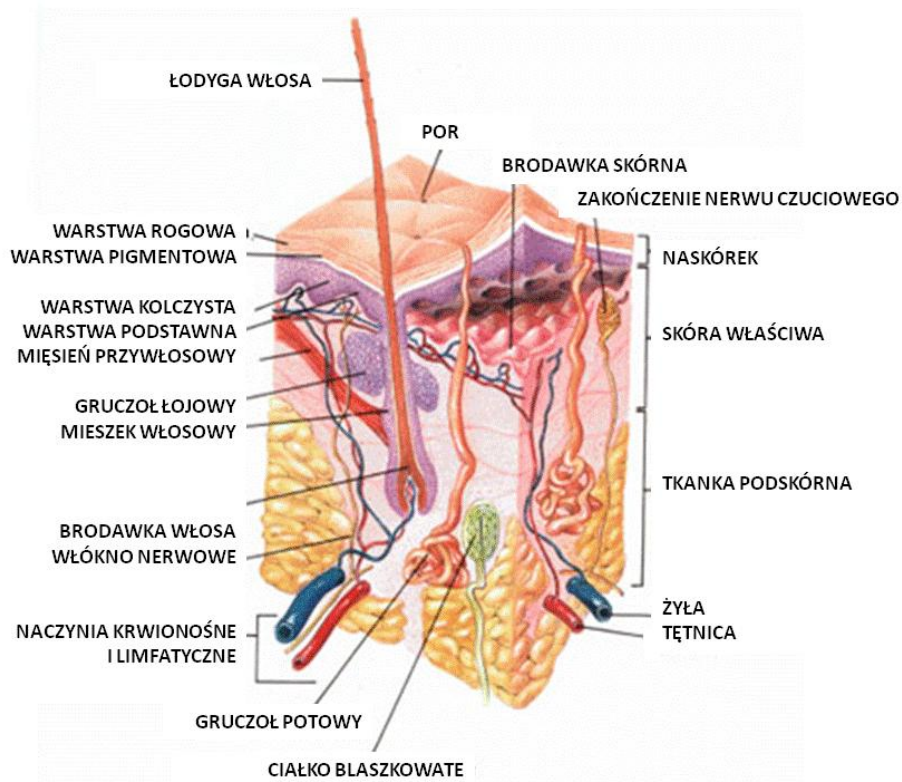
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. WŁOSY

2.1.1. Anatomia i fizjologia włosa

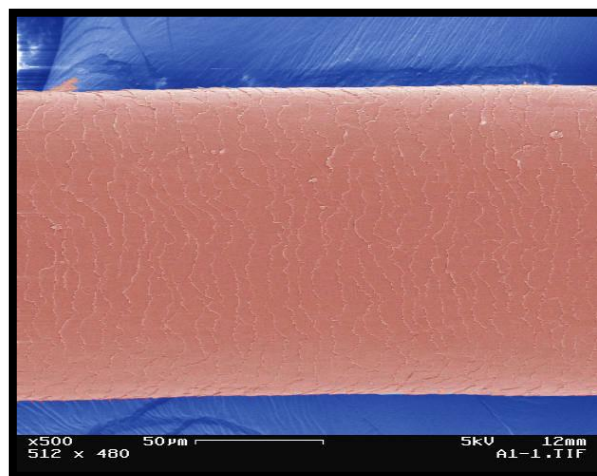
2.1.1.1. Budowa włosa

Włos można zdefiniować jako giętki, wydłużony, wrzecionowaty twór naskórka ssaków. W przekroju poprzecznym może mieć kształt owalny bądź okrągły. W miejscu zawiązywania się włosa komórki intensywnie dzielą się i rosną, formując czop wrastający w mezenchymę. W rezultacie powstaje cylindryczne pasmo rosnące ukośnie w stosunku do powierzchni skóry. Włos składa się z łodygi (*scapus pili*) wyrastającej na powierzchnię skóry i korzenia osadzonego w skórze (Rycina 1). Korzeń rozszerza się kształtując cebulkę (*bulbus pili*), zwaną również opuszką. Tkanka łączna wrasta w podstawę zawiązka tworząc silnie unaczynioną brodawkę włosa (*papilla pili*). Do włókna przyczepia się mięsień przywłosowy (*arector pili*) unoszący włos przy skurczu. Komórki cebulki podlegają podziałom i stanowią podstawowy materiał, z którego powstaje włos, czyli tzw. macierz (*matrix pili*). Z komórek macierzy powstaje stożek, który stopniowo rogowaciejąc i wydłużając się w nitkowaty korzeń (*radix pili*) toruje sobie drogę wzdłuż osi pierwotnego pasma nabłonkowego i tworzy w nim kanał. Ściany kanału stanowią pochewkę włosa, określaną jako mieszek (*folliculus pili*) wewnętrzny nabłonkowy, a tkanka łączna usytuowana dookoła niego to mieszek zewnętrzny. Przy wyrwaniu włosa mieszek nie odrywa się i przylega do włosa w postaci podłużnego białego woreczka. Morfologicznie strukturę włosa tworzą powłoczka (*cuticula*), kora (*cortex*) oraz rdzeń (*medulla*). Powłoczka to półprzezroczysta zewnętrzna warstwa włókna włosowego, którą budują łuski okrywowe, skierowane dachówkowato od końca proksymalnego (od strony korzenia) do dystalnego włosa (Rycina 2). Podłużne i wrzecionowate komórki tworzą trzon włosa, czyli jego korę (Rycina 3). Może ona zawierać skupiska pigmentowe lub przestrzenie powietrzne (Bochenek, Reicher, 2008).



RYCINA 1. Schemat przekroju poprzecznego przez skórę

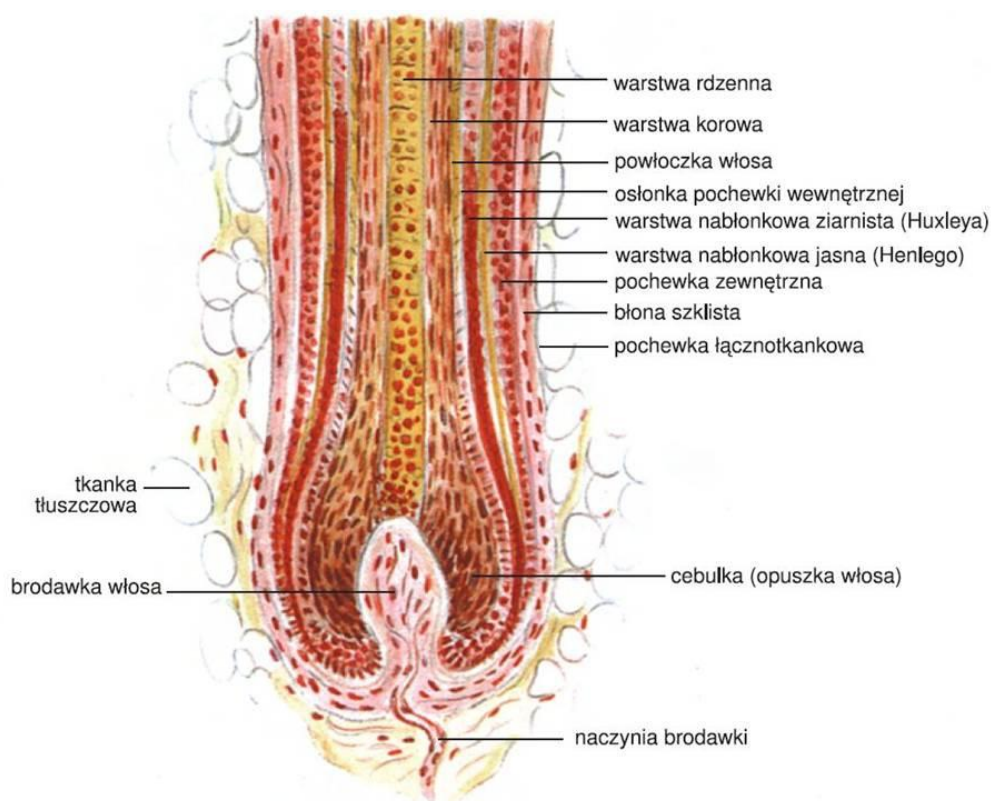
Źródło: na podstawie <http://www.sciencekids.co.nz>, data wejścia: 24.05.2012



RYCINA 2. Mikroskopowe zdjęcie włosa

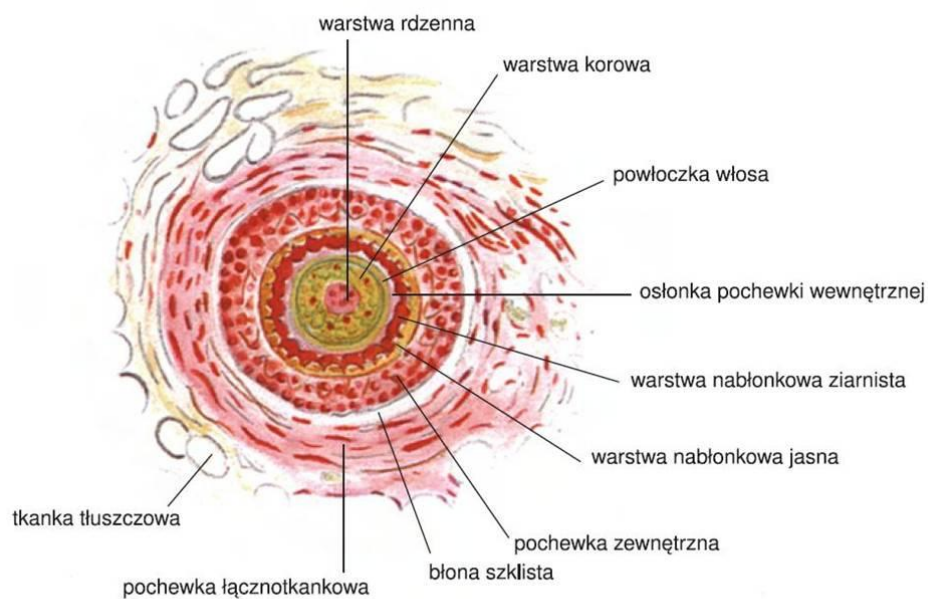
Źródło: <http://www.optics.rochester.edu>, data wejścia: 24.05.2012

Kutikula stanowi warstwę ochronną zbudowaną w głównej mierze z bogatych w siarkę białek (Harkey, 1993). Komórki korowe w wewnętrznej strukturze pasma włosowego zawierają szereg związków chemicznych, w tym melaninę – podstawowy barwnik włosów. Kolor włosów zależy od ilości, rozmieszczenia i rodzaju obecnego barwnika. Rdzeń – najbardziej wewnętrzna część osi włosa – zbudowany jest ze szkieletu gąbczastej keratyny i przestrzeni powietrznych (Rycina 4). Pęcherzyki gazu sprawiają wrażenie, że włos jest siwy lub biały. We włosie ludzkim rdzeń może być nieciągły a nawet nieobecny. Mieszki włosowe u człowieka osadzone są w nabłonku naskórka. Tylko na samej głowie jest ich około 80-100 tysięcy (Forslind, 1990; Cooper, 2011).



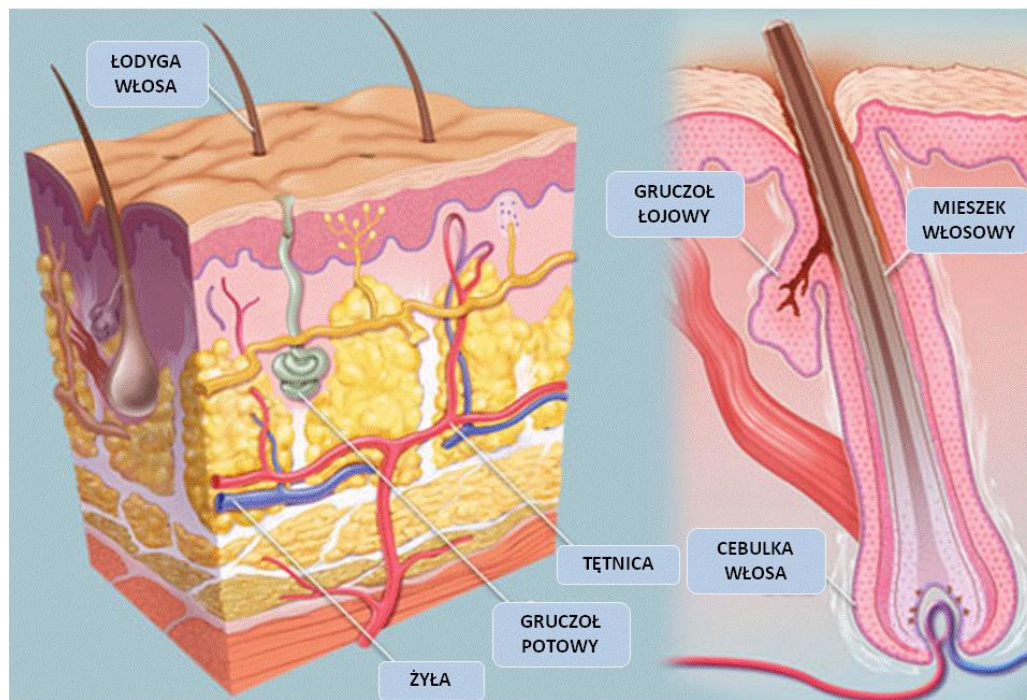
RYCINA 3. Schemat przekroju podłużnego włosa

Źródło: Bochenek, Reicher, 2008



RYCINA 4. Schematu przekroju poprzecznego włosa

Źródło: Bochenek, Reicher, 2008



RYCINA 5. Schemat budowy mieszka włosowego i otaczających go struktur

Źródło: na podstawie <http://img.webmd.com>, data wejścia: 24.05.2012

Gruczoły łojowe holokrynowe i potowe apokrynowe wydzielają substancje bezpośrednio do mieszka włosowego, podczas gdy gruczoły potowe epokrynowe wydzielają w pobliżu ujścia mieszka (Montagna, Van Scott, 1958). Gruczoły łojowe oraz gruczoły ekrynowe są zlokalizowane na niemal całej powierzchni ciała, natomiast apokrynowe znajdują się pod pachami, w okolicy krocza i odbytu (Rycina 5).

2.1.1.2. Rozwój owłosienia

W 3 miesiącu życia płodowego zaczynają zawiązywać się pierwsze włoski na dolnej i górnej wardze oraz na łukach brwiowych. Na przełomie 3 i 4 miesiąca pojawiają się również na głowie. W ciągu kolejnych 3 miesięcy niemal całe ciało płodu pokrywa się delikatnym meszkiem włosowym – *lanugo*. W 6 miesiącu korzenie włosów wzrastając na długość przenikają do naskórka, a następnie pojawiają się na powierzchni skóry tworząc łodygę włosa (Bochenek, Reicher, 2008). Pod koniec życia wewnątrzmacicznego, około 8-9 miesiąca ciąży meszek zanika (za wyjątkiem włosów na głowie, brwi i rzęs) a na jego miejscu pojawia się meszek stały (*vellus*).

Na ludzkim ciele występują 3 podstawowe typy włosów. Włosy pierwotne to cienkie, krótkie niewybarwione włoski umiejscowione na powiekach, czole a także na ciele dzieci i dorosłych. Włosy ostateczne są grubsze, długie i wybarwione, o dużej powierzchni przekroju poprzecznego. Znajdują się one na skórze głowy, brodzie, brwiach, pod pachami i okolicach łonowych. Poza tym na kończynach górnych i dolnych może się pojawić się typ przejściowy włosa, który posiada cechy zarówno włosów pierwotnych, jak i ostatecznych. Włosy pierwotne są wytwarzane przez mieszki niezależne od hormonów płciowych i których aktywność nie podlega zmianom po okresie dojrzewania. Mieszki włosów pośrednich i ostatecznych są uzależnione od wpływu hormonów i zmieniają się po okresie dojrzewania, na przykład w okolicach krocza, pach i na skroniach (Cooper, 2011). Pod względem miejsca występowania, długości, kształtu i koloru można szczególnie wyróżnić włosy głowy, brody, łonowe, rzęsy i brwi. Włosy głowy nie wyrastają prostopadle do powierzchni skóry, lecz ukośnie. W konsekwencji układają się w charakterystyczne pasma, strumienie (*flumina*) i wiry (*vortices*) (Rycina 6) (Bochenek, Reicher, 2008).

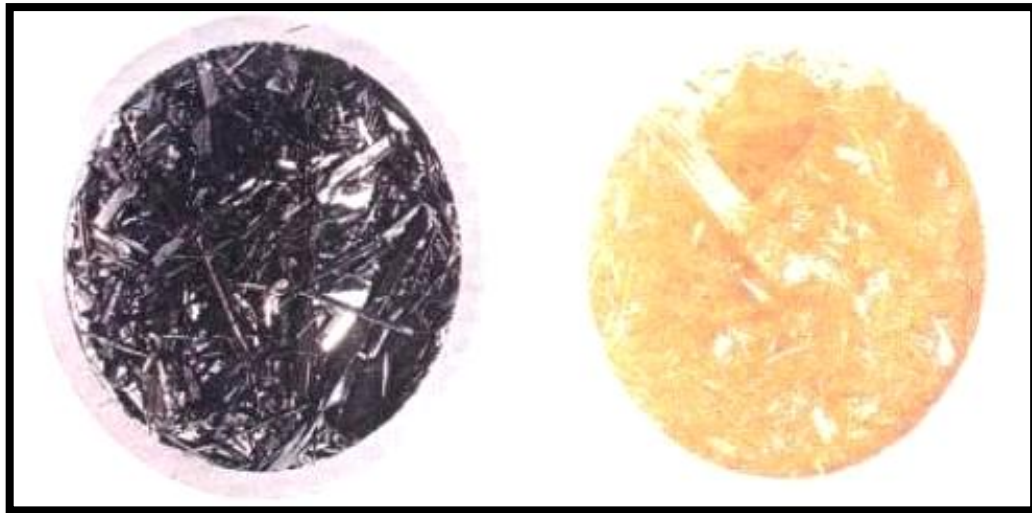


RYCINA 6. Wiry włosów na głowie

Źródło: <http://dermimages.med.jhmi.edu>, data wejścia: 24.05.2012

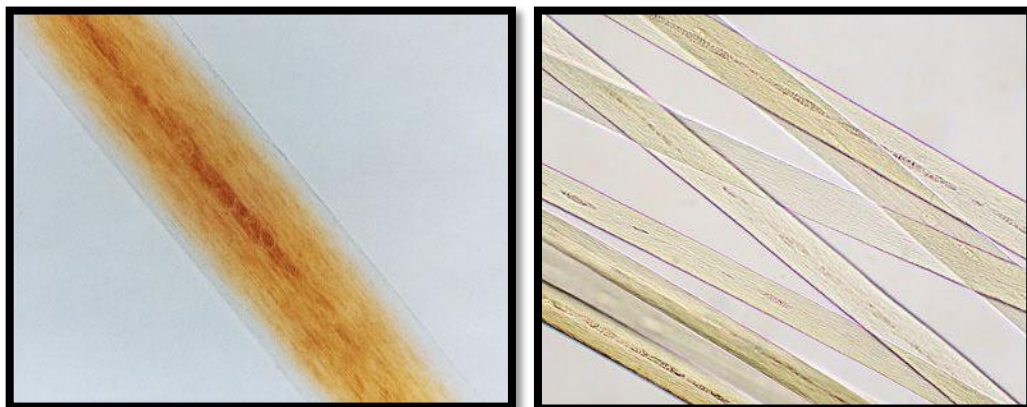
2.1.1.3. Barwa włosów

Kolor włosów jest uzależniony od obecności barwnika – melaniny. Jest on wytwarzany przez komórki pigmentowe (melanocyty, melanofory) podczas procesu melanogenezy. Za barwę włosa odpowiedzialne są dwie odmiany melaniny – eumelanina oraz feomelanina (Rycina 7). Pierwsza z nich nadaje odcień czarno-brązowy, natomiast druga – czerwony. Silna koncentracja eumelaniny daje włosy brązowe lub czarne. Włosy koloru blond zawierają nieliczne skupiska melaniny wyłącznie w warstwie korowej. Rude włosy charakteryzują się najwyższą zawartością feomelaniny (Rycina 8). Zjawisko siwienia jest związane z zanikiem aktywności melanoblastów macierzy, zaś obecność pęcherzyków gazu między komórkami *matrix* sprawia, że włosy mają kolor biały (Bochenek, Reicher, 2008).



RYCINA 7. Naturalne barwniki włosa – po lewej eumelanina, po prawej feomelanina

Źródło: <http://www.naturalhaircolor.com>, data wejścia: 24.05.2012



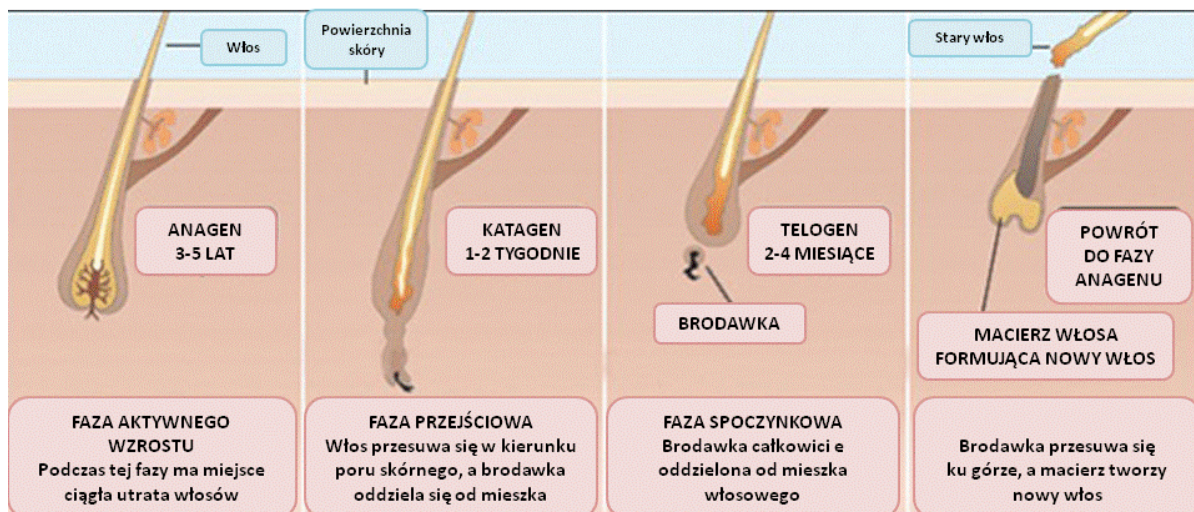
RYCINA 8. Barwy włosów: po lewej rudy włos, po prawej blond włos

Źródło: <http://www.sciencephoto.com>, data wejścia: 24.05.2012

2.1.1.4. Cykl włosowy

Włosy są zbudowane z martwych, zrogowaciałych (skeratynizowanych) komórek, w których po okresie wykształcenia nie zachodzą procesy fizjologiczne. Podlegają one jednak licznym przemianom podczas cyklu włosowego, czyli począwszy od fazy wzrostu do samoistnego wypadnięcia i reaktywacji ze stanu spoczynkowego. W mieszkach włosowych zachodzą kolejno 3 fazy. W pierwszej – anagenie – zachodzi aktywny wzrost. Katagen to

druga faza tzw. inwolucji, czyli zanikowa. Trzecia natomiast określana jest jako spoczynkowa i nosi nazwę telogenu (Rycina 9). Cykl włosowy powtarza się wielokrotnie w ciągu życia (Bochenek, Reicher, 2008).

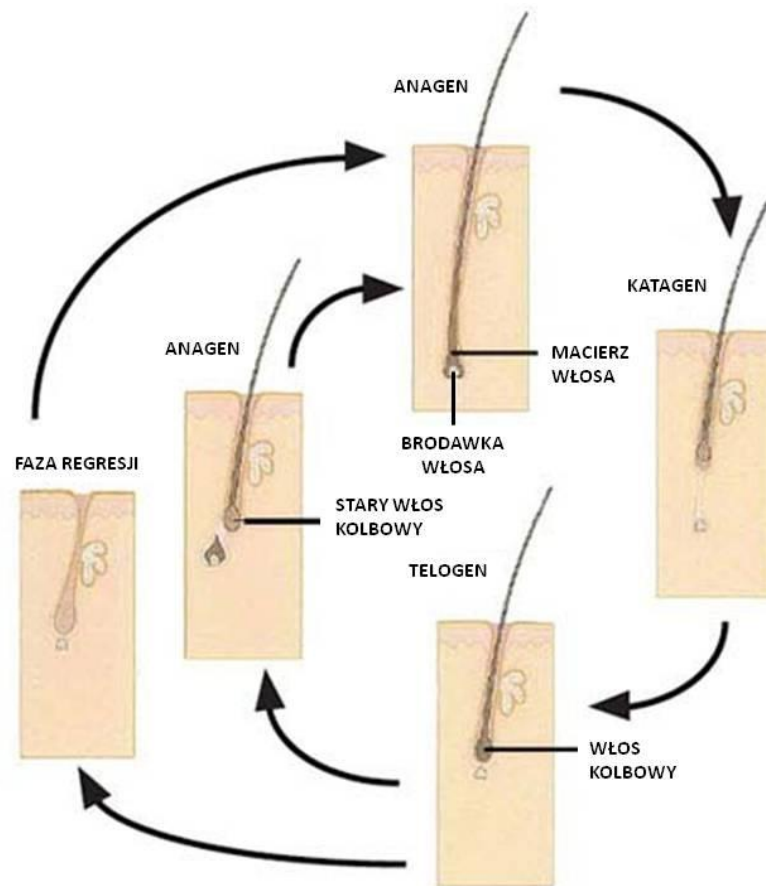


RYCINA 9. Fazy wzrostu włosa

Źródło: na podstawie <http://thelaserhairremovalguide.com>, data wejścia: 24.05.2012

Średnio 85% włosów na głowie znajduje się w fazie anagenu, co związane jest ze wzmożoną aktywnością metaboliczną, podziałami komórkowymi i wzrostem (Cooper, 2011). To normalne zjawisko może zostać zaburzone przez stany chorobowe, niedożywienie, a nawet niektóre leki. Jednym z przykładów takiej zmiany jest okres ciąży. Podczas drugiego i trzeciego trymestru ilość włosów na głowie w fazie anagenu wzrasta do 90%. W ciągu 3 miesięcy po porodzie odsetek ten powoli normuje się, ale jest to także związane z fizjologiczną utratą włosów (Harkey, 1993). Po tym etapie czynność mitotyczna ustaje, pasmo włosa zostaje w pełni skeratynizowane, a cebulka ulega degeneracji. Tę fazę określa się jako katagen, który stanowi okres przejściowy o długości trwania uzależnionej od rodzaju włosa (Cooper, 2011). Dochodzi do oddzielenia brodawki włosa oraz inwolucji pochewki naskórkowej włosa, która przekształca się w woreczek epitelialny obejmujący korzeń włosa. Wytworzenie się włosa w pełni rozpoczyna fazę telogenu, w której nie obserwuje się wzrostu włosów, a jej długość zależy od typu włosa i wydłuża się wraz z wiekiem. Na koniec telogenu następuje wykształcenie nowej macierzy włosa i sprzężenie jej z nową brodawką (Rycina 10). Powstaje nowy włos, mocno osadzony w mieszkach (Bochenek, Reicher, 2008). Za średnie

tempo wzrostu włosów na głowie przyjmuje się 1 cm na miesiąc (Society of Hair Testing, 2004). Należy mieć na uwadze, że włosy przycięte przy skórze głowy nie reprezentują niedawnego wzrostu włosów – szacuje się, że musi minąć od 7-10 dni zanim wzrastający włos osiągnie powierzchnię skóry (Cooper, 2011).



RYCINA 10. Fazy wzrostu włosów

Źródło: na podstawie <http://2.bp.blogspot.com>, data wejścia: 24.05.2012

2.1.1.5. Unaczynienie i unerwienie włosa

W dolnym odcinku mieszka włosowego znajduje się gęsta, silnie rozwinięta sieć włosniczek (Rycina 11). Są one najbardziej rozwinięte w fazie anagenu. Poniżej przewodu gruczołu łojowego mieszek oplata siatka okrężnie i podłużnie przebiegających włókien nerwowych obwodowego układu autonomicznego (Bochenek, Reicher, 2008).



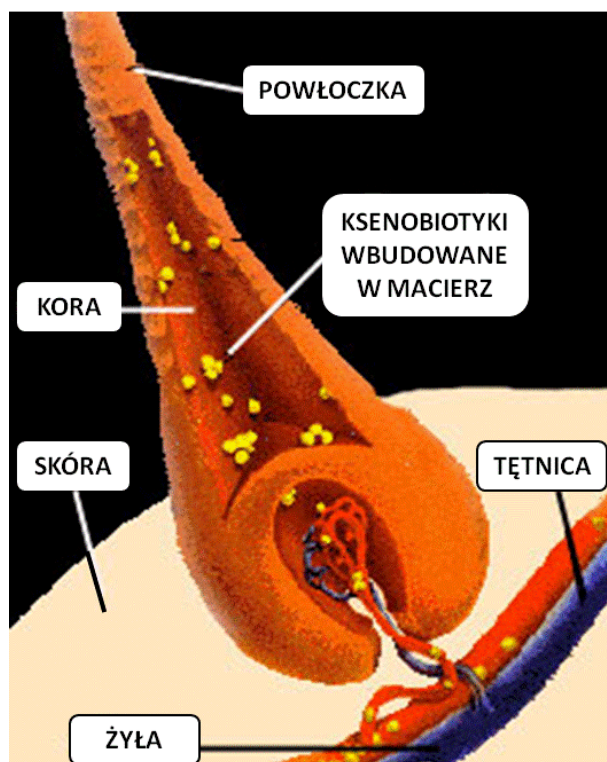
RYCINA 11. Unaczynienie włosa

Źródło: <http://www.surviving-hairloss.com>, data wejścia: 24.05.2012

2.1.2. Dystrybucja i inkorporacja ksenobiotyków we włosie

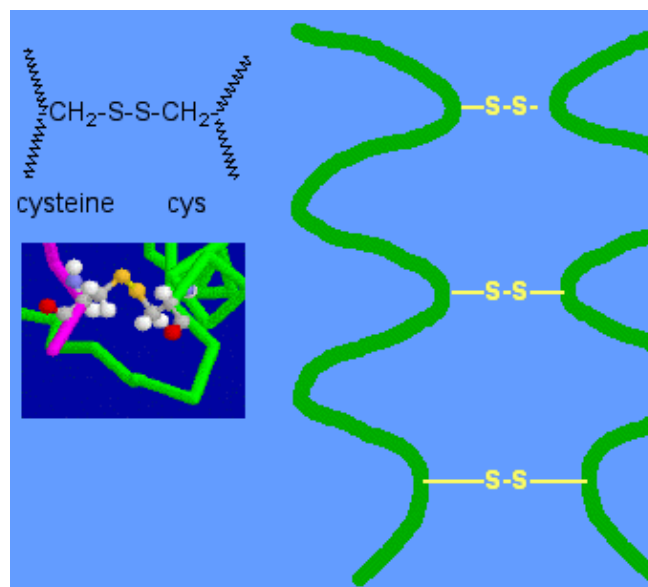
Nieprzeciętnie długi okres obecności ksenobiotyków we włosach, a co za tym idzie możliwość wykrycia substancji nawet po wielu miesiącach od ekspozycji sprawia, że analiza włosa stała się atrakcyjnym narzędziem oceny narażenia. Jej zasadność jest definiowana poprzez określenie parametrów takich jak dawka, czas ekspozycji, tempo metabolizmu i wydalania z ustroju, a także czułość i specyficzność metody (Cone, 1996). Zrozumienie podstawowych mechanizmów chemicznych i farmakologicznych pojawiania się ksenobiotyku i jego metabolitów w strukturze włosa jest konieczne do wykorzystania analizy włosów w praktyce (Baumgartner et al., 1989). Leki i pierwiastki wbudowują się w strukturę włosa. Jednakże mimo wielu lat badań nie w pełni wyjaśniono mechanizm inkorporacji związków chemicznych w macierz włosa. Za podstawową drogę uznaje się bierną dyfuzję substancji z krwi do szybko rosnących komórek mieszka włosowego (Rycina 12). W miarę, jak komórki te obumierają i łączą się formując pasmo włosa związki wbudowują się w tę niezwykle stabilną matrycę. Teoria ta wydaje się być słuszna i zasadna, gdyż podstawa mieszka jest

silnie unaczyniona. Niektóre ksenobiotyki wiążą się z macierzą w większym stopniu ze względu na powinowactwo do składników wewnątrzkomórkowych, takich jak barwnik – melanina (Slawson et al., 1998). Niektórzy naukowcy polemizują na temat istotności tego czynnika, argumentując swoje stanowisko faktem inkorporacji substancji we włosy albinosów, pozbawionych melaniny (Ishiyama et al., 1983). Ponadto zaledwie niewielka część wbudowanego we włos związku jest wyodrębniana z frakcji melaninowej. Innym proponowanym mechanizmem wzmagającym inkorporację może być tworzenie przez ksenobiotyki z grupą sulfhydrylową mostków siarczkowych z aminokwasami siarkowymi (takimi jak cysteina) keratyny budującej macierz włosa (Rycina 13) (Henderson, 1993).



RYCINA 12. Inkorporacja ksenobiotyków w macierz włosów

Źródło: na podstawie <http://www.athomedrugtests.org>, data wejścia: 24.05.2012



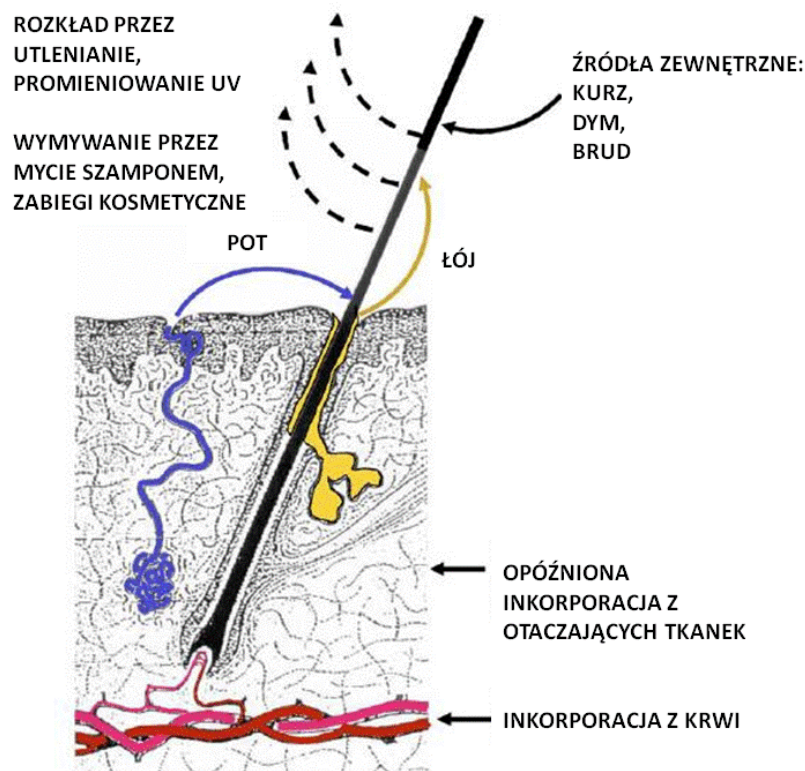
RYCINA 13. Mostki disiarczkowe stabilizujące i uelastyczniające strukturę włosa

Źródło: <http://www.elmhurst.edu>, data wejścia: 24.05.2012

Zjawisko przenikania substancji do komórek włosa z krwi i stopniowe zabudowywanie jej w komórkach ulegających keratynizacji jest podstawą naukową stosowania analizy segmentowej włosa, w której kolejne odcinki włosa są analizowane pod kątem określenia czasu ekspozycji na daną substancję. Ponieważ przyjmuje się, że włosy rosną ze stałą szybkością lokalizacja ksenobiotyku w paśmie włosa odpowiada momentowi jego obecności we krwi w przeszłości. W prostym modelu dyfuzji ksenobiotyku z krwi do włosa zawartość substancji byłaby proporcjonalna do jej stężenia we krwi, a zatem także od przyjętej dawki. Badania i zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych wykazały jednak, że taka teoria stanowi zbyt uproszczenie. Brak wyraźnej zależności dawka – stężenie we włosie przypisuje się różnym czynnikom, wśród których wymienia się: odmienne metodyki oznaczeń poszczególnych laboratoriów, zanieczyszczenia ze środowiska zewnętrznego lub korzystanie z zabiegów kosmetycznych na włosach. Niemniej jednak część badań doświadczalnych dostarczyła dowodów na istnienie korelacji dawka – stężenie dla licznych leków i narkotyków (Baumgartner et al., 1979; Nakahara et al., 1992).

Ważnym aspektem zasługującym na uwagę w analizie włosa jest określenie stosunku zawartości substancji przyjętej do jej metabolitu. Wielu badaczy podważa zasadność idei korelacji dawki i stężenia ksenobiotyku właśnie ze względu na ustalenie wysokiej wartości takiej proporcji. Związki charakteryzujące się krótkim biologicznym okresem półtrwania

(w osoczu) są oznaczane we włosach w stężeniach nawet 10-krotnie wyższych niż ich metabolity (Kidwell, 1993). Powierzchnia włosów i mieszkki włosowe są stale omywane przez pot i łój (Harkey, 1993). Włosy wykazują zróżnicowane powinowactwo do zdolności wiążącej w stosunku do poszczególnych związków, a mechanizm wiązania może być wyjątkowy dla wybranej substancji (Kikura et al., 1997; Nakahara, Kikura, 1996). Z powyższych względów zaproponowano bardziej złożony model wbudowywania związków we włosy. Zakłada on, że związki przenikają do struktury włosa z krwi podczas jego tworzenia, z łaju i potu po zakończeniu tego procesu oraz z otaczającego środowiska (np. z zanieczyszczeń), po tym jak łodyga włosa pojawi się na powierzchni skóry (Rycina 14). Podczas fazy wzrostowej – anagenu – aktywność metaboliczna i podziały komórkowe nasilają się. To właśnie w tym okresie ksenobiotyki, w tym leki i pierwiastki śladowe są prawdopodobnie wbudowywane w strukturę włosów (Cooper, 2011). Dodatkowo niektóre związki mogą być transportowane z różnych kompartmentów organizmu i puli tkankowych. Inkorporacja we włosy zachodzi w tym wypadku, jednakże już po aktywnym ich wzroście, stąd ksenobiotyki są słabiej związane i w dużym stopniu ulegają wypłukaniu podczas procesu mycia włosów na etapie przygotowania próbek do analizy. Przenikanie substancji obcych ze środowiska jest istotnym czynnikiem w przypadku związków lotnych, używek i narkotyków, które są palone i przedostają się do ustroju drogą inhalacyjną (np. nikotyna, marihuana, heroina), a także pierwiastków, zwłaszcza metali ciężkich (Haley, Hoffmann, 1985). Kolejną potencjalną drogę stanowi przenikanie ksenobiotyków ze skóry. Szczególnie substancje lipofilowe, dobrze rozpuszczalne w tłuszczach mogą być zatrzymywane w warstwach skóry i dopiero później transportowane do macierzy włosa (Schaefer et al., 1982).



RYCINA 14. Możliwe drogi inkorporacji i eliminacji ksenobiotyków z włosa

Źródło: na podstawie Pragst, Balikova, 2006

Stabilność i związanie substancji obcej w macierzy włosa zapewniają najprawdopodobniej trzy komponenty matrycy – białka, lipidy oraz melanina (Cone, 1996). Uematsu i współpracownicy zbadali, że wbudowywanie ofloksacyny jest ściśle powiązane z obecnością melaniny (Uematsu et al., 1992). Z kolei zespół badaczy pod kierunkiem Harrisona dowiódł, że pochodne L-DOPA związanej we włosach znajdowały się zarówno we frakcjach melaninowych, jak i bezmelaninowych (Harrison et al., 1974). Badaczy interesowała również zasada przyłączania związków chemicznych do melaniny. Larsson i Tjalve stwierdzili na przykładzie badania chlorpromazyny i chlorochiny, iż to siły elektrostatyczne oraz siły van der Waalsa są istotne w tym procesie (Larsson, Tjalve, 1979). Ustalili oni, że formy kationowe leków były przyciągane przez miejsca anionowe melaniny, a więc na drodze mechanizmu wymiany jonowej. Drugorzędną rolę odgrywały siły van der Waalsa, które są odpowiedzialne za oddziaływanie struktur aromatycznych leków z indolowym centrum melaniny. Prawdopodobnym jest również to, że białka matrycy

włosów posiadają specyficzne grupy, które umożliwiają wiązanie ksenobiotyków za pomocą sił elektrostatycznych i van der Waalsa, podobnie jak ma to miejsce w przypadku melaniny. Su i współpracownicy doszli do wniosku, że radioaktywnie znakowana kokaina wiąże się do włosów w sposób wysoce selektywny i stereospecyficzny, a także zależny od stopnia pigmentacji włosa (Joseph et al., 1996). Czynniki wpływającymi na wbudowywanie ksenobiotyków we włosy są pK_a , molekule substancji niezwiązane z białkami, ich wielkość, lipofilność, budowa i powinowactwo do melaniny (Joseph et al., 1996; Knörle et al., 1998). Naukowcy udowodnili, że związki o charakterze zasadowym wbudowują się we włosy w większym stopniu niż obojętne lub kwasowe. Również to związki zasadowe charakteryzują większe powinowactwo do melaniny (Cooper, 2011).

