



## **DETERMINATION OF SELENIUM AND ARSENIC IN THE BLOOD AND URINE OF PATIENTS TAKING PART IN A METHADONE PROGRAMME**

Renata WIETECHA-POSŁUSZNY<sup>1</sup>, Agnieszka BEDNAREK<sup>1</sup>, Paweł KOŚCIELNIAK<sup>1,2</sup>,  
Justyna DOBROWOLSKA<sup>1</sup>, Agnieszka MORAWSKA<sup>3</sup>, Wojciech PIEKOSZEWSKI<sup>2,3</sup>,  
JAN CHROSTEK-MAJ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow*

<sup>2</sup> *Institute of Forensic Research, Krakow*

<sup>3</sup> *Department of Toxicology and Therapeutic Monitoring, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow*

<sup>4</sup> *Toxicological Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow*

### **Abstract**

The aim of the research was to evaluate the influence of long-term taking of opiates and a methadone substitution programme on the level of selenium and arsenic in the blood and urine of drug-addicted persons. The research encompassed 48 patients who were chronically addicted to opiates. They were being treated at the Detoxification Unit, Toxicological Clinic, Krakow, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow and taking part in a methadone programme (for 3.5 years on average). The control group consisted of 35 young non-addicted persons of medium build (BMI ~22). The ranges of concentrations of both analytes in blood and urine samples collected from the control group and from the addicts were determined at the beginning. The concentrations of selenium in ca. 40% of patients' urine samples turned out to be a bit lower than concentrations obtained for the control group (9.5–48.5 g/l). However, concentrations of selenium in blood were consistent with values determined for the control group (52–124 g/l). Lower concentrations of selenium in urine could indicate disruption of physiological processes (85% of the patients had jaundice and ca. 10% had HIV) or could indicate an increase in bio-assimilation of this element by the weakened organisms of patients. Analysis of data concerning arsenic showed that ca. 50% of patients had increased arsenic concentration in blood samples (e.g. 70 and 115 g/l). This effect is most probably linked to additional taking of drugs of abuse of unknown origin and smoking of significant amounts of cigarettes. These observations were confirmed by additional tests such as analysis of urine samples for the presence of drugs (especially opiates, amphetamine and THC) and also an interview and survey using a questionnaire that had been specially prepared for this purpose. The performed research allowed us to evaluate, to a certain extent, the state of metabolism of selected trace elements in the analysed group of drug addicts and to conclude that the applied therapeutic treatment can restore the equilibrium that has been upset by intoxicants in this range.

### **Key words**

Selenium; Arsenic; Methadone programme; Atomic fluorescence spectroscopy.

*Received 7 December 2005; accepted 30 December 2005*

## 1. Introduction

The most widespread type of opiate addiction in Poland is addiction to so-called Polish heroin, which is a product made from poppy seed milk or poppy seed straw. This substance is made at home, very often in primitive conditions, which is why it is commonly contaminated by bacterial flora and mycosis and various chemical impurities that are residues of the production process. This results in Polish heroine being particularly toxic and infectious. Polish heroin is taken intravenously by addicts. Moreover, taking into account the unknown and variable amounts of psychoactive substances in Polish heroin, overdoses – and, as a result death – can easily occur. Furthermore, the unhygienic conditions of injection increase the risk of catching an infectious illness, including AIDS [8, 16].

Addiction to opiates is characterised by having the fastest development of tolerance and strong psycho-physical addiction amongst eight basic types of toxicomania proposed by the Committee of Experts of the World Health Organisation. The compulsion to continuously increase the dose and to satisfy the extreme escalation of narcotic hunger directs all the actions of addicts towards acquisition of a successive drug dose – related to which is the strong criminogenicity and progressive psycho-social degradation of this milieu [3, 12]. Chronic taking of opiates causes multiple disturbances of homeostasis of the organism: biochemical, immunological and organ. The effects of an unregulated lifestyle are disturbed dietary habits, which are intensified by the direct influence of the stupefying substance on the functioning of nervous-hormonal mechanisms that regulate the taking of food. These factors contribute to a significant increase in demand in addicts (with an insufficient intake of fat and proteins in their diet) for products with a high sugar content, which manifests itself in low body mass [9]. The few studies carried out until now also suggest a disturbance in metabolism of some metals occurring within this group [5, 13].

An acknowledged method of fighting addiction to opiates is substitution treatment by methadone, which is, together with psychotherapy and rehabilitation, a component of a complex therapeutic procedure. Methadone is a synthetic agonist of opioid receptors and has a high specificity for receptor  $\mu$ . Unlike morphine and heroin it has a long half-life, which allows oral administration once per day at a dose of 80–120 mg. This usually ensures a sufficient level of receptor blockade and neutralises drug-related withdrawal symptoms. The period of medical treatment takes 1–3 years – or longer, in cases where this is

needed. The methadone programme is a tool in the prevention of HIV infection, deaths from overdoses and illegal behaviours. There is also a rehabilitation aspect of the conducted pharmacotherapy, in spite of low social acceptance. Patients who take part in the methadone programme can function normally in their families and society. They take up studies, work, set up home, have children and re-establish severed family bonds. Their health improves in general. Their dietary habits, which are the cause of energy-protein deficiency and low weight, also change. Their immunologic processes also normalise, which enables more effective treatment of opportunistic infections [6, 17] in persons infected by HIV.

The milieu of opiates addicts makes them especially susceptible to various types of disturbances of physiological processes [7]. However, there is only scant data concerning the metabolism of micro-elements and levels of toxic elements within this group of persons. Trace metals constitute an extremely small part of the total human body mass; however their biological role is very important. Elements such as selenium are classified as so-called essential elements for the correct functioning of the organism. A disturbance in homeostasis of any micro-element could lead to metabolic anomalies, illnesses and development disturbances. This results from the fact that micro-elements are a part of many enzymes which regulate basic biochemical processes [7, 13].