2.1.3. Analiza włosa

Istnieje wiele różnych definicji i znaczeń określenia „analiza włosa”. Popularna obecnie komercyjna jej odmiana, dostępna również przez Internet, ogranicza się do pomiarów stężeń mikroelementów, które rzekomo odzwierciedlają stan zdrowia klienta. Fryzjerzy rozumieją analizę włosa jako określenie kondycji włosów pod kątem dobrania fryzury i odpowiednich zabiegów kosmetycznych. Naukowcy, w tym toksykolodzy, wykorzystując technikę analizy włosa jako narzędzie retrospektywne potrafią ocenić minione narażenie na ksenobiotyki, takie jak leki czy używki i narkotyki (Pragst, 2004). Akredytowane laboratoria diagnostyczne oferują taką analizę jako procedurę skriningową pracowników (najczęściej dużych korporacji) w celu wykluczenia uzależnienia od środków psychoaktywnych i alkoholu. Naukowe podejście do tematu analizy włosa możliwe jest po zapoznaniu się z budową i fizjologią włosa oraz mechanizmami wbudowywania ksenobiotyków w jego strukturę.

2.1.3.1. Historia

Pierwszy przypadek oznaczenia trucizny we włosie został opublikowany w roku 1858 w „Praktycznym przewodniku do medycyny sądowej” pod redakcją Caspera (Rycina 15) (Casper, 1858). Opisano w nim wykrycie arsenu we włosach pobranych z ciała ekshumowanego po 11 latach.



RYCINA 15. Po lewej – Johann Ludwig Casper (1787-1853) – profesor medycyny sądowej w Berlinie, uważany za jednego z twórców nowoczesnej medycyny sądowej; po prawej – podręcznik "Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin" pod redakcją J.L. Caspera

Źródło: <http://www.kryminalistyka.fr.pl>, data wejścia: 29.05.2012

Dopiero niemal sto lat później, w roku 1954 Goldblum oznaczył amfetaminę we włosach świnki morskiej. Ale to dopiero publikacja zespołu Baumgartner i współpracowników zmieniła sposób postrzegania tej techniki analitycznej (Baumgartner et al., 1979). Wyekstrahowali oni opiaty z włosów i oznaczyli za pomocą metody radioimmunologicznej. Był to początek historii, która przez część świata naukowego była gloryfikowana, a przez innych potępiana. W roku 1980 Klug dodatkowo zweryfikował w swoich badaniach skuteczność analizy włosa, potwierdzając wyniki radioimmunologiczne techniką chromatograficzną. Koncepcja procedury była dość prosta – włosy należy rozetrzeć z formy stałej do roztworu, czyli próbki ciekłej i oznaczyć w niej substancje, tak jak w próbce moczu lub krwi. Wówczas nie podejrzewano, że w tak przygotowanej matrycy włosów można znaleźć inne niż w moczu czy krwi związki. Taki tok myślenia dominował do końca lat 1980., kiedy to udało się wykryć we włosach kokainę i benzoilokgoninę, a w badaniu ilościowym stężenie kokainy było wyższe niż metabolitu. Pierwsza analiza włosów pod kątem obecności kokainy została wykonana przez Valente w 1980 roku (Valente et al., 1981). Oznaczenie przeprowadził przy użyciu metody radioimmunologicznej po

uprzedniej optymalizacji metody ekstrakcji w celu obniżenia granicy oznaczalności. Jego zasługą było porównanie efektów po użyciu środków kwasowych, zasadowych oraz wody, metanolu i buforu. Innym autorom udało się ponadto przeprowadzić analizy fenobarbitalu, metakwalonu czy barbituranów (Smith, Pomposini, 1981; Arnold, Püschel, 1983).

Środowisko naukowe podchodziło jednakże sceptycznie do analizy włosa jako uznanego narzędzia pomiarowego. Dopiero rozwój technik analitycznych, a zwłaszcza chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, umożliwił selektywne i czułe wykrywanie substancji stosunkowo niskim kosztem. Od tego momentu liczba publikacji na temat analizy włosa i oznaczanych związków gwałtownie wzrosła. Pojawiły się również konstruktywne opinie krytyczne i opisy walidacji. Prace dotyczyły prawidłowego przygotowania próbek, technik ekstrakcyjnych, mechanizmów wnikania ksenobiotyków w strukturę włosa. Historię analizy włosa można podsumować jako ewolucję technik ekstrakcyjnych, ponieważ gdy substancja zostanie wyekstrahowana można poddać ją dalszym procedurom jak w przypadku wyodrębnienia z krwi czy moczu. Celem udoskonalenia metody było uzyskanie próbki ciekłej, całkowicie roztworzonej, a zarazem uniknięcie rozkładu i destabilizacji związku. Jednakże jeszcze w roku 1997 Sachs twierdził, że oznaczanie benzodiazepin w tej matrycy nastęrcza sporo trudności. Flunitrazepam udało się wykryć we włosach dopiero w roku 1996 (Sachs, 1997).

The Society of Hair Testing (SoHT) jest jedną z kilkunastu organizacji zajmujących się analizą włosów. Towarzystwo założone w 1995 roku ustala wytyczne w zakresie dobrej praktyki laboratoryjnej dotyczące pobierania włosów, ich przechowywania, przygotowania prób, obróbki wstępnej i samej analizy. Istniejące już standardy europejskie odnoszące się do badań włosów w miejscu pracy, ISO/IEC 17025:2005 oraz ILAC-G19, a także opublikowane wskazówki Towarzystwa Chemii Toksykologicznej i Sądowej (Society of Toxicological and Forensic Chemistry) zostały przyjęte przez Zarząd Towarzystwa SoHT na dorocznym spotkaniu w 2011 roku. Technika ta została uznana jako badanie komplementarne do metod tradycyjnych, zarówno w toksykologii klinicznej, jak i sądowej. Jego niewątpliwą przewagą jest zdolność dostarczenia informacji na temat profilu minionej ekspozycji pacjenta na wybrane ksenobiotyki, w tym leki. Zastosowanie analizy włosa upowszechniło się w dochodzeniach kryminalnych (zgony i przestępstwa związane z nadużyciem substancji chemicznych, ochrona nieletnich), w monitorowaniu zażywania leków i używek (programy odwykowe, kliniczne, epidemiologia, abstynencja w miejscu pracy, wydawanie prawa jazdy). Włos stanowi mocną, stabilną matrycę alternatywną, na którą w mniejszym stopniu niż na

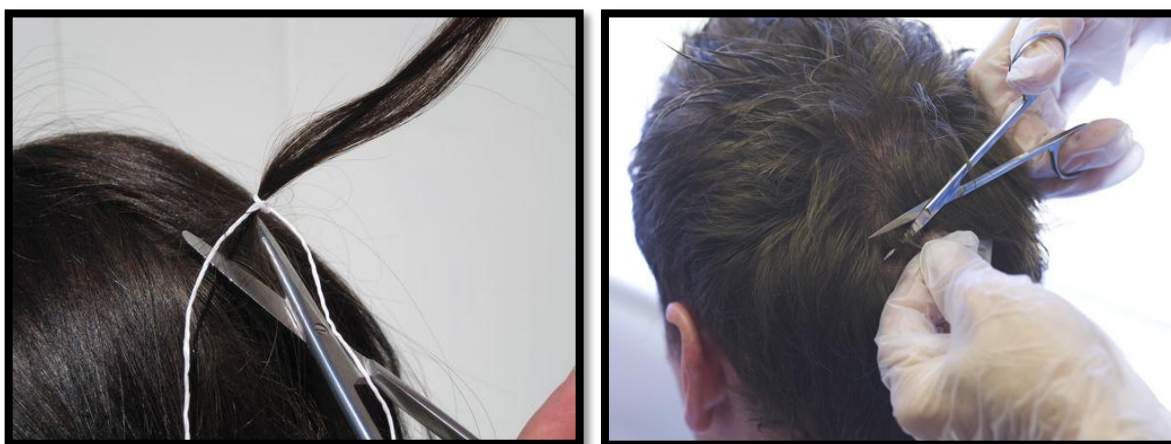
krw i mocz wpływają środki zafałszowujące i krótkotrwała abstinencja i dzięki której możliwe jest potwierdzenie długotrwałego narażenia (wielotygodniowego, wielomiesięcznego) (Cooper et al., 2012).

2.1.3.2. Zastosowanie analizy włosa

- Zgony związane z użyciem substancji chemicznych
Pośmiertnie wykrycie leków i narkotyków we krwi dostarcza informacji na temat ich krótkotrwałego przyjmowania przed zgonem, podczas gdy analiza włosa może stanowić niezastąpione źródło informacji na temat historii zażywania substancji w ciągu miesięcy poprzedzających śmierć. Dzięki tej technice można ustalić przyczynę zgonu, potwierdzić abstinencję i brak tolerancji na dany czynnik toksyczny, stwierdzić zatrucie ostre nawet w przypadku zaawansowanego rozkładu zwłok (Cooper et al., 2012).
- Przepęstwa z wykorzystaniem substancji chemicznych
Środki najczęściej podawane ofiarom przępstw mają działanie sedatywne i amnestyczne – takie jak benzodiazepiny. Wiąże się to z późnym zgłaszaniem przępstwa na policję, co wyklucza pobranie tradycyjnych materiałów – krwi i moczu. Włosy umożliwiają identyfikację wiele miesięcy po zajściu. Sytuacja taka wymaga jednak wyspecjalizowanych metod i sprzętu, zdolnych wykryć substancję podaną w pojedynczej dawce, na poziomie pg/mg włosów (Cooper et al., 2012).
- Ochrona nieletnich
Analiza włosa umożliwia ewaluację długotrwałej ekspozycji noworodków i dzieci. Włosy i smółka pobrane od noworodka potwierdzają narażenie w przypadku dzieci kobiet, które w czasie ciąży nadużywały leków, narkotyków i alkoholu. Niemowlęta karmione piersią przez kobiety stosujące leki przenikające do mleka również mogą być narażone na ich negatywne oddziaływanie. Dzieci rodzą się z włoskami różnej długości i gęstości, niektóre tracą je krótko po narodzinach. U pozostałych jednak możliwe jest oznaczanie substancji w dystalnym odcinku łodygi włosa, który odpowiada części wykształconej w czasie życia płodowego. Uśredniony współczynnik wzrostu włosów stosowany u dorosłych nie może być przyjęty u dzieci, u których szybkość wzrostu włosów jest zróżnicowana, a co za tym idzie - utrudniona jest u nich walidowana analiza segmentowa (Cooper et al., 2012).

2.1.3.3. Zebranie próbek włosów

Pobieranie włosów jest nieinwazyjne i nie powoduje takiego skrupowania jak oddawanie próbki moczu. Zebrane włosy nie muszą być zamrażane i można je przechowywać przez nieograniczony czas. Pasma włosów ucinają się z okolic wierzchołka głowy, możliwie najbliżej skóry, jako że włosy wykazują w tym miejscu najmniejsze zróżnicowanie fazy wzrostu. Na potrzeby badań komercyjnych należy ścinać lok grubości ołówka, w celu zabezpieczenia odpowiedniej ilości materiału na wykonanie potrzebnych testów lub powtórnej analizę w innym laboratorium. W przypadku osób, które obawiają się, że pobranie jednej dużej próbki pozostawi pusty skrawek skóry – np. małe dzieci, osoby łysiejące – możliwe jest pobranie mniejszych próbek z kilku miejsc koncentrujących się w pobliżu wierzchołka głowy. Włosy z głowy są próbką preferowaną, jednakże jeśli ich zebranie jest niemożliwe należy rozważyć zebranie włosów spod pachy, łonowych bądź z brody. Pobranie włosów łonowych wymaga dodatkowo zgody naruszenia prywatności, a współczynniki wzrostu włosów z wymienionych obszarów ciała są odmienne od tych z głowy. Zabiegi kosmetyczne – zarówno pielęgnacji codziennej, jak i trwałej ondulacji, farbowania – mogą niszczyć jednolitą powierzchnię włosa i wpływać negatywnie na stężenie substancji w jego macierzy, stąd wszelkie agresywne procedury chemiczne stosowane na włosach powinny być brane pod uwagę podczas zbierania próbek lub interpretacji wyników analizy (Cooper et al., 2012).



RYCINA 16. Pobieranie próbek włosów

Źródło: po lewej - <http://www.icassp2006.org>; po prawej - <http://www.concateno.com>, data wejścia: 29.05.2012

Zalecenia proceduralne do pobrania próbki włosów:

1. przeprowadzane przez doświadczoną osobę w miejscu wolnym od zanieczyszczeń
2. przeprowadzane w rękawiczkach z użyciem zestawu do zbierania próbek wg załączonej instrukcji
3. zestaw powinien zawierać:
 - formularze
 - kopertę do zabezpieczenia materiału
 - torebkę/opakowanie zbiorcze
 - instrukcję pobrania materiału
4. włosy powinny być rozczesane, wyrównane, a miejsce przycięcia w pobliżu powierzchni skóry odpowiednio zabezpieczone (np. nitką, folią)
5. próbki powinny być przechowywane w suchym miejscu, bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej. Zamrażanie prób jest wręcz niewskazane, ze względu na niebezpieczeństwo degeneracji włosów (spulchnienie macierzy)
6. jeśli włosy były mokre w momencie ich ścinania, należy je osuszyć przed przechowywaniem.

Zalecenia proceduralne dotyczące śledztw kryminalnych i medycyny sądowej są rozszerzone.

W celu prawidłowego przeprowadzenia analizy włosa próbki muszą być starannie odmierzone (w przypadku analizy segmentowej, w której precyzyjnie określona długość pasma stanowi o prawidłowym określeniu czasu narażenia) i zważone (zarówno w analizie segmentowej i ogólnej – do ustalenia stężenia ksenobiotyku w próbce). Etapy ważenia i mierzenia włosów zostały zaprezentowane na rycinach 17 i 18.



RYCINA 17. Ważenie próbki włosów

Źródło: <http://www.psychemedics.com>, data wejścia: 04.06.2012



RYCINA 18. Przygotowanie próbki włosów matki do analizy segmentowej – mierzenie pasma włosów

Źródło: materiały własne

2.2. BENZODIAZEPINY

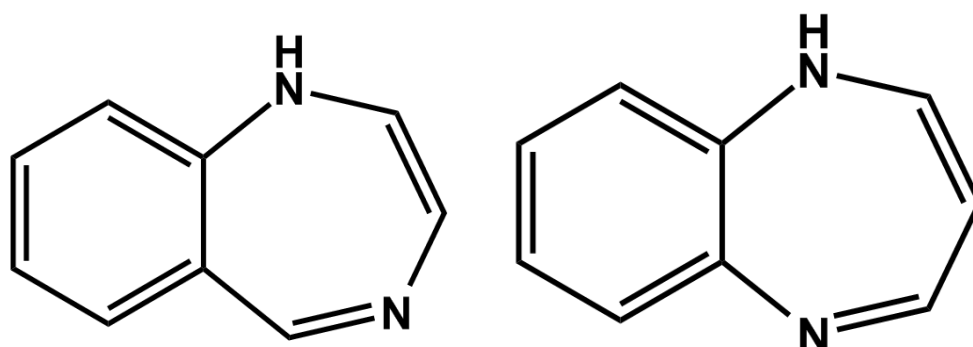
2.2.1. Historia

Syntezę benzodiazepin łączy się z nazwiskiem Leo Sternbacha, farmaceuty i chemika, zatrudnionego w jednostce badawczej firmy Hoffmann-La Roche w Nutley, w New Jersey, USA. We wczesnych latach 30. Sternbach jako student studiów podyplomowych na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie zsyntezował kilka związków (tzw. heptoksydiazyn) w celu uzyskania syntetycznych barwników. W 1954 r., zainspirowany niesamowitym sukcesem chlorpromazyny wznowił swoje badania nad tymi związkami pod kątem ich działania psychoaktywnego. Naukowiec doszedł wtedy do wniosku, że substancje te to tzw. benzoksadiazepiny i zsyntezował około 40 tego typu struktur. Mimo, iż wszystkie otrzymane związki były farmakologicznie nieaktywne, Sternbach postanowił ustabilizować jeden z nich metyloaminą – aminą pierwszorzędową (a nie jak w przypadku poprzednich nieudanych prób – drugo i trzeciorzędową aminą). Związek ten został oznakowany jako Ro 5-0690 i... odłożony na półkę. W 1957 r. odnaleziono go podczas porządków i poddano analizie farmakologicznej. Po badaniach, które wykazały właściwości anksjolityczne i miorelaksacyjne poprawnie zidentyfikowano go jako 1,4-benzodiazepinę. Związek opatentowano w roku 1958, natomiast do lecznictwa w 1960 roku wprowadził go pod nazwą handlową Librium koncern farmaceutyczny Hoffman-La Roche. Następnym lekiem z tej grupy był diazepam, który uzyskał nazwę handlową Valium. W latach 1969-1982 był to najczęściej przepisywany lek w Stanach Zjednoczonych. W ciągu kolejnych lat i dekad pojawiło się wiele nowych benzodiazepin (Baenninger et al, 2004; Ban, 2006, a; Ban, 2006, b).

2.2.2. Budowa

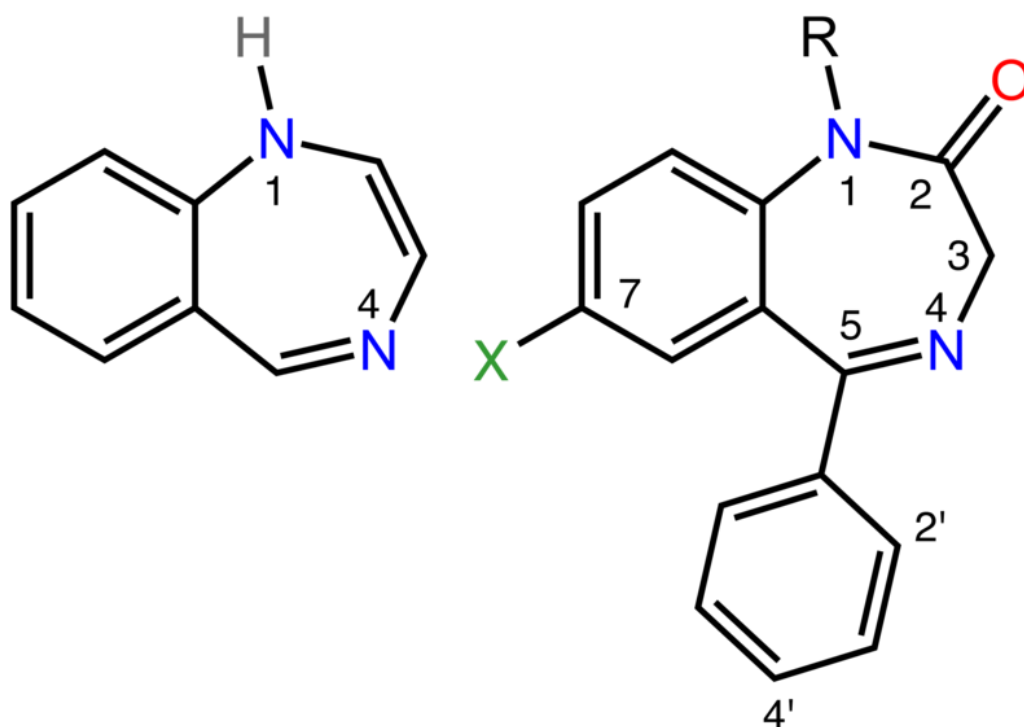
Pod względem chemicznym benzodiazepiny są pochodnymi (alkilowymi, triazolowymi, chlorowcowymi, fenyłowymi itp.) benzo-1,4-diazepiny. Podstawową strukturę chemiczną tworzy połączenie pierścienia benzenowego z siedmioczłonowym, heterocyklicznym pierścieniem diazepinowym (Feldman et al., 1997). Wyjątkiem jest klobazam, o strukturze benzo-1,5-diazepiny (Rycina 19, Rycina 20). Naśladują one

prawdopodobnie działanie naturalnie występujących związków w ośrodkowym układzie nerwowym, tzw. endozepin.



RYCINA 19. Po lewej – budowa strukturalna benzo-1,4-diazepiny; po prawej – budowa strukturalna benzo-1,5-diazepiny

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012

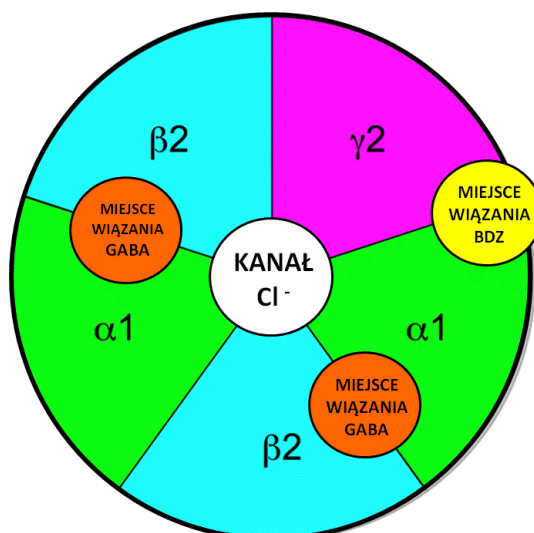


RYCINA 20. Schemat podstawowej budowy strukturalnej wielu popularnych preparatów benzodiazepinowych, takich jak np. diazepam (7-chloro-1-metylo podstawiony)

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012

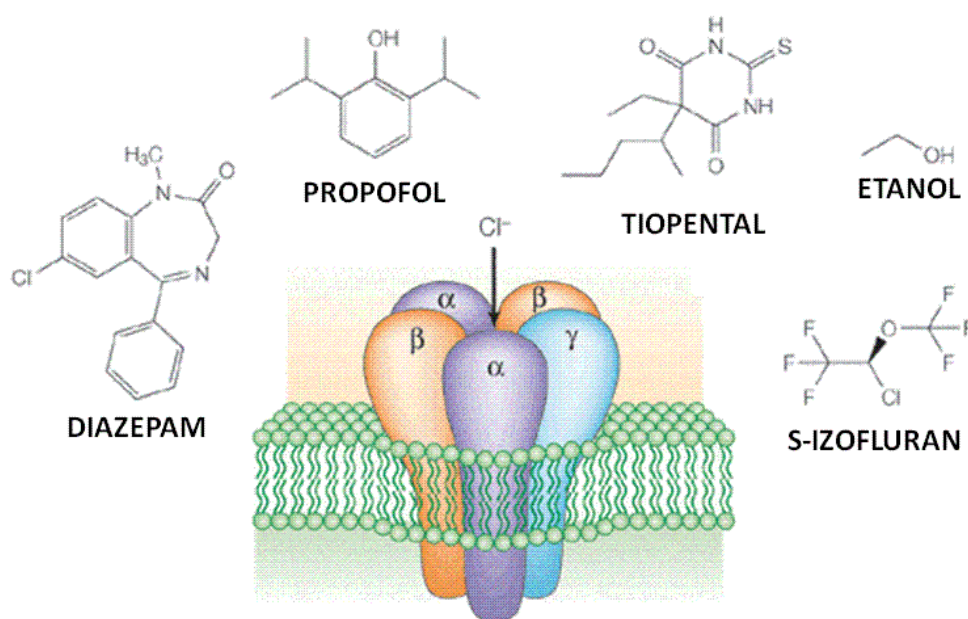
2.2.3. Mechanizm działania

Benzodiazepiny nasilają neurotransmisję GABA-ergiczną na poziomie mózgu i rdzenia kręgowego. Odpowiedzialne miejsca receptorowe znajdują się w rdzeniu kręgowym, hipokampie, podwzgórzu, istocie czarnej, korze mózdzku i korze mózgowej. Stymulacja receptorów przez benzodiazepiny, które wiążą się z receptorem allosterycznie w innym miejscu niż GABA (kwas γ -aminomasłowy) powoduje zwiększenie powinowactwa GABA do receptora GABA-ergicznego. Receptory GABA-ergiczne są związane z kanałem chlorkowym, a ich pobudzenie powoduje zwiększenie częstości otwierania kanału chlorkowego, napływ jonów Cl^- do komórki i hiperpolaryzację błony (Rycina 21). Procesy te prowadzą do zmniejszenia pobudliwości neuronów i zahamowania przewodzenia impulsów (Campo-Soria et al., 2006). Mechanizm działania benzodiazepin obejmuje nasilenie aktywności GABA poprzez wiązanie z ośrodkowym receptorem GABA-A. Istnieją cztery typy receptora GABA-A wrażliwe na obecność benzodiazepin, a różnią się je na podstawie podjednostki α , którą zawierają (α_1 , α_2 , α_3 oraz α_5) (Mohler et al., 2002; Lydiard RB, 2003). Miejsca wiązania benzodiazepin w receptorze α_1 -GABA-A oraz α_2 -GABA-A były poprzednio znane jako BZ-1 i odpowiednio BZ-2, lecz obecnie odchodzi się od tej terminologii. Receptory z podjednostką α_1 występują w dużej ilości w niemal wszystkich obszarach mózgu. Reakcja benzodiazepiny z receptorem α_1 -GABA-A skutkuje uspokojeniem i efektem amnestycznym, podczas gdy efekt anksjolityczny wynika z przyłączenia leku do receptora α_2 -GABA-A (Löw et al., 2000). Drugi z wymienionych typów receptora zlokalizowany jest głównie w układzie limbicznym, korze mózgowej i prążkowie. Obecnie dostępne benzodiazepiny nie łączą się selektywnie z żadnym z czterech podtypów receptora GABA-A. Prowadzone są badania nad stworzeniem leku, który będzie selektywny względem receptora α_2 -GABA-A, który miałby działanie wyłącznie przeciwlękowe, bez efektu sedacyjnego i amnestycznego (Rycina 22) (Möhler et al., 2002; Löw et al., 2000). Dodatkową zaletą takich związków byłoby minimalne zjawisko tolerancji, ograniczonej zależności i zmniejszenie ryzyka zespołu odstawienia (Gorman, 2003). W leczeniu funkcjonują już leki o profilu wybiórczych agonistów receptora α_1 -GABA-A, tak zwane Z-leki (Z-drugs) – zolpidem, zaleplon, zopiklon i eszopiklon, które mają działanie nasenne.



RYCINA 21. Schemat budowy kompleksu receptora GABA_A składającego się z pięciu białkowych podjednostek: dwóch (α_1), dwóch (β_2) i (γ_2) (benzodiazepiny (BDZ) przyłączają się allosterycznie na powierzchni między podjednostkami α_1 i γ_2 .)

Źródło: na podstawie <http://en.wikipedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



RYCINA 22. Przykłady substancji stymulujących receptor GABA_A

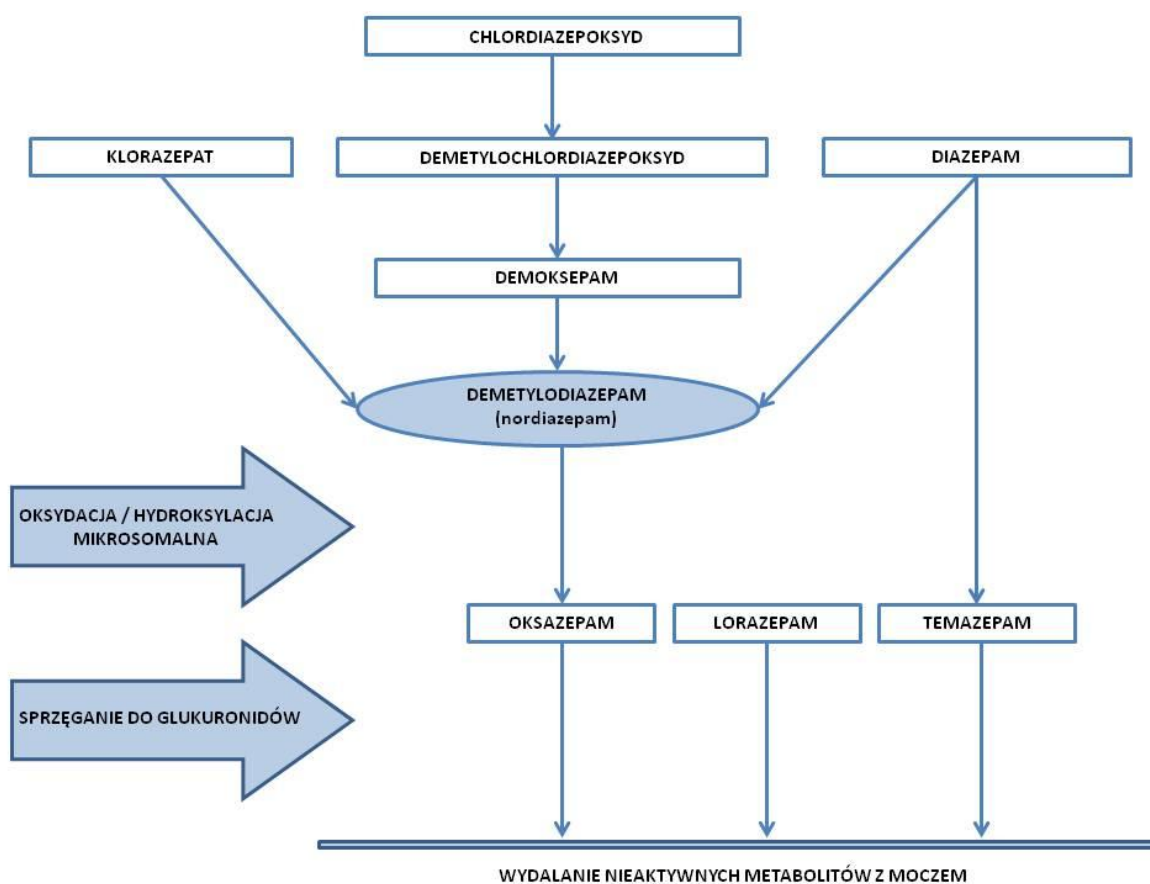
Źródło: na podstawie Belelli, Lambert, 2005

2.2.4. Losy leków w ustroju

Benzodiazepiny są dobrze wchłaniane z przewodu pokarmowego po 2-3 godzinach od podania doustnego. Diazepam i klorazepat wchłaniają się najszybciej, zaś oksazepam – najwolniej. Są rozprowadzane po całym organizmie i w sposób preferencyjny osiągają obszary o charakterze lipidowym, takie jak ośrodkowy układ nerwowy i tkanka tłuszczowa. Leki te ulegają redystrybucji z organów silnie ukrwionych do tkanki tłuszczowej. Stopień wiązania z białkami jest skorelowany z rozpuszczalnością w tłuszczach. Substancje różnią się rozpuszczalnością lipidową, co przekłada się na odmienne współczynniki wchłaniania, szybkością wystąpienia efektu, a także długością działania. Diazepam i klorazepat charakteryzuje największa rozpuszczalność w tłuszczach i najszybsza czynność farmakologiczna, co jest zaletą w przypadku, gdy oczekiwane jest natychmiastowe zahamowanie napadu lęku (choć obydwie mogą wywołać nieprzyjemne wrażenie odurzenia). Wysoce lipofilne leki są ponadto szybciej redystrybuowane z mózgu, co skraca ich czas działania. Diazepam, lorazepam czy chlordiazepoksyd są także dostępne w postaci preparatów do podania parenteralnego (dożylnych – z angielskiego intravenous, IV; domięśniowych – z angielskiego intramuscular, IM). Te drogi są zazwyczaj zarezerwowane do opanowania stanów najwyższego pobudzenia, podniecenia, niepokoju, napadów padaczkowych lub do indukcji sedacji przedoperacyjnej (Koda-Kimble, Young, 2008). Należy zaznaczyć, że domięśniowe wstrzyknięcie zarówno diazepam, jak i chlordiazepoksydu może być nieprzyjemne, a nawet bolesne. Diazepam może wchłaniać się powoli i w sposób nierównomierny, w zależności od miejsca wstrzyknięcia. Lorazepam po takiej drodze podania wchłania się szybko i całkowicie, stąd jest polecany, gdy zachodzi konieczność bezzwłocznej interwencji anksjolitycznej (Charney, 2001). Benzodiazepiny i ich metabolity są dobrze rozprowadzone po tkankach. Przenikają barierę krew – mózg i łożysko, a także przechodzą do mleka matki.

Głównym aspektem różniącym poszczególne benzodiazepiny jest ich profil farmakokinetyczny, który może decydować o wyborze do terapii danej choroby. Cechami odmiennymi są biologiczny okres półtrwania i metabolizm do aktywnych bądź nieaktywnych związków. Biologiczny okres półtrwania poszczególnych leków może być stosunkowo niedługi (np. diazepam), ale w wyniku procesów oksydacji wątrobowej powstają z nich aktywne metabolity (demetylodiazepam, DMDZ), wykazujące wyjątkowo długi czas działania farmakologicznego (biologiczny okres półtrwania minimum 100 godzin) (Charney,

2001). Rycina 23 ilustruje w jaki sposób benzodiazepiny współdzielą podobne szlaki metaboliczne. Diazepam i klorazepat ulegają przekształceniu do demetylodiazepamu i innych aktywnych metabolitów, które następnie są metabolizowane w wątrobie. Podczas przewlekłego zażywania diazepam może dojść do kumulacji demetylodiazepamu, co skutkuje nadmierną sedacją. Demetylodiazepam jest ostatecznie przekształcany do oksazepamu. Oksazepam, temazepam, triazolam oraz lorazepam mają krótki biologiczny okres półtrwania (3-20 godzin), nie powstają z nich aktywne produkty przemian, stąd ich stosowanie nie wywołuje problemu nagromadzenia metabolitów.



RYCINA 23. Szlak metaboliczny benzodiazepin

Źródło: na podstawie Koda-Kimble, Young, 2008

Metabolizm benzodiazepin przebiega przede wszystkim na drodze hydroksylacji, demetylacji i redukcji grupy nitrowej, przy udziale cytochromu P450 (Volz et al., 1979; Tanaka, 1999). W demetylacji diazepam do demetylodiazepamu pośredniczy kilka izoform

cytochromu P450, w tym CYP2C19, CYP3A4 i w mniejszym stopniu CYP2B6. W przypadku stosowania zwyczajowych dawek diazepam to CYP2C19 ma główny udział w metabolizmie leku, jednakże przy wyższych dawkach i przedawkowaniu większe znaczenie zyskuje CYP3A4. Drugi ważny metabolit diazepam – temazepam – powstaje na skutek hydroksylacji mediowanej przez izoenzym CYP3A4 (Schmider et al., 1996). Proleki, takie jak klorazepat, ulegają metabolizmowi do demetylodiazepam (Charney et al., 2001). W związku z długim okresem półtrwania tego aktywnego metabolitu przewlekłe stosowanie benzodiazepin, które są przekształcane do DMDZ może prowadzić do kumulacji leku i przedłużenia efektu farmakologicznego. Benzodiazepiny wykazują efekt kumulacyjny, dlatego też ich okres półtrwania wynosi do 200 godzin. Może to wiązać się z negatywnym skutkiem nadmiernego uspokojenia i ataksji. Zjawisko to jest szczególnie problematyczne dla starszych pacjentów lub osób ze schorzeniami wątroby. Stąd mimo, iż długi czas działania umożliwia dobowe dawkowanie jednorazowe, często przepisywane są mniejsze dawki podzielone w celu uniknięcia skutków ubocznych. Lorazepam, temazepam i oksazepam przechodzą II fazę metabolizmu podczas procesu glukuronidacji. Uważa się, że są substratami w reakcji UDP – glukuronylotransferazy (izoforma 2B7). Leki te nie posiadają aktywnych metabolitów, a ryzyko ich nagromadzenia w długotrwałej kuracji jest niewielkie. W rezultacie są często preparatami wybieranymi do leczenia osób starszych i z chorobami wątroby. W przeciwieństwie do reakcji utleniania fazy I, proces sprzęgania do glukuronidów w fazie II nie pogarsza się wraz z wiekiem (Liston et al., 2001). Metabolity te są wydalane z moczem.

2.2.5. Zastosowanie

U ludzi działanie benzodiazepin ma cztery podstawowe skutki: przeciwlękowy, przeciwdrgawkowy, miorelaksacyjny i sedatywno-nasenny. Środki te są używane w leczeniu różnorodnych chorób i zaburzeń, w tym kurczy mięśniowych, napadów padaczkowych, zaburzeń lękowych, pobudzeniu i bezsenności. Benzodiazepiny szybko i krótko działające są często stosowane w celu obniżenia poczucia lęku i obawy, a także w sedacji przedoperacyjnej i przed innymi zabiegami medycznymi (Koda-Kimble, Young, 2008). Są niezwykle skuteczne u pacjentów ze zdiagnozowanymi zaburzeniami lękowymi, lecz nie w przypadku psychoz. Niekiedy są stosowane w leczeniu zaburzeń psychosomatycznych, zespołu odstawienia alkoholu oraz nadmiernego pobudzenia. Klonazepam i klorazepat znalazły zastosowanie

w leczeniu napadów nieświadomości oraz napadów mioklonicznych. Klorazepat jest także stosowany łącznie z innymi antykonwulsantami w leczeniu padaczki częściowej. Diazepam i lorazepam są używane do opanowania stanu padaczkowego. Inne zastosowania benzodiazepin obejmują m. in. łagodzenie stanów lękowych, stresu i niepokoju, zniesienie świadomości, sedację, zrównoważoną anestezję, kontrolę symptomów odstawienia, zwiotczenie mięśni oraz wspomagająco w leczeniu psychiatrycznym (Mathewson, Kuhn, 1991).

Ludziom od zawsze towarzyszyło dążenie do unikania stresu, zmniejszania napięcia, minimalizacji lęku. Od czasów starożytnych używano w tym celu alkoholu. Bromki (sodu, potasu) zaczęto stosować w połowie XIX wieku jako środki uspokajające, nasenne. Pierwszy barbituran – fenobarbital – wprowadzono do lecznictwa w roku 1912. Wydarzenie to stanowiło przełom i dało początek syntezom oraz testom ponad 2000 związków z tej grupy. Kilka z nich nadal jest w użyciu. Zsyntezowanie w 1950 r. meprobamatu, wykazującego działanie uspokajające, przeciwlękowe oraz nasenne, ukierunkowało badania nad nowymi lekami na poszukiwanie środków uspokajających farmakologicznie bardziej selektywnych i mniej toksycznych. Od momentu wprowadzenia na rynek diazepamem zsyntezowano ponad 3000 związków z grupy benzodiazepin, z czego około 25 stosuje się obecnie na świecie. Benzodiazepiny były powszechnie stosowane w latach 60. i 70. XX wieku, jednakże po okresie popularności dostrzeżono, że są nadużywane. Erę anksjolityków nie wykazujących właściwości uzależniających, niezwiązanych z układem GABA-ergicznym i nie upośledzających zdolności psychomotorycznych, zapoczątkował buspiron. Wymienione leki łagodzą jedynie wybrane symptomy, takie jak lęk czy bezsenność, ale nie wpływają na usunięcie ich przyczyn. Zespół lęku uogólnionego (z angielskiego GAD – Generalized Anxiety Disorder) jest jednym z najczęstszych zaburzeń lękowych, z częstością występowania od 3,9 do 6,6% (Tabela 1) (Lepine, 2002). Średni wiek pojawienia się symptomów zespołu wynosi 21 lat i dotyka kobiety dwukrotnie częściej niż mężczyzn (Pigott, 1999). U większości pacjentów występują równocześnie inne choroby psychiczne, w tym depresja i schorzenia lękowe. Jest to szczególnie istotne w okresie, kiedy kobieta decyduje się na posiadanie dzieci i musi ograniczyć leczenie dotychczas przepisanyymi środkami (Koda-Kimble, Young, 2008).

TABELA 1. Charakterystyka wybranych zaburzeń lękowych

Źródło: na podstawie Bilikiewicz, 2007; Bilikiewicz et al., 2002

<p>RODZAJ ZABURZENIA</p>	<p>KRYTERIUM DIAGNOSTYCZNE</p>
<p>AGORAFOBIA</p>	<p>Irracjonalny lęk przed przebywaniem na otwartej przestrzeni, wyjściem z domu, wejściem do sklepu, tłumem, miejscami publicznymi, samotnym podróżowaniem, wywołany obawą przed napadem paniki i brakiem pomocy.</p>
<p>KOMPULSJA</p>	<p>Występowanie czynności przymusowych, natręctw, tzw. rytuałów, dotyczących ciągłego czyszczenia i sprawdzania wszystkiego, w celu niedopuszczenia do niebezpiecznej sytuacji. U podstaw tego zachowania leży zazwyczaj lęk przed możliwością niebezpieczeństwa, a czynność rytualna jest bezskuteczną symboliczną próbą odwrócenia tego niebezpieczeństwa.</p>
<p>ZABURZENIE OBSESYJNO- KOMPULSYWNE</p>	<p>Występowanie u chorego natrętnych (obsesyjnych) myśli oraz / lub zachowań przymusowych (kompulsywnych).</p>

<p>ZESPÓŁ LĘKU UOGÓLNIONEGO</p>	<p>Nadmierny lęk lub obawy przed przyszłymi wydarzeniami, występujący często przez okres co najmniej 6 miesięcy, dotyczący codziennych aktywności (szkoła, praca itd). Dana osoba nie jest w stanie poradzić sobie z objawami i ich kontrolować. Symptomy: niepokój, nerwowość lub podekscytowanie, łatwe męczenie się, drażliwość, napięcie mięśniowe, problemy z zasypianiem, wstawaniem lub niespokojny sen, problemy z koncentracją.</p>
<p>OBSESJA</p>	<p>Występowanie irracjonalnych myśli i impulsów, którym towarzyszy przekonanie o ich niedorzeczności i chęć uwolnienia się od nich. Osoba dotknięta myślami obsesyjnymi ma świadomość, że pochodzą one z jej umysłu, co ma znaczenie w diagnozie różnicowej z urojeniami.</p>
<p>ZABURZENIA PANICZNE</p>	<p>Występowanie niespodziewanych napadów paniki, charakteryzujących się uczuciem znacznego lęku, którym towarzyszą objawy somatyczne, takie jak: palpacje serca, pocenie się, drżenie, duszność lub zadyszka, uczucie dławienia, ból w klatce piersiowej, nieukładowe zawroty głowy, lęk przed utratą kontroli nad własnym postępowaniem, lęk przed śmiercią, parestezje, dreszcze lub uderzenia gorąca. Objawy te mają charakter nawrotowy. Chorzy unikają zdarzeń lub miejsc, które w przeszłości wywołały atak, aby unikać sytuacji mogących spowodować ponowny atak paniki.</p>

<p>ZESPÓŁ STRESU POURAZOWEGO</p>	<p>Zaburzenie lękowe spowodowane przez stres o dużej sile, powodujący kryzys psychiczny, przekraczający ludzkie przeżywanie. Jest to opóźniona lub przedłużona reakcja. Objawy: przeżywanie na nowo urazowej sytuacji w natrętnych wspomnieniach i koszmarach sennych, poczucie odrętwienia, odizolowanie od innych ludzi, brak reakcji na otoczenie, niezdolność do przeżywania przyjemności, unikanie działań i sytuacji, które mogłyby przypomnieć przeżyty uraz, stan nadmiernego pobudzenia wegetatywnego z nadmierną czujnością i wzmożoną reaktywnością na bodźce oraz bezsennością, lęk, depresja, myśli samobójcze.</p>
<p>FOBIA PROSTA</p>	<p>Zaburzenie nerwicowe, którego objawem osiowym jest uporczywy lęk przed określonymi sytuacjami, zjawiskami lub przedmiotami, związany z unikaniem przyczyn go wywołujących i utrudniający funkcjonowanie w społeczeństwie. Fobie wywoływane są przez pewne sytuacje lub obiekty zewnętrzne wobec osoby przeżywającej lęk, które w praktyce nie są niebezpieczne. Atak paniki występuje zaraz przed lub w trakcie ekspozycji na sytuację stresową.</p>
<p>FOBIA SPOŁECZNA</p>	<p>Lęk dotyczący kontaktów z innymi ludźmi powoduje znaczne ograniczenia życiowe u osób z tym zaburzeniem. Jako przyczyny tego zaburzenia podaje się czynniki genetyczne, psychologiczne, społeczno-kulturowe i neurobiologiczne. Najbardziej typowymi objawami fobii społecznej są uporczywy lęk (obawa przed nienormalnym zachowaniem się wśród ludzi, ośmieszeniem lub kompromitacją), czerwienienie się, drżenie rąk i mięśni, przyspieszone bicie serca, nadmierne pocenie, duszności. Prowadzi ona zwykle do znacznego wycofania z relacji społecznych.</p>

2.2.6. Charakterystyka wybranych leków

Charakterystykę wybranych leków z grupy benzodiazepin zaprezentowano w tabeli 2.

TABELA 2. Charakterystyka wybranych leków z grupy benzodiazepin

Źródło: ulotki informacyjne dla pacjenta dołączane do leków przez producentów

NAZWA POLSKA SUBSTANCJI CHEMICZNEJ	NAZWA ANGIELSKA SUBSTANCJI CHEMICZNEJ	NAZWA HANDLOWA PREPARATU DOSTĘPNEGO NA POLSKIM RYNKU FARMACEUTYCZNYM
Alprazolam	Alprazolam	Xanax, Afobam
Bromazepam	Bromazepam	Lexotan
Chlordiazepoksyd	Chlordiazepoxide	Elenium
Diazepam	Diazepam	Relanium, Valium
Estazolam	Estazolam	Estazolam
Klobazam	Clobazam	Frisium
Klonazepam	Clonazepam	Clonazepamum TZF
Klorazepat disodowy (klorazepan)	Chlorazepate dipotassium	Tranxene, Cloranxen
Lorazepam	Lorazepam	Lorafen

Lormetazepam	Lormetazepam	Noctofer
Nitrazepam	Nitrazepam	Nitrazepam
Oksazepam	Oxazepam	Oxazepam
Temazepam	Temazepam	Signopam

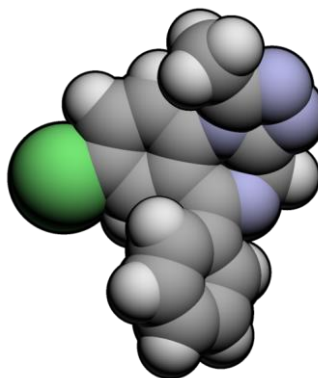
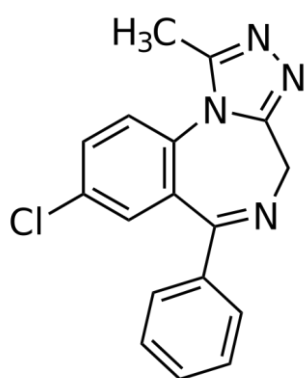
Opis leków, wzory strukturalne oraz budowa przestrzenna (Ryciny 24 – 36) często stosowanych leków z grupy benzodiazepin, wymienionych w tabeli 2:

1. Alprazolam – stosowany głównie w zaburzeniach depresyjnych i napadach paniki; wykazuje pewne działania zbieżne z trójcyklicznymi lekami przeciwdepresyjnymi zachowując właściwości anksjolityczne benzodiazepin. Nagłe przerwanie terapii alprazolamem może skutkować napadami drgawkowymi, psychozą i „lękiem z odbicia” (nawrót stanów lękowych), gdyż jest on szybko usuwany z ustroju.
2. Bromazepam – anksjolityk, który wpływa korzystnie na nastrój i oddziałuje w nieznacznym stopniu na sprawność umysłową. Stosowany w stanach lęku, niepokoju, napięcia nerwowego. Zalecany w nerwicach narządowych, głównie serca. Pomocniczo w zespole napięcia przedmiesiączkowego i bolesnych menstruacjach.
3. Chlordiazepoksyd – doraźne, krótkotrwałe leczenie objawowe zespołów lękowych, w zwiększonym napięciu mięśniowym o różnej etiologii. Pomocniczo w leczeniu objawowego ostrego zespołu odstawienia alkoholu. Lek wchłania się powoli, stężenie maksymalne w osoczu osiąga po około 2-4 godzinach od podania doustnego, a wydalany jest dopiero po 2-4 dniach. Po podaniu mięśniowym wchłanianie jest jeszcze wolniejsze.
4. Diazepam – lek podany doustnie wywołuje efekt nasenny w ciągu jednej godziny, natomiast podany dożylnie działa przeciwdrgawkowo. Substancję stosuje się doraźnie w ostrych stanach lękowych i niepokoju psychoruchowym. Wskazany jest ponadto w stanach podwyższonego napięcia mięśniowego, premedykacji przed różnymi zabiegami diagnostycznymi i chirurgicznymi, a także w zwalczaniu stanu padaczkowego.

Podczas stosowania u dzieci mogą wystąpić reakcje paradoksalne. Pomocniczo w terapii choroby alkoholowej. Diazepam można zaaplikować dożylnie w dawce jednorazowej i wielokrotnej lub we wlewie kroplowym. Jednorazowo osobie dorosłej podaje się zazwyczaj dawkę 5-10 mg z szybkością do 1 ml (5 mg) na minutę. Dawkę można podać powtórnie w interwałach 5-10 minutowych, ale całkowita ilość leku nie powinna przekraczać 30 mg. We wlewach kroplowych lek podaje się najczęściej po rozcieńczeniu 100 mg (10 ampulek po 2 ml) w 500 ml 0,9% roztworu chlorku sodu lub 5% roztworu glukozy, z szybkością 40 ml na godzinę. Stosuje się także podanie domięśniowe, po którym lek wchłania się powoli.

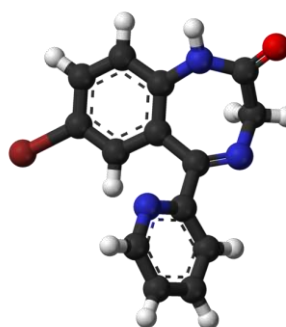
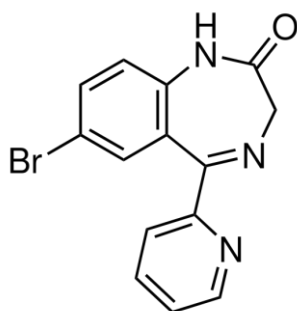
5. Estazolam – działa nasennie, już po pół godziny od momentu zażycia. Lek na ogół nie wywołuje uczucia porannego zmęczenia. Wpływa głównie na skrócenie okresu zasypiania, słabiej na wydłużenie snu. Pomocniczo w terapii padaczki.
6. Klobazam – wskazany do leczenia stanów lękowych i napięcia psychicznego, rozdrażnienia, zaburzenia snu pochodzenia emocjonalnego, wspomagająco w padaczce i alkoholizmie.
7. Klonazepam – lek przepisywany w terapii padaczki, chorobach przebiegających ze wzmożonym napięciem nerwowym (np. tiki, bolesne skurcze mięśni). Może być stosowany w bezsenności i wspomagająco w psychozach. Pacjentów należy ostrzegać, że długotrwałe stosowanie może prowadzić do uzależnienia, a po nagłym odstawieniu preparatu mogą wystąpić objawy abstynencyjne: halucynacje, pobudzenie ruchowe, psychoza, drgawki, zaburzenia zachowania.
8. Klorazepat disodowy (klorazepan) – jest prolekiem, po podaniu doustnym szybko się wchłania i ulega dekarboksylacji do początkowej formy aktywnej, jaką jest demetylodiazepam. Podczas wątrobowych przemian metabolicznych powstaje kolejny aktywny związek – oksazepam. Wskazany w terapii zaburzeń lękowych i zespołu odstawienia alkoholu oraz detoksykacji opioidowej, a także wspomagająco jako antykonwulsant (stosunkowo słabe działanie przeciwdrgawkowe).
9. Lorazepam – preparat podawany głównie w stanach lękowych i podnieceniu, które mają podłoże w chorobach organicznych, zaburzeniach snu i trudnościach w zasypianiu. Obniża napięcie mięśni szkieletowych silniej niż np. diazepam. Przepisywane dawki dobowe wynoszą do 10 mg (z najwyższą dawką wyznaczaną na noc).

10. Lormetazepam – przeznaczony dla osób, które posiadają trudności z zasypianiem i cierpią na płytki, przerywany sen. Wywołany sen trwa 6-8 godzin. Leku nie stosuje się u osób poniżej 18 roku życia. Pacjenci powinni być świadomi, że lek należy odstawiać stopniowo. Jego nagłe odstawienie może spowodować podniecenie, bezsenność, zmniejszenie apetytu, nadmierne pocenie, drgawki. Środek podawany również w przygotowaniu do zabiegów chirurgicznych.
11. Nitrazepam - krótkotrwałe leczenie bezsenności charakteryzującej się trudnościami w zasypianiu i częstymi nocnymi przebudzeniami. Lek wykazuje ponadto działanie przeciwdrgawkowe i obniża napięcie mięśniowe, stąd jest stosowany w niektórych formach padaczki u dzieci. Może być podawany jako środek uspokajający przed zabiegiem chirurgicznym. Aby zmniejszyć ryzyko niepamięci następczej, pacjent powinien mieć zapewniony nieprzerwany sen przez 7-8 godzin po zażyciu dawki. U osób w podeszłym wieku mogą pojawić się reakcje paradoksalne – pobudzenie, niepokój, agresywność.
12. Oksazepam – ułatwia zasypianie jeśli trudności z zaśnięciem wynikają z niepokoju, a efekt pojawia się po ok. 1 godzinie od momentu zażycia, stąd dawkę nasenną (wynoszącą ok. 10-20 mg) podaje się zazwyczaj godzinę przed snem. W procesie biotransformacji oksazepamu nie powstają aktywne metabolity, w związku z czym lek ten został uznany za stosunkowo bezpieczny i jest przepisywany jako lek z wyboru u pacjentów w zaawansowanym wieku i ze schorzeniami wątroby.
13. Temazepam – we wzmożonym napięciu, stanach niepokoju i lęku. Zażywany także w bólach głowy pochodzenia nerwicowego lub przejściowej bezsenności. Przepisywany w przypadku padaczki dziecięcej, zwłaszcza typu petit mal (napady małe). Lek podaje się również pomocniczo w nadczynności tarczycy (na podstawie ulotek informacyjnych dla pacjentów dołączanych do leków).



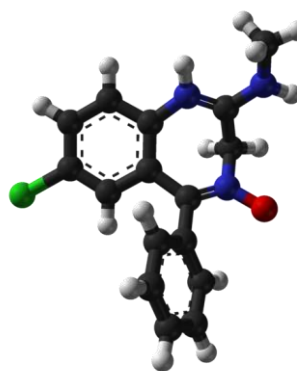
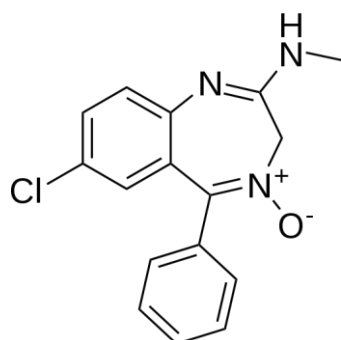
RYCINA 24. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna alprazolamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



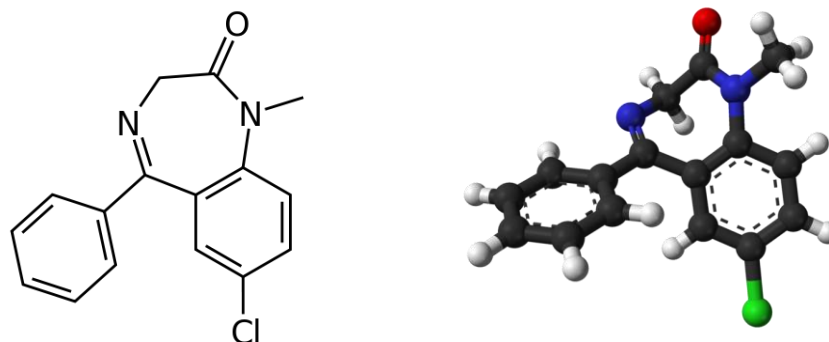
RYCINA 25. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna bromazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



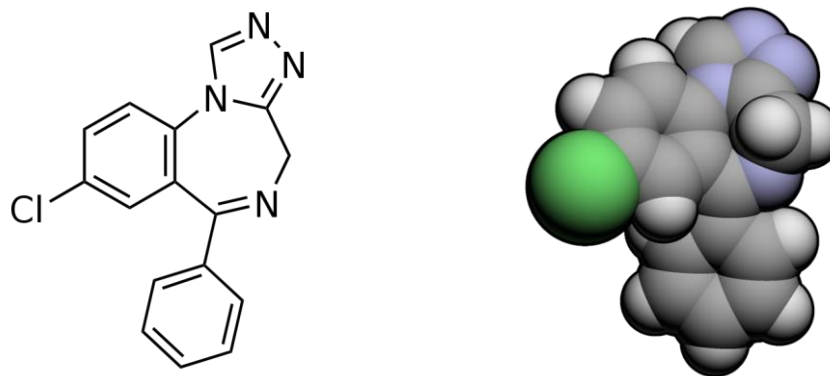
RYCINA 26. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna chlordiazepoksydu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



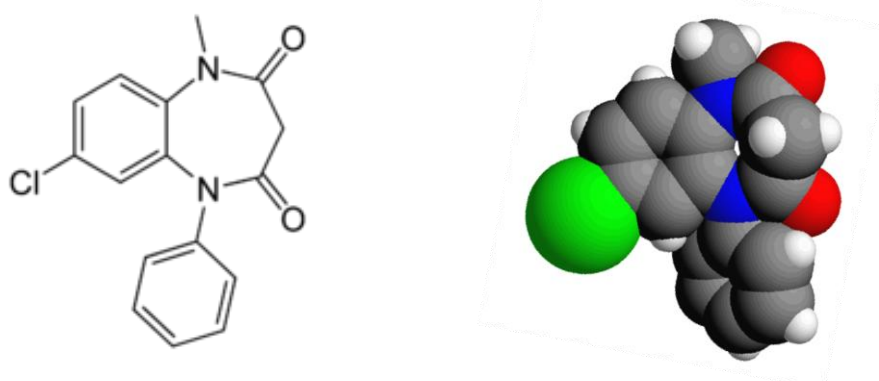
RYCINA 27. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna diazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



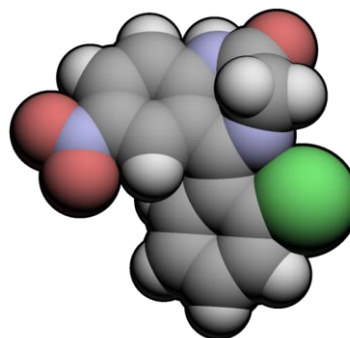
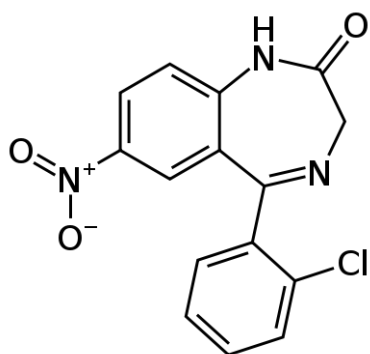
RYCINA 28. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna estazolamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



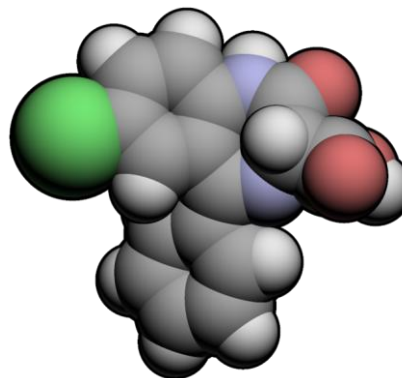
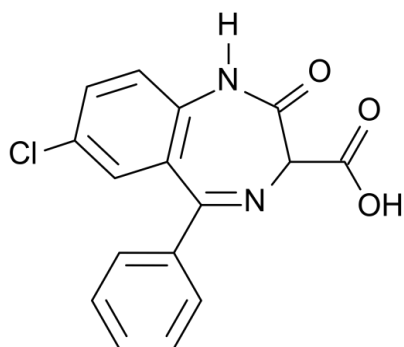
RYCINA 29. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna klobazamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



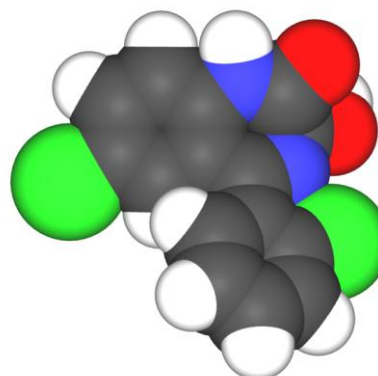
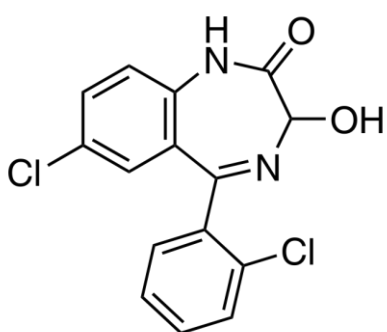
RYCINA 30. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna klonazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



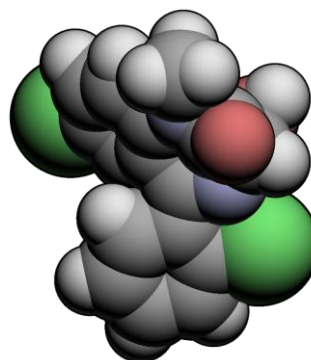
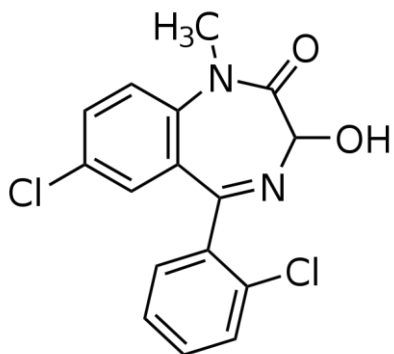
RYCINA 31. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna klorazepatu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



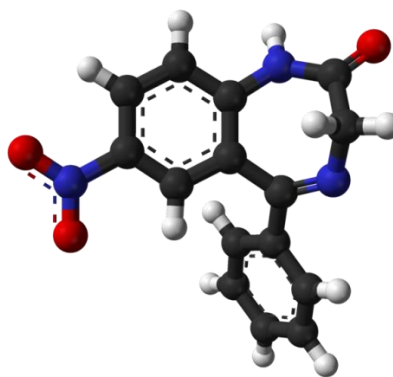
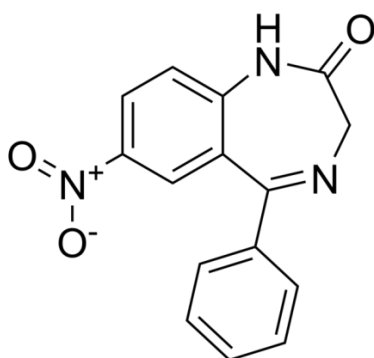
RYCINA 32. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna lorazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



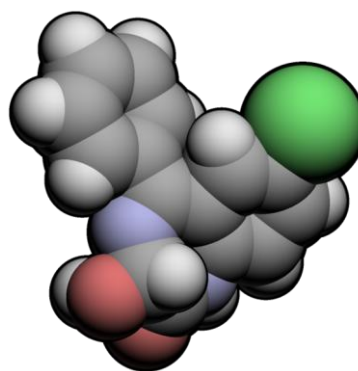
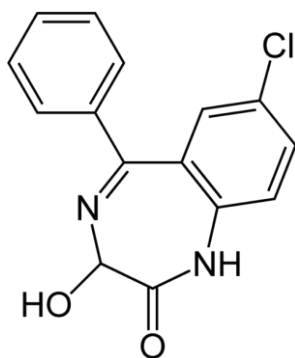
RYCINA 33. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna lormetazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



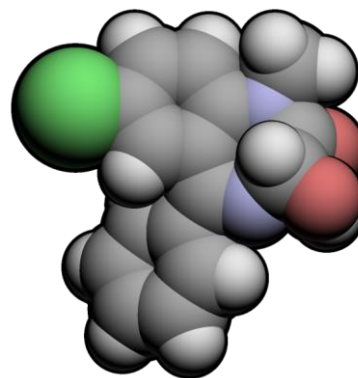
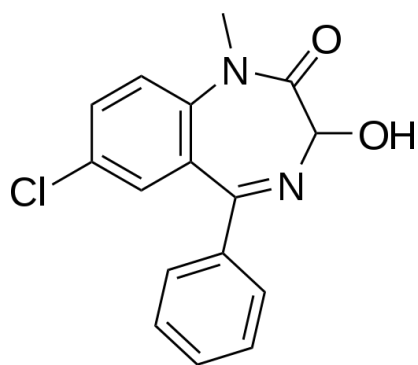
RYCINA 34. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna nitrazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012



RYCINA 35. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna oksazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, dostęp 21.05.2012



RYCINA 36. Wzór strukturalny i budowa przestrzenna temazepamu

Źródło: <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012

W tabeli 3 przedstawiono krótką charakterystykę często stosowanych w Polsce leków z grupy benzodiazepin. Leki różnią się pod względem celu terapeutycznego, najczęściej stosowanych dawek, co ma także znaczenie w schemacie dawkowania i przystępności leczenia. W skutecznym i dogodnym leczeniu ważny jest dobór leku o odpowiednio długim okresie działania.

TABELA 3. Porównanie wybranych benzodiazepin

Źródło: na podstawie Koda-Kimble, Young, 2008; Rzewuska, 1997; Bilikiewicz et al. 2003

LEK	WSKAZANIA	DAWKA [mg/dobę]	OKRES DZIAŁANIA
ALPRAZOLAM	lęk, lęk związany z depresją, lęk paniczny	0,5-6 (do 10 w lęku panicznym)	krótki
BROMAZEPAM	lęk, zespół stresu pourazowego	4-12	średnio długi
CHLOR-DIAZEPOKSYD	lęk, lęk przedoperacyjny, ostry zespół odstawienia alkoholu	15-100	długi

DIAZEPAM	lęk, zwiotczenie mięśni, ostry zespół odstawienia alkoholu, lęk przedoperacyjny, przeciwdrgawkowo	2-40	długi
ESTAZOLAM	uspokajająco, nasennie	1-2 (przed snem)	średnio długi
KLOBAZAM	lęk, zespół odstawienia alkoholu	20-30	długi
KLONAZEPAM	przeciwdrgawkowo, lęk paniczny	0,5-12	średnio długi
KLORAZEPAT	lęk, zespół odstawienia alkoholu, przeciwdrgawkowo	15-40	długi
LORAZEPAM	lęk, lęk związany z depresją	2-6	krótki
LORMETAZEPAM	nasennie, premedykacja	0,5-2	krótki
NITRAZEPAM	nasennie, premedykacja, epilepsja	2-10	średnio długi
OKSAZEPAM	lęk, zespół odstawienia alkoholu	30-120	krótki
TEMAZEPAM	uspokajająco, nasennie	15-30 (przed snem)	krótki

2.2.7. Przeciwwskazania i środki ostrożności

Benzodiazepiny są przeciwwskazane w przypadku nadwrażliwości na leki z tej grupy. Nie powinny być także stosowane u pacjentów z poważnymi chorobami wątroby, gdyż stanowi ona organ metabolizujący te substancje. Terapia benzodiazepinowa powinna być wdrażana w sposób przemyślany u osób z chorobami układu oddechowego, niewydolnością

nerek i ostrą przerywaną porfirią. Niektóre benzodiazepiny (np. klonazepam) nasilają wydzielanie śliny i osłabiają czynność oddechową. Ponieważ leki te są wydalane z moczem pacjenci z zaburzeniami pracy nerek powinni być pod stałą obserwacją podczas terapii. Leczenie napadów padaczkowych i objawów neurologicznych w porfirii może być utrudnione. Wiele środków przeciwdrgawkowych aktywuje działanie syntazy kwasu aminolewulinowego (prekursor syntezy porfiry) oraz cytochromu P450, co skutkuje dalszą nadprodukcją prekursorów hemu i pogorszeniem pierwotnej choroby. Benzodiazepiny mogą powodować rozszerzenie źrenic oraz zwiększać ciśnienie śródgałkowe, stąd należy stosować je ze szczególną ostrożnością u pacjentów cierpiących na jaskrę z wąskim kątem przesączania. Benzodiazepiny mogą być stosowane w połączeniu z innymi depresantami wyłącznie przy zachowaniu ostrożności, gdyż możliwe jest wystąpienie depresji ośrodka oddechowego. U pacjentów stosujących długotrwale benzodiazepiny może rozwinąć się tolerancja. Z kolei w przeciwieństwie do innych leków przeciwdrgawkowych, nagłe przerwanie terapii klonazepamem może wywołać stan padaczkowy. Bezpieczeństwo stosowania w ciąży i w czasie laktacji nie zostało potwierdzone. Leki z tej grupy przechodzą do mleka matki. Stosowanie diazepamu w czasie karmienia piersią jest niewskazane, gdyż lek kumuluje się w organizmie noworodka (Mathewson Kuhn, 1991).

2.2.8. Skutki uboczne

Najpoważniejsze skutki uboczne zażywania benzodiazepin są następstwem działania depresyjnego na ośrodkowy układ nerwowy. W leczeniu doraźnym i ambulatoryjnym, w którym przeważnie stosuje się małe dawki leku, dominują objawy takie jak: zawroty głowy, senność, zmęczenie, apatia, ataksja, dyzartria (zaburzenia mowy) oraz zaburzenia behawioralne (np. agresja, nadaktywność, rozdrażnienie, trudności z koncentracją). U osób starszych obserwowano splątanie, które jest jednak odwracalne po obniżeniu dawek lub zakończeniu podawania leku. Po podaniu dożylnym diazepamem, lorazepamem lub klonazepamem mogą wystąpić zaburzenia krążeniowe i oddechowe, zwłaszcza w przypadku jednoczesnego zastosowania innych depresantów (Mathewson Kuhn, 1991).

Należy podkreślić, że przewlekłe przyjmowanie większości środków uspokajająco-nasennych prowadzi do wykształcenia uzależnienia. Często przedstawiciele opieki zdrowotnej, jak i sami pacjenci decydują się na terapię anksjolitykami w celu ograniczenia stresu dnia codziennego. Leki te zapewniają chwilową ulgę i „chemiczną ucieczkę”, co

wzmacnia ich pozycję na rynku farmaceutyków i popularność, a oddala konieczność uporania się z przyczyną stresu.

Niektóre silniejsze i szybciej działające środki sedatywne są także używane w celu ułatwienia zaśnięcia. Wydają się one wydłużać czas snu, jednakże niekoniecznie gwarantują uczucie wypoczęcia. Ma to związek z faktem, że wydłuża się jedynie okres snu przypadający na I i II fazę snu, a jednocześnie spada liczba cykli i długość czasu snu REM (z angielskiego Rapid Eye Movement – szybkiego ruchu gałek ocznych), skracając fazę snu głębokiego. Istnieje hipoteza, że problemy związane z fazą REM snu sprawiają, że pacjenci zaczynają przyjmować anksjolityki w sposób regularny, długotrwały, co prowadzi do uzależnień. Senność i ataksja to najczęściej występujące skutki uboczne wynikające z podstawowych właściwości farmakologicznych benzodiazepin (tabela 4). Co ciekawe, pacjenci przyjmujący te leki w celu zmniejszenia uczucia lęku i stresu zazwyczaj nie uskarżają się na wymienione problemy. Jednakże osoby zażywające benzodiazepiny przeciwdrgawkowe zgłaszają te efekty jako wyjątkowo uciążliwe. Rzadszym zjawiskiem jest amnezja następową, która mimo, iż stanowi efekt uboczny, jest niekiedy wykorzystywana w celach terapeutycznych – lorazepam pomocniczo w leczeniu nudności podczas chemioterapii lub diazepam podawany dożylnie przed zabiegiem chirurgicznym, kardiowersją elektryczną i porodem. Mogą wystąpić dolegliwości żołądkowo-jelitowe, nudności i wymioty. Sposobem zmniejszenia dokuczliwości tych objawów jest zażywanie benzodiazepin w czasie lub zaraz po posiłku. Inne rzadkie skutki uboczne to: zaburzenia wzroku i mowy, hipotensja, bóle głowy, bezsenność, depresja, bradykardia, spadek libido, żółtaczka, zaparcia, wysypka, nietrzymanie moczu. W przypadku benzodiazepin możliwe jest także wystąpienie swoistych reakcji paradoksalnych, takich jak ekscytacja, wrogość, agresja, splątanie i halucynacje (Mathewson Kuhn, 1991).

TABELA 4. Symptomy występujące w zespole odstawienia benzodiazepin

Źródło: na podstawie Koda-Kimble, Young, 2008

CZĘSTO WYSTĘPUJĄCE	ŚREDNIO CZĘSTO WYSTĘPUJĄCE	RZADKO WYSTĘPUJĄCE
lęk	mdłości	splątanie
bezsennaść	depresja	delirium
drażliwość	ataksja	psychoza
słabość / tkliwość mięśniowa	hiperrefleksja	napady padaczkowe
drżenia	zaburzenia widzenia	katatonia
spadek / zanik apetytu	zmęczenie	

2.2.9. Interakcje

Benzodiazepiny nie podlegają tak złożonym interakcjom z innymi lekami jak większość środków uspokajających i nasennych. Podstawową interakcją leków z tej grupy jest oddziaływanie z pozostałymi depresantami OUN. Do substancji tych należą między innymi: napoje alkoholowe, opioidowe leki przeciwbólowe, pozostałe leki przeciwdrgawkowe, fenotiazyna, leki przeciwhistaminowe i inne leki uspokajająco-nasenne. Takie połączenie prowadzi do nadmiernej sedacji i upośledzenia sprawności ruchowej, a nawet zaburzeń oddechowych i śmierci (Mathewson Kuhn, 1991).

W zależności od budowy i mechanizmów metabolicznych jakim podlegają poszczególne benzodiazepiny, można je podzielić na dwie grupy. Te krótko działające nie wchodzi w sposób znaczący w interakcje. Zdecydowana większość jednak, a zwłaszcza leki długo działające, które są metabolizowane przy udziale cytochromu P450 wykazują większy potencjał do interakcji z innymi substancjami (Meyler, Aronson, 2006). Związki, które upośledzają działanie enzymów cytochromowych w wątrobie (takie jak

doustne środki antykoncepcyjne, przeciwgrzybiczne i przeciwbakteryjne) obniżają współczynnik eliminacji benzodiazepin metabolizowanych przez układ cytochromu P450, co potencjalnie może prowadzić do kumulacji leku i wystąpienia nasilonych efektów ubocznych. Istnieją także leki (takie jak ryfampicyna, karbamazepina czy fenytoina) o odwrotnym mechanizmie działania – indukującym aktywność enzymatyczną, która skutkuje przyspieszeniem eliminacji benzodiazepin i ich mniejszą efektywnością (Moody, 2004).

2.2.10. Epidemiologia

Benzodiazepiny są powszechnie przepisywane pacjentom przez lekarzy. Jednak przegląd piśmiennictwa światowego wskazuje, że cel terapeutyczny, częstość stosowania oraz wybór leków jest niezwykle zróżnicowany i zależny w dużej mierze od polityki lekowej danego kraju. Według Riss i współpracowników benzodiazepiny utrzymują swoją ważną pozycję w leczeniu epilepsji, a także jako leki pierwszego wyboru w terapii stanu przedrzucawkowego i po niedotlenieniu (Riss et al., 2008). Spośród 35 dostępnych leków z tej grupy w leczeniu napadów padaczkowych i drgawkowych używa się kilka: klobazam, klonazepam, klorazepat, diazepam, lorazepam i midazolam. Diazepam i lorazepam są stosowane głównie do opanowania nagłych ataków, podczas gdy klobazam, klonazepam i klorazepat – zazwyczaj w terapii przewlekłej padaczki. Randomizowane badania dowodzą skuteczności tych leków (zwłaszcza diazepam i lorazepam) we wstępnych interwencjach leczniczych w przypadku stanu padaczkowego (Alldredge et al., 2001; Treiman, 1998). Również efektywność w leczeniu zespołu lęku uogólnionego i wielu innych zaburzeń lękowych jest dobrze udokumentowana (Brawman-Mintzer, 2001). Leki te zapewniają szereg ważnych klinicznie zalet w stosunku do uprzednio stosowanych substancji, takich jak barbiturany, meproamat czy alkohol. Należy do nich zaliczyć bardziej specyficzne działanie anksjolityczne, mniejsza śmiertelność w toksyczności ostrej i z przedawkowania, mniej uciążliwe efekty uboczne, niższy potencjał do nadużywania, oraz mniej niebezpieczne interakcje z innymi lekami. W obliczu tych cech przepisywanie i stosowanie starszych związków jest nieuzasadnione i niewskazane (Koda-Kimble, Young, 2008). Około 2/3 benzodiazepin ordynowana jest przez lekarzy ogólnych, z czego zdecydowana większość – 80% stosowana jest u pacjentów z zaburzeniami emocjonalnymi i psychicznymi. W pozostałych przypadkach zalecane są w chorobach układu krążenia i w mniejszym stopniu – w dolegliwościach żołądkowo-jelitowych. Najczęściej korzystają z terapii lekami z tej

grupy osoby w podeszłym wieku, które niejednokrotnie cierpią na wiele schorzeń somatycznych (Rzewuska, 1997). Naukowcy i świadczeniodawcy opieki zdrowotnej finansowanej ze środków publicznych w wielu krajach (Belgia, Francja, Niemcy, Włochy, Holandia, Hiszpania i Stany Zjednoczone) ustalili, iż lekarze pierwszego kontaktu przepisują największe ilości preparatów benzodiazepinowych. Analiza recept i profilu pacjentów wykazała, że jest to zjawisko związane z wiekiem, płcią i chorobami towarzyszącymi. Wyższy odsetek takich leków stosuje się u osób powyżej 65 roku życia, kobiet, u osób cierpiących na choroby układu krążenia oraz tych, którzy w znacznym stopniu korzystają z opieki zdrowotnej (Rosman et al., 2011; Demyttenaere et al., 2008; Kisely et al., 2000; Paulose-Ram et al., 2004; Dell'osso, Lader, 2012). Ankiety dotyczące stosowania benzodiazepin w Wielkiej Brytanii pokazują, że po przejściowym spadku ilości recept wydawanych na te leki odnotowano ponowny wzrost. Około 3,5% grupy, niemal 5000 respondentów stanowiły osoby aktualnie zażywające leki psychotropowe, z czego aż 63% miało przepisane benzodiazepiny. Badanie potwierdziło również zależność terapii benzodiazepinami od wieku i płci (Ohayon et al., 1998). Podobne wyniki uzyskano w Norwegii – 2/3 recept na benzodiazepiny lekarze ogólni wydali kobietom, z których ponad połowa to pacjentki powyżej 65 roku życia (Straand, Rokstad, 1997). W 2001 roku we Francji przeprowadzono sondaż, z którego wynikało, że benzodiazepiny zażywa 7,5% ankietowanych – dwukrotnie częściej kobiety i osoby w podeszłym wieku (Lagnaoui et al., 2004). Staranna ocena danych pochodzących z UK National Health Service (Narodowa Służba Zdrowia Wielkiej Brytanii) dowodzi, że popularność benzodiazepin w ciągu ostatnich 20 lat nieznacznie wzrosła, przy uwzględnieniu że preparaty z tej grupy o działaniu nasennym zostały w dużej mierze zastąpione przez użycie Z-leków (Dell'osso, Lader, 2012). Włoskie badanie dotyczące trendów w konsumpcji benzodiazepin wykazało, że w latach 1995-2003 utrzymywało się ono na stałym, znaczącym poziomie (Ciuna et al., 2004). Jednakże najwięcej leków z tej grupy używa się w Japonii. Analiza elektronicznej bazy danych blisko 650 tysięcy recept sugeruje, że 6,1% z nich przepisano na benzodiazepiny o działaniu anksjolitycznym, a 5,8% - nasennym. Leki te były najczęściej stosowane w medycynie wewnętrznej, chirurgii, na oddziałach neurologicznych, rzadziej w jednostkach leczenia psychiatrycznego. Antydepresanty przepisywano znacznie rzadziej (Nakao et al., 2007). Rozpatrując kwestię częstości korzystania z benzodiazepin nie sposób nie wspomnieć o zjawisku nadużywania tych leków. Jako że benzodiazepiny należą do środków psychoaktywnych są stosowane w celach nieterapeutycznych, również łącznie z alkoholem i narkotykami (Substance Abuse

and Mental Health Services Administration, 2011). Powszechne jest zażywanie tych leków bez specjalnych zaleceń lekarza lub w zbyt dużych i częstych dawkach. Szybki efekt uspokajający i właściwości nasenne sprawiają, że są także chętnie używane w sytuacjach zwykłego podenerwowania, stresu dnia codziennego, zamiast we wskazaniach chorobowych. Ponadto wiele państw boryka się z problemem fałszerstw recept na benzodiazepiny (Pauly et al., 2012). Szacuje się, że aż 33,4% interwencji ratownictwa medycznego było związanych z niemedycznym użyciem leków psychotropowych, szczególnie tych o działaniu sedatywnym, nasennym i przeciwłękowym. To właśnie benzodiazepiny stanowiły największą grupę substancji nadużywanych lub źle używanych substancji, zwłaszcza wśród osób między 18 a 44 rokiem życia. Najczęściej zażywanymi lekami były alprazolam, klonazepam, diazepam oraz lorazepam. W 28% przypadków podjętych prób samobójczych z użyciem leków zastosowano benzodiazepiny. Na przestrzeni lat 2004-2008 zaobserwowano ogólny wzrost ilości tych przypadków (użycie alprazolamu w celu samobójczym wzrosło aż o 87%) (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2011).

2.3. CIAŻA

2.3.1. Stosowanie leków w czasie ciąży i laktacji

Już dawno zauważono, iż choroby czy trucizny które wywierają szkodliwy wpływ na stan zdrowia ciężarnej kobiety stanowią podobne lub nawet większe zagrożenie dla dziecka. Zależność taką zaobserwowano m.in. w przypadku wirusa różyczki, czy kiły wrodzonej. W ostatnim stuleciu okazało się jednak, że istnieje wiele substancji, które wywołują toksyczne efekty wyłącznie u płodu. Do substancji, które wywołały tragiczne efekty u płodów, mimo braku ewidentnych skutków ubocznych u matek należą dietylstilbestrol, talidomid oraz metylortęć. Stosunkowo niedawno zainteresowano się także negatywnym wpływem nałogów matki na prawidłowy rozwój płodu – paleniem tytoniu, piciem alkoholu oraz nadużywaniem leków.