Selenium is a well-known anti-oxidant which protects the organism against oxidative stress. Its special role results from its location between metallic and non-metallic elements in the periodic table, thanks to which selenium proteins are perfect catalysts of redox processes. For example, selenocysteine is located in the active centre of glutathione peroxidase, one of the most important enzymes that takes part in destroying oxygen radicals and prevents oxidation of proteins, nucleic acids and polyunsaturated fatty acids present in biological membranes of the whole organism [2]. This metalloid seems to be essential for the arising of a suitable immunological response and has great significance for correct metabolism and function of thyroid hormones. Antineoplastic activity is ascribed to it. Selenium deficiency could lead to development of cardiomyopathy and other heart illness and cancers [1, 4].

Arsenic is a highly toxic element. Research carried out has shown that it damages respiratory processes of cells of live organisms. This phenomenon consists in blocking of groups of sulfhydryl proteins, causing inhibition of enzymes responsible for the above mentioned processes. A very important role is played by inhibition of NAD-dependent enzymes and enzymes

which catalyse reactions with substances such as pyruvate, glutamate or ketoglutar. Inhibition is caused by joining of arsenic with dihydroliponic acid, which is indispensable in the oxidation of the mentioned substrates. Moreover, arsenic present in the human organism destabilises processes of mitochondrial oxidative phosphorylation [14]. The toxic effect of arsenic is multidimensional and depends on how it enters the body. Arsenic compounds enter the organism mainly via the respiratory tract in the form of dust, vapour or gas together with inhaled air (environmental pollution and smoke) [10], and, furthermore, by oral intake by consumption of contaminated food as well as intoxicants of unknown source.

This paper is an attempt to evaluate the state of metabolism of selected trace elements in the examined group of addicts and to evaluate the influence of long-term taking of opiates and methadone substitution therapy on the level of selenium and arsenic in blood and urine of addicts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

The following reagents were applied in research: a standard solution of selenium (concentration 1 mg/ml Se; analytically pure, Merck), a standard solution of arsenic (concentration 1 mg/ml As; analytically pure, Merck), concentrated  $\text{HNO}_3$  (analytically pure, Merck), concentrated HCl (analytically pure, POCh), 98%  $\text{NaBH}_4$  (analytically pure, Sigma-Aldrich Chemie), 0.5% NaOH (analytically pure, Chemical Industry „Oświęcim”). Methadone hydrochloride (Molteni) at a concentration of 1 mg/ml was used (a stock solution supplied by the producer). Deionised water, of conductivity ca.  $1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , was applied to preparation of solutions.

### 2.2. Materials

48 participants in the methadone programme, including 12 women, were selected for the study. Most of the selected patients had jaundice (a positive HCV test), and, furthermore, the HIV virus was detected in 5 persons. The period of treatment under the methadone programme, which was carried out at Rydygier Hospital, Detoxification Unit, Toxicological Clinic, Krakow, varied in the range 1.9–4.9 years with an average of 3.5 years. 35 non-addicted young persons of average weight (BMI ~22) who declared that they were in good health constituted the control group.

Fasting blood and urine samples were taken from patients and volunteers. Blood samples were stored until analysis in special vials – sputtered with anti-coagulant agent ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) at a temperature of  $-20 \text{ C}$ . Urine samples were stored in hermetically sealed polyethylene containers, also at a temperature of  $-20 \text{ C}$ .

Two reference materials were analysed: a sample of human blood: Seronom Trace Elements (LOT 404109, level 3, Norway) in freeze-dried form and a sample of human urine: Medisafe (001314, level 1, Germany) also in freeze-dried form.

### 2.3. Equipment

A Mars 5X 12-position microwave oven (CEM, USA) was used in the process of sample preparation. The mineralisation process was carried out in XP-1500 type high-pressure teflon containers with simultaneous temperature and pressure control.

A two-channel atomic fluorescence spectrometer with a hydride generating system AFS-230 (Beijing Haiguang Instrument Co., China) was used for measuring analytical signals. Two lamps were installed in the spectrometer: selenium and arsenic lamps with hollow cathodes (intensity 100 mA) as sources of radiation and a photomultiplier tube (working at 300 V) as a detection element. Detailed working conditions of the spectrometer are presented in Table I.

## 3. Results and discussion

Biological material in the form of urine samples collected from patients was analysed for the presence of drugs – opiates, amphetamine and tetra-hydrocannabinol (THC) – by application of screening tests during preliminary examinations. None of these compounds was detected in 24 samples; however, THC was detected in 12 samples, amphetamines in 10 and opiates in 4 cases.

An analytical procedure developed and verified at the Forensic Chemistry Laboratory, Faculty of Chemistry, Jagiellonian University was used for simultaneous determination of selenium and arsenic [15, 16]. This procedure included preliminary mineralisation of samples and analytical signal detection by the atomic fluorescence spectrometric method.

0.5 ml of each sample and 7 ml of concentrated  $\text{HNO}_3$  were measured into teflon containers. Samples prepared in this way were mineralised in three successive steps (I, II, III) under different maximum temperature and pressure conditions I:  $T = 160^\circ\text{C}$ ,  $P = 130 \text{ psi}$ ; II:  $T = 180 \text{ C}$ ,  $P = 190 \text{ psi}$ ; III:  $T = 200 \text{ C}$ ,  $P = 290 \text{ psi}$ .