Postęp nauki i techniki umożliwił badaczom ustalenie wpływu czynników endo- i egzogennych na rozwój płodu. Nowoczesne badania prenatalne pozwalają stwierdzić, czy dziecko będzie zdrowe i czy będzie się prawidłowo rozwijało. W przypadku zagrożenia ciąży możliwe jest ponadto określenie profilaktyki i terapii. Badania te pozwalają na wykrycie wad rozwojowych płodu, powstałych zarówno na drodze obciążenia genetycznego, jak i w wyniku

działania czynników zewnętrznych. Mimo, iż działanie środowiska zewnętrznego odpowiada zaledwie za 10% uszkodzeń, stanowi ono zagrożenie, które niejednokrotnie można wykluczyć poprzez świadomą prewencję. Płód jest narażony na niekorzystny wpływ środowiska szczególnie podczas pierwszych 10 tygodni, kiedy następuje formowanie się głównych narządów ciała. Czynniki, mogące powodować wady płodu, dzieli się na cztery grupy – teratogeny, infekcje, nałożenie się różnych czynników oraz komplikacje ciąży i porodu. Głównie rolą matki rozwijającego się w jej łonie dziecka jest odpowiedzialne unikanie zwłaszcza tych pierwszych. Za czynniki teratogenne uważa się: leki, używki, promieniowanie jonizujące, niedobór witamin, niektóre związki chemiczne. Stopień szkodliwości teratogenów uzależniony jest od tego, w którym momencie rozwoju płodowego nastąpiło ich działanie (Moghe et al., 2008).

Stosowanie leków w czasie ciąży stanowi duże wyzwanie terapeutyczne, z powodu potencjalnych skutków ubocznych jakie mogą wystąpić u zarodka, płodu i noworodka. Ograniczona ilość randomizowanych badań naukowych komplikuje kwestię wyboru leków dla kobiety ciężarnej, nawet jeśli ich zastosowanie jest niezbędne. Większość leków nie jest wskazana przez producentów do użycia w ciąży ze względów natury medycznej i prawnej. Obecnie, zaledwie kilka środków leczniczych z tysięcy opcji terapeutycznych jest dobrze sprawdzona i uznana za stosunkowo niegroźne dla rozwoju zarodka i płodu. Wiedza na temat potencjału teratogenego różnorodnych związków może zostać wykorzystana do zapobiegania lub ograniczenia narażenia płodu w czasie ciąży. Wiele kobiet wyraża generalny pogląd, że użycie jakichkolwiek leków w ciąży może zaszkodzić dziecku. Taka opinia skutkować może decyzją o zakończeniu chcianej ciąży bądź odstawieniu koniecznej terapii na czas trwania ciąży. Dogłębna analiza, obejmująca ocenę ryzyka narażenia płodu na szkodliwe substancje, jak również krytycznego momentu tego narażenia w trakcie ciąży, pozwala na racjonalizację indywidualnego procesu leczenia (Koda-Kimble, Young, 2008).

2.3.1.1. Losy leków w układzie maczyno – płodowo – łożyskowym

Obecnie większość lekarzy ogranicza ilość leków przepisywanych ciężarnym pacjentkom i zaleca im powstrzymanie się od stosowania preparatów z tzw. grupy OTC (z angielskiego Over The Counter), dostępnych bez recepty. Ponieważ jednak wiele kobiet stosuje leki w czasie ciąży, istotne jest uświadamianie ich w zakresie zagrożeń z tym związanych. Jeśli zażywanie leków jest konieczne w celu utrzymania zdrowia, ich dawka

powinna być dostosowana do potrzeb pacjentki, tak by była efektywna, a zarazem nieszkodliwa dla rozwijającego się płodu (Mathewson Kuhn, 1991).

Zmiany fizjologiczne, zachodzące w organizmie kobiety w czasie ciąży wpływają na wszystkie parametry farmakokinetyczne przyjmowanych substancji. Dotyczy to zarówno absorpcji, dystrybucji, biotransformacji, jak i wydalania. Na podstawie pomiarów powyższych zmian oraz po uwzględnieniu przemian hormonalnych można racjonalnie zindywidualizować dawkowanie.

Absorpcja

Opróżnianie żołądka oraz motoryka żołądkowo-jelitowa ulegają zahamowaniu w czasie ciąży na skutek podwyższonych stężeń progesteronu. Zjawisko to jednak nie wpływa zazwyczaj na opóźnienie i zmniejszenie stopnia wchłaniania leków z przewodu pokarmowego (Mathewson Kuhn, 1991).

Dystrybucja

W czasie ciąży znacznie zwiększa się objętość płynów ustrojowych. Największy przyrost dotyczy płynów zewnątrzkomórkowych. Objętość osocza zwiększa się o 50%, podczas gdy stężenie białek osoczowych spada. Ponieważ większość leków wiąże się z białkami osocza przekłada się to na podwyższenie frakcji wolnej, wywołującej efekt farmakologiczny. Może to skutkować zmianami w objętości dystrybucji i osoczowym stężeniu leku. Największe zmiany dotyczą leków charakteryzujących się niską rozpuszczalnością w tłuszczach, które w dużym stopniu wiążą się z białkami osocza. Takie zjawisko skutkowałoby wydłużeniem biologicznego okresu półtrwania, jednakże w ciąży zwiększa się klirens związany z biotransformacją i wydalaniem. Efektem może być obniżenie całkowitego stężenia leku w osoczu kobiety ciężarnej, co wiąże się z koniecznością monitorowania efektywności terapii (Mathewson Kuhn, 1991).

Biotransformacja

Uważa się, że w czasie ciąży metabolizm wątrobowy ksenobiotyków jest zwiększony, głównie w związku ze stymulacją progesteronową. Istnieją także dowody na podwyższone wydzielanie enzymów metabolizujących leki. Niewielki udział w całkowitym metabolizmie mają również przemiany łożyskowe i zachodzące w wątrobie płodu (Mathewson Kuhn, 1991).

Wydalanie

W przypadku zwiększonego metabolizmu ksenobiotyków dochodzi do podwyższenia klirensu wątrobowego, co w efekcie przyspiesza ich eliminację z ustroju i skraca biologiczny okres półtrwania. Nerkowy przepływ krwi zwiększa się w czasie ciąży niemal dwukrotnie w stosunku do stanu sprzed ciąży. Znacznie wzrastają również współczynnik przesączania kłębuszkowego i klirens kreatyninowy (Mathewson Kuhn, 1991).

W obliczu powyższych faktów oczywista wydaje się konieczność zastosowania zmian w podawaniu leków kobietom ciężarnym. Jednakże dane dotyczące sposobu podania są dostępne dla nielicznych leków. Potrzebne jest poszerzenie badań nad efektywnością leków w ciąży, co jednak wiąże się z problemem etycznym.

2.3.1.2. Transport przezłożyskowy

Efekt działania leku na płód zależy od jego dystrybucji w ustroju. Ksenobiotyk może podlegać dystrybucji ogólnoustrojowej bądź selektywnej. Rodzaj dystrybucji jest istotny w określeniu, czy lek przenika przez barierę łożyskową. Łożysko wykazuje istotną funkcję przepuszczania substancji z ustroju matki do płodu. Najważniejszymi parametrami decydującymi o transporcie przezłożyskowym są właściwości fizykochemiczne substancji, stan fizjologiczny tkanki łożyska oraz maczyne i płodowe krążenie łożyskowe. Do czynników fizykochemicznych charakteryzujących substancję należą: masa molekularna, struktura molekularna, stopień jonizacji, rozpuszczalność w tłuszczach i stopień wiązania z białkami. Leki o masie cząsteczkowej mniejszej niż 600 z łatwością przenikają przez łożysko. Im wyższy jest stopień jonizacji leku, tym mniejsze prawdopodobieństwo, że przenikną barierę. Podobnie zachowują się substancje, które w dużym stopniu wiążą się z białkami osocza matki. Na transport przezłożyskowy duży wpływ ma także równowaga kwasowo-zasadowa u matki i płodu. Płodowa hipoksja i związana z nią kwasica może wywoływać u płodu akumulację ksenobiotyków o charakterze zasadowym. Łożysko charakteryzuje ponadto zdolność metabolizowania substancji, zarówno do związków mniej, jak i bardziej aktywnych. Ta cecha jest istotna w planowaniu terapii, w zależności czy planowany efekt ma zostać wywołany u matki czy u płodu, a także w celu uniknięcia działań niepożądanych. Związki, które ulegają aktywacji podczas metabolizmu łożyskowego mogą pojawiać się w stężeniach toksycznych w ustroju płodu. Stopień przenikania przez barierę

łożyskową zależy także od krążenia maciczo-łożyskowego. Przepływ krwi zmniejsza się przed porodem lub w wyniku określonych dolegliwości, takich jak stan przedrzucawkowy, nadciśnienie lub cukrzyca. Podczas skurczów macicy przepływ krwi zostaje ograniczony, co może skutkować zatrzymaniem i kumulacją leków w organizmie płodu. Jest to związane z niemożnością powrotu substancji przez łożysko do krążenia matczyne.

Kilka czynników może wywołać efekty uboczne działania leków u płodu: rodzaj leku, ilość leku, współczynnik eliminacji, dystrybucja w tkankach płodu, wiek płodowy czy działanie specyficznych receptorów w organizmie płodu. W pierwszym trymestrze ksenobiotyki mogą w znaczący sposób wpływać na rozwój płodu. Stopień toksyczności i wielkość efektów teratogennych jest różna na poszczególnych etapach ciąży. Od momentu zapłodnienia do implantacji obserwuje się szereg możliwych skutków działania leków, począwszy od uszkodzeń – które rozwijający się zarodek potrafi naprawiać i minimalizować – aż po śmierć embrionalną i aborcję ciąży. Okres organogenezy to czas, w którym mogą wystąpić największe malformacje. Układ moczopłciowy i podniebienie są najbardziej wrażliwe na szkodliwe działanie ksenobiotyków po 36 dniu ciąży. W okresie płodowym czynniki teratogenne wpływają na komórki wywołując ich śmierć, spowolnienie wzrostu lub zahamowanie dyferencjacji. Po 8 tygodniu ciąży mózg płodu rozwija się bardzo intensywnie i jest niezwykle wrażliwy na szkodliwe działanie teratogenów. Po pierwszym trymestrze leki nie powodują poważnych nieprawidłowości strukturalnych, lecz mogą w istotny sposób zaburzać wzrost i rozwój funkcjonalny płodu lub prowadzić do jego intoksykacji.

Wiele substancji chemicznych przenika z łatwością z krwi matki do płynu owodniowego. Jednym z najszerzej omawianych związków w tej grupie jest alkohol etylowy. Bardzo szybko przechodzi on barierę łożyskową i szybko osiąga w płynie owodniowym takie stężenie jak we krwi matki. Dwukrotnie dłuższy jest jednak jego czas biotransformacji i eliminacji z tego środowiska. Podobnie zachowuje się wiele leków, które zażywa matka. Istotnym czynnikiem warunkującym ich dystrybucję w ustroju ciężarnej kobiety i płodu jest m.in. zdolność wiązania się ksenobiotyków z białkami surowicy. Przykładem ilustrującym to zjawisko jest dikloksacylina, która wiąże się z białkami w 98% i pojawia w płynie owodniowym po 2 godzinach od momentu podania dożylnego kobiecie ciężarnej. Obserwacje te mają duże znaczenie kliniczne i terapeutyczne, co podkreśla praktyczny aspekt analizy biomarkerów ekspozycji na substancje obce w okresie ciąży (Czajka, 2005).

Leki przenikają przez łożysko drogą dyfuzji biernej, transportu ułatwionego, transportu aktywnego i pinocytozy. Część leków nie przenika tej bariery.

1. Dyfuzja bierna – jest najczęstszym mechanizmem transportu leków przez łożysko i polega na przenikaniu leków z miejsca o wyższym stężeniu substancji do miejsca o niższym stężeniu. Ten rodzaj transportu nie wymaga energii.
2. Transport ułatwiony – odbywa się w kierunku obniżania się potencjału elektrochemicznego. Jest to możliwe po połączeniu się cząstek leku z nośnikiem stanowiącym część bariery łożyskowej. Zgodnie z tą regułą transportowane są glukoza i inne cukry proste. Ten rodzaj transportu również nie wymaga energii.
3. Transport aktywny – odbywa się w kierunku przeciwnym do gradientu elektrochemicznego i wymaga energii. Tą drogą przenoszone są aminokwasy i niektóre jony.
4. Pinocytoza – po wglębieniu się fragmentu błony komórkowej i objęciu nią określonej liczby cząsteczek substancji transportowanej, błona zamyka się i tworzy pęcherzyk przesuwający się przez cytoplazmę komórki do przeciwległego jej bieguna. Po połączeniu z błoną komórkową pęcherzyk uwalnia substancję.
5. Transport przez błony płodowe pozałożyskowe – za wybiórczość i wielkość tego transportu odpowiada owodnia. Większość leków podawanych matce przechodzi do płynu owodniowego. Z płynu owodniowego ksenobiotyki przenikają do płodu w rezultacie połknięcia oraz przez płuca i naskórek płodu.

W obrębie układu maczyno – płodowo – łożyskowego dystrybucja leków zachodzi wielokierunkowo: płód swobodnie wydala lek do płynu owodniowego, reabsorbuje go ponownie lub lek powraca do krwioobiegu matki (Czajka, 2005).

Aktywność terapeutyczna i toksyczność leku działającego na płód jest modyfikowana przez metabolizm ustroju matki, łożysko i płód. W czasie ciąży organizm matki podlega głębokim przemianom, takim jak stopniowy wzrost objętości wody całkowitej i krwi krążącej, co skutkuje zmniejszeniem stężenia białek surowicy. Jedynie leki niezwiązane z białkami przenikają przez łożysko. We krwi płodu krąży znacznie więcej niezwiązanego leku niż we krwi matki, gdyż prawdopodobnie białka osocza płodu mają mniejszą zdolność wiązania substancji egzogennych. Metabolizm leku w łożysku i błonach płodowych odgrywa ważny wpływ na aktywność terapeutyczną substancji i efekt toksyczny na płód. łożysko może syntezować i transportować substancje endogenne i egzogenne docierające z krążenia maczynego. Podczas procesów zachodzących w łożysku może dojść do dwóch rodzajów przemian – aktywność środków farmakologicznych może zostać zahamowana lub zniesiona,

bądź zwiększona. Do bioaktywacji dochodzi zazwyczaj podczas procesów utleniania, które jednak zachodzą w łożysku w niewielkim stopniu. Natomiast dezaktywacja następuje na drodze sprzęgania z glutationem, glicyną, glukuronidacji, sulfhydrylacji, acetylacji albo metylacji. Stężenie enzymów katalizujących te procesy w łożysku jest niskie lub brak ich zupełnie (np. enzymów uczestniczących w glukuronidacji), co skutkuje znikomą rolą tego organu w obniżaniu aktywności toksycznej ksenobiotyków. Środki farmakologiczne, które przenikają do płodu osiągają 50-100% stężenia występującego w surowicy krwi matki. Podstawową rolę w metabolizmie leków odgrywa wątroba płodu, lecz procesy w niej zachodzące charakteryzuje mniejsze nasilenie niż u matki, co w konsekwencji prowadzi do przedłużenia działania leków na płód (Czajka, 2005).

2.3.1.3. Wpływ leków na rozwój płodu

Nieprawidłowości powstające w okresie życia wewnątrzmacicznego mogą mieć różną etiologię i patogenezę. Ksenobiotyki mogą wywołać szereg działań niepożądanych u rozwijającego się dziecka, w tym zaburzenia morfologiczne wewnętrzne i zewnętrzne. W zależności od rozległości wady można podzielić na trzy kategorie (Tabela 5).

Faza rozwojowa, w której wystąpiło działanie teratogenne warunkuje rodzaj uszkodzenia tkanek zarodka i płodu. Wyróżnia się zatem genopatie, blastopatie, embriopatie oraz fetopatie. Farmakologiczne uszkodzenie płodu może wystąpić w jednym z trzech okresów rozwojowych, czyli przedimplantacyjnym, zarodkowym – organogenezy i okresie płodowym. Oprócz czasu wystąpienia ekspozycji, wpływ na toksyczne działanie na zarodek i płód wywiera wielkość dawki środka farmakologicznego i wrodzone predyspozycje. Niektóre leki oddziałują bezpośrednio na zarodek, doprowadzając nawet do jego obumarcia. W innych przypadkach szkodliwość substancji wynika z niedojrzałości układów enzymatycznych płodu lub ich zaburzenia przez same ksenobiotyki. Do najbardziej niebezpiecznych dla rozwoju prenatalnego środków farmakologicznych zaliczyć należy te, których wysoka specyficzność uszkodzania tkanek i narządów płodu została wykazana w badaniach teratogenności u kilku gatunków zwierząt doświadczalnych. Ponieważ badania takie nie są w pełni przekonujące w stosunku do człowieka, źródłem cennych informacji są również epidemiologiczne badania retro- i prospektywne, w których zaobserwowano związek między zastosowaniem leku a wystąpieniem deformacji u noworodków (Czajka, 2005).

TABELA 5. Podział wad rozwojowych występujących u płodu

Źródło: Czajka, 2005

WADY ROZWOJOWE PŁODU	
CIEŻKIE WADY ROZWOJOWE	defekty rozwoju deformujące cały organizm w stopniu uniemożliwiającym rozpoznanie zasadniczych cech ludzkiego fenotypu
MALFORMACJE	zmiany morfologiczne jednego lub więcej narządów lub całego ciała zarodka, przekraczające zmienności osobnicze w obrębie rodzaju
ANOMALIE I NIEPRAWIDŁOWOŚCI	morfologiczne odchylenia od powszechnie przyjętej normy, przy zachowanej prawidłowej czynności poszczególnych narządów

2.3.1.4. System klasyfikacji leków stosowanych w ciąży i laktacji

Istnieje kilka systemów klasyfikacji ryzyka działania leków na płód opracowanych w różnych krajach, które zostały oparte na badaniach klinicznych i eksperymentalnych. Najbardziej znaną i uznaną klasyfikacją jest ta obowiązująca od 1979 r. w Stanach Zjednoczonych, ustanowiona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (z angielskiego Food and Drug Administration, FDA) na wzór wprowadzonego rok wcześniej systemu szwedzkiego. Wiele krajów zaadaptowało ją z niewielkimi zmianami. W Polsce nie opracowano jeszcze jednolitej klasyfikacji ryzyka teratogenności działania leków na płód (Czajka, 2005). Ciąża to okres w życiu kobiety, w którym powinna unikać, o ile to tylko możliwe, przyjmowania leków. System klasyfikacji leków FDA zawierający wskazówki terapeutyczne oparte na potencjalnym zysku i ryzyku dla płodu dzieli leki na kategorie A, B, C, D i X (Tabela 6). W pierwszej z nich – grupie A – znajdują się leki, które w badaniach na ciężarnych kobietach nie stanowiły zagrożenia dla płodu. Grupa B wskazuje, że podczas

badania na zwierzętach lek określono jako bezpieczny dla płodu, lecz brak jest takich badań na ludziach. Do grupy C zaliczono leki, których stosowanie u kobiet ciężarnych jest możliwe i uzasadnione wyłącznie wtedy, gdy potencjalne korzyści przeważają nad ryzykiem dla płodu, udowodnionym w badaniach na zwierzętach. W grupie D znajdują się leki, które mają udokumentowane negatywne działanie na płód ludzki. Substancje te mogą być stosowane w wyjątkowych sytuacjach, takich jak stan zagrożenia życia lub choroba, której nie można leczyć żadnym innym, bezpieczniejszym lekiem. Leki, których udowodnione szkodliwe działanie na płód przewyższa jakiegokolwiek korzyści, takie jak Talidomid, należą do Kategorii X. Leków z kategorii X nie powinny natomiast zażywać kobiety, u których istnieje prawdopodobieństwo zajścia w ciążę (Food and Drug Administration, 2008).

TABELA 6. System klasyfikacji leków stosowanych w ciąży Agencji ds. Żywności i Leków (FDA)

Źródło: na podstawie Food and Drug Administration, 2008

KATEGORIA	OPIS DZIAŁANIA SZKODLIWEGO NA PŁÓD
KATEGORIA A	Leki, które w badaniach na zwierzętach oraz w odpowiednio liczonych i kontrolowanych obserwacjach u ludzi nie wykazały działania szkodliwego dla płodu, lek może być stosowany bez przeszkód w czasie ciąży.
KATEGORIA B	To grupa leków, w której badania na zwierzętach wykazały szkodliwe działanie na płód, chociaż obserwacje u ludzi nie wykazują zagrożeń dla płodu ludzkiego. Takie leki mogą być stosowane w ciąży tylko w wypadku zdecydowanej konieczności.

KATEGORIA C	Leki te w badaniach na zwierzętach wykazały szkodliwość dla płodu, bądź też takich badań nie wykonano oraz brak jest odpowiednio wiarygodnych danych z obserwacji stosowania tego leku u ludzi. Lek z tej grupy można zastosować w przebiegu ciąży jedynie wtedy, gdy w opinii lekarza spodziewana korzyść dla matki przewyższa potencjalne ryzyko dla płodu.
KATEGORIA D	To leki, o których wiadomo na podstawie wcześniejszych obserwacji, że wskazują na zagrożenie dla płodu. Stosowanie takiego leku podczas ciąży jest dopuszczone jedynie w sytuacji, gdy jest to bezwzględnie konieczne ze względu na dobro matki, a podanie bezpieczniejszego alternatywnego leku jest niemożliwe lub przeciwwskazane.
KATEGORIA X	To grupa leków, o których niewątpliwie wiadomo, że stanowią bezpośrednie zagrożenie dla płodu. Takie leki są bezwzględnie niedopuszczone do stosowania podczas ciąży.

Obiektem szczególnej uwagi są matki zażywające narkotyki, palące tytoń, pijące alkohol i nadużywające leków w czasie ciąży, gdyż ich nałóg jest wyjątkowo niebezpieczny dla zdrowia i życia dzieci. Płód, a następnie noworodek jest w oczywisty sposób uzależniony od decyzji matki, także w kwestii korzystania z używek. W profilaktyce uzależnień lub ustaleniu terapii kobiet ciężarnych niezbędne jest wyznaczenie zależności pomiędzy wielkością narażenia na ksenobiotyk a efektami zdrowotnymi u płodu i noworodka.

Należy wziąć pod uwagę, że żadne badania nie mogą wykluczyć ryzyka dla zdrowia płodu, stąd leki powinny być przepisywane i zażywane w czasie ciąży, gdy jest to absolutnie konieczne i po ustaleniu potencjalnych następstw dla płodu. Ze względu na aspekt etyczny

badania dotyczących wpływu leków na płód informacje na temat teratogennego działania substancji pochodzą głównie z badań retrospektywnych (Mathewson Kuhn, 1991).

TABELA 7. Przykłady powszechnie stosowanych benzodiazepin i ich klasyfikacja bezpieczeństwa wg FDA

Źródło: na podstawie informacji o leku dostarczanych przez producentów w ulotkach dla pacjenta

NAZWA LEKU	KATEGORIA
diazepam, lorazepam, nitrazepam, oksazepam, chlordiazepoksyd	KATEGORIA D
estazolam, klobazam i temazepam	KATEGORIA X

Benzodiazepiny stosowane w czasie ciąży przenikają przez barierę łożyskową. Jako leki zakwalifikowane przez FDA do grup D i X, nie powinny być stosowane w ciąży (zwłaszcza w pierwszym trymestrze), ponieważ ryzyko wystąpienia wad wrodzonych przewyższa potencjalne korzyści terapeutyczne (Tabela 7). Wczesne doniesienia wskazywały, że diazepam był odpowiedzialny za różnorodne wady wrodzone, w tym rozszczep wargi i/lub podniebienia, deformacje członków i palców, lecz późniejsze badania tego nie potwierdziły. Dostępne dane świadczą o tym, że zażywanie benzodiazepin w pierwszym trymestrze ciąży zwiększa ryzyko wystąpienia rozszczepu w obrębie twarzoczaszki 2,4-krotnie. Alprazolam i lorazepam nie wykazały efektu teratogennego, ale zawsze słusznym jest unikanie leków w pierwszym trymestrze ciąży, o ile to tylko możliwe (Koda-Kimble, Young, 2008). Przewlekłe zażywanie tych leków przez ciężarną może skutkować wystąpieniem uzależnienia fizycznego u noworodka i w konsekwencji zespołem odstawienia. Z kolei przyjmowanie benzodiazepin w okresie kilku ostatnich tygodni przed rozwiązaniem związane jest z ryzykiem wystąpienia depresji ośrodkowego układu nerwowego u noworodka. Ich działanie teratogenne objawia się zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia rozszczepu

podniebienia. Podane przed porodem mogą być przyczyną zaburzeń oddychania dziecka. Jeżeli matka zażywa je w późnym okresie ciąży, mogą powodować komplikacje u niemowlęcia. Zarówno u płodu, jak i noworodka, benzodiazepiny są metabolizowane bardzo powoli, co prowadzi do ich kumulacji we krwi utrzymującej się nawet 2 tygodnie po przyjściu na świat. Rezultatem może być zespół słabości mięśniowej, nadmiernego uspokojenia, nieumiejętności ssania. Z kolei po tym czasie, może rozwinąć się zespół odstawienia z nadpobudliwością, płaczem i bezsennością. Ich chroniczne zażywanie przez matkę w ciąży może zakłócić wewnątrzmaciczny rozwój płodu i opóźnić rozwój mózgu. Istnieją obawy, że dzieci takie w późniejszym życiu mogą być podatne na zaburzenia skupienia uwagi, nadpobudliwość, trudności w nauce, i całe spektrum zaburzeń autystycznych. Przed podjęciem terapii kobiety ciężarnej lekami z tej grupy należy przeprowadzić bilans ryzyka i potencjalnych korzyści – bowiem zarówno choroba matki, jak i przenikające przez łożysko oraz do mleka wszystkie główne grupy leków psychotropowych stanowią zagrożenie dla dziecka (Mathewson Kuhn, 1991).

2.3.2. Zaburzenia ciąży leczone benzodiazepinami

2.3.2.1. Zaburzenia lękowe

W przypadku pacjentek cierpiących na zespół lęku uogólnionego całkowite odstawienie leku jest niekiedy niemożliwe. Wtedy lekiem z wyboru jest alprazolam bądź lorazepam i może być stosowany bardziej bezpiecznie w drugim i trzecim trymestrze, w małych dawkach jednorazowych bądź wielokrotnych. Długotrwałe terapie dużymi dawkami leków długo działających są niedopuszczalne ze względu na kumulację leku w ustroju płodu. Raporty okołoporodowe noworodków, których matki przyjmowały benzodiazepiny w czasie ciąży zawierają informacje na temat symptomów zespołu odstawienia, sedacji, słabości mięśniowej, hipotonii, bezdechu, niedożywienia i zaburzeń termoregulacji (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 2000). Jako, że ciążę bywają niezaplanowane może zaistnieć sytuacja kliniczna nieoczekiwanej ciąży u pacjentki, która jest w trakcie terapii benzodiazepinowej. Standardowym postępowaniem jest wtedy natychmiastowe odstawienie wszystkich leków. Jednakże nagłe przerwanie długotrwałego leczenia może być szkodliwe zarówno dla matki, jak i dziecka, ze względu na prawdopodobieństwo wystąpienia syndromu odstawienia. Dawki powinny być zatem

zmniejszone do koniecznego minimum, aż do całkowitego zakończenia terapii. Okres poporodowy jest czasem podwyższonego ryzyka ze względu na prawdopodobieństwo powrotu zaburzeń lękowych, stąd matki muszą pozostać pod stałą obserwacją pod kątem symptomów nawrotu (Altshuler et al., 1998). Benzodiazepiny przenikają również łatwo do mleka matki i z tego powodu są odradzane w okresie laktacji (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 2001).

2.3.2.2. Nadciśnienie i stan przedrzucawkowy

Choroba nadciśnieniowa występuje u 5-10% ciężarnych pacjentek i stanowi główną przyczynę śmiertelności matczynej i okołoporodowej (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000). Od 15 do 24% zgonów kobiet ciężarnych w krajach rozwiniętych przypisuje się komplikacjom nadciśnieniowym (Wildman, Bouvier-Colle, 2004; Chang et al., 2003). Nadciśnienie w ciąży definiuje się poprzez wartość systolicznego (skurczowego) ciśnienia krwi przewyższającą 140 mm Hg oraz diastolicznego (rozkurczowego) przekraczającą 90 mm Hg, potwierdzonych podczas dwóch odrębnych pomiarów (w odstępie przynajmniej 6-godzinnym). Nadciśnienie związane z ciążą można podzielić na kilka kategorii: przewlekłe nadciśnienie, stan przedrzucawkowy-rzucawka, stan przedrzucawkowy nakładający się na nadciśnienie przewlekłe i nadciśnienie ciążowe (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000). Jeśli stan przedrzucawkowy nie wystąpi podczas porodu, a ciśnienie krwi unormuje się w ciągu 12 tygodni po porodzie, nadciśnienie ciążowe jest ostatecznie określone jako przejściowe nadciśnienie ciążowe. Jeśli zaś ciśnienie krwi będzie nadal podwyższone – choroba kwalifikowana jest jako przewlekłe nadciśnienie (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000). Przewlekłe nadciśnienie to nadciśnienie stwierdzone przed zapłodnieniem lub przed 20 tygodniem ciąży, a także takie, które utrzymuje się ponad 12 tygodni po porodzie. Warto także podkreślić, że kobiety z nadciśnieniem przewlekłym często mają normalne wartości ciśnienia krwi w pierwszej połowie ciąży, co wynika z fizjologicznego spadku ciśnienia w drugim trymestrze ciąży. Ciśnienie zazwyczaj osiąga ponownie wartości sprzed okresu ciąży w trzecim trymestrze (ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, 2001). Nadciśnienie zaobserwowane po 20 tygodniu ciąży może być

trudne do zdeterminowania, zwłaszcza gdy kobieta nie była pod właściwą opieką prenatalną obejmującą kontrolę ciśnienia krwi.

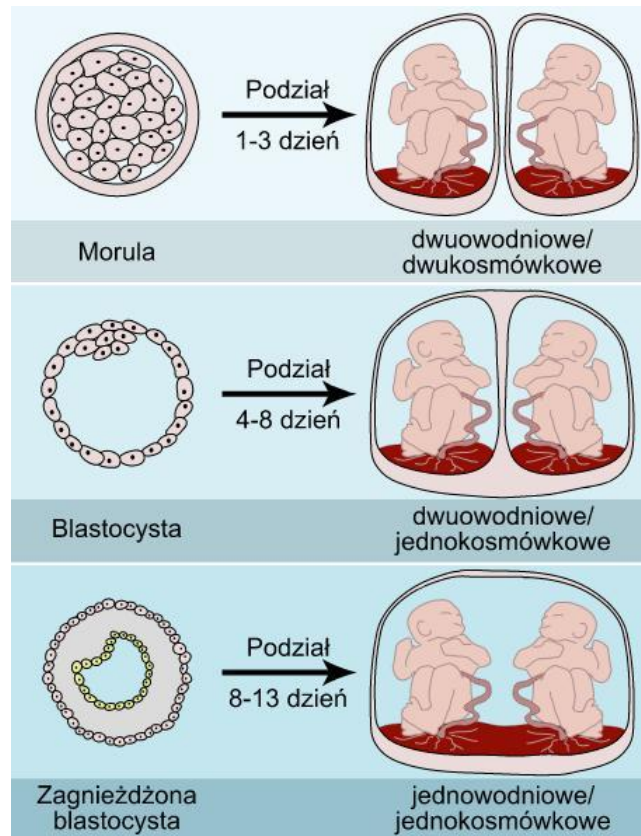
Stan przedrzucawkowy jest to zespół objawów chorobowych specyficznych dla okresu ciąży, występujący najczęściej po 20 tygodniu, na który składa się nadciśnienie i białkomocz. Oznaki mogą zaburzać pracę wielu układów organizmu (np. nerek, wątroby, krążenia, ośrodkowego układu nerwowego), są nieprzewidywalne i niejednokrotnie są mylnie diagnozowane jako inne schorzenia. Ponieważ obrzęki pojawiają się powszechnie w ciąży o normalnym przebiegu nie są obecnie uznawane za kryterium diagnostyczne stanu przedrzucawkowego. Stan przedrzucawkowy jest rezultatem postępującej dysfunkcji komórek śródbłonna maciczno-łożyskowego, wzmożonej agregacji płytkowej oraz utraty regulacji czynności naczyń krwionośnych (Lockwood, Paidas, 2000). Odmianą stanu przedrzucawkowego jest zespół HELLP obejmujący następujące objawy: niedokrwistość hemolityczną, podwyższony poziom enzymów wątrobowych i małopłytkowość. Litery zaczerpnięte z angielskich nazw kolejnych symptomów tworzą akronim – “hemolysis” (H), “elevated liver enzymes” (EL) oraz “low platelet count” (LP). Zespół ten również może zagrażać życiu, mimo że często ciśnienie krwi jest tylko nieznacznie podwyższone, a białkomocz niewielki (ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, 2002). W sytuacji, gdy u kobiety ciężarnej ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym wystąpią napady drgawkowe dochodzi do rzucawki. Pacjentka może nieoczekiwanie w ciągu kilku dni, a nawet godzin przejść z łagodnej do ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego, a następnie do rzucawki. Rzucawka to powikłanie stanu przedrzucawkowego, któremu potencjalnie można zapobiegać. Około 20% kobiet, u których dochodzi do rzucawki ma ciśnienie krwi poniżej 90 mm Hg lub nie wykazuje proteinurii (Sibai, 1996). Określenie „nadciśnienie ciążowe” stosuje się, gdy ciśnienie krwi jest podwyższone w czasie ciąży lub w ciągu 24 godzin po porodzie u pacjentki, która nie miała objawów stanu przedrzucawkowego i uprzednio stwierdzonego nadciśnienia tętniczego (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000). Należy mieć na uwadze, że pacjentkę taką charakteryzuje podwyższone ryzyko nawrotu choroby podczas kolejnej ciąży. Stan przedrzucawkowy występuje najczęściej w czasie pierwszej ciąży (2/3 przypadków). Czynnikiem ryzyka są otyłość, stan przedrzucawkowy w wywiadzie rodzinnym (u siostry lub matki) oraz bardziej zaawansowany wiek matki (Roberts, Funai, 2009). Również choroby przewlekłe, takie jak cukrzyca, insulinooporność oraz choroby nerek mogą podwyższać ryzyko stanu przedrzucawkowego. Czynniki ryzyka

powiązane z ciążą obejmują infekcje dróg moczowych, ciążę mnogą, określone nieprawidłowości chromosomowe płodu i zaśnied groniasty (niezłśliwa postać ciążowej choroby trofoblastycznej) (Koda-Kimble, Young, 2008).

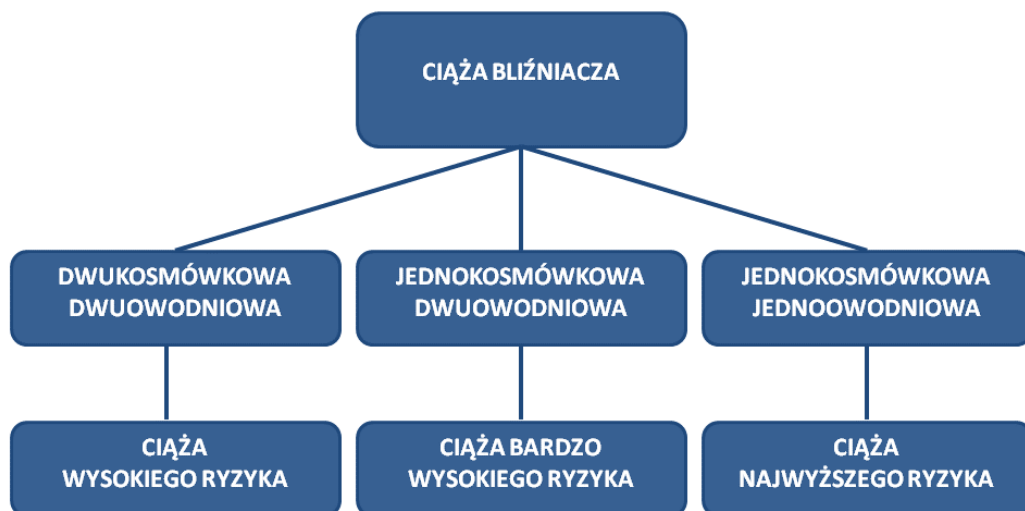
2.3.3. Cięża wielopłodowa

Ciąża wielopłodowa charakteryzuje się jednoczesnym rozwojem w jamie macicy dwóch lub większej liczby płodów. W zależności od liczby rozwijających się płodów wyróżnia się ciążę bliźniaczą (dwojaczą, z łaciny – *graviditas gemellaris s. bigeminalis*), trojaczą itd. Najczęstszą postacią ciąży wielopłodowej u człowieka jest ciąża bliźniacza. Płody rozwijające się w wyniku zapłodnienia oddzielnych komórek jajowych przez dwa osobne plemniki są różne genetycznie i stanowią bliźnięta dwujajowe (inaczej dwuzygotyczne). Bliźniaki takie są do siebie fizycznie podobne jak rodzeństwo urodzone w tej samej rodzinie, a nie identyczne. Natomiast w wyniku podziału pierwotnie pojedynczej zygoty powstałej na skutek zapłodnienia jednej komórki jajowej przez jeden plemnik może dojść do wytworzenia dwóch identycznych genetycznie struktur embrionalnych. Podział taki następuje ok. dwa tygodnie po zapłodnieniu. Bliźnięta te określa się jako jednojajowe (jednozygotyczne) i są one zawsze jednopłciowe. Przyjmuje się, że w Polsce częstość tego typu ciąż stanowi około 0,4% ogółu porodów, zaś dwuzygotycznych – 1% i jest ona uzależniona od wielu czynników (np. rasy kobiety, wieku matki, predyspozycji genetycznych i innych) (Malinowski, 2005).

W ciążach bliźniaczych można wyróżnić trzy rodzaje łożysk: dwa oddzielne dyski łożysk, łożyska podwójne – ale złączone ze sobą oraz pojedynczy dysk łożyska. Ponadto możliwe jest różnorodne wykształcenie błon płodowych: dwie kosmówki i dwie owodnie, jedna kosmówka i dwie owodnie lub jedna kosmówka i jedna owodnia (Rycina 37, Rycina 38):



RYCINA 37. Różne typy kosmówki i owodni w ciąży bliźniaczej monozygotycznej, rozwijające się w zależności od czasu podziału zapłodnionej komórki jajowej
 Źródło: na podstawie <http://commons.wikimedia.org>, data wejścia: 10.06.2012



RYCINA 38. Ryzyko związane z rodzajem ciąży bliźniaczej
 Źródło: Poręba, Poręba, 2003

1. łożyska dwukosmówkowe, dwuowodniowe - występują u wszystkich bliźniąt dwujajowych, a także u ok. 13% jednojajowych (podział pojedynczej zygoty następuje w tym wypadku w okresie przedimplantacyjnym – poniżej 4 dni po zapłodnieniu). Jeśli blastocysty zagnieżdżą się obok siebie dyski łożysk mogą być ze sobą złączone, natomiast gdy implantacja nastąpi w oddalonych od siebie rejonach macicy powstają rozdzielone dyski łożysk (Malinowski, 2005)
2. łożyska jednokosmówkowe występują wyłącznie w ciążach jednojajowych. Dysk łożyska jest wtedy zawsze pojedynczy. W zależności od czasu podziału zapłodnionej komórki pierwotnie pojedynczej wytwarzają się różne formy błon płodowych. Ciąża jednokosmówkowa i zarazem dwuowodniowa (czyli 85% przypadków) powstaje między 4. a 7. dniem od zapłodnienia. Jeśli do podziału dochodzi po tygodniu powstaje najrzadsza postać ciąży bliźniaczej, czyli jednokosmówkowa, jednoowodniowa (1-2% przypadków wszystkich ciąż bliźniaczych, 3-4% jednokosmówkowych) (Malinowski, 2005).

3. CEL PRACY

W zależności od rodzaju materiału biologicznego użytego w badaniach otrzymuje się informację o narażeniu organizmu na ksenobiotyk w różnych okresach czasu. Szczególne znaczenie ma informacja o okresie prenatalnym.

W pracy wykorzystano pomiar benzodiazepin we włosach matek i ich noworodków narażonych prenatalnie na lek z tej grupy. Benzodiazepiny wbudowują się w strukturę włosa. W odróżnieniu od badania płynów ustrojowych, w których leki ulegają szybkiemu metabolizowaniu i wydaleniu, analiza włosów dostarcza informacji na temat bliskiej lub odległej historii przyjmowania leku przez matkę.

Opracowanie, walidacja i określenie funkcjonalności metody oznaczania benzodiazepin u ciężarnych i ich noworodków umożliwi ustalenie okresu narażenia, związanego z tym ryzyka zdrowotnego dla dziecka i wdrożenia odpowiedniego postępowania terapeutycznego.