The duration of each step was 8 min (the sample was maintained at maximum temperature for 4 of these minutes). After finishing the mineralisation step and cooling the mineralisate to room temperature, the sample was placed under a stream of nitrogen for 10 min with the aim of removing interference components. Next, the mineralisate was put in a 25 ml flask, 12.5 ml of 6 M HCl was added and the flask was filled to the mark with deionised water. A series of standard solutions, which contained both analytes together in the range of concentrations from 0.0 to 4.0  $\mu\text{g/l}$ , was created for calibration purposes. These solutions were made by dilution of basic 6 M standard solution with hydrochloric acid solution and deionised water to the same volume. The parameters of the spectrometer were established according to data presented in Table I and triple detection of selenium and arsenic signals was performed – firstly for standard solutions and next for other samples.

TABLE I. PARAMETERS OF AFS-230 SPECTROMETER

Parameter	Values
Source of radiation	Lamp with hollow cathodes (HCL) – Se, As
Lamp current intensity	100 mA
Photomultiplier voltage	300 V
Oven temperature	200°C
Flame high	8 mm
Carrier gas flow	500 ml/min
Shield gas flow	800 ml/min
Carrier	3 M HCl
Carrier flow	11 ml/min
Reductant	2% NaBH <sub>4</sub> w 0,5% m/v NaOH
Reductant flow	6 ml/min

Firstly, selenium and arsenic were determined in reference samples of blood and urine (taking three portions of each sample for analysis) in accordance with the above mentioned procedure. The obtained results and expected values (obtained from attached certificates) are juxtaposed in Table II. Examining these results, it may be ascertained that the applied procedure of simultaneous determination of selenium and arsenic in blood and urine allowed us to determine these elements in blood and urine with good accuracy and good precision (*RSD* below 2%).

TABLE II. RESULTS OF ANALYSIS OF REFERENCE BLOOD AND URINE SAMPLES

Material	Se concentration [ $\mu\text{g/l}$ ]		As concentration [ $\mu\text{g/l}$ ]	
	Expected value	Obtained value	Expected value	Obtained value
Blood	80 $\pm$ 1.0	80.5 $\pm$ 1.8	25*	26.1 $\pm$ 1.6
Urine	20.0 $\pm$ 6.6	20.8 $\pm$ 1.8	50.0 $\pm$ 11.6	51.5 $\pm$ 0.9

\* Value not confirmed by certificate.

Moreover, during the mentioned control procedure, elements were determined in a sample of methadone which patients took per os at 50 to 120 mg per day, depending on the established dose. Analysis of methadone samples did not show significant amounts of these analytes in the analysed batch. The obtained values for concentrations of selenium oscillated near to the quantification limit of the applied method; however concentrations of arsenic were definitely below the quantification limit.

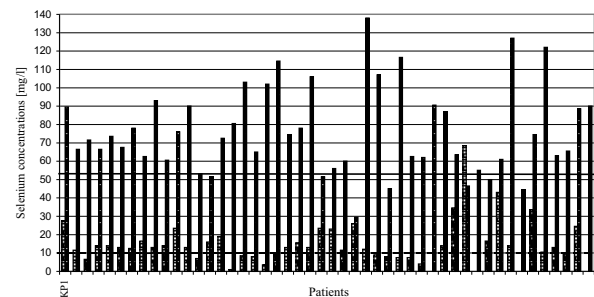


Fig. 1. Selenium concentrations determined in samples of blood (filled columns) and urine (hatched columns) of 48 addicts; minimum concentrations of selenium in blood and urine determined for the control group are marked by continuous and dashed lines respectively.

Analyses of blood and urine samples collected both from persons in the control group and patients included in the methadone programme were performed in the main stage of research. The obtained results are presented in Figure 1 and Table III. A detailed analysis of obtained results showed that levels of concentrations of selenium in blood samples in 85% of patients turned out to be consistent with data obtained for the control group (52.0–123.5  $\mu\text{g/l}$ ). Moreover, they are consistent with data presented in other papers (63.0–109.0  $\pm$  14.0  $\mu\text{g/l}$ ) [14]. Determined concentrations of selenium were somewhat lower than values determined for the control group (9.5–48.5  $\mu\text{g/l}$ ) in the

TABLE III. RANGES OF SELENIUM AND ARSENIC DETERMINED IN BLOOD AND URINE SAMPLES FOR CONTROL GROUP AND A GROUP OF PATIENTS TAKING PART IN A METHADONE PROGRAMME

Material	Concentration Se [ $\mu\text{g/l}$ ]		Concentration As [ $\mu\text{g/l}$ ]	
	Control group	Addicts group	Control group	Addicts group
Blood	52.0–123.5	44.5–138.0	0.0*–7.0	6.0–115.5
Urine	9.5–48.0	0.0*–43.0	0.0*–17.0	0.0*–48.0

\* Value below method quantification limit;  $DL_{\text{Se}} = 0.12 \mu\text{g/l}$ ,  $DL_{\text{As}} = 0.15 \mu\text{g/l}$ .

case of urine samples collected from ca. 40% of patients. Lower concentrations of selenium in urine could indicate existing disturbances of physiological processes (it was known that most patients had suffered from jaundice in the past and that ca. 10% had HIV) or indicated increased bio-assimilation of this element by the weakened organisms of patients.