Celem pracy była ocena narażenia na benzodiazepiny noworodków, których matki przyjmowały w różnych okresach ciąży leki z tej grupy. W realizacji celu pracy wykorzystano innowacyjną metodę analizy alternatywnego materiału biologicznego – włosów, pobranych zarówno od matek, jak i noworodków. Ocenę przeprowadzono po ustaleniu, w jakim momencie ciąży pacjentka zażywała benzodiazepinę, a także jakie substancje farmakologicznie czynne z grupy benzodiazepin pojawiły się u płodu. Zadaniem badawczym było porównanie stopnia narażenia noworodka względem matki, a także – w przypadku ciąży mnogich – porównanie stopnia ekspozycji obojga noworodków.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Materiał i metody

4.1.1. Grupa badana

W latach 2008-2010 przeprowadzono badania wśród ciężarnych pacjentek Oddziału Porodowego Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, które w okresie ciąży przyjmowały leki z grupy benzodiazepin. 62 zakwalifikowane do projektu pacjentki były w ciąży pojedynczej, a 33 – ciąży bliźniaczej. Badaniami objęto również ich noworodki – 62 z ciąży pojedynczej oraz 66 bliźniąt z ciąży mnogiej. Ponadto o wstępnej selekcji ochotniczek decydowała długość i kondycja włosów.

Zgodę na przeprowadzenie badań wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (zgoda nr 387/08 w dniu 03.04.2008 r.). Udział w badaniach był dobrowolny, a pacjentki wypełniały formularz świadomej zgody na udział w badaniach w obecności świadka, do którego dołączona była informacja opisująca celowość i przebieg badań. Dodatkowo pacjentki odpowiadały na cztery pytania zawarte w kwestionariuszu ankiety, które dotyczyły stosowania leków z grupy benzodiazepin. Udzielając odpowiedzi na pierwsze pytanie pacjentka potwierdzała stosowanie leku z grupy benzodiazepin, a następnie określała precyzyjnie rodzaj preparatu farmakologicznego. W odpowiedzi na trzecie i czwarte pytanie należało opisać schemat dawkowania leku.

4.1.2. Materiał biologiczny do badań

Materiałem biologicznym do badań były włosy matek i ich noworodków. Włosy pobierano metodą nieinwazyjną w ciągu doby po porodzie. Wybierano kosmyki włosów z rejonu szczytowego głowy, o orientacyjnej grubości zapalki, około 100 mg (w przypadku noworodków pobierano możliwie największą ilość włosów, optymalnie od 30 do 50 mg). Włosy matek były związywane niebarwioną nitką w celu wyrównania i oznaczenia końców proksymalnych (bliższych powierzchni skóry) i przycinane prostopadle do powierzchni i jak najbliżej skóry, jednym cięciem naostrzonymi nożyczkami. Włosy umieszczano w kopercie

i przechowywano w temperaturze pokojowej w suchym i ciemnym miejscu do momentu oznaczeń. Materiałem odniesienia (referencyjnym) były włosy, które pochodziły z zakładu fryzjerskiego, z obciętego warkocza 9-letniej dziewczynki.

4.1.3. Metodyka oznaczania benzodiazepin we włosach

Benzodiazepiny we włosach oznaczono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (z angielskiego Liquid Chromatography – Coupled Tandem Mass Spectrometry, LC-MS-MS), z użyciem diazepamu deuterowanego d_5 jako wzorca wewnętrznego, po uprzedniej ekstrakcji z wykorzystaniem techniki ciecz-ciecz.

Analizę chromatograficzną wykonano w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie.

Aparatura i sprzęt

- Chromatograf cieczowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies
- Kolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 50 x 4.6 mm
- Rotator Biosan Multi Bio RS-24
- Wirówko-worteks Biosan MSC-6000 MultiSpin
- Dwumodułowy suchy blok grzewczy Rocker seria Sahara 320
- Butla ze sprzężonym azotem
- Blok grzejny model Reacti- Therm Pierce

Odczynniki i roztwory

- Bufor fosforanowy pH=7,4 10-krotnie stężony koncentrat PBS (z angielskiego Phosphate Buffer Saline) - BioReagent
- Alkohol izopropylowy – Sigma-Aldrich
- Dichlorometan (chlorek metylenu) – Sigma-Aldrich
- Eter dietylowy – Sigma-Aldrich

- Wzorce benzodiazepin (diazepam, nordiazepam, oksazepam, temazepam) - LGC Standards Polska
- Diazepam d₅, roztwór 200 ng/ml – Sigma-Aldrich
- Eter diizopropylowy - Merck Darmstadt, Niemcy
- Alkohol izopropylowy - Chempur Piekary Śląskie, Polska
- Chlorek metylenu - Merck Darmstadt, Niemcy
- Acetonitryl - Merck Darmstadt, Niemcy
- Woda do HPLC – Sigma-Aldrich

Procedura przygotowania próbek do analizy

Związane włosy umieszczano w 15 ml probówce polipropylenowej typu Falcon i poddawano myciu przez łagodne wytrzásanie sekwencją następujących rozpuszczalników, za każdym razem dekantując ciecz: bufor fosforanowy pH=7,4 (10 ml) przez 5 minut, alkohol izopropylowy (10 ml) przez 5 minut i dichlorometan (10 ml) przez 5 minut. Włosy suszono na twardej bibule, po czym dokładnie układano i wyrównywano względem miary. Przeprowadzano segmentację włosów matek na 3 cm odcinki odpowiadające kolejnym trymestrom ciąży (3 cm = 1 trymestr). Włosów od dzieci nie segmentowano, tylko pobierano w całości. Odpowiednio oznakowane naczynia reakcyjne typu Eppendorf ważono i przenoszono do nich segmenty rozdrobnione nożyczkami na 0,5-1 mm odcinki. Tak przygotowane próbki były ważone, a masy netto zapisywane. Do włosów dodawano po 400 µl buforu fosforanowego o pH=7,4 (przygotowanego uprzednio z koncentratu PBS), standardu wewnętrznego diazepam d₅, w ilości 20 µl o stężeniu 200 ng/ml (stężenie w przeliczeniu na masę włosów to 400 pg/mg). Inkubowano przez noc w temperaturze 50 °C w suchym bloku grzewczym. Po ostudzeniu dodawano 1,2 ml eteru diizopropylowego i ekstrahowano przez wytrzásanie przez 1 minutę. Odwirowywano próbki i fazę organiczną w ilości 1 ml przenoszono do fiolek szklanych Supelco celem odparowania (40 °C) przy nadmuchu azotu. Sucha pozostałość była rozpuszczana w 50 µl fazy ruchomej, czyli mieszaninie acetonitrylu z wodą (w stosunku 30:70) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego.

Oznaczanie z użyciem metody chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas

Skład i warunki przepływu fazy ruchomej:

- faza A woda + kwas mrówkowy 0,1 ml/100 ml wody
- faza B acetonitryl + kwas mrówkowy 0,1 ml/100 ml acetonitrylu
- przepływ 0,4 ml/min
- ciśnienie minimalne 30 barów

W tabeli 8 przedstawiono zmiany składu fazy ruchomej w czasie (dopełnieniem fazy B była faza A).

TABELA 8. Zmiana składu fazy ruchomej w czasie

CZAS	ZAWARTOŚĆ B %
0 min.	40
3 min.	40
6 min.	80
7 min.	80
8 min.	40
13 min.	40

Walidacja metody

- Specyficzność – dla każdego z wymienionych związków (analitów) zastosowano trzy przejścia trybie monitorowania wybranych fragmentacji (z angielskiego Multiple Reaction Monitoring, MRM), co zapewniało specyficzność metody.
- Liniowość – dla zakresu 10-500 pg/mg przy stężeniu standardu wewnętrznego diazepam d₅ 400 pg/mg współczynniki korelacji krzywych kalibracyjnych wynosiły: diazepam R²=0,999; nordiazepam R²=0,997; oksazepam R²=0,989
- Granica wykrywalności i oznaczalności:
Granica wykrywalności oszacowana na 5 pg/mg na podstawie najsłabszego (najmniej intensywnego) przejścia MRM i wartości S/N (stosunek sygnału do szumu) równej 3.
Granica oznaczalności stanowi najniższe stężenie z krzywych kalibracyjnych 20 pg/mg
- Dokładność i precyzja (Tabela 9)

TABELA 9. Dokładność metody oznaczenia benzodiazepin

SUBSTANCJA	DOKŁADNOŚĆ	PRECYZJA
nordiazepam	108%	CV < 20%
diazepam	111%	CV < 1%
oksazepam	87,5%	CV < 26%

- Wartości stężeń dodanych i obliczonych przedstawiono w tabeli 10.

TABELA 10. Walidacja i dokładność metody oznaczania benzodiazepin

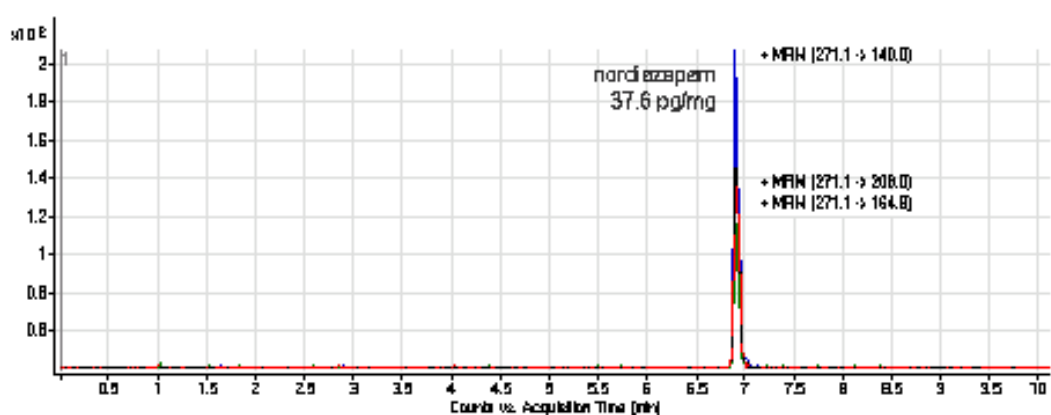
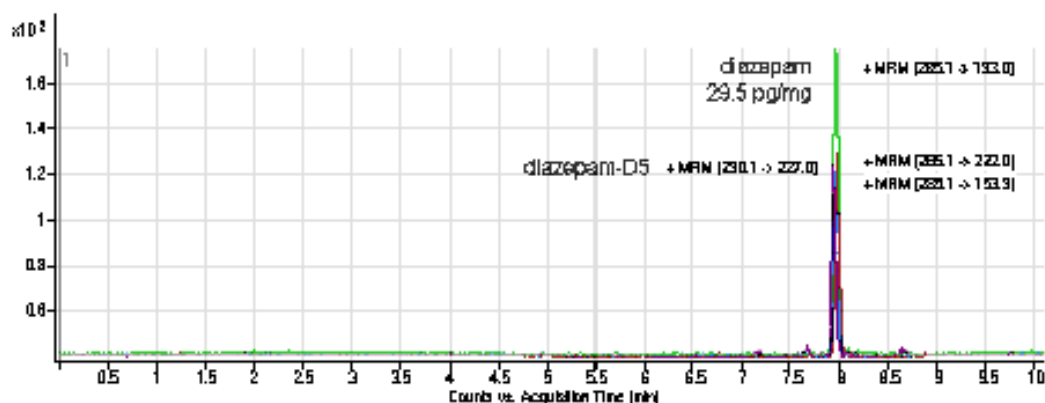
Stężenie dodane [pg/mg]	Stężenie obliczone oksazepam [pg/mg]	Stężenie obliczone nordiazepam [pg/mg]	Stężenie obliczone diazepam [pg/mg]
20	19,8	24,1	22,4
20	20,9	24,2	22,2
20	9,7	14,1	22,4
20	16,9	22,1	22,4
20	20,2	23,4	22,2
50	49,0	57,1	51,4
100	115,1	82,5	88,5
100	103,0	113,5	98,9
100	86,7	93,3	99,3
100	126,6	90,2	101,6
100	82,0	86,2	100,7
200	201,4	203,0	201,4
500	452,0	482,1	491,7
500	480,5	493,0	509,0
500	537,8	514,2	499,4
500	527,2	513,3	500,5

TABELA 11. Precyzja na podstawie analizy materiału pobranego od kobiet przyjmujących Relanium

Średnie stężenie nordiazepamu [pg/mg] n=5	26,3	24,3	23,8
SD	0,843	2,93	0,93
CV	3%	12%	4%

Analiza z użyciem LC-MS/MS została przeprowadzona w trybie monitorowania wybranych fragmentacji (MRM) w trybie pozytywnej jonizacji w polu elektrycznym (z angielskiego electrospray ionization, ESI+) (Rycina 39). Dla każdego analitu za wyjątkiem wzorca wewnętrznego śledzono trzy przejścia jonowe:

- diazepam 285.1-222.0; 285.1-193.0; 285.1-153.9
- nordiazepam 271.1-208.0; 271.1-164.9; 271.1-140.0
- oksazepam 287.1-269.0; 287.1-240.9; 287.1-104.0
- diazepam-d₅ 290.1-227.0; 290.1-198.1
- czas akwizycji jonów dla wszystkich przejść – 80 msec w trybie MRM
- napięcia fragmentora i kolizji: diazepam d₅ – 151 V i 24 V; diazepam – 145 V i 28 V; oksazepam – 95 V i 21 V; nordiazepam – 151 V i 25 V



RYCINA 39. Przykładowy chromatogram przedstawiający oznaczenie benzodiazepin w trybie MRM

4.2. Analiza statystyczna

Wyniki badań poziomu benzodiazepin we włosach matek i noworodków poddano analizie statystycznej z zastosowaniem komputerowego programu Statistica 10 firmy StatSoft. Jako poziom istotności przyjęto $\alpha=0,05$. Wyniki uznano za istotne statystycznie, gdy $p<\alpha$.

Badane wartości opisano średnią arytmetyczną, medianą, odchyleniem standardowym, wartościami minimalnymi, maksymalnymi, kwartylami górnym i dolnym. Parametry wyrażone w skali nominalnej zawarte w ankiecie opisano licznosciami oraz wartościami procentowymi.

Do zbadania rozkładów różnic zmiennych zmierzonych na skali interwałowej, nie posiadających jednak rozkładów zgodnych z rozkładem normalnym, zastosowano testy Wilcoxon oraz Friedmana (w zależności od liczby grup).

Do zbadania zależności pomiędzy zmiennymi zmierzonymi na skali interwałowej, ale nie posiadających rozkładów zgodnych z normalnym, obliczono współczynnik korelacji rangowej RS Spearmana. Do zbadania zgodności rozkładu zmiennej z rozkładem normalnym (przy wystarczających licznosciach) zastosowano 2 testy: Lillieforsa i Shapira-Wilka.

5. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badaniami objęto 62 pacjentki w ciąży pojedynczej i 33 w ciąży bliźniaczej oraz ich noworodki. Wszystkie badane kobiety zażywały w czasie ciąży jeden lek z grupy benzodiazepin – diazepam, preparat handlowy Relanium (w postaci iniekcji i tabletek).

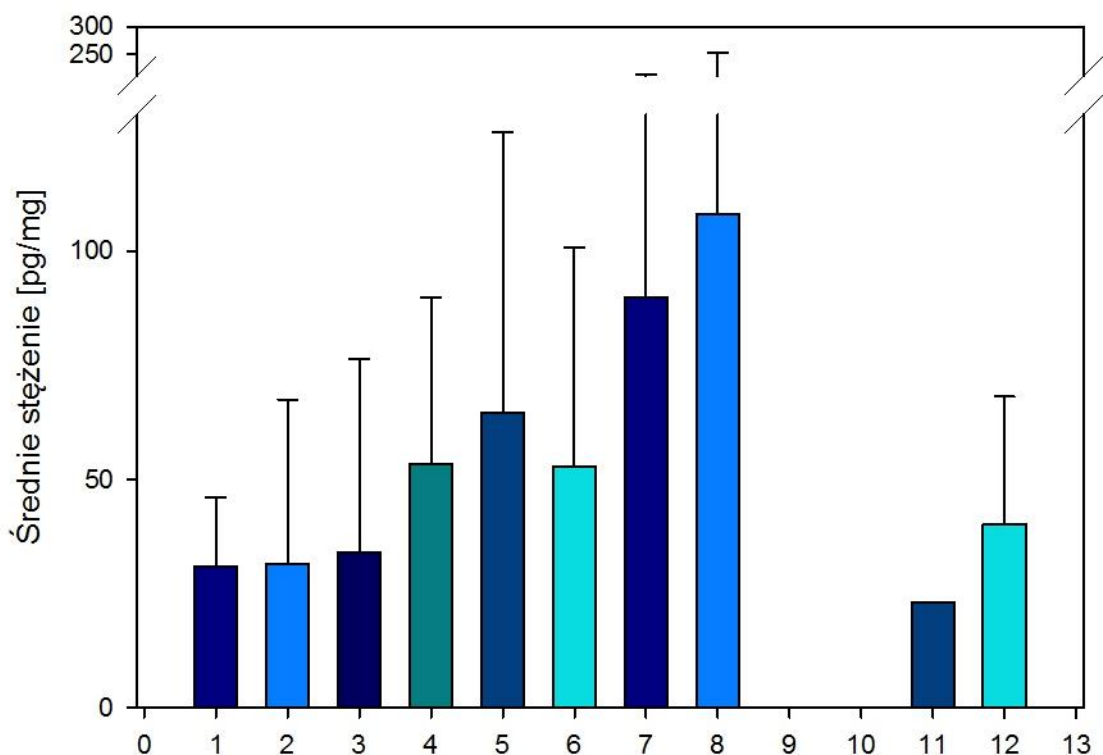
W pobranych próbach biologicznych oznaczono zwalidowaną metodą LC-MS/MS stężenie diazepam oraz jego metabolitów – nordiazepamu i oksazepamu. Dane porównywano pomiędzy grupami matek i noworodków, a także w obrębie poszczególnych trymestrów ciąży. Prezentacja wyników koncentruje się na opisie zmian i zależności zaobserwowanych u matki w III trymestrze ciąży i u noworodków, gdyż zgodnie z obecnymi obawami neonatologów i toksykologów to właśnie ten okres stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia dziecka. Również zastosowanie wybranej matrycy biologicznej jest uzasadnione dla ostatniego trymestru, ponieważ możliwe jest zebranie włosów o odpowiedniej długości od matek oraz wykształconych już włosów noworodka.

5.1. Wyniki dla ciąży pojedynczej

Średnie stężenie poszczególnych substancji z grupy benzodiazepin przedstawiono w tabeli 12, w której uwzględniono ponadto wartości minimum i maksimum danej zmiennej, górne i dolne kwartyle oraz pomiar odchylenia standardowego. Zbiorczo dane te zaprezentowano także na rycinie 40, w której różnice w poziomach związków są łatwe do zaobserwowania.

TABELA 12. Statystyka opisowa otrzymanych wyników w grupie ciąży pojedynczej

Zmienna	N	Średnie stężenie [pg/mg]	Mediana	Minimum [pg/mg]	Maksimum [pg/mg]	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Diazepam w I trymestrze	6	30,8	30,0	13,0	56,0	18,0	38,0	15,3
Diazepam w II trymestrze	12	31,6	22,5	6,0	140,0	13,5	33,5	36,0
Diazepam w III trymestrze	26	34,1	21,5	4,3	205,0	11,0	31,0	42,4
Diazepam u noworodka	13	53,3	42,0	10,0	128,0	34,0	67,0	36,5
Nordiazepam w I trymestrze	4	64,5	47,0	11,0	153,0	26,5	102,5	61,5
Nordiazepam w II trymestrze	16	52,9	39,0	5,0	166,0	22,5	57,5	48,1
Nordiazepam w III trymestrze	27	89,9	54,0	5,0	624,0	19,0	128,0	122,8
Nordiazepam u noworodka	27	108,1	40,0	8,2	527,0	18,0	136,0	144,2
Oksazepam w I trymestrze	0							
Oksazepam w II trymestrze	0							
Oksazepam w III trymestrze	1	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	
Oksazepam u noworodka	2	40,1	40,1	20,2	60,0	20,2	60,0	28,1



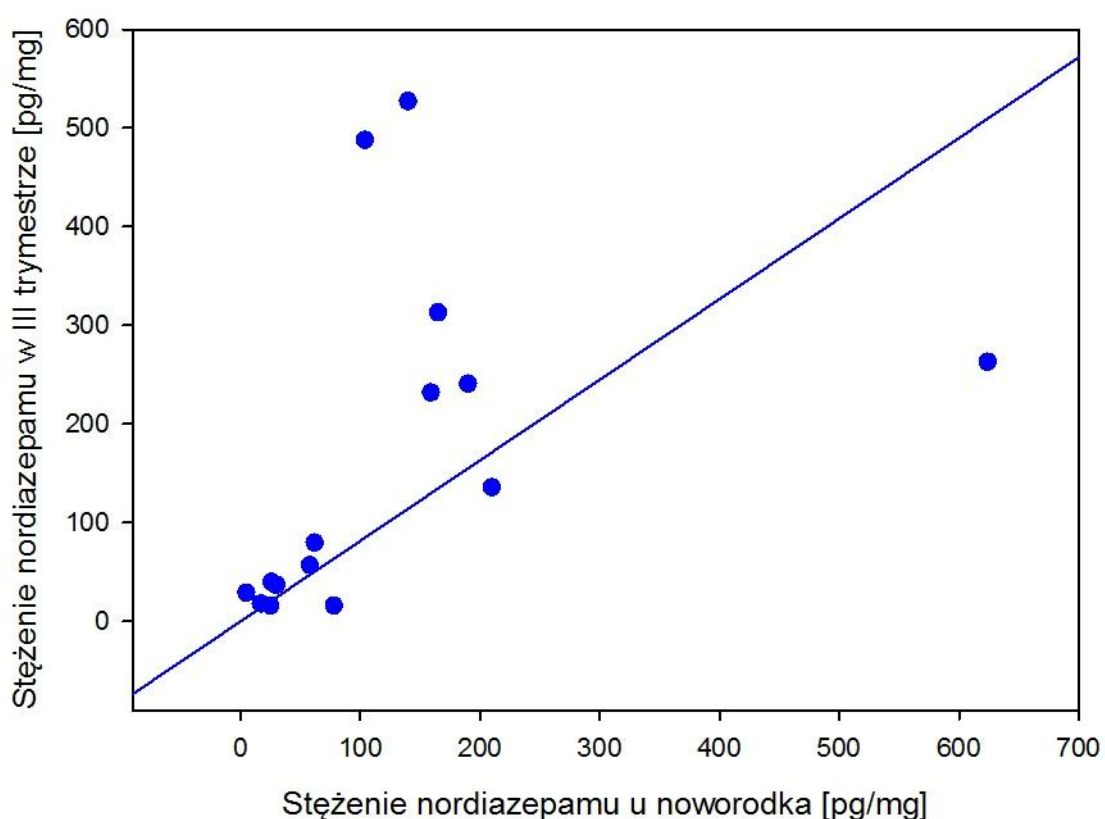
1-diazepam I trymestr; 2-diazepam II trymestr; 3-diazepam III trymestr;
 4-diazepam noworodek;
 5-nordiazepam I trymestr; 6-nordiazepam II trymestr; 7-nordiazepam III trymestr;
 8-nordiazepam noworodek;
 9-oksazepam I trymestr; 10-oksazepam II trymestr; 11-oksazepam III trymestr;
 12-oksazepam noworodek

RYCINA 40. Zbiorcze przedstawienie graficzne średnich stężeń (z odchyleniem standardowym) dla poszczególnych benzodiazepin oznaczanych u matek w trzech trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków

Przeprowadzono sprawdzenie normalności rozkładu dla zmiennych o wystarczającej liczności, tj. dla stężenia diazepamu w I, II oraz III trymestrze, dla stężenia diazepamu u noworodka, nordiazepamu w II oraz III trymestrze a także dla stężenia nordiazepamu u noworodka. Ze względu na brak normalności rozkładu wykonano test Wilcoxona.

Zbadano zależność stężenia nordiazepamu oznaczonego we włosach matek w III trymestrze oraz ich noworodków. Ponieważ określony został brak normalności rozkładu zastosowano współczynnik korelacji rangowej R_s Spearmana. Analiza otrzymanych pomiarów stężeń wykazała brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy stężeniem

diazepamu w III trymestrze oraz jego stężeniem u noworodka, natomiast potwierdziła wystąpienie różnicy istotnej pomiędzy średnim stężeniem nordiazepamu oznaczonym w III trymestrze a stężeniem tego metabolitu u noworodka ($p = 0,00196$). Dla par kompletnych zestawów danych wynosił on $R_s = 0.731$. Ponieważ R_s było dodatnie, to wnioskować można iż wzrost stężenia nordiazepamu w III trymestrze powodował wzrost stężenia tej aktywnej farmakologicznie benzodiazepiny u płodu (Rycina 41). Fakt ten można tłumaczyć szybkim metabolizmem leku macierzystego do nordiazepamu oraz większym powinowactwem metabolitu do macierzy włośa. Należy mieć to na uwadze dokonując oceny noworodka i podejmując interwencję medyczną.

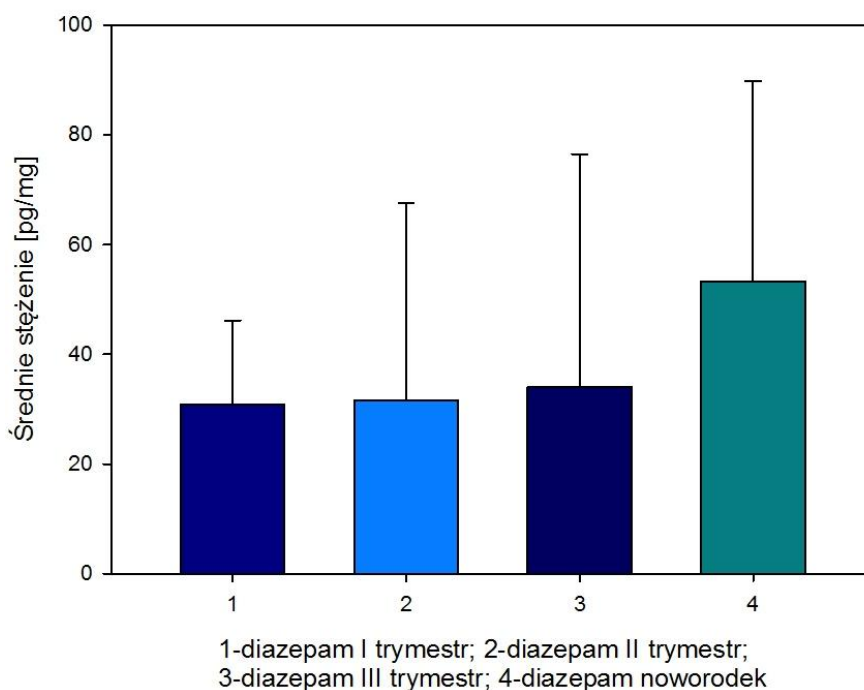


RYCINA 41. Korelacja stężeń nordiazepamu [pg/mg] oznaczonych u matek w III trymestrze i noworodków z ciąży pojedynczej

W tabeli 13 zebrano średnie stężenia diazepamu oznaczone w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków, a graficznie wyniki te zaprezentowano na rycinie 42.

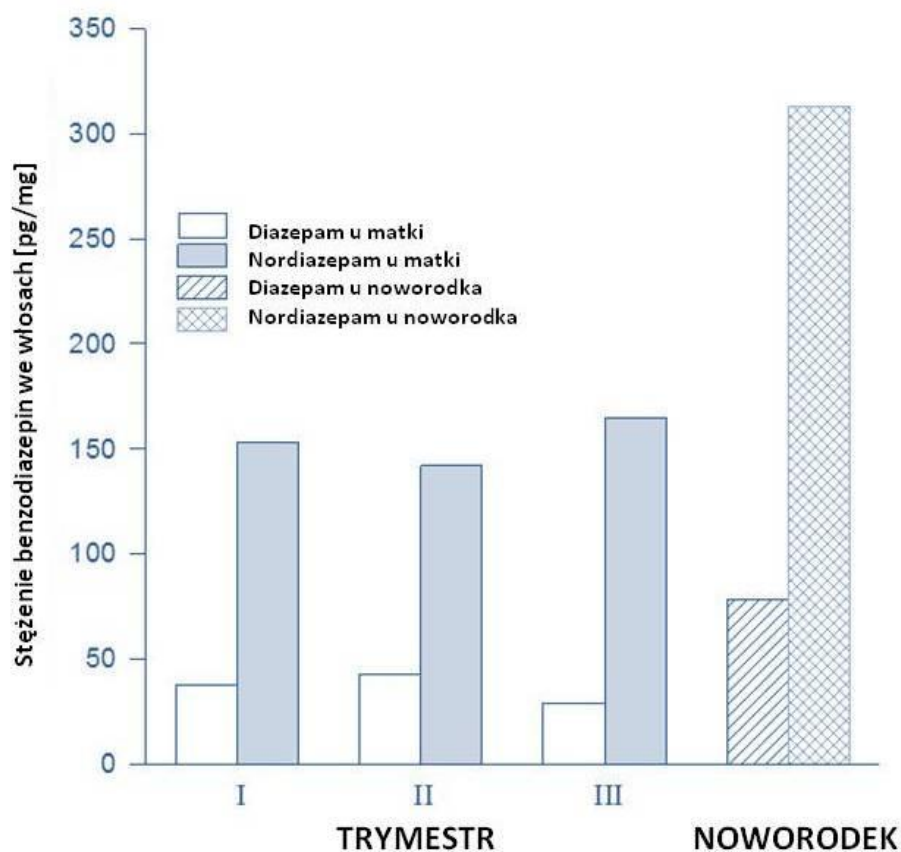
TABELA 13. Średnie stężenia diazepamu [pg/mg] oznaczone w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków

Parametr	N	Średnie stężenie [pg/mg]	Odchylenie standardowe
Diazepam w I trymestrze	6	30,8	15,3
Diazepam w II trymestrze	12	31,6	36,0
Diazepam w III trymestrze	26	34,1	42,4
Diazepam u noworodka	13	53,3	36,5



RYCINA 42. Średnie stężenia diazepamu [pg/mg] oznaczone u matek w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków

Na rycinie 43 zaprezentowano wyniki oznaczeń diazepam i jego głównego metabolitu we włosach przykładowej pacjentki i jej noworodka. Wyraźnie zaznaczone jest wysokie stężenie metabolitu diazepam – nordiazepam, który jest związkiem farmakologicznie czynnym.

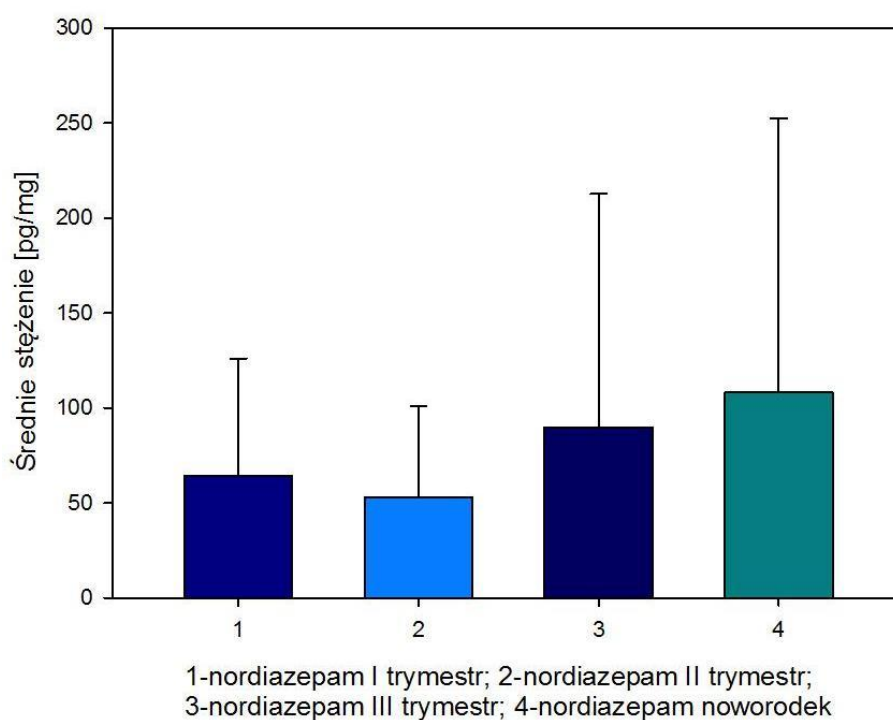


RYCINA 43. Wyniki oznaczeń diazepam i jego głównego metabolitu we włosach przykładowej pacjentki i jej noworodka

W tabeli 14 zebrano średnie stężenia nordiazepamu oznaczone u matek w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków, a graficznie wyniki te zaprezentowano na rycinie 44.

TABELA 14. Średnie stężenia nordiazepamu oznaczone u matek w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków

Parametr	N	Średnie stężenie [pg/mg]	Odchylenie standardowe
Nordiazepam w I trymestrze	4	64,5	61,5
Nordiazepam w II trymestrze	16	52,9	48,1
Nordiazepam w III trymestrze	27	89,9	122,8
Nordiazepam u noworodka	27	108,1	144,2

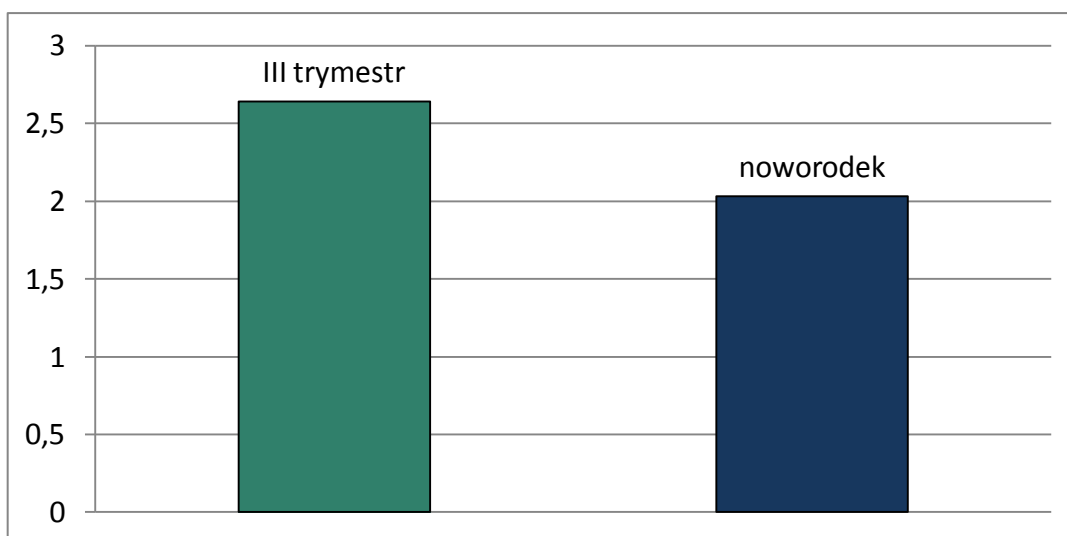


RYCINA 44. Średnie stężenia nordiazepamu [pg/mg] oznaczone u matek w poszczególnych trymestrach ciąży pojedynczej oraz u noworodków

Tabela 15 przedstawia stosunek stężeń nordiazepamu do diazepamu we włosach odpowiadających III trymestrowi ciąży pojedynczej pobranych od matek oraz we włosach noworodków. Prezentacja graficzna powyższych wartości na rycinie 45. Obliczone wartości sugerują, że nordiazepam jest obecny w ponad dwukrotnie wyższych stężeniach zarówno we włosach matek odpowiadających III trymestrowi ciąży, jak i we włosach noworodków. Może to być związane z intensywnym i szybkim metabolizmem leku diazepam oraz większym powinowactwem metabolitu do komórek macierzy włosa.

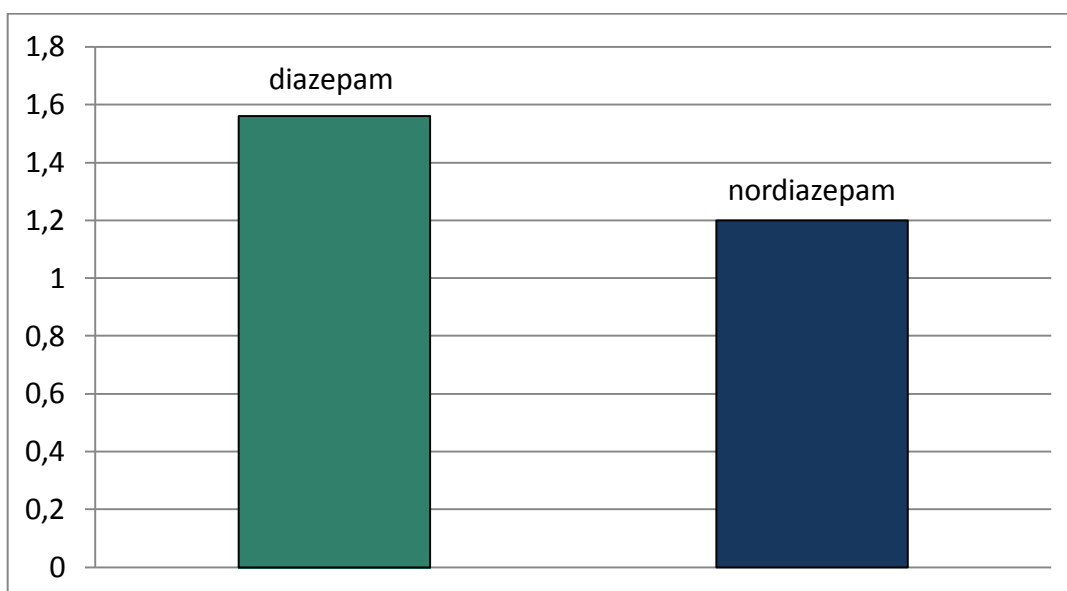
TABELA 15. Stosunek stężeń nordiazepamu do diazepamu oznaczonych we włosach matek z III trymestru oraz noworodków

Parametr	we włosach matki w III trymestrze	we włosach noworodka
Stężenie diazepam [pg/mg]	34,1	53,3
Stężenie nordiazepamu [pg/mg]	89,9	108,1
Stosunek stężeń nordiazepamu do diazepamu	2,64	2,03



RYCINA 45. Stosunek stężeń nordiazepamu do diazepamu oznaczonych we włosach matek w III trymestrze ciąży oraz noworodków

W tabeli 16 zestawiono także stężenia diazepamu i jego metabolitu oznaczone u matek w III trymestrze ciąży i u noworodków, po czym określono stosunek tych wartości. Wartości te wskazują, że stężenie diazepamu i nordiazepamu we włosach noworodków było odpowiednio 1,56 i 1,2 razy wyższe niż u matek w III trymestrze (Rycina 46).



RYCINA 46. Stosunek stężeń benzodiazepin oznaczonych u noworodków względem stężeń oznaczonych we włosach w III trymestrze u ich matek

TABELA 16. Średnie stężenia diazepamu i nordiazepamu [pg/mg] oznaczone w III trymestrze ciąży u matek i u noworodków i stosunek ich wartości

Zmienna	Średnia
Stężenie diazepamu w III trymestrze [pg/mg]	34,1
Stężenie diazepamu u noworodka [pg/mg]	53,3
Stosunek stężenia diazepamu u noworodka do stężenia w III trymestrze	1,56
Stężenie nordiazepamu w III trymestrze [pg/mg]	89,9
Stężenie nordiazepamu u noworodka [pg/mg]	108,1
Stosunek stężenia nordiazepamu u noworodka do stężenia w III trymestrze	1,20

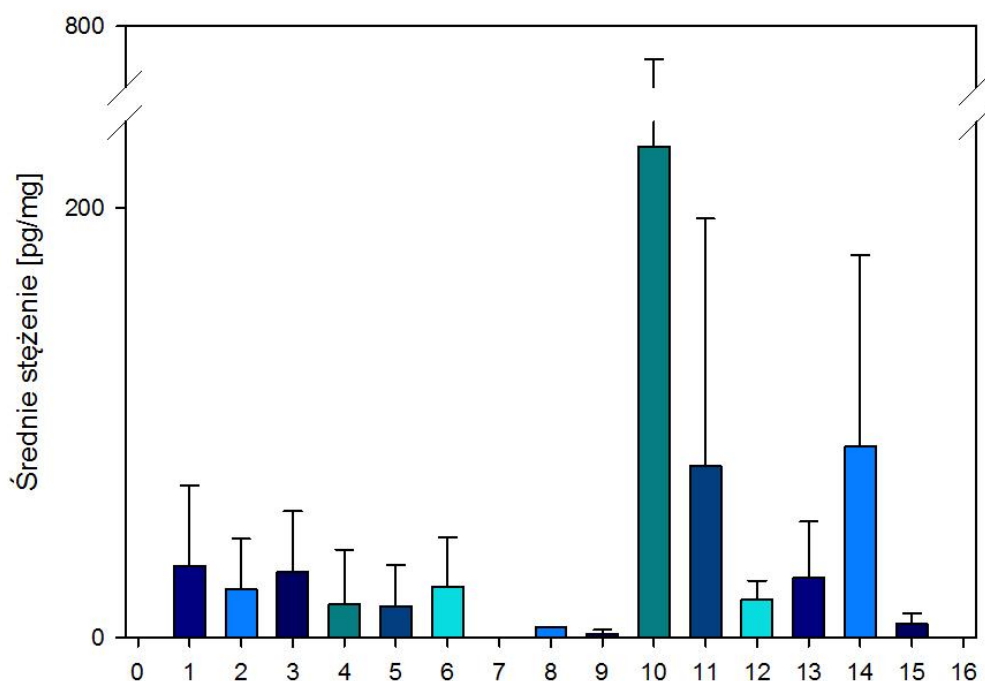
5.2. Wyniki dla ciąży bliźniaczej

Po rozwiązaniu zdecydowanej większości ciąż bliźniaczych urodziły się bliźnięta dwujajowe. Tylko 6 par noworodków stanowiły bliźnięta jednojajowe. W jednym przypadku wykształciło się łożysko jednoowodniowe, jednokosmówkowe. W pięciu ciążach zdiagnozowano łożysko dwuowodniowe, jednokosmówkowe. W pozostałych sytuacjach bliźnięta rozwijały się w łożyskach dwuowodniowych, dwukosmówkowych lub dwukosmówkowych połączonych.