The observed effect was confirmed to a certain extent by the normal levels of selenium concentration in blood ascertained in analysed patients. This could be evidence of intensive accumulating of selenium in the organism (especially since the diet of the majority of these persons was rich in selenium) and hence decreased elimination of selenium in the urine. Additional research is required to explain this phenomenon; however, a certain regularity was already observed at this stage of research. On the basis of the survey carried out (questionnaires were specially prepared for this purpose), it transpires that as many as 40 persons consumed products that are rich in selenium 2–3 times per week or more often. Moreover, more than half of the patients regularly took vitamin supplements. De-

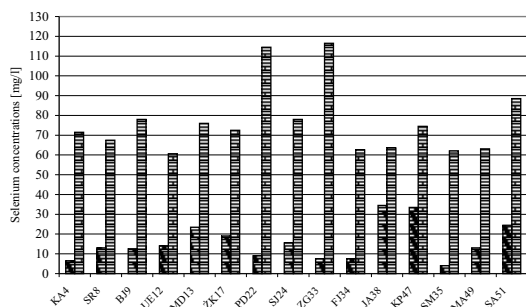


Fig. 2. Selenium concentration in blood samples (filled columns) and urine (hatched columns) determined for the examined group of patients who regularly took vitamins. The solid line represents the minimum concentration of selenium within the control group.

termined concentrations of selenium in blood and urine samples of patients who took vitamin supplements are presented in Figure 2. It can be observed that all these patients had elevated concentrations of selenium in comparison to the lower limit of the range determined for the control group ( $53.0 \mu\text{g/l}$  – Table III). It may thus be supposed that a suitable diet and taking vitamin supplements increases the chances of patients on the methadone programme of restoring the balance of these microelements in their organisms and maintaining homeostasis.

Results of determination of arsenic in blood and urine samples show that ca. 50% of studied patients have an increased concentration of arsenic in the blood (in some cases it was even ca. 70, 106 and  $115 \mu\text{g/l}$ ). A certain correlation between increased concentration of arsenic in blood and the number of cigarettes smoked per day was observed. The characteristics of the analysed group as regards smoking are presented in Figure 3, whereas concentrations of arsenic determined in blood and urine samples of smokers who smoke more than 10 cigarettes per day are presented in

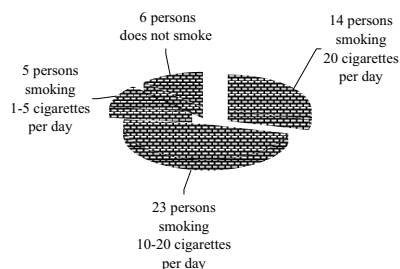


Fig. 3. The number of cigarettes smoked by participants in the methadone programme.

Figure 4. In most of these cases, the concentration of arsenic in blood was significantly higher than the maximum concentration determined for the control group. However, this effect is difficult to confirm on the basis of results of analysis of urine samples: a higher concentration of arsenic was only determined in two smokers who smoked more than 10 cigarettes.

Accumulation of arsenic in the blood, and thus in organisms of participants of the methadone programme, may be correlated to additional taking of intoxicants of unknown origin. These observations were partially confirmed by additional tests which included checking urine samples for drugs presence (es-

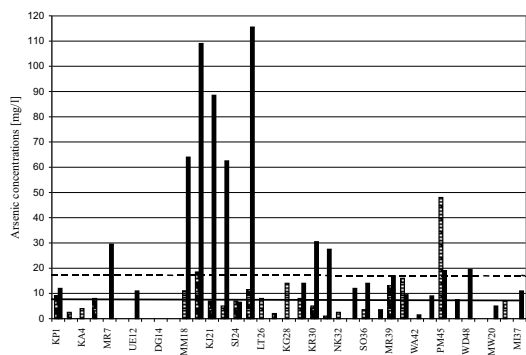


Fig. 4. Arsenic concentration in blood samples (filled columns) and urine samples (hatched columns) collected from smokers who smoked more than 10 cigarettes per day; the maximum concentration of arsenic in blood and urine determined for the control group are marked by continuous and dashed lines respectively.

pecially opiates, amphetamines and tetra-hydro-cannabinol) – positive results were determined in 50% of cases. The presented hypothesis required additional research and observations, which will be the subject of the next part of the realised project.

#### 4. Conclusions

The application of a fast and universal analytical procedure which encompassed simultaneous determination of selenium and arsenic by HG-AFS method allowed us to:

- determine the ranges of selenium and arsenic in blood and urine samples collected from 48 participants in a methadone programme and 35 non-addicted volunteers in a reliable way and in a relatively short time;
- preliminarily evaluate the state of metabolism of selected trace elements in the analysed group of drug addicts by comparison of obtained concentrations of selenium and arsenic to values obtained for the control group and values cited in the literature;
- conclude that the applied treatment could contribute to normalisation of dietary habits – which were changed by long-term taking of drugs and a specific lifestyle – and on taking care of health (by application of a suitable diet and vitamin supplementation);
- preliminarily define disturbances in arsenic metabolism and reveal probable reasons of accumulation of this toxic element in the blood of the analysed patient, such as excessive smoking and consumption of intoxicants of unknown origin.

Further research is planned, encompassing the following:

- analysis of biological material for other micro-elements, such as zinc, which is an element responsible for regulation of immune and nervous systems [11] and copper, which is a co-enzyme of many oxidation-reduction processes (its excess is highly toxic) [13];
- use of alternative biological materials (e.g. hair, nails) allowing monitoring of concentration of particular elements in the organism over a long period of time;
- a statistical evaluation of the obtained results.