Średnie stężenie poszczególnych substancji z grupy benzodiazepin przedstawiono w tabeli 17, w której uwzględniono ponadto wartości minimum i maksimum danej zmiennej, górne i dolne kwartyle oraz pomiar odchylenia standardowego. Zbiorczo dane te zaprezentowano także na rycinie 47, w której różnice w poziomach związków są łatwe do zaobserwowania.

TABELA 17. Statystyka opisowa wyników otrzymanych w grupie ciąży bliźniaczej

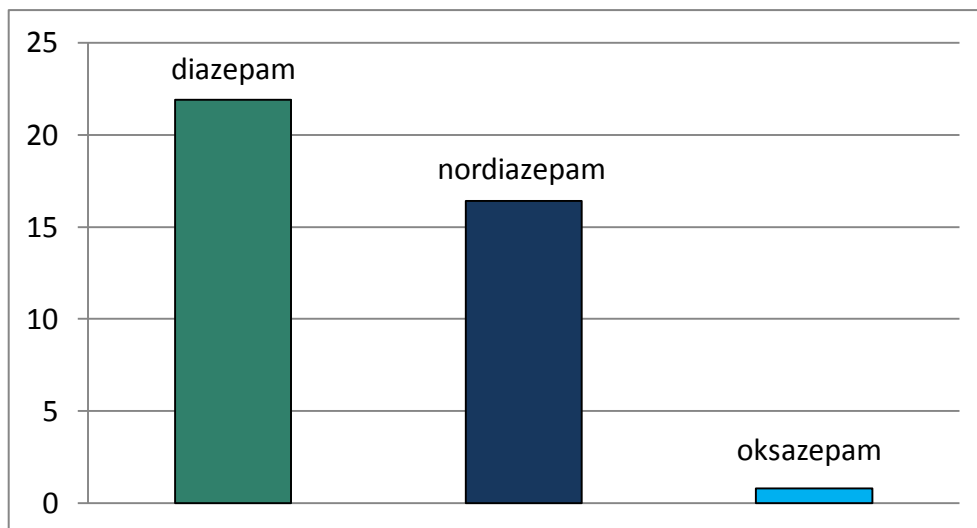
Zmienna	N	Średnie stężenie [pg/mg]	Mediana	Minimum [pg/mg]	Maksimum [pg/mg]	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odchylenie standardowe
Diazepam w I trymestrze	14	33,5	23,0	5,0	129,4	10,9	28,7	37,3
Diazepam w II trymestrze	13	22,4	12,7	5,3	92,0	9,3	25,5	23,6
Diazepam w III trymestrze	20	30,9	30,8	1,8	100,5	5,1	45,4	27,9
Nordiazepam w I trymestrze	19	15,8	6,9	1,3	111,0	2,7	16,4	25,1
Nordiazepam w II trymestrze	21	14,8	5,6	0,8	65,4	2,8	16,1	19,0
Nordiazepam w III trymestrze	22	23,8	12,8	1,1	69,5	4,5	40,6	22,8
Oksazepam w I trymestrze	0							
Oksazepam w II trymestrze	1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	
Oksazepam w III trymestrze	6	1,9	1,3	0,6	5,4	1,0	2,2	1,8
Diazepam u noworodka I	8	228,5	53,2	8,6	1408,0	15,7	136,8	479,6
Nordiazepam u noworodka I	25	80,1	39,9	2,7	537,0	14,5	87,7	114,9
Oksazepam u noworodka I	3	17,7	15,8	9,9	27,4	9,9	27,4	8,9
Diazepam u noworodka II	10	28,1	27,7	1,8	94,1	12,3	29,4	26,1
Nordiazepam u noworodka II	27	88,9	62,5	3,4	402,7	25,3	125,4	89,3
Oksazepam u noworodka II	5	6,4	4,7	1,4	12,7	2,6	10,4	4,9



1-diazepam w I trymestrze; 2-diazepam w II trymestrze; 3-diazepam w III trymestrze;
 4-nordiazepam w I trymestrze; 5-nordiazepam w II trymestrze; 6-nordiazepam w III trymestrze;
 7-oksazepam w I trymestrze; 8-oksazepam w II trymestrze; 9-oksazepam w III trymestrze;
 10-diazepam u noworodka I; 11-nordiazepam u noworodka I; 12-oksazepam u noworodka I;
 13-diazepam u noworodka II; 14-nordiazepam u noworodka II; 15-oksazepam u noworodka II

RYCINA 47. Zbiorcze przedstawienie graficzne średnich stężeń (z odchyleniem standardowym) dla poszczególnych benzodiazepin oznaczanych u matek w trzech trymestrach ciąży bliźniaczej oraz u noworodków.

Na rycinie 48 przedstawiono średnie stężenia diazepamu i jego dwóch metabolitów wyznaczone dla całego okresu ciąży (uśrednione z próbek włosów z wszystkich trzech trymestrów). Dla diazepamu wynosiło ono 21,9 pg/mg, dla nordiazepamu – 16,4 pg/mg, zaś dla oksazepamu – 0,8 pg/mg.



RYCINA 48. Średnie stężenia benzodiazepin [pg/mg] oznaczone we włosach matek ze zdiagnozowaną ciążą bliźniaczą

Przeprowadzono sprawdzenie normalności rozkładu dla zmian poziomu diazepam, nordiazepamu i oksazepamu w czasie. Ze względu na brak normalności rozkładu przeprowadzono analizę wariancji ANOVA Friedmana z uwzględnieniem współczynnika zgodności Kendalla. Jego wartość dla analizy zmian stężeń diazepam w trzech trymestrach ciąży wynosiła 0,17355. Do sprawdzania istotności współczynnika zgodności użyto testu chi-kwadrat ($\chi^2 = 3,818182$ przy $p = 0,14822$). Porównując wartość p z poziomem istotności $\alpha = 0,05$ stwierdzono, że zmiany w czasie nie są istotne statystycznie.

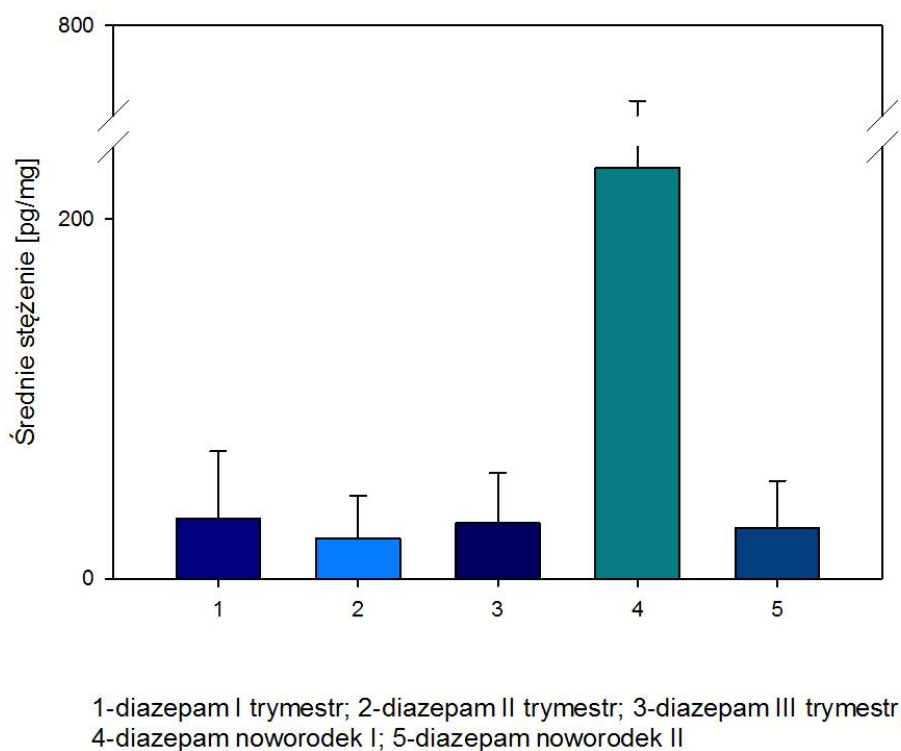
Wartość współczynnika Kendalla dla analizy zmian stężeń nordiazepamu w trzech trymestrach ciąży wynosiła 0,14879. Do sprawdzania istotności współczynnika zgodności użyto testu chi-kwadrat ($\chi^2 = 5,058824$ przy $p = 0,07971$). Porównując wartość p z poziomem istotności $\alpha = 0,05$ stwierdzono, że zmiany w czasie nie są istotne statystycznie.

Ze względu na zbyt małą ilość przypadków wykrycia i oznaczenia oksazepamu nie przeprowadzono analizy statystycznej.

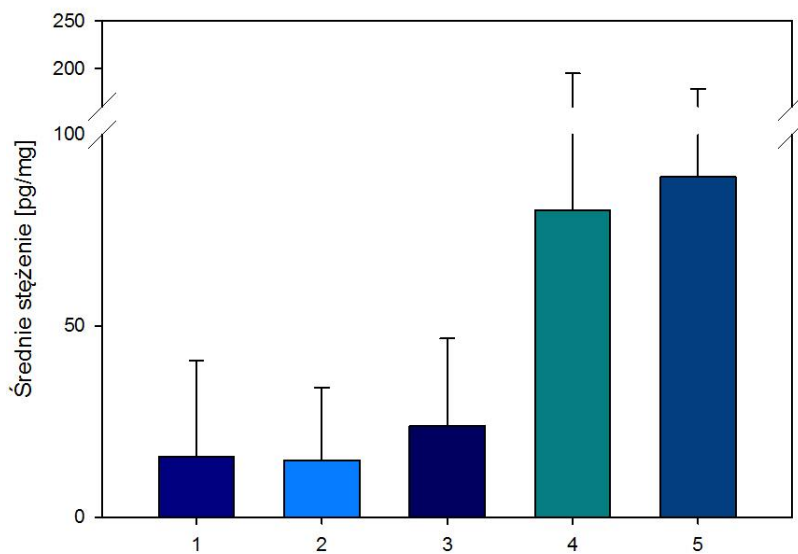
Przeprowadzono również porównanie średnich stężeń benzodiazepin oznaczonych u matki i jej pierwszego noworodka w poszczególnych trymestrach ciąży, korzystając z testu Wilcoxon, ponieważ pary danych traktować można jako zmienne powiązane – płód był ekspozowany na benzodiazepiny w związku z przyjmowaniem leków przez matkę. W konsekwencji ujawniono statystycznie istotne różnice w stężeniu nordiazepamu u kobiet i dzieci w każdym z trymestrów, jak i zbiorczo dla całej ciąży. Podobnie, jak w przypadku

cięż pojedynczych fakt ten można tłumaczyć intensywnym metabolizmem diazepamu do nordiazepamu zarówno w organizmie matek, jak i ich dzieci, a także większym fizjologicznym powinowactwem metabolitu do macierzy włosów dzieci.

Na rycinach 49, 50 i 51 przedstawiono graficznie średnie poziomy stężeń diazepam, nordiazepam i oksazepam oznaczone we włosach matek w poszczególnych trymestrach ciąży mnogiej oraz u ich noworodków. Uwagę zwracają wysokie stężenia substancji oznaczone u dzieci.

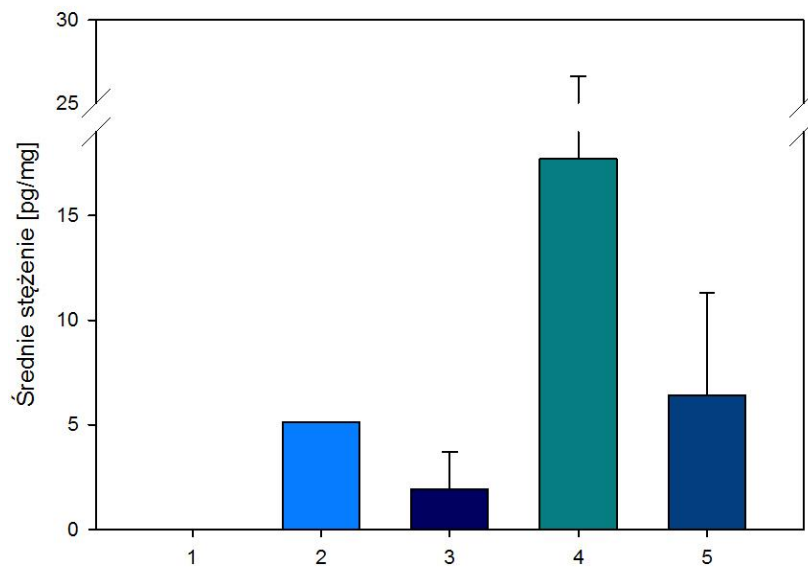


RYCINA 49. Średnie stężenia diazepam [pg/mg] oznaczone w poszczególnych trymestrach ciąży u matek i u bliźniąt



1-nordiazepam I trymestr; 2-nordiazepam II trymestr; 3-nordiazepam III trymestr;
4-nordiazepam noworodek I; 5-nordiazepam noworodek II

RYCINA 50. Średnie stężenia nordiazepamu [pg/mg] oznaczone w poszczególnych trymestrach ciąży we włosach matek i u bliźniąt



1-oksazepam I trymestr; 2-oksazepam II trymestr; 3-oksazepam III trymestr;
4-oksazepam noworodek I; 5-oksazepam noworodek II

RYCINA 51. Średnie stężenia oksazepamu [pg/mg] oznaczone w poszczególnych trymestrach ciąży we włosach matek i u bliźniąt

Zbadano także zależność pomiędzy średnimi stężeniami benzodiazepin oznaczonymi u matek i każdego z dwójki noworodków.

Analizę statystyczną porównującą średnie stężenia benzodiazepin oznaczonych u matki i jej pierwszego noworodka przedstawiono poniżej.

Wobec braku normalności rozkładu zastosowano współczynnik korelacji rangowej R_s Spearmana. Stwierdzono, że istnieje zależność pomiędzy średnim stężeniem nordiazepamu oznaczonym we włosach pobranych od dziecka I a stężeniem tego związku we włosach matek odpowiadających I trymestrowi ciąży ($p = 0,015185$). Ponieważ współczynnik korelacji R_s był dodatni (0,57756) to należy wysnuć wniosek, iż wzrost stężenia głównego metabolitu diazepamu u matki w I trymestrze ciąży skutkowało wzrostem jego stężenia u noworodka I.

W następnym etapie analizy statystycznej ciąży bliźniaczej przeprowadzono porównanie średnich stężeń benzodiazepin oznaczonych u matki i jej drugiego noworodka w poszczególnych trymestrach ciąży, korzystając z testu Wilcoxa. Podobnie, jak w przypadku porównania z pierwszym noworodkiem różnice istotne statystycznie zauważono w stężeniu nordiazepamu. Różnice te odnotowano w każdym z trymestrów, jak i zbiorczo dla całej ciąży.

Analizę statystyczną porównującą średnie stężenia benzodiazepin oznaczonych u matki i jej drugiego noworodka zaprezentowano poniżej.

Wobec braku normalności rozkładu zastosowano współczynnik korelacji rangowej R_s Spearmana. Wartość p dla stężenia diazepamu i nordiazepamu we wszystkich trzech trymestrach wskazuje, że nie zachodziła zależność pomiędzy średnimi stężeniami tych substancji oznaczonymi we włosach matek a stężeniami u noworodka II.

Analiza stężeń oksazepamu nie była możliwa ze względu na zbyt małą liczbę przypadków.

Zestawienie danych uzyskanych z analizy par bliźniąt, obejmujące sprawdzenie normalności rozkładu i kolejne przeprowadzenie testu Wilcoxa nie wykazało żadnych istotnych różnic dla stężeń opisywanych benzodiazepin.

Podobnie porównanie danych dotyczących stężeń benzodiazepin pomiędzy noworodkami z ciąży bliźniaczych testem U Manna-Whitneya nie wykazało żadnych różnic wynikających z rodzaju bliźniąt (jedno- i dwujajowych). Analogiczne badanie przeprowadzono dla zmiennych pod względem typu łożyska (z analizy wyłączono jednak

przypadek łożyska jednoowodniowego, jednokosmówkowego z powodu małej liczności grupy – jedna para bliźniąt.

W ocenie ekspozycji noworodków z ciąży mnogich wykorzystano porównanie stężeń nordiazepamu do diazepamum we włosach matek w III trymestrze oraz ich dzieci. Uzyskane wartości stosunków zamieszczono w tabeli 18.

TABELA 18. Średnie stężenia diazepamum i nordiazepamum [pg/mg] oznaczone w III trymestrze ciąży u matek i u noworodków oraz stosunek ich wartości

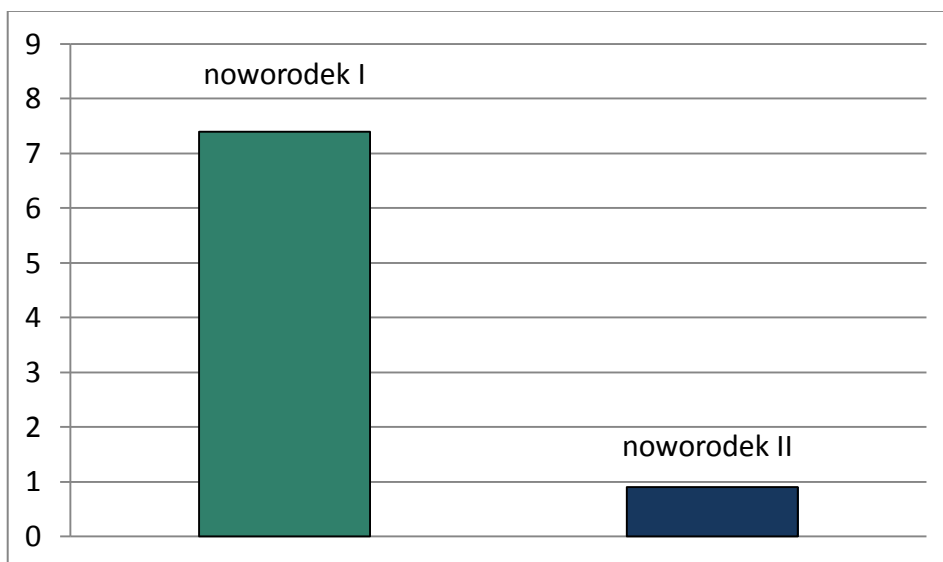
Parametr	We włosach matki w III trymestrze	We włosach noworodka I	We włosach noworodka II
Stężenie diazepamum [pg/mg]	30,9	228,5	28,1
Stężenie nordiazepamum [pg/mg]	23,8	80,1	88,9
Stosunek stężeń nordiazepamum do diazepamum	0,77	0,35	3,16

W tabeli 19 zestawiono także stężenia diazepamum oznaczone u matek w III trymestrze ciąży i u bliźniąt, po czym określono stosunek tych wartości. Wartości te wskazują, że przeciętnie stężenie diazepamum u pierwszego noworodka było 7,39 wyższe niż u matki w III trymestrze ciąży, zaś u drugiego porównywalne ze stężeniem w ostatnim trymestrze. Graficzna prezentacja powyższych zależności widnieje na rycinie 52.

W tabeli 20 zaprezentowano stężenia nordiazepamum oznaczone w III trymestrze ciąży i u bliźniąt, po czym określono stosunek tych wartości. Wskazują one, że przeciętnie stężenie nordiazepamum u pierwszego noworodka było 3,36, zaś u drugiego 3,73 razy wyższe niż u matki w III trymestrze ciąży. Powyższe zależności zilustrowano na rycinie 53.

TABELA 19. Średnie stężenia diazepamu [pg/mg] oznaczone w III trymestrze ciąży u matek i u bliźniąt oraz stosunek ich wartości

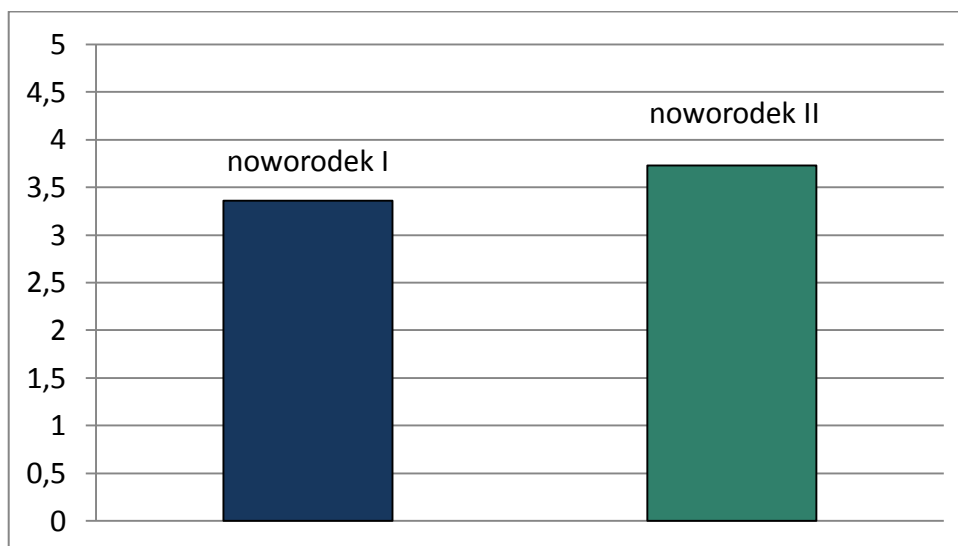
Zmienna	Średnia
Stężenie diazepam w III trymestrze [pg/mg]	30,9
Stężenie diazepam u noworodka I [pg/mg]	228,5
Stężenie diazepam u noworodka II [pg/mg]	28,1
Stosunek stężenia diazepam u noworodka I do stężenia w III trymestrze	7,39
Stosunek stężenia diazepam u noworodka II do stężenia w III trymestrze	0,90



RYCINA 52. Stosunek średniego stężenia diazepam oznaczonego we włosach bliźniąt względem średniego stężenia diazepam oznaczonego w III trymestrze ciąży u matki

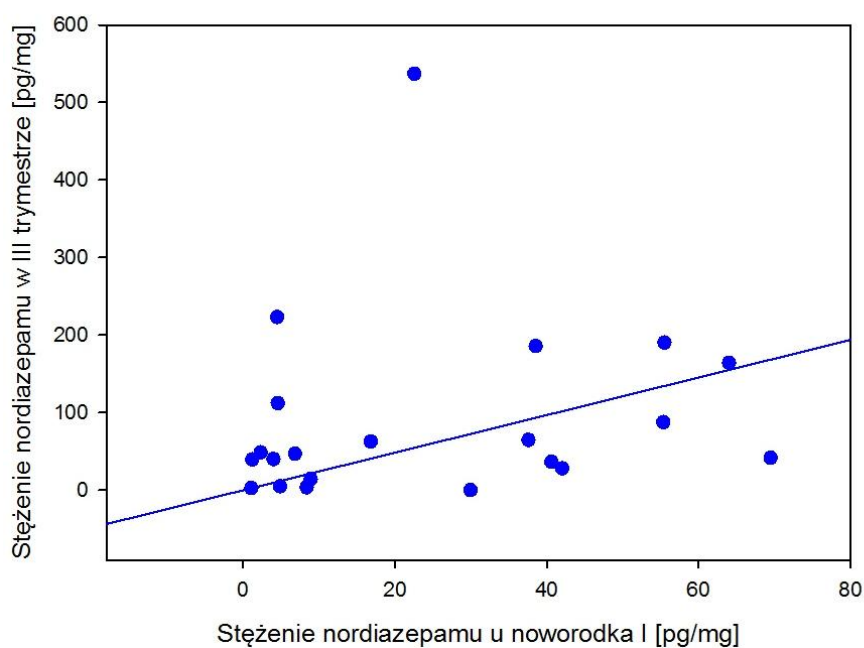
TABELA 20. Średnie stężenia nordiazepamu [pg/mg] oznaczone w III trymestrze ciąży u matek i u bliźniąt oraz stosunek ich wartości

Zmienna	Średnia
Stężenie nordiazepamu w III trymestrze [pg/mg]	23,8
Stężenie nordiazepamu u noworodka I [pg/mg]	80,1
Stężenie nordiazepamu u noworodka II [pg/mg]	88,9
Stosunek stężenia nordiazepamu u noworodka I do stężenia w III trymestrze	3,36
Stosunek stężenia nordiazepamu u noworodka II do stężenia w III trymestrze	3,73

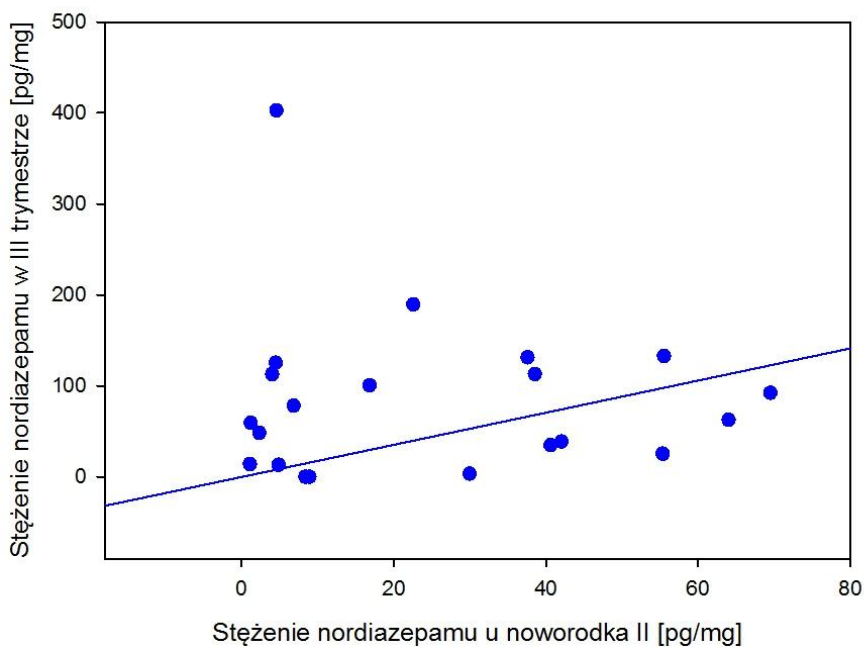


RYCINA 53. Stosunek średniego stężenia nordiazepamu oznaczonego we włosach bliźniąt względem średniego stężenia diazepamu oznaczonego w III trymestrze ciąży u matki

Na rycinach 54 i 55 przedstawiono graficznie korelację stężeń nordiazepamu oznaczonego we włosach poszczególnych matek w III trymestrze i we włosach ich kolejnych noworodków.



RYCINA 54. Korelacja stężeń nordiazepamu [pg/mg] oznaczonych u matki w III trymestrze ciąży i pierwszego noworodka z ciąży bliźniaczej



RYCINA 55. Korelacja stężeń nordiazepamu [pg/mg] oznaczonych u matki w III trymestrze ciąży i drugiego noworodka z ciąży bliźniaczej.

6. DYSKUSJA

Wszelkie choroby występujące w ciąży i okresie karmienia piersią stanowią ogromne wyzwanie terapeutyczne. Konieczne jest efektywne leczenie stanu patologicznego z jednoczesnym minimalizowaniem narażenia płodu na szkodliwe leki. Idealnym rozwiązaniem jest planowanie prekonceptyjne. W sytuacji, gdy chora pacjentka zachodzi w ciążę lub gdy choroba rozwija się w trakcie trwania ciąży, zadanie powrotu do zdrowia jest utrudnione. Niejednokrotnie (np. w przypadku zaburzeń psychicznych) szansa na zmniejszenie dawek leków w celu osiągnięcia maksymalnej ochrony płodu w pierwszym trymestrze zostaje zaprzepaszczona. W momencie uwidocznienia się dość zaawansowanej już ciąży okazuje się, że rozwijający się płód był narażony na substancje teratogenne. Mimo, iż FDA nie zatwierdziła żadnego związku z grupy leków psychotropowych do leczenia w czasie ciąży i laktacji (np. diazepam należy do kategorii D) całkowite zaprzestanie terapii może okazać się zbyt ryzykowne zarówno dla matki, jak i dla płodu. W takich sytuacjach rozsądne jest korzystanie z leków starszych, sprawdzonych w wieloletniej praktyce, których skutki uboczne zostały już zaobserwowane i scharakteryzowane w piśmiennictwie. Nowe substancje, potencjalnie bezpieczniejsze, mogą bowiem wywoływać u płodu zmiany wykrywalne dopiero po porodzie lub toksyczne efekty odległe. Lekarz mający pod opieką pacjentkę ciężarną bądź karmiącą musi więc podjąć się indywidualnej oceny ryzyka i korzyści wpływających z wybranego postępowania farmakologicznego. Ważnymi aspektami takiej analizy są niewątpliwie stopień zaawansowania choroby kobiety, konsekwencje jej nie leczenia, potencjalne skutki uboczne zastosowania leków dla zdrowia matki i dziecka, a ponadto okres ciąży lub karmienia. Badania obserwacyjne, mimo licznych słabych stron, stanowią obecnie najważniejsze źródło wiedzy do optymalizacji terapii. Złożone i delikatne kwestie dotyczące przeprowadzania dogłębnych badań interwencyjnych w ciąży sprawiają, że leczenie pozostaje zagadkowe. Ten zrozumiały, a zarazem niefortunny fakt sprawił, że badacze poszukują nieinwazyjnych i etycznych sposobów pogłębienia wiedzy na temat terapii kobiet ciężarnych.

Szacunkowe dane dotyczące ryzyka stosowania leków w ciąży pozyskiwane są głównie z opisów przypadków lub retrospektywnych badań epidemiologicznych. Tego typu analizy obarczone są często błędem związanym z brakami w raportach medycznych lub występowaniem przeróżnych zmiennych wnikających, takich jak: stan zdrowia, odżywienia, wiek matki, używanie alkoholu, tytoniu i nielegalnych substancji, toksyny środowiskowe,

historia poronień i urodzeń martwych, uwarunkowań genetycznych, obciążeń rodzinnych, stosowanie licznych leków dostępnych bez recepty lub bez konsultacji farmaceutycznej, wiek ciążowy w momencie wystąpienia ekspozycji, stosowanie się do zaleceń lekarza, dawki leku, skutków choroby towarzyszącej ciąży (American Academy of Pediatrics, 2000).

Obecnie stosowane modele oceny bezpieczeństwa leków stosowanych w ciąży to m.in. opis przypadku, czyli doniesienie sygnalizujące potencjalny problem, które umożliwia wdrożenie formalnego dochodzenia badawczego lub serie przypadków - opis od kilku do nawet kilkuset podobnych przypadków, który jednak ograniczony jest brakiem grupy porównawczej (kontrolnej), która reprezentowałaby populację. W piśmiennictwie wyróżnia się również porównawcze badania kohortowe prospektywne – model często stosowany w identyfikacji działania teratogennego. Kobiety narażone na dany czynnik są kwalifikowane do badania, najczęściej w pierwszym tryestrze ciąży (okres organogenezy) w celu prospektywnej obserwacji. Po narodzinach dziecka uzyskane wyniki ciąży porównuje się z wynikami grupy nienarażonej i zdrowej. Proponowane jest również kontrolne badanie przypadków – badania retrospektywne, w których porównuje się grupę przypadków z określonym efektem zdrowotnym z grupą bez tego efektu. Związek między potencjalnym czynnikiem ryzyka a wystąpieniem efektu jest sprawdzany poprzez porównanie częstości jego obecności u pacjentów chorych i zdrowych. Istnieje również metaanaliza – narzędzie przydatne zwłaszcza w zakresie analizy stosowania leków w ciąży, w związku z małą liczbą przypadków dostępnych w badaniach obserwacyjnych; metoda umożliwiająca łączenie grup w obrębie różnych badań w celu ustalenia pewniejszej ekspertyzy na podstawie dostępnego piśmiennictwa; warunkiem włączenia przypadków do badania jest ich podobieństwo, oceniane przez niezależnych recenzentów artykułów (Einarson, 2009).

Ocena bezpieczeństwa leków w ciąży i narażenia płodu na toksyczne działanie ksenobiotyków jest procesem skomplikowanym. W związku z licznymi zastrzeżeniami natury etycznej dotyczącymi badań kobiet ciężarnych, płodów, a nawet noworodków wątpliwe jest przeprowadzenie randomizowanych badań klinicznych. Wszystkie wymienione metody charakteryzują się pewnymi ograniczeniami, takimi jak mała grupa badana, obciążenie retrospektywne, brak pewności co do procesu farmakoterapii w ciąży (np. stosowanie się do zaleceń lekarza – z angielskiego compliance), czy brak pełnej historii medycznej pacjentki. Nie oznacza to jednak, że wnioski uzyskane za pomocą tych narzędzi nie są oparte na dowodach naukowych (Einarson, 2009).

Specjaliści opieki zdrowotnej powinni mieć do dyspozycji technikę umożliwiającą rozpoznanie noworodka, który był narażony w życiu płodowym na nielegalne i niebezpieczne dla zdrowia substancje. Jest to istotne podczas porodu i pierwszego okresu pielęgnacji dziecka, zwłaszcza w obliczu nieoczekiwanych objawów patologicznych. Neonatolodzy i pediatrzy zwracają szczególną uwagę na rolę analizy próbek biologicznych pobranych od noworodków, zarówno pod względem klinicznym, jak i prawnym. Określenie stopnia ekspozycji dziecka na leki jest niezbędne do wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego, a ponadto stanowi podstawę do ustalenia strategii pomocy zdrowotno-socjalnej dla matki. Praktyka dowodzi, że kobiety zażywają leki nie tylko ze wskazań lekarskich, ale również nadużywają ich, stosują w niewłaściwych sytuacjach, a nawet są ofiarami przemocy z użyciem środków farmakologicznych. W tych dramatycznych przypadkach sytuacja nie ulega zmianie, gdy kobieta zachodzi w ciążę. Są to pacjentki wysokiego ryzyka, których zdiagnozowanie może decydować o bezpieczeństwie rodziny po wypisie ze szpitala. Precyzyjna ocena krótko- i długoterminowych objawów ubocznych występujących u noworodka, wynikających z narażenia na ksenobiotyki w czasie ciąży, może być niezwykle trudna.

Potencjalne efekty związane z narażeniem prenatalnym na nielegalne substancje i nadużywane leki (stymulanty, kannabinoidy, opiaty/opioidy, halucynogeny i środki uspokajające) mogą być niezwykle zróżnicowane pod względem charakteru i nasilenia. Zażywanie przez kobietę ciężarną metamfetaminy lub kokainy może wiązać się z objawami okołoporodowymi u noworodka takimi jak: niska masa urodzeniowa, rozdrażnienie, płaczliwość, trudności z ssaniem, zaburzenia psychorozwoju, martwicze zapalenie jelit oraz długotrwałymi: umiarkowane zaburzenia wzrostu, poznawcze, językowe czy behawioralne. Podobne objawy obserwuje się po stosowaniu heroiny, morfiny, kodeiny oraz fentanylu. Profil okołoporodowych działań niepożądanych u dziecka jest ponadto rozszerzony o noworodkowy zespół abstynencyjny (z angielskiego Neonatal Abstinence Syndrome, NAS): drażliwość, zaburzenia układu autonomicznego, układu oddechowego, żołądkowo-jelitowe. Zyskujące coraz większą akceptację społeczną korzystanie z marihuany wiąże się z wystąpieniem u długotrwale narażonego płodu/novorodka wyjątkowej impulsywności oraz zaburzeniami procesów kognitywnych. Zażywanie halucynogenów przez ciężarną kobietę wiąże się głównie z krótkotrwałymi, aczkolwiek groźnymi skutkami negatywnymi u noworodka – niską masą urodzeniową i zaburzeniami psychorozwoju. Okołoporodowe objawy stosowania popularnych środków uspokajających, takich jak barbiturany

i benzodiazepiny to występujące u noworodka: niska masa urodzeniowa, depresja układu oddechowego, hipotonia, trudności z ssaniem, zespół odstawienia, rozdrażnienie i płaczliwość. Do długotrwałych efektów ich działania zaliczyć należy zaburzenia psychorozwoju dziecka (Farst et al., 2011). Należy podkreślić, że niewłaściwe stosowanie leków przepisywanych na receptę, takich jak leki przeciwbólowe czy benzodiazepiny uznaje się za przyjmowanie nielegalnych substancji. Do najczęściej nadużywanych leków z grupy benzodiazepin należą w Stanach Zjednoczonych alprazolam i diazepam, a także flunitrazepam, stosowany jako narkotyk imprezowy (z angielskiego „party drug”, zwany popularnie „roofie”) (United States Drug Enforcement Administration, 2012).

Stosowanie benzodiazepin w czasie ciąży jest nadal dyskusyjne. Badania kohortowe kobiet ciężarnych w stanie Waszyngton wykazały, że ponad 10% z nich (300 pacjentek) zażywało substancje psychotropowe w czasie ciąży, z czego aż 85% – benzodiazepiny. Stosowanie przez matkę benzodiazepin w czasie ciąży było związane z niemal 7-krotnie wyższym ryzykiem porodu przedwczesnego oraz podwyższonym ryzykiem wystąpienia niskiej urodzeniowej masy ciała (38,4% w porównaniu do 5,5% w grupie kontrolnej), zespołu zaburzenia oddychania noworodka (17,4% w porównaniu do 2,8% w grupie kontrolnej), obniżeniem wyniku w skali Apgar (wynik poniżej 7 mierzony w 5 minucie u 8,1% przypadków, w porównaniu do 1,5% w grupie kontrolnej), a także częstszym przyjmowaniem noworodków na oddział intensywnej opieki (32,6% przypadków w porównaniu do 6,3% w grupie kontrolnej). Ryzyko wystąpienia negatywnych skutków zdrowotnych różniło się ponadto w zależności od momentu rozpoczęcia terapii benzodiazepinowej. Warto podkreślić, że większość kobiet zakwalifikowanych do analizy zażywało lorazepam (73 przypadki), a diazepam przepisano tylko 2 pacjentkom (Calderon-Margalit et al., 2009). Natomiast w badaniach przeprowadzonych wśród 1944 kobiet deklarujących zażywanie benzodiazepin w czasie ciąży przez Wikner i współpracowników dominującym lekiem był diazepam. Szwedzki zespół otrzymał wyniki dotyczące zagrożeń ciąży i noworodka zbieżne, choć nieco niższe niż w/w zespół z USA. Podobnie odnotowano różnice w wielkości ryzyka uzależnione od czasu ekspozycji na leki. Wczesne narażenie prenatalne wiązało się z niemal 1,5-krotnie wyższym, zaś późne – z ponad 2,5-krotnie wyższym ryzykiem przedwczesnego porodu. Późniejsze podanie benzodiazepiny zwiększało również prawdopodobieństwo wystąpienia wszystkich pozostałych negatywnych skutków zdrowotnych (Wikner et al., 2007). Z kolei badania przeprowadzone w Tours (Francja) dowodzą, że ponad połowa noworodków narażonych na działanie benzodiazepin wykazywała odstępstwa od normy zdrowotnej. Istotne

ryzyko wiązało się z hipotonią i hipowentylacją (42% przypadków zaburzeń zdrowotnych związanych z ekspozycją na benzodiazepiny) oraz zespołem odstawienia (20% przypadków zaburzeń zdrowotnych związanych z ekspozycją na benzodiazepiny). Wymieniono następujące wskazania do stosowania leków: depresja (36,5%), lęk (22,5%), epilepsja (18%), inne zaburzenia psychiatryczne (11,5%) oraz bezsenność (4,5%). Niestety stosunkowo duża grupa pacjentek podejmowała samodzielne leczenie tymi lekami psychotropowymi (7%). Najczęściej stosowanymi lekami z tej grupy były: oksazepam (20%), bromazepam (19%) i alprazolam (16,5%). Autorzy zauważają, że w późnym okresie ciąży (zwłaszcza w ostatnim miesiącu) warto wziąć pod uwagę możliwość zmiany przepisanej benzodiazepiny na bezpieczniejszą, krócej działającą, nie kumulującą się w organizmie płodu – np. oksazepam (Swortfiguer et al., 2005). Ta sugestia warta jest podkreślenia również w kontekście wyników badań własnych i niniejszej analizy oraz częstości stosowania diazepam u wśród poznańskich pacjentek ciężarnych. Wszystkie pacjentki zakwalifikowane do badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej zażywały diazepam. Po uwzględnieniu różnic dotyczących profilu działania diazepam i oksazepam oraz potrzeb danej pacjentki, może okazać się, że wystarczające będzie zastosowanie leku mniej toksycznego, który nie kumuluje się w organizmie dziecka. W badaniach własnych oksazepam, jako metabolit diazepam został oznaczony w sporadycznych przypadkach par matka – noworodek, co może potwierdzać jego mniejszy udział w ekspozycji benzodiazepinowej płodu. Przytoczone przykłady badań wskazują, że problem zbyt częstego stosowania benzodiazepin u pacjentek ciężarnych dotyczy wielu państw europejskich. Również informacje zawarte w pracy opublikowanej przez zespół naukowców z Chorwacji stanowią argument potwierdzający tę tezę. To właśnie diazepam był drugim najczęściej przepisywanym lekiem w ciąży. Ponad 1/3 pacjentek ciężarnych czterech szpitali w Zagrzebiu przyjmowała ten lek, a częstość jego zażywania zwiększała się wraz z wiekiem ciążowym – w pierwszym trymestrze zażywało go 8,3% kobiet, w drugim – 14,2% oraz 23,7% w trzecim. Badacze apelują o rozważenie w stosowaniu benzodiazepin i wprowadzanie innych niż farmakologiczne procedur leczniczych (Leppée et al., 2010). Amerykańska Akademia Pediatria (American Academy of Pediatrics) zaniepokojona skalą zjawiska wystosowała zalecenia do terapii substancjami psychoaktywnymi w czasie ciąży (American Academy of Pediatrics, 2000). W opracowaniu znalazły się cenne uwagi dotyczące leków z grupy benzodiazepin. Naukowcy zaznaczają, że do najistotniejszych skutków ubocznych działania benzodiazepin u noworodków należą sedacja, uzależnienie oraz objawy odstawienia. U noworodków eksponowanych nawet na

obniżone dawki leku mogą okołoporodowo wystąpić: benzodiazepinowy zespół wiotkiego dziecka (z angielskiego floppy infant syndrome) – hipotonia mięśniowa, niski wynik w skali Apgar, hipotermia, osłabiona reakcja na zimno, depresja neurologiczna, a także objawy zespołu odstawienia – hipertonia, hiperrefleksja, irytacja, niepokój ruchowy, drgawki, zaburzenia snu, nadmierna płaczliwość, dreszcze, bradykardia, sinica. Objawy mogą wystąpić zaraz po porodzie lub nawet do 3 tygodni po narodzinach i utrzymywać się kilka miesięcy (w zależności od stopnia ekspozycji i profilu farmakokinetycznego leku). Na przykład diazepam posiada długodziałający metabolit – nordiazepam, którego średni biologiczny okres półtrwania wynosi u dorosłych 73 godziny, a wśród benzodiazepin nieposiadających lub posiadających jedynie krótko-aktywne metabolity najdłużej działającym lekiem jest klonazepam (średni biologiczny okres półtrwania u dorosłych to 23 godziny). W raporcie podsumowano również aktualną wiedzę na temat działania teratogennego często stosowanych benzodiazepin i ustalono, że twierdzenie o teratogennym działaniu diazepamu jest nadal kontrowersyjne (Briggs et al., 1994), a także nie wykazano wad wrodzonych po stosowaniu u ludzi alprazolamu i lorazepamu (St Clair, Schirmer, 1992). Jedynie ograniczone badania wskazują na możliwość uszkodzenia płodu po stosowaniu klonazepam, stąd zalecane jest badanie ultrasonograficzne pod kątem anomalii pomiędzy 18 a 20 tygodniem ciąży. W podsumowaniu eksperci przedstawili wskazówki terapeutyczne do stosowania leków z grupy benzodiazepin. Jeżeli wskazane jest zastosowanie benzodiazepiny u kobiety ciężarnej to lekiem z wyboru powinien być alprazolam lub lorazepam (w stosunku do długodziałającego diazepam i klonazepam). Jak dotąd nie wykazano wad wrodzonych po stosowaniu alprazolamu i lorazepam. W postępowaniu zapobiegawczym lekiem preferowanym względem alprazolamu jest lorazepam, ze względu na nieco dłuższy okres działania, nieobecność aktywnych metabolitów i brak powiązania z występowaniem zespołu odstawienia u noworodka.

Inny raport kliniczny Amerykańskiej Akademii Pediatrycznej został w całości poświęcony problemowi zespołu odstawienia u noworodka. Duża jego część poświęcona jest objawom powiązanim z ekspozycją na benzodiazepiny. Autorzy zaznaczają, że w przypadku diazepam mogą się one pojawić dopiero 12 dni po porodzie, a utrzymywać do ósmego miesiąca życia noworodka. Pediatrzy zwrócili uwagę na fakt, że zespół ten może być mylony z innymi stanami chorobowymi, np. infekcją. Jeśli niemożliwe jest postawienie jednoznacznej diagnozy, konieczne jest przeprowadzenie dokładnego wywiadu medycznego. Specjaliści podkreślają jednocześnie, iż informacje uzyskane od matki są niedoszacowane, a analiza

moczu matki nie gwarantuje wykrycia ksenobiotyków. W związku z powyższym niezbędne jest badanie skriningowe noworodka (Hudak, Tan, 2012). Badania narażenia noworodków można przeprowadzić w moczu, krwi, krwi pępowinowej, smółce, włosach lub fragmentach tkanek. Testy immunologiczne krwi i moczu mimo opisanego zastrzeżenia są często wykorzystywane ze względu na szybkość wykonania. Gdy to możliwe, preferowana jest do badania próbka moczu, którą można w sposób nieinwazyjny pobrać do specjalnego pojemnika na mocz dla noworodków i niemowląt. Podstawową wadą tych materiałów biologicznych jest szybki czas eliminacji ksenobiotyków, który może skutkować fałszywie negatywnym wynikiem w przypadku opóźnionego zebrania próbek (Lozano et al., 2007). Tworzenie smółki rozpoczyna się w drugim trymestrze ciąży, stąd dodatni wynik analizy świadczy o ekspozycji na ksenobiotyk, która wystąpiła po tym czasie. Badanie smółki może dostarczyć bardziej szczegółowych informacji na temat historii stosowania substancji/leku. W sytuacji, gdy została ona przyjęta po raz pierwszy krótko przed porodem może okazać się, że upłynęło zbyt mało czasu, by przeniknęła do smółki i otrzymany wynik będzie fałszywie ujemny. Pobranie tego materiału jest utrudnione u noworodków ciężko chorych, małych i z oczywistych powodów wykluczone, gdy zostanie wydalona jeszcze podczas życia płodowego. W badaniu smółki oraz krwi pępowinowej niemożliwe jest ponadto ustalenie konkretnego okresu przyjęcia ksenobiotyku (Farst et al., 2011). Autorzy aktualnego raportu "Neonatal Drug Withdrawal" omówili powszechnie stosowane materiały biologiczne, zauważając że mocz dziecka musi zostać zebrany niezwłocznie po porodzie, gdyż wiele leków jest szybko eliminowanych z ustroju noworodka, a nawet dodatni wynik analizy dostarcza informacji wyłącznie na temat niedawnej ekspozycji na ksenobiotyk (Hudak, Tan, 2012). Docenili zalety smółki, zaznaczając zarazem, że ocena tego materiału biologicznego nie jest standardowo wykonywana w szpitalu. Należy też zebrać ją odpowiednio wcześnie, przed zanieczyszczeniem przez mleko przejściowe lub modyfikowane (Ostrea et al., 1989; Ryan et al., 1994). W raporcie wspomniano również o prowadzonych w laboratoriach badawczych analiz włosów pobranych od matek i noworodków (Ostrea et al., 2001). Cytowany zespół badaczy pod kierunkiem Vinner uznał w konkluzji swoich badań, iż analiza włosów umożliwia stwierdzenie wystąpienia noworodkowego zespołu odstawienia (Vinner et al., 2003). Ośrodki opieki zdrowotnej są odpowiedzialne za właściwą ocenę pacjenta za pomocą specjalistycznych technik potwierdzających wynik badań przesiewowych. Jest to bardzo ważne zwłaszcza w sytuacji, gdy u noworodka stwierdzono dodatni wynik kontroli na obecność środków toksycznych, a matka zaprzecza ich zażywaniu. Należy przyjąć możliwość

otrzymania błędnie pozytywnego wyniku np. w przypadku testów immunologicznych i zweryfikować go metodą bezpośredniej identyfikacji (chromatografii gazowej lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową). Odsetek błędnych wyników badań immunologicznych jest wysoki zwłaszcza w przypadku amfetamin i benzodiazepin (Valentine, Komoroski, 1995). Wnioski wypływające z opublikowanych badań wpłynęły na wybór bardziej specyficznej metody oznaczania w niniejszym projekcie badawczym, a mianowicie LC-MS/MS.

Włosy są praktycznym materiałem alternatywnym w ocenie stopnia intoksykacji po dłuższym okresie od jej wystąpienia, a także długotrwałej ekspozycji na ksenobiotyki. Stanowią lepszy wybór w porównaniu do próbek moczu i krwi. Tę zaletę analizy włosa można wykorzystać w określeniu stopnia narażenia płodu w czasie rozwoju wewnątrzmacicznego. Większość badań przeprowadzonych w tej dziedzinie dotyczy nadużywania leków, narkotyków i używek. Callahan i współpracownicy porównali stężenia kokainy oznaczonej we włosach pobranych od matek i ich noworodków oraz smółce i moczu z ankietowym wywiadem dotyczącym zażywania narkotyku uzyskanym od 59 pacjentek. Włosy matek zostały podzielone za 3 równe segmenty, które odpowiadały 3 kolejnym trymestrom ciąży. Uzyskane z analiz materiału biologicznego dane potwierdziły 94% deklaracji pozytywnych/potwierdzających stosowania kokainy i tylko 6% deklaracji negatywnych/zaprzeczających. Próbkę włosów noworodków zostały przebadane w całości i w 25 z 32 przypadków wykazano wynik pozytywny narażenia (Callahan et al., 1992). Nakahara z zespołem przeprowadził podobne badania z udziałem noworodków, u których wykryto metamfetaminę, metyloefedrynę, dihydrokodeinę oraz chlorfeniraminę. Ich matki używały tych środków w czasie ciąży (Nakahara, 1999). Pomiar stężenia opiatów we włosach pobranych od 17 par matek i noworodków został z kolei przeprowadzony przez naukowców pod kierunkiem Vinner (Vinner et al., 2003). Poważną kwestią ekspozycji w okresie prenatalnym na dym tytoniowy i jego składniki zajmował się m.in. Kintz. Kontrola 40 par próbek wykazała 83% korelację pomiędzy stężeniami nikotyny oznaczonymi we włosach matek i ich noworodków (Kintz et al., 1993). W kontekście ciekawych wyników badań dotyczących analizy włosów matek i noworodków pod kątem obecności substancji nielegalnych, a także istnienia potwierdzonych zagrożeń związanych z zażywaniem benzodiazepin w ciąży, została w niniejszym projekcie podjęta próba oceny ekspozycji tej grupy populacyjnej przy użyciu innowacyjnej matrycy biologicznej – włosa.

Noworodek narażony w czasie życia płodowego na działanie leków i narkotyków może cierpieć na zespół odstawienia o różnym stopniu nasilenia. Jego wyleczenie jest możliwe, lecz rozpoznanie źródła intoksykacji nie jest łatwe ze względu na szerokie spektrum wykazywanych przez dzieci symptomów oraz na brak wiarygodnych danych dotyczących przyjmowania substancji przez matki. Analiza włosów noworodków przyczynia się do ustalenia przyczyny ekspozycji, jej wielkości, czasu wystąpienia (co jest niezwykle istotne w przypadku rozwoju wewnątrzmacicznego organów i układów) i przeprowadzenia adekwatnej interwencji terapeutycznej, zwłaszcza gdy testy moczu i smółki są negatywne czy nieosiągalne (Balíková, 2005).

Przygotowanie próbek do analizy obejmuje kilka etapów, w tym mycie i segmentację (opcjonalnie). Dokładność analizy segmentowej zależy zarówno od procedury pobrania próbki, jak i etapu fragmentacji w laboratorium. Należy mieć na uwadze fakt, że stężenie ksenobiotyków w odcinkach bardziej oddalonych od cebulki włosa może być nieco niższe, co wiąże się z wymywaniem substancji na skutek codziennej pielęgnacji. Tylko włosy z głowy, odpowiednio wyrównane i zabezpieczone mogą być poddane analizie segmentowej. Pierwszym etapem przygotowania materiału jest mycie. Ma ono na celu usunięcie produktów ochrony i pielęgnacji włosów, potu, łoju, a także wszelkich zanieczyszczeń powierzchniowych (takich jak komórki skóry, pasożyty, brud), które mogłyby zakłócać wyniki poprzez obniżenie odzysku ekstrakcyjnego. Ponadto eliminuje potencjalne zanieczyszczenie zewnętrzne samym ksenobiotykiem (np. poszukiwanym lekiem, czy narkotykiem) (Society of Hair Testing, 2004). W chwili obecnej nie ma standaryzowanych procedur mycia, które zapewniłyby całkowite usunięcie mikrozanieczyszczeń bez naruszenia struktury włosów. Istnieją jednak ogólne zasady pozwalające na wykluczenie zanieczyszczeń środowiskowych z oceny ekspozycji po przyjęciu substancji. Powszechnie przyjętym jest, że rozpuszczalnik organiczny (taki jak dichlorometan lub aceton) usuwa zanieczyszczenia z powierzchni włosów, podczas gdy roztwory wodne lub metanol spulchniają włosy i uwalniają ksenobiotyk z macierzy. Wysuszona część włosów wybrana do analizy musi być homogeniczna, co uzyskuje się poprzez odpowiednie rozdrobnienie fragmentów pasm lub ich zmielenie. Do kolejnego etapu odważa się zazwyczaj od 10 do 50 mg włosów. Wstępna obróbka tak przygotowanego materiału biologicznego wymaga uwolnienia poszukiwanych ksenobiotyków z macierzy. Uzyskany ekstrakt może być następnie bezpośrednio analizowany technikami detekcyjnymi, ale najczęściej niezbędne jest oczyszczenie analitu techniką ekstrakcji ciecz-ciecz (z angielskiego Liquid-Liquid Extraction, LLE) lub do fazy stałej

(z angielskiego Solid Phase Extraction, SPE). Wybór niewłaściwej techniki ekstrakcyjnej może w znacznym stopniu obniżyć wydajność metody. Procedurę należy zawsze dobierać pod kątem oznaczanego związku chemicznego. Rozpuszczalniki powinny być wyselekcjonowane tak, by nie wpływały na ksenobiotyk obecny we włosach. Związki niestabilne, takie jak kokaina i heroina ulegają hydrolizie w środowisku kwasowym i zasadowym. Z kolei inkubacja z metanolem nie skutkuje rozkładem, natomiast odzysk jest niższy (Cooper et al., 2012).

Oznaczanie poszczególnych substancji w próbach biologicznych jest możliwe dzięki zastosowaniu metod immunologicznych i chromatograficznych (Musshoff, Madea, 2007). Testy immunologiczne stosowane zwykle do szybkiego badania skriningowego tradycyjnego materiału biologicznego są obecnie również dostępne dla matryc alternatywnych (m.in. włosów). Metody chromatograficzne wykorzystujące spektrometrię masową są mniej przydatne w przypadku oznaczania dużej liczby próbek, ale ich niewątpliwą zaletą jest zdolność jednoczesnej detekcji szerokiego spektrum substancji podczas jednej analizy. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, gdy objętość próbki jest niewielka. Należy upewnić się, że metoda jest wystarczająco czuła do wykrywania niskich stężeń ksenobiotyków, a matryca włosa nie zakłóca pomiaru. Wskazano, by wstępne wyniki pozytywne badań immunologicznych potwierdzać bardziej specyficznymi dla poszukiwanej substancji sposobami, np. z użyciem spektrometrii masowej (Society of Hair Testing, 2004). Rozdział i oznaczenie poszczególnych związków można osiągnąć poprzez zastosowanie chromatografii gazowej lub cieczonej sprzężonej ze spektrometrią masową. Ponieważ poziomy oznaczanych we włosach substancji są niższe od tych we krwi i moczu, często wykorzystywany jest spektrometr tandemowy – z dwoma analizatorami (MS/MS). W badaniach własnych wysoką specyficzność metody gwarantowana była przez trzy przejścia MRM w zastosowanej technice LC-MS/MS. Granica wykrywalności została oszacowana na poziomie 5 pg/mg włosów na podstawie najslabszego przejścia MRM i wartości S/N=3. Ponadto cennym aspektem tego typu technik analitycznych jest umiejętność wykrycia i oznaczenia ilościowego związku macierzystego oraz jego metabolitu/ów, co pomaga w odróżnieniu zanieczyszczenia od faktycznego przyjęcia ksenobiotyku (Cooper et al., 2012; Musshoff, Madea, 2007).

Ekstrakcja i oznaczanie benzodiazepin w próbkach włosów są stosunkowo trudne, ponieważ ich stężenie po wbudowaniu w macierz jest bardzo niskie. Istotną rolę w oznaczaniu ksenobiotyków we włosach odgrywa mycie próbek, ich wytrawianie oraz ekstrakcja substancji z macierzy. Benzodiazepiny próbowano uwolnić ze struktury włosów na

drodze trawienia enzymatycznego, podczas inkubacji z mocnymi kwasami i zasadami w podwyższonych temperaturach, bezpośrednią ekstrakcją rozpuszczalnikami, buforami lub płynem nadkrytycznym. Sachs i Kintz udowodnili, że zasadowa i kwasowa hydroliza próbek jest niewskazana w przypadku ekstrakcji benzodiazepin, a inkubacja z metanolem skutkuje podwyższeniem szumów podczas uzyskiwania chromatogramu (Sachs, Kintz, 1998). Hydroliza kwasowa i zasadowa może doprowadzić do rozkładu tych leków i powstania benzofenonów. Scott i Nakahara przeprowadzili porównanie technik ekstrakcji benzodiazepin z włosów pochodzących od szczurów i najlepsze wyniki uzyskali po wykorzystaniu mieszaniny metanolu z kwasem trifluorooctowym (Scott, Nakahara, 2003). Najbezpieczniejszą i efektywną metodą, zapewniającą stabilność substancji i dobry odzysk, jest delikatne trawienie enzymatyczne lub roztwarzanie buforowe, z ekstrakcją rozpuszczalnikami. Należy zaznaczyć, że ocena metod ekstrakcyjnych jest niedoskonała z powodu oczywistego braku standardowych, zunifikowanych próbek włosów zawierających ściśle określone ilości leku. Wysoce wskazane jest stosowanie deuterowanego wzorca wewnętrznego (np. diazepamu d_5 w przypadku benzodiazepin) w celu zwiększenia dokładności i precyzji metody. Po uwolnieniu benzodiazepin z matrycy, dalsze oznaczenie może zostać przeprowadzone podobnie jak w moczu czy we krwi (Kronstrand et al., 2002).

Po raz pierwszy benzodiazepiny we włosach wykrył zespół badaczy pod kierunkiem Sramek w roku 1992, kiedy to oznaczono diazepam za pomocą techniki radioimmunologicznej (Sramek et al., 1992). Kolejni naukowcy podjęli się wykrycia benzodiazepin we włosach bardziej czułymi i specyficznymi metodami. Na uwagę zasługuje w tym miejscu praca Cirimele i Kintza, w której przedstawiono wyniki analizy włosów po hydrolizie z buforem Sørensen. W 1997 roku zespół oznaczył flunitrazepam w zakresie stężeń 0,031-0,129 ng/mg oraz nordiazepam w zakresie 0,20-18,87 ng/mg, we włosach osób dorosłych, po ekstrakcji eterem dietylowym i chloroformem (Cirimele et al., 1997, a; Cirimele et al., 1997, b). Również w tym roku zespół pod kierunkiem Yegles podjął się zadania oznaczenia diazepam i oksazepam we włosach. Po zastosowaniu buforu octanowego, β -glukuronidazy oraz arylosulfatazy, a następnie ekstrakcji do fazy stałej uzyskano następujące wyniki: 0,01-2,21 ng diazepam oraz 0,20-3,44 ng oksazepam na mg włosów (Yegles et al. 1997).

Metodą oznaczania benzodiazepin we włosach była z wyboru chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową (z angielskiego gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS) (Kintz et al., 1996; Negrusz et al., 2000). Technika ta wymagała

jednak uprzedniej derywatywacji próbek, a i na etapie oznaczania występowało ryzyko częściowego lub całkowitego rozkładu termicznego tych substancji podczas nastrzyku. Próba optymalizacji procesu wykrywania leków benzodiazepinowych we włosach zaowocowała zastosowaniem chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), co umożliwiło ominięcie derywatywacji i skróciło procedurę przygotowania próbek biologicznych (McClean, 1999).

Uniwersalną metodę wykrywania 16 benzodiazepin i ich oznaczania ilościowego na poziomie pg/mg włosów przedstawiła Villain ze współpracownikami. Próbki po hydrolizie z buforem fosforanowym o pH=8,4 poddano ekstrakcji typu ciecz – ciecz z użyciem eteru dietylowego oraz dichlorometanu. Granica oznaczalności dla wszystkich leków z tej grupy wynosiła od 0,5 do 5 pg/mg. Kontrolowane badanie udowodniło, że zastosowanie powyższych procedur umożliwia wykrycie obecności benzodiazepiny nawet po jednokrotnym podaniu (Villain et al., 2005). Interesujące porównanie procedur ekstrakcyjnych przedstawił zespół naukowców pod kierunkiem Morini. Opisano w nim dwie techniki uwolnienia benzodiazepin z macierzy włosa, z których pierwsza obejmowała te same etapy co w/w metoda Villain, zaś druga roztwarzanie w metanolu. Uzyskane w ten sposób anality były oznaczane przy użyciu chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Przebadano 35 próbek (33 pobrane podczas autopsji) pod kątem obecności aż 32 substancji o budowie benzodiazepinowej. Procedura z zastosowaniem buforu okazała się bardziej czuła, wykazała niższe granice wykrywalności i oznaczalności (z angielskiego Limit Of Detection, LOD oraz Limit Of Quantification, LOQ). Przykładowo dla diazepamu wartości te wynosiły odpowiednio LOD=0,1 pg/mg, LOQ=0,3 pg/mg dla pierwszej metody oraz LOD=0,3 pg/mg i LOQ=1,5 pg/mg dla drugiej. Lepszy odzysk substancji uzyskano po wydłużeniu czasu inkubacji. Autorzy zaznaczają, że dla przesiewowego wykrycia przyjmowania benzodiazepin w stężeniach od 20 pg/mg wygodniejsze, szybsze i tańsze jest stosowanie roztwarzania w metanolu, które umożliwia bezpośrednie nastrzykiwanie próbek na układ LC-MS/MS (Morini et al., 2012). Chèze i współpracownicy zastosowali podobne warunki przygotowania materiału biologicznego do analizy. W celu dodatkowego oczyszczenia próbki poddano filtracji. Po rozpuszczeniu w mieszaninie acetonitrylu i metanolu anality były oznaczane przy użyciu LC-MS/MS. Również w tym badaniu uzyskano satysfakcjonujące granice LOD i LOQ (np. dla diazepamu LOD=1 pg/mg, LOQ=2 pg/mg) (Chèze et al., 2005). Metoda hydrolizy buforem fosforanowym została także wykorzystana przez naukowców z Chin, którzy we włosach ochotników oznaczyli podczas analizy segmentowej estazolam po podaniu

jednorazowym. Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią masową umożliwiło oznaczenie ilościowe związku w stężeniu 0,56 pg/mg po zażyciu 1 mg leku, w odcinku włosów o długości 2 cm, przyciętym przy skórze, miesiąc po ekspozycji (Xiang et al., 2011). W badaniach własnych zakres stężeń diazepamem oznaczonego u matek w III trymestrze ciąży pojedynczej wynosił 4,3 – 205,0 pg/mg włosów, a u ich noworodków 10,0 – 128,0 pg/mg włosów. Nordiazepam u matek osiągał w ostatnim trymestrze ciąży stężenia od 5,0 do 624,0 pg/mg włosów, a u noworodków od 8,2 do 527,0 pg/mg włosów. Kolejny metabolit – oksazepam – oznaczono na poziomie 23,0 pg/mg u jednej z matek, oraz 20,2 i 60,0 pg/mg u dwójki dzieci. Stężenia diazepamem oznaczone u matek bliźniąt we włosach z trzeciego trymestru wynosiły 1,8 – 100,5, nordiazepamem 1,1 – 69,5, zaś oksazepamem 0,6 – 5,4 pg/mg włosów. W grupie pierwszej połowy noworodków stężenie diazepamem mieściło się w zakresie 8,6 – 1408,0, a u drugiej w zakresie 1,8 – 94,1 pg/mg włosów. Główny metabolit – nordiazepam, osiągał stężenia od 2,7 do 537,0 pg/mg w pierwszej połowie bliźniąt oraz od 3,4 do 402,7 pg/mg w drugiej połowie. Zakres stężeń oksazepamem w pierwszej grupie noworodków z ciąży bliźniaczych wynosił 9,9 – 27,4 pg/mg włosów, a u drugiej 1,4 – 12,7 pg/mg.

Wybór metody oczyszczania i ekstrakcji substancji z próbek w badaniach własnych był przemyślany i opierał się na analizie aktualnego piśmiennictwa światowego. Na podstawie najnowszych metod wykorzystywanych do jednoczesnego wykrywania różnych leków z grupy benzodiazepin, opisanych w literaturze przez prekursorów analiz włosów, zdecydowano o inkubacji prób z buforem fosforanowym i diazepamem d_5 jako wzorcem wewnętrznym (Villain et al., 2005). Procedura ekstrakcyjna okazała się skuteczna w uzyskiwaniu czystych analitów umożliwiających oznaczenie benzodiazepin na poziomie kilku pikogramów na miligram włosów. Według analityków z zespołu Morini użycie prostszej i szybszej metody metanolowej jest zadowalające, ale zastosowanie buforu zapewnia obniżenie dolnej granicy detekcji benzodiazepin (Morini et al., 2012).

Wzrost popularności Z-leków, selektywnych względem receptora benzodiazepinowego ω_1 , stworzył potrzebę opracowania procedur jednoczesnego wykrywania środków farmakologicznych o klasycznej budowie benzodiazepinowej, jak i zopiklonu, zolpidemu i zaleplonu. Irving i Dickson zaproponowali użycie metanolu z dodatkiem kwasu trifluorooctowego jako stabilizatora dla zopiklonu i jego metabolitu. Kolejne etapy obejmowały wytrząsanie z buforem fosforanowym o $pH=7,2$, dichlorometanem oraz rozpuszczanie w fazie ruchomej do analizy LC-MS. Badacze otrzymali bardzo dobre

granice wykrywalności dla 14 związków (najniższa 0,01 pg/mg dla midazolamu, najwyższa 6,00 pg/mg dla temazepamu) (Irving, Dickson, 2007). W badaniach przeprowadzonych przez zespół Rust otrzymano zadowalający odzysk dla benzodiazepin po jednokrotnej ekstrakcji bezpośredniej metanolem. Poszerzenie profilu badań o Z-leki wymagało jednakże wydłużenia procesu o dodatkową ekstrakcję tym rozpuszczalnikiem zmieszany z mrówczanem amonu. Zabieg ten okazał się istotny, jako że aż w 24% próbek wykryto zolpidem. Najczęściej oznaczanymi benzodiazepinami były natomiast diazepam, nordiazepam i oksazepam (odpowiednio 10, 13 i 12% prób). Ponieważ nordiazepam i oksazepam stanowią metabolity diazepamu, związki te były często obecne we włosach jednocześnie (Rust, 2012).

Publikacje dotyczące wykrywania benzodiazepin we włosach opierały się głównie na opisie kontrolowanych badań na zdrowych ochotnikach lub przypadków kryminalnych, w których leki te były przyczyną zgonów lub nadużyć. Badacze nie byli zgodni co do przydatności metody do analiz klinicznych, między innymi kontroli podporządkowania się zaleceniom lekarskim. Traqui i współpracownicy wyrazili obawę, że nie istnieje korelacja między dawką podanego leku a jego stężeniem we włosach. Potencjalnym powodem braku konsensusu są trudności w ustaleniu precyzyjnych informacji retrospektywnych na temat przyjmowania leków, stopnia faktycznego zastosowania się do wskazówek lekarskich oraz duża zmienność międzysobnicza w pigmentacji czy pielęgnacji włosów (Tracqui et al., 1995). Zespół Kronstranda argumentuje jednak na korzyść analizy włosa, że w tego typu technice pacjent stanowi autokontrolę, ponieważ porównywane są względem siebie stężenia substancji oznaczone w poszczególnych segmentach włosów. Z tego względu wiele źródeł różnic międzysobniczych – pigmentacja, pojemność metaboliczna, współczynnik wzrostu włosa – może zostać wykluczonych (Kronstrand et al., 2002). Analogiczne porównanie można zastosować w przypadku oznaczania benzodiazepin we włosach matek i noworodków, które zostało przedstawione w badaniach własnych. Stężenia leków oznaczone w poszczególnych segmentach odpowiadają trymestrom ciąży, stanowiąc odzwierciedlenie ekspozycji. Można je porównywać względem siebie w celu określenia przebiegu narażenia, a także względem stężeń leku oraz jego metabolitów we włosach noworodka. Jedynym i całkowitym źródłem benzodiazepin dla płodu było bowiem przyjmowanie leku w czasie trwania ciąży przez matkę, bez względu na drogę wniknięcia substancji (wody płodowe, łożysko).

Przygotowując się do przeprowadzenia analizy włosów pod kątem obecności ksenobiotyków należy mieć na uwadze fakt, że pomimo licznych zalet jest ona obciążona

również pewnymi wadami. Analiza segmentowa dostarcza bardziej szczegółowych informacji na temat długotrwałego narażenia w porównaniu do testów przeprowadzanych na ślinie, moczu czy krwi. Ksenobiotyki charakteryzują się dłuższym okresem biologicznego półtrwania w matrycy włosa. Ekspozycja długoterminowa jest jednym z głównych tematów badań związanych ze zdrowiem publicznym. Brak aktywności metabolicznej w łodydze włosa oraz stosunkowo ujednolicony współczynnik wzrostu w określonym regionie ciała może pomóc w ustaleniu faktów z minionego narażenia (określenie profilu historycznego), w założeniu, że oznaczone stężenia substancji w poszczególnych odcinkach włosa odpowiadają kolejnym miesiącom ekspozycji. Ksenobiotyki można oznaczać we włosach standardowymi technikami, jak i bardziej nowoczesnymi, wydajnymi metodami, które można stosować w badaniach epidemiologicznych. Próbkę włosów można pobrać w łatwy sposób, bez konieczności specjalnego przygotowania uczestników badania. Procedura nie jest krępująca, jest bezbolesna, a zebrany materiał można długo i niskim kosztem przechowywać bez ryzyka utraty jakości próbek. Użycie tego biomarkera wyklucza błędy ankietowe związane z rozmijaniem się z prawdą, nieświadomością lub zapominaniem o faktach dotyczących ekspozycji na ksenobiotyki. Analiza włosa noworodka umożliwia ocenę ekspozycji płodowej na różnorodne czynniki (Al-Delaimy, 2002). W kontekście badań własnych ważnym aspektem projektu badawczego jest charakterystyka grupy badanej, która obejmowała zarówno pacjentki długo hospitalizowane – przyjmujące diazepam zaordynowany przez lekarza, jak i te, które zażywały lek doraźnie lub bez kontroli medycznej.

Zastrzeżenia dotyczące analizy włosa dotyczą zarówno etapu pobierania prób, jak i przeprowadzenia toku analitycznego. Stężenie substancji we włosach nie wykazuje jednoznacznej korelacji z dawką i może być zaburzone przez nieregularny wzrost włosów, ich kolor itp. Ponadto zabiegi chemiczne stosowane na włosach, takie jak utlenianie i trwała ondulacja mogą naruszać ich strukturę i powodować wymywanie ksenobiotyków. Materiały referencyjne dla poszczególnych technik oznaczania ksenobiotyków są wciąż trudnodostępne. Użycie analizy włosa jest bardziej kosztowne od kwestionariusza ankiety. W niektórych kręgach kulturowych istnieją ograniczenia dotyczące obcinania włosów. W kontekście badań u noworodków trzeba mieć na uwadze fakt, iż część dzieci rodzi się z małą ilością włosów na głowie, co uniemożliwia zebranie odpowiedniej próbki do analizy (Al-Delaimy, 2002).

Zasady fizjologii, fizykochemiczne i proceduralne, które charakteryzują analizę włosa są skomplikowane. Wiąże się to z ryzykiem popełnienia błędów wykonania analizy.

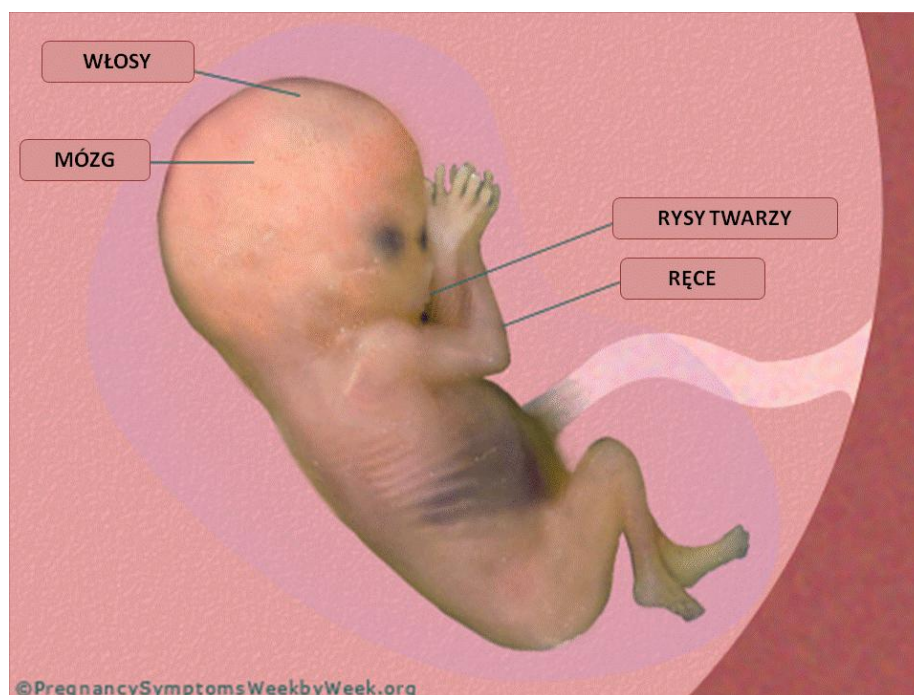
Znajomość zagrożeń to podstawowy warunek odpowiedzialnego postępowania analitycznego – począwszy od etapu zbierania próbek aż po interpretację wyników. Ponieważ to narzędzie diagnostyczne zdobywa coraz większe uznanie, także w kryminalistyce i sądownictwie, prawidłowe wnioskowanie nabrało niezwykle istotnego znaczenia. Rezultat badania może rozstrzygać w kwestiach odpowiedzialności prawnej, przyznawania praw do opieki nad dziećmi, prawa jazdy, kontroli abstynencyjnej w miejscu pracy i wielu innych (Pragst, 2004)

W przypadku retrospektywnej analizy włosa stosowanej w badaniach epidemiologicznych wśród kobiet ciężarnych i ich dzieci właściwa ocena danych może warunkować postawienie trafnej diagnozy. Najpoważniejsze zastrzeżenia dotyczące analizy włosa skupiają się na analizie segmentowej. Wynikają one z konieczności uzyskania dokładnej długości kosmyka włosów pobranego do analizy. Precyzyjne zebranie materiału biologicznego warunkuje w tym wypadku wiarygodność uzyskanych wyników. Wiele czynników genetycznych i zewnętrznych może wpływać na wzrost włosa. Należą do nich środowisko, wiek, ciąża czy zmiany hormonalne. Ponieważ jednak naukowcy są zgodni co do niewielkiego wpływu tych zmiennych na ostateczny wynik analizy, dla uproszczenia przyjmuje się średni współczynnik wzrostu włosa, wynoszący 1 cm na miesiąc dla włosów rosnących na wierzchołku głowy.

W badaniach własnych, podczas pobierania włosów od matki zwrócono więc szczególną uwagę na selekcję pasma ze szczytowego miejsca na głowie (w tym miejscu włosy znajdują się w tej samej fazie wzrostu) i staranne związanie włosów tuż nad powierzchnią skóry. Cięcie było prostopadłe i zdecydowane, przez co uzyskano pożądaną jednolitość długości dla wszystkich włosów. Niedoświadczeni analitycy mogą popełnić błąd wybierając zbyt szerokie pasmo włosów, niewłaściwie zabezpieczając kosmyk przed rozpadem lub obcinając go pod kątem, co uniemożliwia uzyskanie identycznych końców proksymalnych w całej objętości próby. Fragment włosa z wbudowanym ksenobiotykiem pojawia się na powierzchni głowy z około dwutygodniowym opóźnieniem (LeBeau et al., 2011). W prezentowanych badaniach włosy obcinano pacjentkom Oddziału Porodowego GPSK Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu 3 dni po porodzie, ponieważ nie uczestniczyły one w programie typu follow-up w okresie połogowym. Z badania wykluczono ponadto pacjentki, których włosy były zniszczone agresywnymi zabiegami kosmetycznymi, takimi jak silne rozjaśnianie i trwała ondulacja.

Kolejne ograniczenie opisywanych badań stanowi rozwój włosów u płodu. Rozpoczyna się on około 10 tygodnia życia płodowego, a większość włosów pojawia się na powierzchni skóry około 16 tygodnia życia (Gareri, Koren, 2010) (Rycina 56). Dane te

wskazują, że matryca włosów dziecka może nie odzwierciedlać ekspozycji przebytej w pierwszym trymestrze ciąży. W prezentowanych badaniach możliwe jest jednak zestawienie danych uzyskanych zarówno od matki, jak i noworodka. Istotnym jest również fakt, że obecnie obawy specjalistów opieki zdrowotnej w zakresie leczenia benzodiazepinami dotyczą głównie narażenia w późnych okresach ciąży, związanych z wykształceniem u płodu uzależnienia, a w konsekwencji zespołu odstawienia po narodzinach. Zdarza się także, że noworodek rodzi się z niewielką ilością włosów na głowie, co utrudnia pobranie odpowiedniej masy próbki. Włosy wykształcone w czasie życia płodowego są zanieczyszczone płynem owodniowym, jednakże nie należy rozpatrywać tego zanieczyszczenia jako zewnętrznego w kontekście oceny ekspozycji wewnątrzmacicznej na leki (Bailey et al., 1997).



RYCINA 56. Około 14 tygodnia ciąży u płodu pojawiają się włosy na główce, w które od początku wzrostu wbudowują się ksenobiotyki przenikające przez barierę łożyskową

Źródło: na podstawie www.pregnancysymptomsweekbyweek.org, data wejścia: 04.06.2012

W dotychczas zrealizowanych projektach badawczych nie podjęto próby zestawienia danych uzyskanych z analizy włosów pobranych jednocześnie od matek i ich noworodków narażonych prenatalnie na benzodiazepiny. W wyniku analizy statystycznej stężeń diazepamu

i jego metabolitów w próbkach pobranych podczas badań własnych od matek i ich noworodków z ciąży pojedynczej stwierdzono, że wzrost stężenia nordiazepamu (głównego metabolitu diazepamu) u matki w III trymestrze ciąży jest związany ze wzrostem jego stężenia u płodu. Co więcej stężenie nordiazepamu u matek i noworodków ponad dwukrotnie przewyższało stężenie związku macierzystego. Zarówno stężenie diazepamu, jak i nordiazepamu było wyższe u noworodków niż u matek w III trymestrze. W przypadku ciąż mnogich u połowy bliźniąt średnie stężenie diazepamu było nawet ponad siedmiokrotnie wyższe niż u matek w III trymestrze. Stężenie nordiazepamu było ponad trzy razy wyższe u noworodków w obu podgrupach niż u matek w ostatnim trymestrze ciąży. Na podstawie powyższych obserwacji można przypuszczać, że ma to związek z szybkim metabolizmem diazepamu do farmakologicznie aktywnego nordiazepamu, a także z większym powinowactwem tego metabolitu do struktury włosa dziecka. Istnieje także realne zagrożenie dla zdrowia płodu i noworodka wynikające z kumulacji nordiazepamu w jego organizmie.

W wyniku przeprowadzenia badań dotyczących ekspozycji płodowej na narkotyki z użyciem analizy włosa matki i noworodka, badacze odkryli, że może istnieć zmienność międzypersonalna w wielkości przezłożyskowego przenikania np. kokainy. Naukowcy podkreślają także potencjalne różnice w płodowym metabolizmie ksenobiotyków oraz w stopniu ich wbudowywania we włosy rozwijającego się płodu (Lozano et al., 2007). Na poparcie tych wątpliwości przytaczane są przykłady badań, w których u noworodków kobiet zażywających i silnie uzależnionych od kokainy nie wykryto tego związku. W analizie segmentowej, we fragmentach włosów matki odpowiadających poszczególnym trymetrom ciąży oznaczono metabolit kokainy, jednakże nie znaleziono go we włosach dziecka (Potter et al., 1994; Katikaneni et al., 2002; Marques et al., 1993). Zastrzeżeń tych jednak nie można przyjmować niepodważalnie dla pozostałych ksenobiotyków. Stopień przenikania związku przez barierę łożyskową oraz powinowactwo do macierzy włosa uwarunkowane jest przez zmienne parametry, takie jak: rozpuszczalność lipidowa, współczynnik wiązania z białkami i czynniki fizykochemiczne, które sprawiają, iż substancja przyjmuje postać niezjonizowaną we krwi. Ciekawy aspekt zależności pomiędzy ekspozycją na benzodiazepiny a typem łożyska i kosmówki został przeanalizowany w badaniach własnych podczas analizy różnic między poziomami stężeń leków w obrębie bliźniąt. Analiza statystyczna nie wykazała jednak takich różnic po porównaniu rodzaju bliźniąt (jedno- i dwujajowych) oraz typów łożysk.