#### References:

1. Andrzejak R., Groch J., Jurga M., Rola selenu w patofizjologii człowieka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 1996, 50, 293–307.
2. Barceloux G., Selenium, *Clinical Toxicology* 1999, 37, 145–172.
3. Barnfield C., Burns S., Byron D. L. [et al.], The routine profiling of forensic heroin samples, *Forensic Science International* 1988, 39, 107–117.
4. Dickson R., Tomlinson R., Selenium in blood and human tissues, *Clinica Chimica Acta* 1967, 16, 311–321.
5. Elnimr T., Hashem A., Assar R., Heroin dependence effects on some major and trace elements, *Biological Trace Element Research* 1996, 54, 153–162.
6. Fraser A., Canadian guidelines for the use of methadone and other drugs in the treatment of opiate dependency, Canada 1990, 42–47.
7. Iyengar V., Chou P., Constantino A. [et al.], Excessive urinary excretion of zinc in drug addicts: a preliminary study during methadone detoxification, *Trace Elements Electrolytes Health Disease* 1994, 8, 213–215.
8. Kała M., Lechowicz W., Stanaszek R., Kompot – the Polish source of opium alkaloids, *Problems of Forensic Sciences* 1998, vol. 37, pp. 45–52.
9. Kolarzy E., Kroch S., Szot W., Rodzaj uzależnienia a składowe masy ciała, *Przegląd Lekarski* 2001, 58, 276–280.
10. Mandal B., Suzuki K., Arsenic round the world: a review, *Talanta* 2002, 58, 201–235.
11. Nowak G. [red.], Cynk w fizjologii, patofizjologii i terapii depresji, Wydawnictwo PAN, Warszawa 2001.
12. Pach J., Kamenczak A., Chrostek-Maj J. [et al.], Ocena stanu zdrowia uczestników programu metadonowego w Krakowie po roku leczenia substytucyjnego, *Przegląd Lekarski* 2001, 58, 240–244.
13. Sadlik K., Pach J., Winnik L. [et al.], Stężenie cynku, miedzi i magnezu w surowicy krwi osób uzależnionych od narkotyków, *Przegląd Lekarski* 2000, 57, 563–564.
14. Seńczuk W. [red.], Toksykologia współczesna, PZWL, Warszawa 1999.

15. Wietecha R., Kościelniak P., Lech T. [et al.], Simple method for simultaneous determination of selenium and arsenic in human hair by means of atomic fluorescence spectrometry with hydride generation technique, *Microchimica Acta* 2005, 149, 137–144.
16. Wietecha R., Kościelniak P., Lech T. [et al.], Determination of selenium in human blood using atomic fluorescence spectrometry, *Problems of Forensic Sciences* 2002, 55, 21–36.
17. Wietecha R., Stanaszek R., Determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in hair of addicted persons, *Problems of Forensic Sciences* 2002, 49, 38–50.

---

**Corresponding author**

Renata Wietecha-Posłuszny  
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Ingardena 3  
30-060 Kraków  
e-mail: wietecha@chemia.uj.edu.pl

---

## ANALIZA KRWI I MOCZU NA ZAWARTOŚĆ SELENU I ARSENU U PACJENTÓW OBJĘTYCH PROGRAMEM METADONOWYM

### 1. Wprowadzenie

Najbardziej rozpowszechnionym rodzajem uzależnienia opiatowego w Polsce jest uzależnienie od tzw. polskiej heroiny, rodzimego produktu otrzymywanego z mlecza makowego lub słomy makowej. Substancja ta powstaje w domowych, często prymitywnych warunkach, stąd powszechne jest jej skażenie florą bakteryjną i grzybiczą oraz różnymi chemicznymi zanieczyszczeniami będącymi pozostałościami procesu produkcyjnego. Decyduje to o jej szczególnej toksyczności i infekcyjności. Polska heroina jest przez narkomanów stosowana dożylnie, co, biorąc pod uwagę nieznaną i zmienne ilości substancji psychoaktywnych w niej obecnych, stwarza łatwą sposobność przedawkowania narkotyku i w jego efekcie zgonu. Dodatkowo niehigieniczne warunki iniekcji zwiększają ryzyko zachorowania na choroby zakaźne, w tym AIDS [8, 16].

Wśród ośmiu podstawowych typów toksykomanii zaproponowanych przez Komitet Ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia, uzależnienie od opiatów cechuje najszybszy rozwój tolerancji i silne uzależnienie psychiczne. Przymus ciągłego zwiększania dawki i konieczność zaspakajania krańcowo nasilonego głodu narkotycznego ukierunkowuje wszystkie poczynania osób uzależnionych na zdobycie kolejnej porcji narkotyku, z czym wiąże się znaczna kryminogenność i postępująca degradacja psychospołeczna tego środowiska [3, 12]. Przewlekłe przyjmowanie opiatów powoduje wielorakie zaburzenia homeostazy ustrojowej: biochemicznej, immunologicznej i narządowej. Następstwem nieuregulowanego trybu życia są zaburzone zachowania żywieniowe pogłębiane przez bezpośredni wpływ substancji odurzającej na funkcjonowanie nerwowo-hormonalnych mechanizmów regulujących pobieranie pożywienia. Czynniki te przyczyniają się do znacznego wzrostu u osób uzależnionych (z niedostatecznym udziałem w ich diecie tłuszczów i białek) zapotrzebowania na produkty o wysokiej zawartości cukru, co manifestuje się niską wagą ciała [9]. Nieliczne przeprowadzone dotąd badania wskazują również na występujące w tej grupie osób zaburzenia gospodarki niektórymi metalami [5, 13].

Uznany sposób zwalczania uzależnienia od opiatów jest leczenie substytucyjne metadonem, będące obok psychoterapii i resocjalizacji składową kompleksowego postępowania terapeutycznego. Metadon jest syntetycznym agonistą receptorów opioidowych o wysokiej specyficzności w stosunku do receptora  $\mu$ . W odróżnieniu od morfiny i heroiny ma długi okres półtrwania, co pozwala na podawanie go doustnie raz na dobę w dawce

80–120 mg. Zazwyczaj zapewnia to wystarczający poziom blokady receptorowej i znosi objawy głodu narkotykowego. Czas leczenia wynosi 1–3 lata i – w uzasadnionych przypadkach – dłużej. Program metadonowy jest narzędziem w profilaktyce zakażeń HIV, zgonów z przedawkowania i zachowań sprzecznych z prawem. Mimo niskiej akceptacji społecznej podnoszony jest aspekt resocjalizacyjny prowadzonej farmakoterapii. Pacjenci uczestniczący w programie metadonowym są w stanie normalnie funkcjonować w rodzinie i w społeczeństwie. Podejmują naukę, pracę, zakładają rodziny, mają dzieci, nawiązują ponownie zerwane więzi rodzinne. Ogólnej poprawie ulega ich stan zdrowia. Zmieniają się też ich nawyki żywieniowe będące przyczyną niedoborów energetyczno-białkowych i niedowagi. Normalizują się procesy immunologiczne, co u osób zakażonych HIV umożliwia skuteczniejsze leczenie infekcji oportunistycznych [6, 17].

Środowisko osób uzależnionych od opiatów jest szczególnie podatne na różnego typu zakłócenia procesów fizjologicznych [7]. Niewiele jednak danych dotyczy stanu gospodarki mikroelementami oraz poziomów pierwiastków toksycznych w tej grupie osób. Metale śladowe stanowią skrajnie małą część całkowitej masy organizmu ludzkiego, jednak rola biologiczna, jaką w nim pełnią, jest trudna do przecenienia. Pierwiastki takie, jak selen, należą do tzw. pierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenie homeostazy któregośkolwiek mikroelementu może prowadzić do anomalii metabolicznych, chorób lub zaburzeń rozwojowych. Wynika to z faktu, iż mikroelementy włączone są w strukturę wielu enzymów regulujących podstawowe procesy biochemiczne [7, 13].

Selen jest znanym antyoksydantem chroniącym organizm przed stresem tlenowym. Jego szczególna rola wynika z położenia selenu w układzie okresowym pierwiastków między metalami i niemetalami, dzięki czemu selenoproteiny są idealnymi katalizatorami wielu procesów redox. Na przykład selenocysteina znajduje się w centrum aktywnym peroksydazy glutationowej, jednego z najważniejszych enzymów uczestniczących w niszczeniu rodników tlenowych i zapobiegających utlenianiu białek, kwasów nukleinowych oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach biologicznych całego organizmu [2]. Metaloid ten wydaje się niezbędny do powstawania właściwej odpowiedzi immunologicznej i ma istotne znaczenie dla prawidłowego metabolizmu i funkcji hormonów tarczycowych. Przypisuje się mu aktywność przeciwnowotworową. Niedobór selenu może prowadzić do rozwoju kardiomiopatii i innych chorób serca oraz nowotworów [1, 4].



Arsen należy do grupy silnie toksycznych pierwiastków. Przeprowadzone badania udowodniły, że uszkadza on procesy oddechowe komórek żywych organizmów. Zjawisko to polega na blokowaniu grup sulfhydrylowych białek, powodując inhibicję enzymów odpowiedzialnych za wyżej wymienione procesy. Bardzo ważną rolę odgrywa tu inhibicja enzymów NAD-zależnych i katalizujących reakcje z takimi substancjami, jak pirogronian, glutaminian lub ketoglutaran. Inhibicja spowodowana jest łączeniem się arsenu z kwasem dihydroliponiowym, który jest niezbędny w reakcji utleniania powyższych substratów. Ponadto arsen obecny w organizmie człowieka destabilizuje procesy mitochondrialnej oksydacyjnej fosforylacji [14]. Działanie toksyczne arsenu jest wielokierunkowe i zależy od drogi podania. Związki arsenu dostają się do organizmu głównie przez drogi oddechowe w postaci pyłu, pary lub gazu wraz z wdychanym powietrzem (zanieczyszczeniami środowiskowymi oraz dymem tytoniowym) [10], ponadto drogą dostną poprzez spożywanie skażonego pokarmu jak i środków odurzających niewiadomego pochodzenia.

Niniejsza praca jest próbą oceny stanu gospodarki wybranych metali śladowych w badanej grupie narkomanów oraz wpływu długotrwałego przyjmowania opiatów i substytucyjnej terapii metadonem na poziom selenu i arsenu we krwi i moczu osób uzależnionych.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Odczynniki

W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: roztwór wzorcowy selenu o stężeniu 1 mg/ml Se (cz.d.a., Merck), roztwór wzorcowy arsenu o stężeniu 1 mg/ml As (cz.d.a., Merck), stężony  $\text{HNO}_3$  (cz.d.a., Merck), stężony HCl (cz.d.a., POCh), 98%  $\text{NaBH}_4$  (cz.d.a., Sigma-Aldrich Chemie), 0,5% NaOH (cz.d.a., Zakłady Chemiczne Oświęcim). Stosowano chlorowodorek metadonu o stężeniu 1 mg/ml (Molteni) (gotowy roztwór zakupiony u producenta). Do przygotowania roztworów używano wody dejonizowanej o przewodnictwie właściwym ok. 1 S/cm.

### 2.2. Materiał do badań

Do badań zakwalifikowano 48 uczestników programu metadonowego, w tym 12 kobiet. Większość z wybranych pacjentów przebyła żółtaczkę (dodatni aHCV), ponadto u 5 osób stwierdzono obecność wirusa HIV. Czas leczenia w ramach programu metadonowego realizowanego na Oddziale Detoksykacji Kliniki Toksykologii Szpitala im. Rydygiera w Krakowie wahał się w granicach 1,9–4,9 roku i wynosił średnio 3,5 roku. Grupę kontrolną stanowiło 35 młodych osób o średniej wadze

(BMI ~22), niezależnych, deklarujących dobry stan zdrowia.

Próbki krwi i moczu były pobierane zarówno od pacjentów, jak i od ochotników, na czczo. Próbki krwi przechowywano do czasu analizy w specjalnych fiolkach napyłanych środkiem antykrzepialnym ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ . Próbki moczu przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach polietylenowych również w temperaturze  $-0^\circ\text{C}$ .

Analizom poddano ponadto dwa materiały referencyjne: próbkę krwi ludzkiej Seronom Trace Elements (LOT 404109, level 3, Norwegia) w postaci liofilizowanej oraz próbkę moczu ludzkiego Medisafe (001314, level 1, Niemcy) również w postaci liofilizowanej.

### 2.3. Aparatura

W procesie przygotowania próbek wykorzystano 12-pozycyjny mineralizator mikrofalowy Mars 5X (CEM, Stany Zjednoczone). Proces mineralizacji prowadzono w teflonowych, wysokociśnieniowych naczyniach typu XP-1500 z równoczesną kontrolą temperatury i ciśnienia.

Do pomiaru sygnałów analitycznych zastosowano dwukanałowy spektrometr fluorescencji atomowej z systemem do generacji wodorków AFS-230 (Beijing Haiguang Instrument Co., Chiny). W spektrometrze zainstalowano dwie lampy: selenową i arsenową odpowiednio z katodami wnikowymi (o natężeniu 100 mA) jako źródła promieniowania i fotopowielacz (pracującego pod napięciem 300 V) jako element detekcyjny. Szczegółowe warunki pracy spektrometru zamieszczono w tabeli I.

## 3. Wyniki i ich dyskusja

W ramach badań wstępnych materiał biologiczny w postaci próbek moczu pobrany od pacjentów sprawdzono, wykonując testy skryningowe, pod kątem obecności narkotyków – opiatów, amfetaminy i tetrahydrokanabinoli (THC). W rezultacie w przypadku 24 próbek nie wykryto obecności żadnej z tych substancji, natomiast w 12 próbkach stwierdzono obecność THC, w 10 amfetaminy, a w 4 przypadkach opiatów.

Do jednoczesnego oznaczania selenu i arsenu w próbkach krwi i moczu zastosowano procedurę analityczną opracowaną i zweryfikowaną w Pracowni Chemii Sądowej Wydziału Chemii UJ [15, 16]. Obejmuje ona wstępną mineralizację próbek i pomiar sygnałów analitycznych metodą atomowej spektrometrii fluorescencyjnej.

Do naczyń teflonowych odmierzano 0,5 ml każdej próbki i dodawano 7 ml stężonego  $\text{HNO}_3$ . Tak przygotowaną próbkę poddawano mineralizacji w trzech kolejnych etapach (I, II, III) w różnych warunkach maksymalnej temperatury i ciśnienia. I:  $T = 160^\circ\text{C}$ ,  $P = 130$  psi;

II:  $T = 180\text{ C}$ ,  $P = 190\text{ psi}$ ; III:  $T = 200\text{ C}$ ,  $P = 290\text{ psi}$ . Czas trwania każdego etapu wynosił 8 min (w tym 4 min to czas utrzymywania próbki w maksymalnej temperaturze). Po zakończeniu procesu mineralizacji i schłodzeniu mineralizatu do temperatury pokojowej próbkę poddawano pod strumień azotu na 10 min w celu usunięcia składników interferujących. Następnie mineralizat przenoszono do kolbki o pojemności 25 ml, dodawano 12,5 ml 6 M HCl i uzupełniano wodą dejonizowaną do kreski. Do celów kalibracyjnych sporządzono serię roztworów wzorcowych zawierających jednocześnie oba anality w stężeniach od 0,0 do 4,0 g/l. Roztwory te sporządzano przez rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego 6 M roztworem kwasu solnego oraz wodą dejonizowaną do jednakowej objętości. Parametry spektrometru ustalano zgodnie z danymi umieszczonymi w tabeli I i wykonywano trójkrotny pomiar sygnałów dla selenu i arsenu najpierw dla roztworów wzorcowych, a następnie dla kolejnych próbek.

Zgodnie z powyższą procedurą w pierwszym rzędzie oznaczono selen i arsen w próbkach materiałów referencyjnych krwi i moczu (biorąc do analizy po trzy porcje każdej próbki). W tabeli II zamieszczono otrzymane wyniki, porównując je z wartościami oczekiwanymi (zaczepnietymi z dołączonych certyfikatów). Rozpatrując te wyniki, można stwierdzić, że zastosowana procedura równoczesnego oznaczania selenu i arsenu we krwi i moczu pozwala na oznaczanie selenu i arsenu w krwi i moczu z dużą dokładnością i dobrą precyzją (wartości *RSD* poniżej 2%).

Ponadto w ramach kontroli przebadano, pod kątem zawartości wspomnianych pierwiastków, próbkę metadonu, który pacjenci przyjmują doustnie w zależności od ustalonej dawki: od 50 do 120 mg dziennie. Przeprowadzona analiza próbek metadonu nie ujawniła znaczących ilości obu analitów w badanej partii metadonu. Otrzymane wartości stężeń selenu oscylowały w zakresie granicy oznaczalności stosowanej metody, natomiast wartości stężeń arsenu były zdecydowanie poniżej tej granicy.

W głównym etapie badań wykonano analizy próbek krwi i moczu pobranych zarówno od osób wchodzących w skład grupy kontrolnej, jak i od pacjentów objętych programem metadonowym. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie 1 oraz w tabeli III. Ze szczegółowej analizy tych danych wynika, że poziomy stężenie selenu w próbkach krwi u 85% pacjentów okazały się zgodne z wartościami otrzymanymi dla grupy kontrolnej (52,0–123,5 g/l). Ponadto są one zgodne z wartościami przytaczanymi w innych pracach (63,0–109,0 ±14,0 g/l) [14]. W przypadku próbek moczu u około 40% pacjentów wyznaczone stężenia selenu okazały się nieco niższe od wartości wyznaczonych dla grupy kontrolnej (9,5–48,5 g/l). Mniejsze stężenia selenu w moczu mogą świadczyć o istniejących zakłóceniach procesów fizjolo-

gicznych (wiadomo, że w badanej grupie pacjentów u większości stwierdzono przebyłą żółtaczkę oraz u ok. 10% wirus HIV) lub wskazywać na zwiększoną bioprzyzwajalność tego pierwiastka przez wycieńczone organizmy pacjentów.

Zaobserwowany efekt w pewnym stopniu potwierdzają stwierdzone u badanych pacjentów prawidłowe poziomy stężenia selenu we krwi. Może to świadczyć o intensywnej kumulacji selenu w organizmie (zwłaszcza, że dieta większości tych osób jest bogata w selen) i wynikające z tego faktu zmniejszone wydalanie selenu wraz z moczem. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga podjęcia dodatkowych badań, jednak już na tym etapie badań zauważono pewną prawidłowość. Na podstawie przeprowadzonej ankiety (specjalnie w tym celu opracowanej) wynika, że aż 40 osób spożywa produkty bogate w selen 2–3 razy w tygodniu, a nawet częściej. Ponadto ponad połowa pacjentów zażywa regularnie preparaty witaminowe. Na rycinie 2 zestawiono wyznaczone wartości stężeń selenu we krwi oraz w moczu dla badanej grupy pacjentów zażywających preparaty witaminowe. Widać, że u wszystkich tych pacjentów stwierdzono podwyższone stężenie selenu w porównaniu do dolnej granicy zakresu wyznaczonego dla grupy kontrolnej (53,0 µg/l – tabela III). Można więc przypuszczać, że odpowiednia dieta oraz zażywanie preparatów witaminowych zwiększają szansę pacjentów objętych programem metadonowym na przywrócenie równowagi w gospodarce tego mikroelementu oraz utrzymaniu jego homeostazy w organizmie.

Wyniki oznaczenia arsenu w próbkach krwi i moczu wskazują, że u około 50% badanych pacjentów występuje podwyższone stężenie arsenu we krwi (w niektórych przypadkach wynosi ono nawet ok. 70, 106 oraz 115 g/l). Zauważono pewną korelację pomiędzy podwyższonym stężeniem arsenu we krwi a liczbą wypalanych dziennie papierosów. Charakterystykę badanej grupy pod względem używania tytoniu przedstawia rycin 3, natomiast na rycinie 4 przedstawiono stężenia arsenu wyznaczone w próbkach krwi i moczu u osób palących powyżej 10 papierosów dziennie. W większości tych przypadków stężenie arsenu we krwi jest zdecydowanie wyższe aniżeli maksymalne stężenie wyznaczone dla grupy kontrolnej. Efekt ten trudno jest jednak potwierdzić na podstawie analizy próbek moczu: tylko u dwóch osób palących powyżej 10 papierosów dziennie stwierdzono podwyższone stężenia arsenu.

Kumulacja arsenu we krwi, a tym samym w organizmie badanych uczestników programu metadonowego, może być związana z dodatkowym zażywaniem środków odurzających niewiadomego pochodzenia. Obserwacje te częściowo potwierdzono dodatkowymi testami obejmującymi sprawdzenie próbek moczu na obecność narkotyków (w szczególności opiatów, amfetaminy oraz tetrahydrokanabinoli), w których w 50% stwierdzono

wynik pozytywny. Przedstawione hipotezy wymagają jednak dalszych badań i obserwacji, co będzie przedmiotem kolejnej części realizowanego projektu.

#### 4. Podsumowanie

Dzięki zastosowaniu szybkiego i uniwersalnego postępowania analitycznego obejmującego równoczesne oznaczania selenu i arsenu metodą HG-AFS, przeprowadzone badania pozwoliły:

- w sposób wiarygodny i w stosunkowo krótkim czasie wyznaczyć zakresy stężeń zarówno selenu, jak i arsenu w próbkach krwi i moczu pobranych od 48 uczestników programu metadonowego oraz 35 ochotników niezależniących od środków psychotropowych;
- wstępnie ocenić stan gospodarki wybranych metali śladowych w badanej grupie narkomanów poprzez porównanie otrzymanych poziomów stężeń selenu i arsenu z wartościami otrzymanymi dla grupy kontrolnej oraz cytowanymi w literaturze przedmiotu;
- stwierdzić, że zastosowany proces leczniczy może wpływać na normalizację zmienionych (przez wieloletnie przyjmowanie narkotyków i prowadzony tryb życia) nawyków żywieniowych oraz na dbałość o stan zdrowia (poprzez zastosowanie odpowiedniej diety i suplementacji witaminowej);
- wstępnie określić zaburzenia w gospodarce arsenem oraz ujawnić prawdopodobne przyczyny, jakimi są nadmierne palenie tytoniu oraz zażywanie środków odurzających niewiadomego pochodzenia, kumulacji tego toksycznego pierwiastka we krwi badanych pacjentów.

W toku dalszych badań planuje się:

- analizę materiału biologicznego pod kątem innych mikroelementów, takich jak cynk, który jest pierwiastkiem odpowiedzialnym za regulację układu odpornościowego i nerwowego [11] oraz miedź, będącą koenzymem wielu procesów oksydacyjno-redukcyjnych (jej nadmiar jest silnie toksyczny) [13];
- wykorzystanie alternatywnych materiałów biologicznych (np. włosów, paznokci) pozwalających na monitorowanie zawartości poszczególnych pierwiastków w organizmie w dłuższym czasie;
- opracowanie statystyczne wszystkich otrzymanych wyników.