Na każdym etapie analizy włosa należy wystrzegać się potencjalnych uchybień. Dotyczą one zarówno pracy analityka, jak i schematu postępowania (Pragst, Balikova, 2006).

Przy określeniu celu badania źródłem błędów mogą być niedostateczne informacje na temat podmiotu badania, brak wywiadu środowiskowego, historii choroby lub przypadku, niewłaściwy wybór włosa jako materiału do badań, a także nieprawidłowa długość obciętych włosów. W badaniach własnych wybór włosa jako próbki biologicznej umożliwił przeprowadzenie badań retrospektywnych, a pobranie fragmentów o długości 9 cm pozwoliło na przeprowadzenie analizy segmentowej włosów matek. Podczas pobierania i zabezpieczania próbki należy zwrócić szczególną uwagę na jednoznaczną identyfikację podmiotu badania, dostateczną ilość włosów, prawidłowe oznakowanie i zabezpieczenie próbki oraz ryzyko jej zanieczyszczenia lub rozkładu. Podczas realizacji niniejszych badań kierowano się zaleceniami Society of Hair Testing. Kolejnymi ważnymi etapami są oczyszczanie i ekstrakcja substancji z włosów. Błędem o zasadniczym znaczeniu może być błędny wybór rozpuszczalników lub ich kolejności, niewłaściwy wybór metody roztwarzania i ekstrakcji. Doświadczenia autorów takich jak Villain, Morini, Cirimele, Sachs czy Kintz pozwoliły na dobranie optymalnych warunków oczyszczania i ekstrakcji w projekcie badań własnych. Istnieje ponadto ryzyko rozkładu ksenobiotyku lub wysokiego stopnia zanieczyszczenia analitu. W kluczowym momencie oznaczania związków źródłem błędów może być natomiast niedostateczna specyficzność, czułość i dokładność metody, brak deuterowanego standardu w technice GC-MS lub LC-MS, a w konsekwencji błędnie pozytywny lub negatywny wynik. Podczas realizacji badań własnych wykorzystano wzorzec wewnętrzny – diazepam deuterowany oraz technikę LC-MS/MS, co gwarantowało wysoki poziom specyficzności, dokładności i precyzji pomiarów. W podsumowaniu analizy niezbędne jest zachowanie obiektywizmu warunkującego wystawienie racjonalnej ekspertyzy – możliwe są nieadekwatna interpretacja stężenia ksenobiotyku, czasu ekspozycji, czy nieuwzględnienie właściwości próbki (Pragst, Balikova, 2006).

Mimo wymienionych pułapek analitycznych obserwuje się rosnące zainteresowanie analizą włosa na świecie. Nowe kierunki w analizie włosa obejmują badania nad mechanizmem inkorporacji i retencji ksenobiotyków we włosie. Uwzględniają one eksperymenty na modelu zwierzęcym, użycie substancji znakowanych izotopowo, badania *in vitro*, określenie wpływu działań zewnętrznych na strukturę włosów, a także optymalizację metod usuwania zanieczyszczeń. Poszukiwane są nowe procedury analityczne – np. metody immunoenzymosorbcyjne (z angielskiego ELISA), alternatywne metody przygotowania próbek (np. mikroekstrakcja do fazy stałej z headspace – z angielskiego HS-SPME). Coraz bardziej popularne i dostępne staje się wykorzystanie chromatografii cieczowej sprzężonej

z tandemową spektrometrią masową (LC-MS/MS) z nowoczesnymi analizatorami masy (QTrap, Q-TOF). Analiza włosów znajduje ponadto nowe zastosowania, np. w przestępstwach z wykorzystaniem substancji chemicznych, w których określa się obecność: benzodiazepin, Z-leków, neuroleptyków, używek, etanolu, leków antyhistaminowych, anestetyków i narkotyków. Istotnym aspektem takiej analizy jest optymalizacja metod w kierunku stwierdzenia ekspozycji po jednokrotnym podaniu ksenobiotyku. Duże wyzwanie dla analityków wykorzystujących włosy jako materiał biologiczny jest analiza pod kątem obecności rzadkich, nowych, labilnych lub niespecyficznych związków, takich jak kwasu γ -hydroksymasłowego (z angielskiego GHB), kawainy, katynonu, ketaminy i leków (m.in. benzodiazepin, antybiotyków, chemioterapeutyków). Obiecującym trendem wymagającym jednak obecnie dodatkowych obserwacji jest kliniczne zastosowanie analizy włosów. Nowoczesnym zadaniem takiej analizy byłoby dostarczanie informacji dotyczących profilu ekspozycji długoterminowej, które mogłyby znaleźć zastosowanie w monitoringu klinicznym, diagnostyce, terapiach odwykowych, ocenie ekspozycji płodowej, kontroli dostosowania pacjentów do zaleceń lekarza (z angielskiego compliance) – w terapii padaczki, zaburzeń psychicznych czy dolegliwości bólowych (Musshoff, Madea 2007).

7. WNIOSKI

1. Diazepam i nordiazepam wbudowują się trwale w strukturę włosa.
2. Obecność diazepam i nordiazepamu we włosach noworodka potwierdza fakt przenikania benzodiazepin przez barierę łożyskową.
3. Analiza segmentowa włosa umożliwia ocenę czasu przyjmowania leku przez matkę.
4. Leki i ich metabolity oznaczane we włosach mogą stanowić biomarker narażenia prenatalnego.
5. Zastosowana metoda LC-MS/MS okazała się przydatna w tego typu oznaczeniach. Pozwoliła na wykrycie nawet niewielkich ilości ksenobiotyków, rzędu kilku pikogramów na miligram włosów.
6. Diazepam we włosach noworodków z ciąży pojedynczej i mnogiej osiągał stężenia porównywalne lub wyższe od stężeń oznaczonych u matek. Może to potwierdzać fakt, że zdolność metabolizowania diazepam u płodu jest ograniczona.
7. Nordiazepam wykryto w wyższych stężeniach we włosach noworodków niż ich matek, co może świadczyć o kumulacji związku w organizmie dziecka. Fakt ten dotyczył zarówno noworodków z ciąży pojedynczej, jak i bliźniaczej.
8. Pozostałe metabolity diazepam i nordiazepamu - oksazepam i temazepam – wykryto w sporadycznych przypadkach, w bardzo niskich stężeniach, co może świadczyć o ograniczonym metabolizmie płodowym nordiazepamu.
9. Analiza porównawcza pomiędzy noworodkami z ciąż bliźniaczych, uwzględniająca typ bliźniąt i rodzaj łożyska, nie wykazała różnic istotnych statycznie w ekspozycji na przyjęty przez matkę diazepam.

8. STRESZCZENIE

Podjęcie leczenia benzodiazepinami kobiet ciężarnych może być uzasadnione, ponieważ udowodniono, że nieleczony stres wiąże się z ryzykiem przedwczesnego porodu lub niskiej masy urodzeniowej dziecka, a współistniejące poważne stany patologiczne mogą nawet skutkować utratą ciąży. Jednak każda decyzja uwzględniająca terapię benzodiazepinami powinna być przemyślana, ponieważ niesie za sobą niebezpieczeństwo dla rozwijającego się płodu. Leki te przenikają przez barierę łożyskową i osiągają w organizmie płodu stężenia wyższe niż u matki. W ekspozycji płodu na związki benzodiazepinowe bardzo istotną kwestią jest czas jej wystąpienia w okresie ciąży.

W pracy wykorzystano pomiar stężenia benzodiazepin we włosach matek i ich noworodków narażonych prenatalnie na lek z tej grupy. Benzodiazepiny wbudowują się w strukturę włosa. W odróżnieniu od badania płynów ustrojowych, w których leki ulegają szybkiemu metabolizowaniu i wydaleniu, analiza włosów dostarcza informacji na temat bliskiej lub odległej historii przyjmowania leku przez matkę.

Opracowanie, walidacja i określenie funkcjonalności metody oznaczania benzodiazepin u ciężarnych oraz ich noworodków umożliwiła ustalenie okresu narażenia, związanego z tym ryzyka zdrowotnego dla dziecka i wdrożenia odpowiedniego postępowania terapeutycznego.

Badania przeprowadzono wśród ciężarnych pacjentek Oddziału Porodowego Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, które w okresie ciąży przyjmowały lek z grupy benzodiazepin – diazepam (Relanium). Zgodę na przeprowadzenie badań wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (zgoda nr 387/08 z dnia 03.04.2008 r.). 62 zakwalifikowane do projektu pacjentki były w ciąży pojedynczej, a 33 – ciąży bliźniaczej. Badaniami objęto również ich noworodki – 62 z ciąży pojedynczej oraz 66 bliźniąt z ciąży mnogiej. Materiałem biologicznym do badań były włosy matek i ich noworodków. Włosy matek poddano analizie segmentowej, która umożliwiła określenie czasu przyjęcia leku. Benzodiazepiny we włosach oznaczono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas, z użyciem diazepamu deuterowanego d_5 jako wzorca wewnętrznego, po uprzedniej ekstrakcji z wykorzystaniem techniki ciec-ciecz. Analizę chromatograficzną wykonano w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 10 (StatSoft).

W grupie kobiet w ciąży pojedynczej wykryto diazepam w średnim stężeniu $30,8 \pm 15,3$, $31,6 \pm 36$ oraz $34,1 \pm 42,4$ pg/mg we fragmentach włosów odpowiadających kolejnym trymestrom ciąży. We włosach I trymestru oznaczono główny metabolit diazepam – nordiazepam w średnim stężeniu $64,5 \pm 61,5$, II trymestru – $52,9 \pm 48,1$ oraz III trymestru – $89,9 \pm 122,8$ pg/mg. U ich noworodków średnie stężenie diazepam wynosiło $53,3 \pm 36,5$, a nordiazepam $108,1 \pm 144,2$ pg/mg włosów. Stosunek stężenia diazepam oznaczonego u noworodków do stężenia oznaczonego we włosach matek w III trymestrze wyniósł 1,56, zaś nordiazepam 1,2. We włosach matek odpowiadających III trymestrowi ciąży wykryto 2,64, a we włosach pobranych od noworodków 2,03 razy więcej nordiazepam niż diazepam.

W grupie kobiet ze zdiagnozowaną ciążą mnogą oznaczono we włosach I trymestru diazepam w średnim stężeniu $33,5 \pm 37,3$, II trymestru – $22,4 \pm 23,6$, a III trymestru – $30,9 \pm 27,9$ pg/mg. Nordiazepam oznaczono we włosach odpowiadających kolejnym trymestrom ciąży bliźniaczej w średnich stężeniach: $15,8 \pm 25,1$; $14,8 \pm 19,0$ oraz $23,8 \pm 22,8$ pg/mg. Diazepam wykryto w średnim stężeniu wynoszącym $228,5 \pm 479,6$ u jednej połowy bliźniąt oraz $28,1 \pm 26,1$ pg/mg włosów u drugiej. Średnie stężenia nordiazepam w tych grupach wynosiły odpowiednio $80,1 \pm 114,9$ i $88,9 \pm 89,3$ pg/mg włosów. Stosunek średnich stężeń nordiazepam do diazepam oznaczonych we włosach matek z III trymestru wyniósł 0,77, a u dwóch grup noworodków odpowiednio 0,35 i 3,16.

Stosunek stężeń diazepam oznaczonego u jednej połowy bliźniąt do stężenia we włosach matek w III trymestrze wyniósł 7,39, a u drugiej 0,9. Nordiazepam został wykryty w ilości 3,36 razy większej u pierwszej połowy bliźniąt niż w III trymestrze u matek oraz 3,73 razy większej u drugiej połowy.

W wyniku badań stwierdzono, że diazepam i nordiazepam wbudowują się trwale w strukturę włosa. Obecność diazepam i nordiazepam we włosach noworodka potwierdza fakt przenikania benzodiazepin przez barierę łożyskową. Analiza segmentowa umożliwia ocenę czasu przyjmowania leku przez matkę. Leki i ich metabolity oznaczane we włosach mogą stanowić biomarker narażenia prenatalnego. Zastosowana metoda LC-MS/MS okazała się przydatna w tego typu oznaczeniach. Pozwoliła na wykrycie nawet niewielkich ilości ksenobiotyków, rzędu kilku pikogramów na miligram włosów. Diazepam we włosach noworodków z ciąży pojedynczej i mnogiej osiągał stężenia porównywalne lub wyższe od stężeń oznaczonych u matek. Może to potwierdzać fakt, że zdolność metabolizowania diazepam u płodu jest ograniczona. Nordiazepam wykryto w wyższych stężeniach we włosach noworodków niż ich matek, co może świadczyć o kumulacji związku w organizmie

dziecka. Fakt ten dotyczył zarówno noworodków z ciąży pojedynczej, jak i bliźniaczej. Pozostałe metabolity diazepam i nordiazepam - oksazepam i temazepam – wykryto w sporadycznych przypadkach, w bardzo niskich stężeniach, co może świadczyć o ograniczonym metabolizmie płodowym nordiazepam. Analiza porównawcza pomiędzy noworodkami z ciąży bliźniaczych, uwzględniająca typ bliźniąt i rodzaj łożyska, nie wykazała różnic istotnych statycznie w ekspozycji na przyjęty przez matkę diazepam.

Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę dla dalszych badań kontrolnych, obejmujących obserwację zdrowia dzieci narażonych w okresie prenatalnym na benzodiazepiny. Mogą one przyczynić się do określenia szkodliwych efektów odległych utrzymujących się u dzieci, u których stwierdzono wysokie poziomy leków. Potencjalną korzyścią zastosowania niniejszej metody byłoby wykonywanie badań przesiewowych noworodków i szybsze wdrożenie postępowania terapeutycznego u rozwijającego się dziecka.

9. SUMMARY

Treatment of pregnant women with benzodiazepines may be justified since untreated stress disorders are associated with a risk of preterm delivery or low birth weight of a newborn. Co-existing severe pathological conditions can even result in pregnancy loss. However, each decision about implementation of such treatment should be thoroughly considered as it carries danger for developing fetus. Benzodiazepines permeate placental barrier and are present in higher concentrations in fetus than in mother. Time of exposure during course of pregnancy is a significant aspect of fetal exposure to drugs. Benzodiazepine concentration assay in hair of mothers and newborns exposed prenatally to these drugs was performed in the studies. Development, validation and evaluation of benzodiazepine determination method in mothers and their newborns enables assessment of time of exposure, health risks for the child and implementation of adequate therapeutic procedures. The studies were carried out among patients of Obstetric Unit in the Gynecological-Obstetrical Clinical Hospital of Poznan University of Medical Sciences (PUMS), who were prescribed diazepam (Relanium) during pregnancy. Permission for the research was issued by the Bioethical Committee by PUMS (permission No 387/08 on April 3rd 2008). 62 of enrolled patients were in singleton and 33 in twin pregnancy. Moreover, the study group included 62 newborns from the singleton pregnancies and 66 twin newborns from multiple ones. Hair collected from mothers and their newborns was the biological sample used in the project. Segmental hair analysis was performed on mothers' hair, which enabled assessment of drug administration time. Benzodiazepines – diazepam and its metabolites – were assayed in the Institute of Forensic Research in Cracow, Poland, by means of liquid chromatography – tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS), with use of diazepam d₅ as an internal standard, subsequent to liquid-liquid extraction. Statistical analysis of obtained data was performed with Statistica 10 (StatSoft) software.

In the group of women in singleton pregnancy diazepam was detected and determined in three hair segments corresponding to subsequent trimesters, in mean concentrations: 30.8±15.3, 31.6±36 and 34.1±42.4 pg/mg, respectively. Diazepam's main metabolite – nordiazepam – was determined in a mean concentration of 64.5±61.5 pg/mg in hair shaft from the 1st trimester, 52.9±48.1 pg/mg from the 2nd, and 89.9±122.8 pg/mg in the 3rd trimester. Mean concentration of diazepam in their newborns' hair was 53.3±36.5 pg/mg and of

nordiazepam – 108.1 ± 144.2 pg/mg. The ratio of diazepam concentration determined in newborns to concentration assayed in mothers' hair in the 3rd trimester was 1.56. Ratio of nordiazepam concentrations in these samples was 1.2. The level of nordiazepam was 2.64 higher than diazepam in hair collected from mothers in the 3rd trimester and 2.03 times higher than in hair of newborns.

In the group of women in twin pregnancy diazepam was determined in a mean concentration of 33.5 ± 37.3 pg/mg in hair from the 1st trimester, 22.4 ± 23.6 pg/mg in hair from the 2nd one and 30.9 ± 27.9 pg/mg from the 3rd one. Nordiazepam was assayed in hair segments corresponding to the three subsequent trimesters of twin pregnancy in mean concentration: 15.8 ± 25.1 , 14.8 ± 19.0 and 23.8 ± 22.8 pg/mg. Diazepam was detected at levels amounting to 228.5 ± 479.6 pg/mg in the first half of twins and 28.1 ± 26.1 pg/mg in the other half. Mean concentrations of nordiazepam in these groups of newborns were 80.1 ± 114.9 and 88.9 ± 89.3 pg/mg of hair, respectively. Ratio of mean nordiazepam concentration to mean diazepam concentration determined in mother's hair from the 3rd trimester was 0.77 and in two groups of twins – 0.35 and 3.16, respectively.

Ratio of diazepam hair concentrations to concentrations found in mothers' hair from the 3rd trimester was 7.39 in the first subgroup of twins and 0.9 in the second one. There was 3.36 times more nordiazepam determined in hair collected from the first half of twins and 3.73 times more in the second one than in mothers' hair from the 3rd trimester.

In this study it was concluded that diazepam and nordiazepam are permanently incorporated into the hair structure. Presence of diazepam and its metabolites in newborn's hair confirms that these benzodiazepines permeate placental barrier. Segmental analysis of mothers' hair enabled the assessment of drug administration time. Diazepam and its metabolites determined in hair of newborns may serve as biomarkers of prenatal exposure to these drugs. The performed LC-MS/MS analysis was proved to be useful in execution of the research project. It was accurate enough to determine even low concentrations of benzodiazepines, at the level of few pg/mg of hair. Levels of diazepam detected in hair of newborns in singleton and twin pregnancies were comparable or higher than levels determined in mothers. This may confirm the fact, that fetus's ability to metabolize diazepam is scarce. Nordiazepam was found in higher concentrations in hair of newborns than in hair of mothers, which may suggest that it is cumulated in child's organism. This observation was made in case of both singleton and twin pregnancies. Other metabolites of diazepam – oxazepam and temazepam – were detected in very few cases, in low concentrations.

Comparative analysis between newborns in multiple pregnancy, including type of twins and placenta, did not reveal any statistical differences in exposure to diazepam taken by mother.

The obtained results may serve as a cornerstone for further follow-up control studies, including observations of health effects in children prenatally exposed to benzodiazepines. They can contribute to determination of long-lasting side effects in children exposed to high levels of these drugs. The application of the hereby presented method in newborns' screening examination and a fast implementation of an appropriate treatment would be of potential benefit for the developing child.

10. PIŚMIENNICTWO

1. ACOG Committee on Practice Bulletins, ACOG Practice Bulletin. Chronic hypertension in pregnancy, *Obstet Gynecol* 2001; 98: 177-185
2. ACOG Committee on Practice Bulletins, Obstetrics.ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia, *Obstet Gynecol* 2002; 99: 159-167
3. Al-Delaimy WK, Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke, *Tob Control* 2002; 11: 176-182
4. Alldredge BK, Gelb AM, Isaacs SM, Corry MD, Allen F, Ulrich S, Gottwald MD, O'Neil N, Neuhaus JM, Segal MR, Lowenstein DH, A comparison of lorazepam, diazepam and placebo for the treatment of out-of-hospital status epilepticus. *N Engl J Med* 2001; 345: 631-637
5. Altshuler LL, Hendrick V, Cohen LS, Course of mood and anxiety disorders during pregnancy and the postpartum period, *J Clin Psychiatry* 1998; 59: 29-33
6. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, Transfer of drugs and other chemicals into human milk, *Pediatrics* 2001; 108: 776-789
7. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, Use of psychoactive medication during pregnancy and possible effects on the fetus and newborn, *Pediatrics* 2000; 105: 880-887
8. Arnold W, Püschel K, Experimental studies on hair as an indicator of past or present drug use, *J Forensic Sci Soc* 1983; 21: 83-88
9. Baenninger A, Costa e Silva JA, Hindmarch A, Moeller HJ, Rickels K, Good chemistry: The life and legacy of valium inventor Leo Sternbach, McGraw-Hill, New York 2004
10. Bailey B, Klein J, Koren G, Noninvasive methods for drug measurement in pediatrics, *Pediatr Clin North Am* 1997; 44: 15-26
11. Balíková M, Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005; 149: 199–207
12. Ban TA, In memory of three pioneers, *Int J Neuropsychopharmacol* 2006 a; 9: 475-477
13. Ban TA, The role of serendipity in drug discovery, *Dialogues Clin Neurosci* 2006 b; 8: 335-344

14. Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories, *J Nucl Med.* 1979; 20: 748-752
15. Baumgartner WA, Hill VA, Bland WH, Hair analysis for drugs of abuse, *J Forensic Sci* 1989; 34: 1433-1453
16. Belelli D, Lambert JJ, Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor, *Nature Rev Neurosci* 2005; 6: 565-575
17. Bilikiewicz A, *Psychiatria: podręcznik dla studentów medycyny*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007
18. Bilikiewicz A, Pużyński S, Rybakowski J, Wciórka J, *Psychiatria, tom 2*, Urban & Partner, Wrocław 2002
19. Bilikiewicz A, Pużyński S, Rybakowski J, Wciórka J, *Psychiatria, tom 3*, Urban & Partner, Wrocław, 2003
20. Bochenek A, Reicher M, *Anatomia człowieka, tom V*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008
21. Brawman-Mintzer O, Pharmacologic treatment of generalized anxiety disorder, *Psychiatr Clin North Am* 2001; 24:119
22. Briggs G, Freeman RK, Yaffe SJ, *Drugs in Pregnancy and Lactation: A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 1994
23. Calderon-Margalit R, Qiu C, Ornoy A, Siscovick DS, Williams MA, Risk of preterm delivery and other adverse perinatal outcomes in relation to maternal use of psychotropic medications during pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 579.e1-579.e8
24. Callahan CM, Geant TM, Phipps P, Clark G, Novack AH, Atreissguth AP, Raisys VA, Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine, *J Pediatr* 1992; 120: 763-768
25. Campo-Soria C, Chang Y, Weiss DS, Mechanism of action of benzodiazepines on GABA_A receptors, *Br J Pharmacol* 2006; 148: 984-990
26. Casper JL, *Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin*, A. Hirschwald, Berlin, 1858
27. Chang J, Elam-Evans LD, Berg CJ, Herndon J, Flowers L, Seed KA, Syverson CJ, Pregnancy-related mortality surveillance – United States, 1991-1999. *MMWR CDC Surveill Summ* 2003; 52:1-8

28. Charney DS, Minic SJ, Harris RA, Hypnotics and sedatives, W: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ed. Hardman JG, Limbird LE, McGraw-Hill, New York, 2001: 399
29. Chèze M, Duffort G, Deveaux M, Pépin G, Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris, *Forensic Sci Int* 2005; 153: 3-10
30. Cirimele V, Kintz P, Ludes B, Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 a; 700: 119-129
31. Cirimele V, Kintz P, Staub C, Mangin P, Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NCI, *Forensic Sci Int* 1997 b; 84: 189-200
32. Ciuna A, Andretta M, Corbari L, Levi D, Mirandola M, Sorio A, Barbui C, Are we going to increase the use of antidepressants up to that of benzodiazepines? *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 629-634
33. Cone EJ, Mechanism of Drug Incorporation into Hair, *Ther Drug Monit* 1996; 18: 438-443
34. Cooper GAA, Hair testing is taking root, *Ann Clin Biochem* 2011; 48: 516-530
35. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci Int* 2012; 218: 20-24
36. Czajka R, Farmakoterapia w okresie ciąży, W: Położnictwo i ginekologia, Bręborowicz GH, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005
37. Dell'osso B, Lader M, Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal, *Eur Psychiatry* 2012 (e-publicacja przed wydrukiem 09.04.2012)
38. Demyttenaere K, Bonnewyn A, Bruffaerts R, De Girolamo G, Gasquet I, Kovess V, Haro JM, Alonso J, Clinical factors influencing the prescription of antidepressants and benzodiazepines: results from the European study of the epidemiology of mental disorders (ESEMeD), *J Affect Disord.* 2008; 110: 84-93
39. Einarson A, Risks/safety of psychotropic medication use during pregnancy – Motherisk Update 2008, *Can J Clin Pharmacol* 2009; 16: e58-e65
40. Farst KJ, Valentine JL, Hall RW, Drug testing for newborn exposure to illicit substances in pregnancy: pitfalls and pearls, *Int J Pediatr* 2011; 2011: 951616

41. Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1997; 673-729
42. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling, Federal Register 2008; 73: 30831-30867
43. Forslind B, The growing anagen hair, W: Hair and Hair Diseases, Red. Orfanos CE, Happle R, Springer, Berlin, 1990: 73-98
44. Gareri J, Koren G, Prenatal hair development: implications for drug exposure determination, Forensic Sci Int 2010; 196: 27-31
45. Gorman JM, New molecular targets for antianxiety interventions, J Clin Psychiatry 2003; 64: 28-35
46. Haley NJ, Hoffmann D, Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status, Clin Chem 1985; 31: 1598-1600
47. Harisson WH, Gray RM, Solomon LM, Incorporation of L-DOPA, L- α -methyldopa and DL-isoproterenol into guinea pig hair, Acta Dermatovener 1974; 54: 249-253
48. Harkey MR, Anatomy and physiology of hair, Forensic Sci Int 1993; 63: 9-18
49. Henderson GL, Mechanisms of drug incorporation into hair, Forensic Sci Int. 1993; 63:19-29
50. <http://2.bp.blogspot.com>, data wejścia: 24.05.2012
51. <http://commons.wikimedia.org>, data wejścia: 10.06.2012
52. <http://dermimages.med.jhmi.edu>, data wejścia: 24.05.2012
53. <http://en.wikipedia.org>, data wejścia: 21.05.2012
54. <http://img.webmd.com>, data wejścia: 24.05.2012
55. <http://thelaserhairremovalguide.com>, data wejścia: 24.05.2012
56. <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012
57. <http://upload.wikimedia.org>, data wejścia: 21.05.2012
58. <http://www.athomedrugtests.org>, data wejścia: 24.05.2012
59. <http://www.concateno.com>, data wejścia: 29.05.2012
60. <http://www.elmhurst.edu>, data wejścia: 24.05.2012
61. <http://www.icassp2006.org>, data wejścia: 29.05.2012
62. <http://www.kryminalistyka.fr.pl>, data wejścia: 29.05.2012
63. <http://www.naturalhaircolor.com>, data wejścia: 24.05.2012

64. <http://www.optics.rochester.edu>, data wejścia: 24.05.2012
65. <http://www.pregnancysymptomsweekbyweek.org>, data wejścia: 04.06.2012
66. <http://www.psychemedics.com>, data wejścia: 04.06.2012
67. <http://www.sciencekids.co.nz>, data wejścia: 24.05.2012
68. <http://www.sciencephoto.com>, data wejścia: 24.05.2012
69. <http://www.surviving-hairloss.com>, data wejścia: 24.05.2012
70. Hudak ML, Tan RC, Committee on Drugs, Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics, Neonatal drug withdrawal, *Pediatrics* 2012; 129: e540-e560
71. Irving R, Dickson S, The detection of sedatives in hair and nails samples using tandem LC-MS-MS, *Forensic Sci Int* 2007; 166: 58-67
72. Ishiyama I, Nagai T, Toshiba S, Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants, nicotine) from human hair, *J Forensic Sci*, 1983; 28: 380-385
73. Joseph RE Jr, Su TP, Cone EJ, In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucoid and Africoid hair, *J Anal Toxicol* 1996; 20: 338-344
74. Katikaneni LD, Salle FR, Hulsey TC, Neonatal hair analysis for benzoylecgonine: a sensitive and semiquantitative biological marker for chronic gestational cocaine exposure, *Biol Neonate* 2002; 81: 29-37
75. Kidwell DA, Analysis of phencyclidine and cocaine in human hair by tandem mass spectrometry, *J Forensic Sci* 1993; 38: 272-284
76. Kikura R, Nakahara Y, Mieczkowski T, Tagliaro F, Hair analysis for drug abuse XV. Disposition of MDMA and its related compounds into rat hair and application to hair analysis for MDMA abuse, *Forensic Sci Int* 1997; 84: 165-177
77. Kintz P, Cirimele V, Vayssette F, Mangin P, Hair analysis for nordiazepam and oxazepam by gas chromatography – negative-ion chemical ionization mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 677: 241-244
78. Kintz P, Kieffer I, Messer J, Mangin P, Nicotine analysis in neonate's hair for measuring gestational exposure to tobacco, *J Forensic Sci*, 1993; 38: 119-123
79. Kisely S, Linden M, Bellantuono C, Simon G, Jones J, Why are patients prescribed psychotropic drugs by general practitioners? Results of an international study. *Psychol Med* 2000; 20: 1217-1225

80. Knörle R, Schniz E, Feuerstein TJ, Drug accumulation in melanin: an affinity chromatographic study, *J Chromatogr B* 1998; 714: 171–179
81. Koda-Kimble MA, Young LY, Applied therapeutics: the clinical use of drugs, Point (Lippincott Williams & Wilkins), Philadelphia, 2008
82. Kronstrand R, Nyström I, Josefsson M, Hodgins S, Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients, *J Anal Toxicol* 2002; 26: 479-484
83. Lagnaoui R, Depont F, Fourrier A, Abouelfath A, Bégau B, Verdoux H, Moore N, Patterns and correlates of benzodiazepine use in the French general population, *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 523-529
84. Larsson B, Tjalve H, Studies on the mechanism of drug-binding to melanin, *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 1181-1187
85. LeBeau MA, Montgomery MA, Brewer JD, The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair, *Forensic Sci Int* 2011; 210: 110-116
86. Lepine JP, The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and social costs, *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 4-8
87. Leppée M, Culig J, Eric M, Sijanovic S, The effects of benzodiazepines in pregnancy, *Acta Neurol Belg* 2010; 110: 163-167
88. Liston HL, Markowitz JS, Devane CL, Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology, *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 500-515
89. Lockwood CJ, Paidas MJ, Preeclampsia and hypertensive disorders, W: Cherry and Merkatz's Complications of Pregnancy, Cohen WR, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2000, 207-214
90. Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U, Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety, *Science* 2000; 290: 131-134
91. Lozano J, García-Algar O, Vall O, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S, Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse, *Ther Drug Monit* 2007; 29: 711-734
92. Lydiard RB, The role of GABA in anxiety disorders, *J Clin Psychiatry* 2003; 64: 21-27

93. Malinowski W, Cięża wielopłodowa, W: Położnictwo i ginekologia, Bręborowicz GH, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005
94. Marques PR, Tippetts AS, Branch DG, Cocaine in the hair of mother-infant pairs: quantitative analysis and correlations with urine measures and self-report, *Am J Drug Alcohol Abuse* 1993; 19: 159-175
95. Mathewson Kuhn M, *Pharmacotherapeutics for the obstetrical patient*, W: *Pharmacotherapeutics: a nursing process approach - 2nd Edition*, F.A. Davis Company, Philadelphia 1991, 327-614
96. McClean S, O'Kane E, Hillis J, Smyth WF, Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1999; 838: 273-291
97. Meyler L, Aronson JK, *Meyler's Side Effects of Drugs: the International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*, Elsevier, 2006, 429–443
98. Moghe VV , Kulkarni U, Parmar U, Thalidomide; *BJO* 2008, 50: 472-476
99. Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U, A new benzodiazepines pharmacology, *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 2-8
100. Montagna W, Van Scott EJ, *The anatomy of the hair follicle*, W: *The Biology of Hair Growth*, Ed. Montagna W, Ellis RA, Academic Press, New York, 1958: 39-64
101. Moody D, *Drug interactions with benzodiazepines*, W: Raymon LP, Mozayani A, *Handbook of Drug Interactions: a Clinical and Forensic Guide*, Humana, 2004: 3–88
102. Morini L, Vignali C, Polla M, Sponta A, Groppi A, Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC-MS/MS, *Forensic Sci Int* 2012; 218: 53-56
103. Musshoff F, Madea B, New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes, *Forensic Sci Int* 2007; 165: 204–215
104. Nakahara Y, Hair analysis for abused and therapeutic drugs, *J Chromatogr B* 1999; 733: 161-180
105. Nakahara Y, Kikura R, Hair analysis for drugs of abuse XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs, *Arch Toxicol* 1996; 70: 841-849

106. Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Hair analysis for drug abuse: III. Movement and stability of methoxyphenamine (as a model compound of methamphetamine) along hair shaft with hair growth, *J Anal Toxicol* 1992; 16: 253-257
107. Nakao M, Takeuchi T, Yano E, Prescription of benzodiazepines and antidepressants to outpatients attending a Japanese university hospital, *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45: 30-35
108. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high blood pressure in pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22
109. Negrusz A, Moore CM, Kern JL, Janicak PG, Strong MJ, Levy NA, Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair, *J Anal Toxicol* 2000; 24: 614-620
110. Ohayon MM, Caulet M, Priest RG, Guilleminault C, Psychotropic medication consumption patterns in the UK general population, *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 273-283
111. Ostrea EM Jr, Brady MJ, Parks PM, Asensio DC, Naluz A, Drug screening of meconium in infants of drug-dependent mothers: an alternative to urine testing, *J Pediatr* 1989; 115: 474-477
112. Ostrea EM Jr, Knapp DK, Tannenbaum L, Ostrea AR, Romero A, Salari V, Ager J, Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis, *J Pediatr* 2001; 138: 344-348
113. Paulose-Ram R, Jonas BS, Orwig D, Safran MA, Prescription psychotropic medication use among the U.S. adult population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1994, *J Clin Epidemiol* 2004; 57: 309-317
114. Pauly V, Pradel V, Pourcel L, Nordmann S, Frauger E, Lapeyre-Mestre M, Micallef J, Thirion X, Estimated magnitude of diversion and abuse of opioids relative to benzodiazepines in France, *Drug Alcohol Depend* (e-publikacja dostępna 02.04.2012)
115. Pigott TA, Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders, *J Clin Psychiatry* 1999; 60: 4-15

116. Poręba R, Poręba A, Rozpoznanie ciąży wielopłodowej, W: Ciąża wielopłodowa, Bręborowicz GH, Malinowski W, Ronin-Walknowska E, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2003
117. Potter S, Klein J, Valiante G, Stack DM, Papageorgiou A, Stott W, Lewis D, Koren G, Zelazo PR, Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure, *J Pediatr* 1994; 125: 652-654
118. Pragst F, Balikova MA, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin Chim Acta* 2006; 370: 17-49
119. Pragst F, Pitfalls in hair analysis, praca zaprezentowana podczas Joint GTFCh/TIAFT Symposium "Analytical pitfalls and trends in clinical and forensic toxicology", Monachium, 12.05.2004
120. Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S, Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics, *Acta Neurol Scand* 2008; 118: 69-86
121. Roberts JM, Funai EF, Pregnancy-related hypertension, W: Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice, Creasy RK, Resnik R, Saunders, Philadelphia 2009, 651–688
122. Rosman S, Le Vaillant M, Pelletier-Fleury N, Gaining insight into benzodiazepine prescribing in General Practice in France: a data-based study, *BMC Family Practice* 2011, 12:28
123. Rust KY, Baumgartner MR, Meggiolaro N, Kraemer T, Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 "z-drugs" in human hair by LC-MS/MS, *Forensic Sci Int* 2012; 215: 64-72
124. Ryan RM, Wagner CL, Schultz JM, Varley J, DiPreta J, Sherer DM, Phelps DL, Kwong T, Meconium analysis for improved identification of infants exposed to cocaine in utero, *J Pediatr* 1994; 125: 435-440
125. Rzewuska M, Leki Anksjolityczne (Przeciwłękowe, ataraktyczne), W: Farmakologia kliniczna, Chodera A, Herman ZS, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997, 320-325
126. Sachs H, History of Hair Analysis, *Forensic Sci Int* 1997; 84: 7-16
127. Sachs H, Kintz P, Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 713: 147-161
128. Schaefer H, Zesch A, Stuttgart G, Skin Permeability, Springer-Verlag, Berlin, 1982: 720-728

129. Schmider J, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Shader RI, Relationship of in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics and drug interactions: implications for diazepam disposition in humans, *J Clin Psychopharmacol* 1996; 16: 267-272
130. Scott KS, Nakahara Y, A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair, *Forensic Sci Int* 2003; 133: 47-56
131. Sibai BM, Treatment of hypertension in pregnant women. *N Eng J Med* 1996; 335: 257-265
132. Slawson MH, Wilkins DG, Rollins DE, The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 406-413
133. Smith FP, Pomposini DA, Detection of phenobarbital in bloodstains, semen, seminal stains, saliva, saliva stains, perspiration stains, and hair, *J Forensic Sci* 1981; 26: 582-586
134. Society of Hair Testing, Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 2004; 145: 83-84
135. Sramek JJ, Baumgartner WA, Ahrens TN, Hill VA, Cutler NR, Detection of benzodiazepines in human hair by radioimmunoassay, *Ann Pharmacother* 1992; 26: 469-472
136. St Clair SM, Schirmer RG, First-trimester exposure to alprazolam, *Obstet Gynecol* 1992; 80: 843-846
137. Straand J, Rokstad K, General practitioners' prescribing patterns of benzodiazepine hypnotics: Are elderly patients at particular risk for overprescribing?, *Scand J Prim Health* 1997; 15: 16-21
138. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Center for Behavioral Health Statistics and Quality. Drug Abuse Warning Network, 2008: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. HHS Publication No. SMA 11-4618 2011; Rockville, Maryland, USA (e-publicacja dostępna na <http://www.samhsa.gov/data/DAWN.aspx>)
139. Swortfiguer D, Cissoko H, Giraudeau B, Jonville-Béra AP, Bensouda L, Autret-Leca E. Retentissement néonatal de l'exposition aux benzodiazépines en fin de grossesse, *Arch Pediatr* 2005; 12: 1327-1331
140. Tanaka E, Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with benzodiazepines, *J Clin Pharm Ther* 1999; 24: 347-355

141. Tracqui A, Kintz P, Mangin P, Hair analysis: a worthless tool for therapeutic compliance monitoring, *Forensic Sci Int* 1995; 70: 183-189
142. Treiman DM, Meyers PD, Walton NY, Collins JF, Colling C, Rowan AJ, Handforth A, Faught E, Calabrese VP, Uthman BM, Ramsay RE, Mamdani MB, Veterans Affairs Status Epilepticus Cooperative Study Group. A comparison of four treatments for generalized convulsive status epilepticus. *N Engl J Med* 1998; 339: 792-798
143. Uematsu T, Miyazawa N, Okazaki O, Nakashima M, Possible effect of pigment on the pharmacokinetics of ofloxacin and its excretion in hair, *J Pharm Sci* 1992; 81: 45-48
144. United States Drug Enforcement Administration, Drug information resources, <http://www.justice.gov/dea/concern/concern.htm>, data wejścia: 30.05.2012
145. Valente D, Cassani M, Pigliapochi M, Vansetti G, Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction, *Clin Chem* 1981; 27: 1952-1953
146. Valentine JL, Komoroski EM, Use of a visual panel detection method for drugs of abuse: clinical and laboratory experience with children and adolescents, *J Pediatr* 1995; 126: 135-140
147. Villain M, Concheiro M, Cirimele V, Kintz P, Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 825: 72-78
148. Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M, Neonatal hair analysis contribution to establishing a gestational drug exposure profile and predicting a withdrawal syndrome, *Ther Drug Monit* 2003; 25: 421-432
149. Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M, Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy, *Forensic Sci Int* 2003; 133: 57-62
150. Volz M, Christ O, Kellner HM, Kuch H, Fehlhaber HW, Gantz D, Hajdu P, Cavagna F, Kinetics and metabolism of clobazam in animals and man, *Br J Clin Pharmacol* 1979; 7: 41S-50S

151. Wikner BN, Stiller CO, Bergman U, Asker C, Källén B, Use of benzodiazepines and benzodiazepine receptor agonists during pregnancy: neonatal outcome and congenital malformations, *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007; 16: 1203-1210
152. Wildman K, Bouvier-Colle MH, Maternal mortality as an indicator of obstetric care in Europe, *BJOG* 2004; 111: 164-169
153. Xiang P, Sun Q, Shen B, Chen P, Liu W, Shen M, Segmental hair analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines, *Forensic Sci Int* 2011; 204: 19-26
154. Yegles M, Mersch F, Wennig R, Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS, *Forensic Sci Int* 1997; 84: 211-218

11. OŚWIADCZENIA AUTORA

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.: „*Ocena narażenia prenatalnego na benzodiazepiny – ciąża pojedyncza i bliźniacza*”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem **stopnia naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej, a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis