



Università degli Studi di Roma “La Sapienza”

**Facoltà di Farmacia
Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia
Farmaceutiche**

Tesi di Laurea sperimentale in Farmacologia

**Il ruolo degli accertamenti tossicologici nell’abuso
di cocaina e nei relativi trattamenti della
dipendenza.**

Implicazioni in studi di farmacocinetica.

**Relatore
Prof. Luciano Saso**

**Candidato
Gustavo Merola
matr. 06033969**

**Correlatore
Dott.sa Teodora Macchia
Dip. del Farmaco – I.S.S.**

Anno Accademico 2006/07

Introduzione

I dati ufficiali sulla diffusione nell'uso di sostanze psicoattive indicano una crescita rapida, in alcuni casi esponenziale, della cocaina. Questo fenomeno ha portato all'aggravarsi di problemi di tipo sanitario e sociale. Sono in aumento le intossicazioni acute da cocaina con accessi ai Pronto Soccorso, le richieste di trattamento per abuso e dipendenza e i decessi correlati; si rileva inoltre un incremento di incidenti stradali e di comportamenti aggressivi-violenti. Questo quadro giustifica l'interesse internazionale, e ovviamente nazionale, su tutto ciò che ruota attorno al monitoraggio, alla diagnosi, al trattamento e allo studio delle interazioni, in termini di farmacocinetica e farmacodinamica, della cocaina con altre sostanze psicoattive d'abuso (alcool compreso) e di farmaci di diffuso utilizzo.

Scopo del lavoro

Alla luce di quanto detto, appare rilevante il ruolo di un idoneo approccio metodologico-analitico-tossicologico. Ad oggi però metodologie che siano idonee sia alla ricerca che al monitoraggio sono carenti. Scopo del presente lavoro è la messa a punto di una procedura analitica dotata di elevata affidabilità ma anche di buona praticabilità, che possa essere utilizzata per finalità di monitoraggio, per applicazioni diagnostiche e di ricerca anche per studi di farmacocinetica. Si è proceduto inoltre all'applicazione di tale metodo analitico a campioni reali di diverse matrici biologiche con lo scopo di testare l'idoneità della procedura in diversi ambiti di applicazione.

Metodi

La procedura analitica è basata sulla Microestrazione in Fase-Solida (SPME) e sullo spazio di testa con l'uso della Gas-Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di massa (GC-MS). L'estrazione degli analiti avviene mediante una fibra di silice fusa ricoperta da un sottile strato di materiale assorbente (100 µm polidimetilsilossano). I parametri relativi al trattamento del campione, tempi di esposizione della fibra, temperatura, volume di estrazione e i parametri analitici sono stati opportunamente calibrati e confrontati con quanto disponibile in letteratura. Dopo l'estrazione, la fibra è trasferita, con l'ausilio di un fiber holder per campionamento manuale, allo strumento analitico per la separazione, l'individuazione e la quantificazione degli analiti. Nello specifico, la strumentazione analitica è costituita da un Gas-Cromatografo 6890 Plus e da un rivelatore Spettrometro di massa 5973N (Agilent Technologies, Milano, Italia). È stata utilizzata una colonna capillare (Restek-5ms 13423 30m 250µm 0.30µm) e le seguenti condizioni operative: temperatura iniziale a 60°C per 2 min, successivamente una rampa con incremento di 20°C/min fino a raggiungere 250°C per 5 min. Il gas di trasporto è stato l'elio (He) con un flusso di 0.7 ml/min, l'iniettore è in modalità splitless e lo spettrometro di massa con ionizzazione ad impatto elettronico. L'individuazione degli analiti è stata ottenuta in scan, i dati quantitativi sono stati ottenuti in *selected ion monitoring* (SIM) con riferimento agli ioni 182, 82 e 303. La cocaina deuterata (coc-D3) (S.A.L.A.R.S., Como, Italia) è stata utilizzata come standard interno, e l'MDPA (S.A.L.A.R.S., Como, Italia) sempre come standard interno per altre sostanze che il metodo riesce a determinare in un unico run analitico. Il metodo è stato validato in matrice

acquosa e successivamente adattato a matrici non convenzionali, come il traspirato, la saliva e la matrice cheratinica.

Risultati

La procedura è semplice, rapida e richiede minime quantità di campione (200µl di matrice acquosa, 200µl di saliva, 10 mg di capelli, 1 pad di raccolta del traspirato). Una buona linearità è stata ottenuta anche nel range 1-200 ng/ml ($y = 1.21 + 1.40x$). In termini di sensibilità: il limite di identificazione (LOD) è di 1.6 ng/ml e il limite di quantificazione (LOQ) è di 4.8 ng/ml e l'errore standard 0.74. Per l'applicazione del metodo alle matrici biologiche alternative sono state effettuate delle variazioni in termini di pretrattamento del campione. La linearità che ne è risultata è: per la matrice cheratinica ($y = -0.24 + 4.23x$) con LOD 0.27 ng/mg e LOQ 0.81 ng/mg e l'errore standard 0.38; per il traspirato ($y = -0.10 + 1.24x$) con LOD 0.31 ng/pad e LOQ 0.93 ng/pad e l'errore standard 0.13.

Discussione

In base ai risultati ottenuti, la procedura analitica ha dimostrato un buon livello di affidabilità ma anche una ragionevole praticabilità che ne consente l'utilizzo in settori diversi di applicazione, dalla ricerca all'epidemiologia. Il metodo non necessita di derivatizzazione e consente in un unico run di determinare, in aggiunta alla cocaina, altre sostanze oggetto di abuso quali Amfetamina (A), Metamfetamina (MA), Metilen-diossiamfetamina (MDA), Metilen-diossimetamfetamina (MDMA), Metilen-diossietamfetamina (MDE), N-metil-1-(1,3-benzodiossol-5-il)-2-butanamina (MBDB), Ketamina, Metadone, e prodotti del metabolismo come la Cocaetilene. Nel lavoro vengono discussi problemi quali il cut-off analitico e decisionale, i tempi di permanenza e rilevabilità della cocaina e dei suoi metaboliti nella diverse matrici e la conseguente adeguatezza dei metodi analitici di scelta.

E' stato infine trattato l'aspetto dell'applicazione del metodo messo a punto nel monitoraggio del trattamento e la possibile applicazione in studi di farmacocinetica. Il metodo ha mostrato la sua applicabilità anche in matrici biologiche non convenzionali, quali capelli, la saliva e traspirato, matrici che sempre più diffusamente sono e verranno utilizzate, non solo nell'ambito di ricerca, ma anche in ambito amministrativo e legale (lavoro e sicurezza stradale) secondo le indicazioni della Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA).

Introduzione

La cocaina è un alcaloide che si ottiene dalle foglie della coca (*Erythroxylon coca*), pianta originaria del Sud America, principalmente del Perù e della Bolivia, dove veniva usata dagli indigeni per alleviare la fatica del lavoro e per lenire la fame.

Fu introdotta nella farmacopea occidentale nella metà del XIX secolo ad opera di Paolo Mantegazza (*“Sulle virtù igieniche e medicinali della cocaina e degli alimenti nervosi in genere”*), fu proprio ispirandosi all'opera di Mantegazza che un chimico farmacista corso, Angelo Mariani, ideava nel 1863 una bevanda preparata con cocaina sciolta in vino: il Vin Mariani. Questa bibita tonificante veniva usata anche in medicina, perché si pensava capace di sollevare il morale ai depressi e di curare praticamente ogni tipo di disturbo fisico, dal mal di gola alle affezioni nervose, dall'impotenza all'insonnia, dall'anemia alle febbri, finanche ai morbi di tipo contagioso.

Un farmacista americano di Atlanta, John Styh Pemberton, commercializzò nel 1885 la prima bevanda in concorrenza con il Vin Mariani, il French Wine Coca. L'anno successivo Pemberton modificava il suo preparato eliminando l'alcool e aggiungendo estratto di noce Cola, una sostanza ricca di caffeina, oli di agrumi e dolcificanti. Il nuovo analcolico era destinato, secondo la pubblicità che ne accompagnò l'immissione sul mercato, “agli intellettuali e agli alcolisti in astinenza”: il suo nome commerciale era Coca Cola. Sino al 1903, anno in cui il governo federale statunitense imponeva la decocainizzazione delle foglie di coca usate per la preparazione, la cocaina fu un ingrediente della Coca Cola.

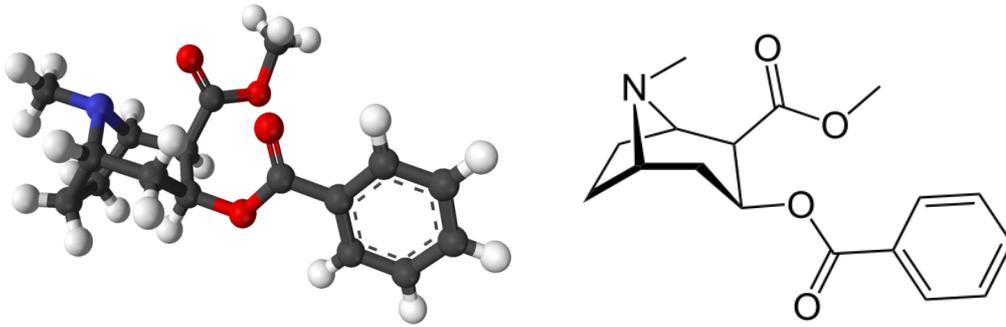
L'abuso cronico di cocaina fu irrilevante e sottovalutato sino agli inizi degli anni '70. Successivamente il cocainismo esplose in America in forma epidemica dapprima nelle le classi sociali medio alte poi in quelle meno abbienti e tra le minoranze etniche.

Meccanismo di azione

Metil-(1*R*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-(benzoilossi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]-ottan-2-carbossilato

La formula bruta è $C_{17}H_{21}NO_4$; il peso molecolare è 303,36

Numero CAS 53-21-4



L'effetto farmacologico principale della cocaina a livello del sistema nervoso centrale (SNC) è quello di bloccare il recupero (reuptake) di dopamina nel terminale presinaptico una volta che questa è stata rilasciata dal terminale del neurone nello spazio intersinaptico.

La rimozione della dopamina dal terminale sinaptico avviene ad opera delle cosiddette proteine di trasporto che favoriscono l'assorbimento del neurotrasmettitore dall'esterno all'interno del neurone. La cocaina agisce sulla

funzionalità delle proteine di trasporto, impedendo il riassorbimento di dopamina (Fig. 1). Il risultato è quindi un aumento della quantità di questo neurotrasmettitore a livello delle terminazioni sinaptiche dei neuroni dopaminergici del SNC. La cocaina può bloccare anche il riassorbimento presinaptico di noradrenalina e serotonina.

Questo effetto provoca l'esaurimento delle riserve di neurotrasmettitore del neurone presinaptico, causando una sorta di affaticamento sinaptico, alterandone la normale risposta fisiologica alla depolarizzazione.

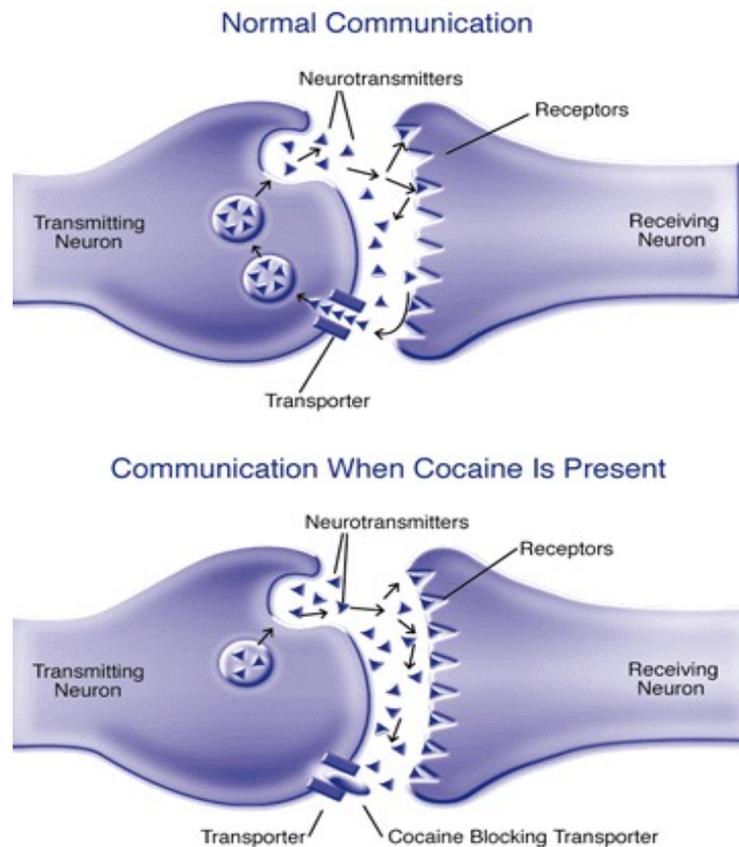


Fig. 1 Meccanismo d'azione della cocaina a livello recettoriale

Farmacodinamica

Gli effetti della droga si verificano più o meno rapidamente e in funzione della modalità di assunzione, in ordine di velocità: via endovenosa, fumo, inalazione per via nasale, masticazione delle foglie [1]. La cocaina base (crack) assunta tramite particolari pipe e la cocaina cloridrato assunta endovena vengono rapidamente assorbite con effetti che si manifestano dopo 30 secondi per decrescere in 30-45 minuti. L'assunzione per tali vie dà luogo al cosiddetto “rush”, l'assuntore diviene più loquace, iperattivo, aumenta la stima in se stesso, aumenta la libido, diminuisce la stanchezza, la fame ed il sonno.

Effetti correlati all'uso di cocaina sono:

- tachicardia (aumento della frequenza cardiaca)
- aumento anche grave della pressione (Vasocostrizione: a livello periferico la cocaina potenzia la risposta adrenergica bloccando il reuptake del noradrenalina liberata; a livello centrale si hanno alterazioni nella trasmissione sinaptica sia noradrenergica che dopaminergica.)
- midriasi (pupille dilatate)
- tremori.

A dosi più elevate lo stato euforico si alterna a stati di irritabilità, aggressività e di riduzione della capacità critica.

L'uso ripetuto porta ad una diminuzione degli effetti euforizzanti e alla comparsa di sintomi psicotici. Il paziente manifesta idee di persecuzione, può avere allucinazioni persecutorie (sente voci di persone inesistenti che lo minacciano) ed allucinazioni tattili (avverte prurito diffuso e lo riferisce solitamente presenza di animaletti, che peraltro non vede) che inducono il cocainomane a grattarsi di continuo ed a ispezionarsi la pelle. Aumentano inoltre i comportamenti aggressivi. Talora si hanno comportamenti ripetitivi ed il soggetto passa ore a ripetere gli stessi gesti o la stessa attività. Abituale è la depressione per il mancato uso di sostanza.

Le aritmie, le crisi anginose, gli infarti del miocardio e le crisi ipertensive, se accompagnate da emorragie cerebrali, non sono evenienze rare e rappresentano le più comuni cause di morte. Altre cause di morte non trascurabili sono il suicidio a

seguito degli stati depressivi, gli incidenti stradali, le morti violente in corso di atti criminosi e le overdosi.

Farmacocinetica

La cocaina è ben assorbita per qualsiasi via di somministrazione. Per via endovenosa, la concentrazione plasmatica raggiunge immediatamente il suo massimo e successivamente diminuisce con un $t_{1/2}$ compreso tra 45 e 90 minuti. Per inalazione, invece, il picco plasmatico raggiunge il suo massimo intorno a 1 ora, ma l'assorbimento è più rapido se viene assunta tramite il fumo come base libera (cocaina sotto forma di crack o ottenuta miscelando direttamente nella pipa il cloridrato di cocaina con un alcalinizzante-neutralizzante, tipo carbonato o bicarbonato di sodio). Questo tipo di preparazione sfrutta la maggiore velocità di attraversamento delle membrane biologiche presentata dalla molecola indissociata rispetto a quella salificata. La manipolazione produce due effetti biologici convergenti: da un lato la pronta sensazione anestetica trasmessa dalla base libera che simula una più elevata concentrazione di cocaina cloridrato in fase di test organolettico preliminare; dall'altro il pronto raggiungimento dei recettori e in quantità più massiccia da parte della forma immediatamente biodisponibile quando assunta mediante fumo, che simula una maggiore "potenza" in confronto con la preparazione iniettabile a base di cocaina cloridrato. Ciò è attribuibile sia alla maggiore volatilità della base (p.f. 94 °C) rispetto al cloridrato (p.f. 198 °C), con la conseguente minore suscettibilità alle alterazioni termiche, sia all'ampio sviluppo superficiale disponibile per la diffusione attraverso gli alveoli polmonari. La durata dell'effetto euforigeno della cocaina base libera assunta mediante il fumo non è proporzionale all'intensità dell'effetto e si esaurisce molto presto, lasciando il posto ad un rinnovato desiderio di un'altra assunzione.

Dopo l'assorbimento, la cocaina è degradata da esterasi plasmatiche e, in un secondo tempo, da enzimi microsomiali epatici; solo circa l'1% della dose assunta è escreto inalterato nell'urina. I metaboliti principali sono due composti polari, la benzoilecgonina e l'ecgonina. La prima si forma per idrolisi del legame estereo con liberazione del gruppo carbossilico e formazione di metanolo; la seconda per

successiva idrolisi della benzoilegonina con liberazione del gruppo alcolico e formazione di acido benzoico. L'ecgonina può venire ulteriormente demetilata a norecgonina (Fig. 2). Questi metaboliti vengono eliminati più lentamente, ma in condizioni normali, dopo due giorni dall'ultima assunzione è difficile trovare ancora qualche traccia di essi nelle urine [2].

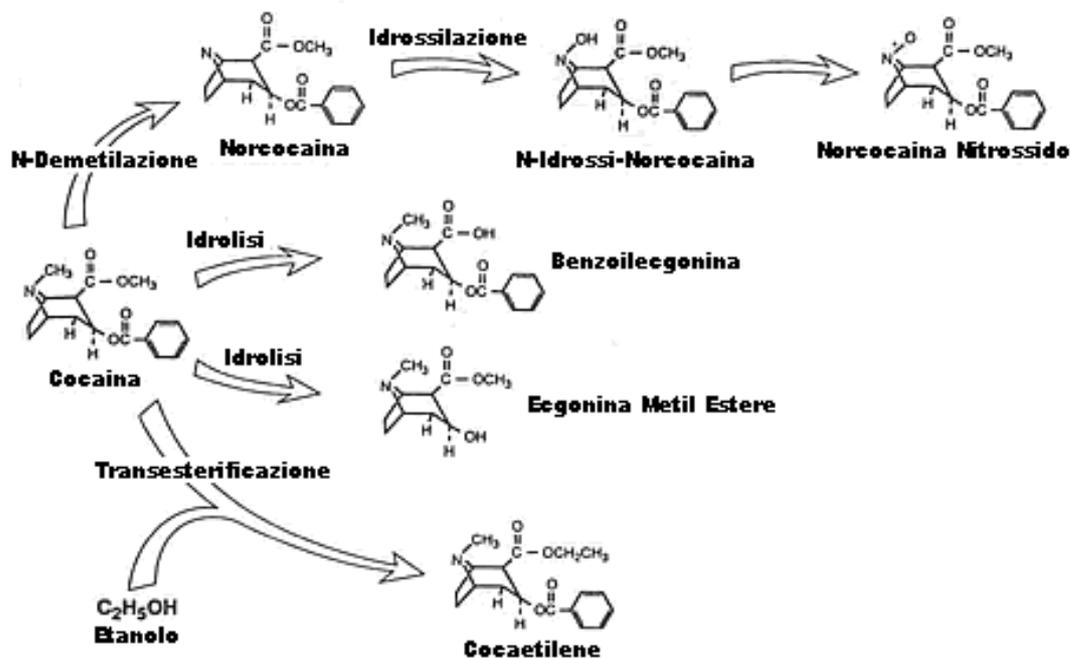


Fig. 2 Metabolismo della cocaina

Il metabolismo risulta influenzato da particolari condizioni tra le quali la via di assunzione e l'interazione con altre sostanze psicoattive o farmaci.

A titolo di esempio, si riporta quanto avviene a seguito di un abuso concomitante di cocaina e alcool. In questa situazione nel fegato si forma un ulteriore metabolita, il cocaetilene, che dà una fortissima dipendenza ed è altamente pericoloso per il cuore, ha infatti una tossicità cardiovascolare superiore alla cocaina stessa. Uno studio condotto a Miami ha dimostrato che, a parità di ogni altra condizione, il rischio relativo di infarto del miocardio in soggetti che abusano dell'una e dell'altra sostanza, è 11.5 volte superiore rispetto a chi abusa o dell'una o dell'altra separatamente.

Per quanto riguarda invece il contributo delle diverse vie con cui la cocaina viene assunta, si cita, sempre a titolo di esempio, quanto avviene, in termini di metabolismo, a seguito del consumo di cocaina base, crack, per fumo. In questo caso si riscontra un metabolita insolito, la metilecgonidina, agonista muscarinico, e il suo relativo metabolita (formato dal metabolismo dalle esterasi) ecgonidina. Questi due metaboliti sono considerati markers biologici per differenziare l'uso di cocaina per fumo rispetto alle altre vie di assunzione.

Anche sostanze da taglio o aggiunte a vario titolo possono influenzare i normali processi metabolici che coinvolgono la cocaina. A tal proposito ricordiamo quanto recentemente avvenuto, anche nel nostro paese, in relazione alle intossicazioni acute da cocaina-atropina. Alla base della letalità di tale associazione vi sono i meccanismi di azione delle singole sostanze, che seppur diversi, hanno effetti simili. Determinando così, la cocaina con la stimolazione simpatica e l'atropina con blocco del parasimpatico, gravissimi stati di eccitazione del sistema cardiocircolatorio (tachicardie e aritmie refrattarie e maligne, ipertensione arteriosa, infarto del miocardio) e del cervello (allucinazioni, delirio, convulsioni) con effetti di sommazione e di potenziamento reciproco.

L'assunzione di cocaina può avere pericolose interazioni farmacologiche quando, in concomitanza all'assunzione, si è sotto terapia medico-farmacologica di qualsiasi tipo.

La purezza della cocaina di strada è variabile essendo impiegate sostanze adulteranti di taglio: lattosio, mannite, procaina, lidocaina, glucosio, caffeina, talco, chinino, morfina e, come rilevato in tempi recenti, scopolamina, diltiazem, levamisole, atropina.

Alcuni dati sul consumo di cocaina in Italia

Il consumo di cocaina si diffonde velocemente con l'aiuto del basso costo, della facile reperibilità e della scarsa riprovazione sociale, la qual cosa agevola l'arruolamento delle donne tra gli utilizzatori. Il consumo di questa sostanza comincia ad essere percepito come "normale" ed i problemi sorgono anche al di fuori della dipendenza vera e propria. E' rilevato un numero crescente di consumatori che si definiscono occasionali e che rappresentano invece il target di interventi indispensabili per contenere eventi e costi relativi a ricoveri, incidenti stradali, incidenti sul lavoro, esiti di comportamenti asociali, aggressivi e violenti. La diffusione della cocaina nell'uso è rappresentata in termini quantitativi e qualitativi da dati che provengono dai flussi informativi dello Stato, i cui dati confluiscono nella Relazione al Parlamento sullo stato delle Tossicodipendenze, e da ricerche sul campo.

Questi dati tuttavia colgono solo una parte marginale del fenomeno dal momento che una gran parte dei consumatori di cocaina rimane ancora "sommersa", e quindi forniscono un quadro sottostimato, e non reale, della situazione. Nonostante questo, le fonti ufficiali evidenziano un andamento dei consumi e dei problemi tutto in salita. Ad esempio, dai dati del Ministero della Salute sull'utenza dei Servizi pubblici per le dipendenze (Ser.T), si rileva che le domande di trattamento per problemi di abuso e dipendenza da cocaina sono cresciute del 230% tra il 1998 ed il 2004. Un ulteriore incremento si è registrato nel 2005. In termini di punti percentuali, tra il 1991 ed il 2005 la cocaina fa registrare incrementi (Tab. 1, Fig. 3) superiori a quelli, ad es. di eroina, sia come sostanza primaria (cioè la sostanza che ha portato il soggetto a richiedere

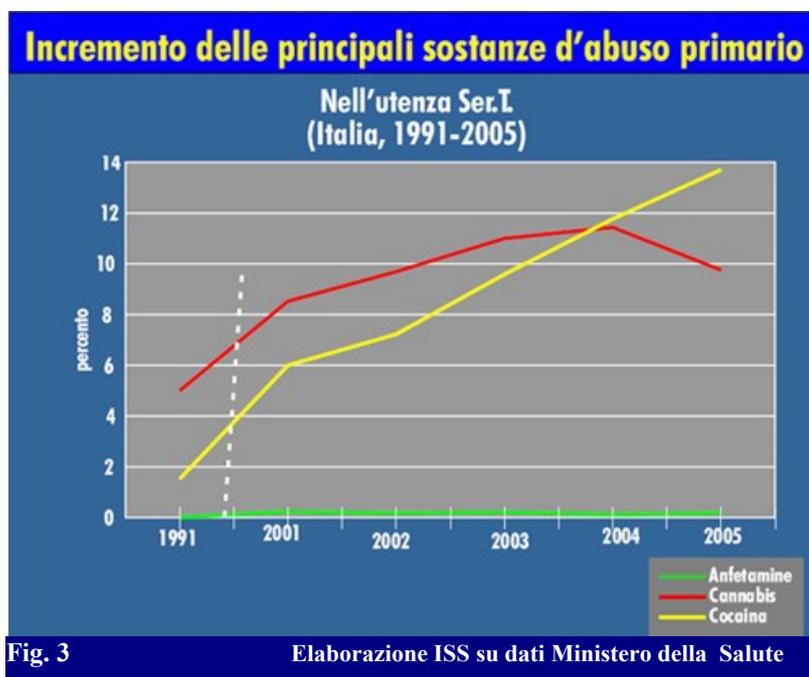
Tab. 1

CAMBIAMENTI DELLE PRINCIPALI SOSTANZE D'ABUSO PRIMARIE.
Percentuale utenti Ser.T. Italia 1991 - 2005

SOSTANZA	1991	2005	Δ punti %
EROINA	90.1	72.3	-17,8
COCAINA	1.3	13.2	+11.9
ANFETAMINE	0.1	0.2	+0,1
CANNABIS	5.0	9.7	+4.7

Fonte: Elaborazione ISS su dati del Ministero della Salute

un intervento specialistico), sia come sostanza secondaria (cioè sostanza utilizzata oltre alla primaria).



Nel complesso, oggi nei Ser.T, quasi 4 utenti su 10 (7 su 10 tra i nuovi utenti) presentano problemi connessi al consumo di cocaina ed il trend è ancora in crescita.

Tab. 2

CAMBIAMENTI DELLE PRINCIPALI SOSTANZE D'ABUSO SECONDARIE.
Percentuale utenti Ser.T. Italia 1991 - 2005

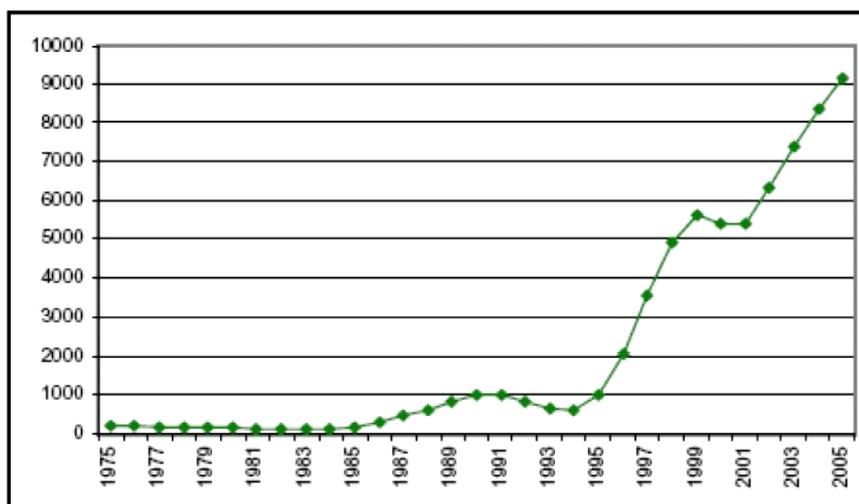
Sostanza	1991	2001	Δ punti %	2005	Δ punti % Vs1991
EROINA	1,3	3,4	+ 2,1	4,3	+ 3,0
COCAINA	11,7	25,0	+ 14,7	30,1	+ 18,4
ANFETAMINE	1,9	1,5	- 0,4	1,2	- 0,7
CANNABIS	41,5	36,2	- 5,3	32,0	- 9,5

Fonte: Elaborazione ISS su dati del Ministero della Salute

Nella Relazione al Parlamento 2006 sullo stato delle Tossicodipendenze in Italia, la dimensione del fenomeno nella popolazione generale è affidata a delle stime in termini di prevalenza (stima del numero di assuntori problematici tra i 15 ed i 54 anni nell'anno 2005, eroina 6.2 – 7.0 soggetti ogni 1000 residenti, cocaina 4.0 – 4.5 soggetti ogni 1000 residenti) e di incidenza (stima del numero di soggetti tra i 15 ed i 54 anni, che hanno iniziato a fare uso di sostanze nel 2005: eroina 29.663 soggetti, cioè 9 su 10.000 residenti. erano 25.000 nel 2001; cocaina 9.174 soggetti, cioè 3 su 10.000 residenti, erano 5.500 nel 2001).

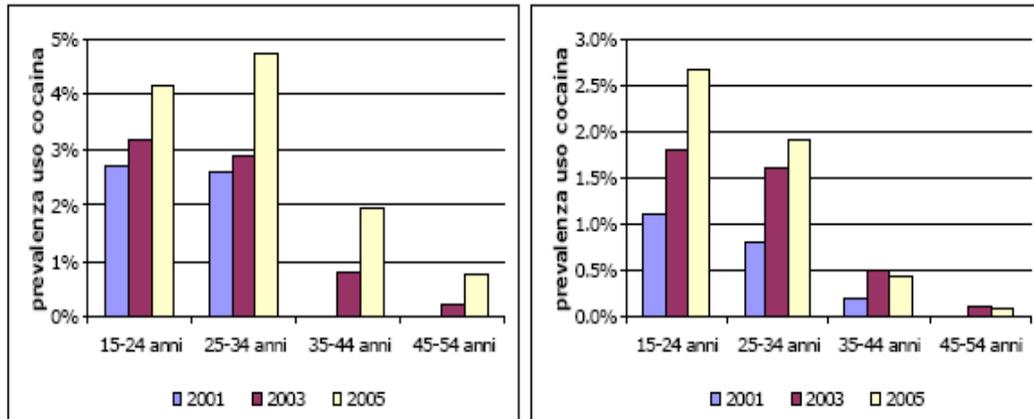
Fig. 4

Incidenza di uso di cocaina in Italia



Fonte: Istituto di Fisiologia Clinica, Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Analizzando i consumi di cocaina per classi d'età riferiti dagli intervistati nei vari anni di rilevazione (Fig. 5) si osserva un trend significativamente crescente di utilizzatori della sostanza, incremento più accentuato nell'ultimo intervallo di tempo analizzato (2003-2005). Analizzando per genere, si evidenzia un aumento per i maschi con età compresa tra i 25 ed i 34 anni (2003: 2,9%; 2005: 4,7%; + 62%) e per le femmine tra i 15 ed i 24 anni (2003: 1,8%; 2005: 2,7%; + 50%); raddoppia la percentuale di utilizzatrici dal 2001 al 2003 per le femmine 25-34enni (2001: 0,8%; 2003: 1,6%); il trend in maggior crescita sembra essere quello dei maschi 35-44enni (2001: 0,01; 2003: 0,8%; 2005: 2%).



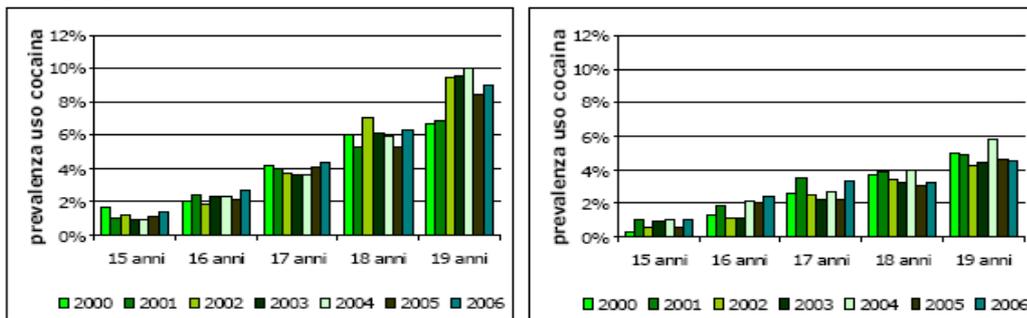
Elaborazione sui dati IPSAD®Italia2001, IPSAD®Italia2003, IPSAD®Italia2005

Fig.5: Uso di cocaina (una o più volte negli ultimi 12 mesi) distribuzione per genere, classi d'età ed anno di rilevazione nella popolazione generale. a) a sinistra: maschi b) a destra: femmine

L'indagine ESPAD®Italia1 permette di ottenere informazioni relative alla prevalenza dei consumi di cocaina nella popolazione scolarizzata. Dalla Figura 6 si osserva che la distribuzione dei consumi all'interno delle classi d'età e per genere rimane sostanzialmente invariata nel corso degli anni, ed i consumi aumentano all'aumentare dell'età [3].

Grafico 2.4: Uso di cocaina (una o più volte negli ultimi 12 mesi) distribuzione per genere, classi d'età ed anno di rilevazione nella popolazione scolarizzata.

a) grafico a sinistra: maschi
b) grafico a destra: femmine



Elaborazione sui dati ESPAD®Italia2000, ESPAD®Italia2001, ESPAD®Italia2002, ESPAD®Italia2003, ESPAD®Italia2004, ESPAD®Italia2005, ESPAD®Italia2006

Fig. 6: Uso di cocaina (una o più volte negli ultimi 12 mesi) distribuzione per genere, classi d'età ed anno di rilevazione nella popolazione scolarizzata. a) a sinistra: maschi b) a destra: femmine

Secondo i dati del Ministero dell'Interno, Direzione Centrale Servizi Antidroga, sono in incremento anche i sequestri di cocaina (+21.8% tra 2004 e 2005, un ulteriore +5.7% tra 2005 e 2006), sequestri che in termini quantitativi hanno

superato quelli di eroina confermando, anche se in modo indiretto, la forte richiesta di cocaina sul mercato [3].

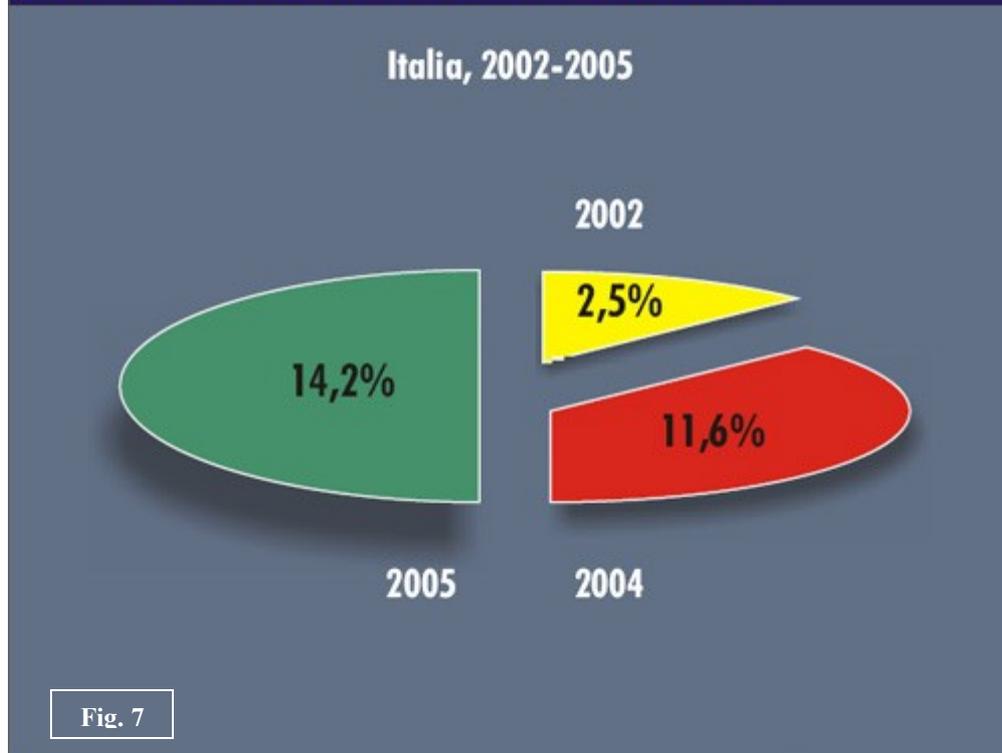
Infine, da studi effettuati dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con agenzie del privato sociale a Roma e Vicenza, in campioni di capelli forniti da giovani e giovani adulti in contesti di aggregazione spontanea, tra le positività a sostanze psicoattive rilevate, oltre il 90% si riferiva alla cocaina.

In Italia, nell'ultimo decennio, si registra una lenta ma costante diminuzione dei decessi droga correlati secondo i dati forniti dalle due fonti ufficiali: Ministero dell'Interno-DCSA ed ISTAT. Questo dato tuttavia, pur confortante, non tiene conto dei decessi indirettamente riconducibili alla droga, sempre più numerosi dopo la diffusione degli stimolanti, e del policonsumo; non riguarda inoltre, se non in piccola parte, i decessi che avvengono tra le mura domestiche in soggetti non tossicodipendenti; è influenzato dalla illegalità del fenomeno che pesa sulla completezza delle schede di morte, dalla complessità delle rilevazioni, dalla non obbligatorietà dell'autopsia nella totalità delle morti sospette. Ne consegue una sottostima del dato.

In sostanza, a fronte di un sostanziale incremento nei sequestri di cocaina ed altri stimolanti negli ultimi anni, e alla crescente diffusione nel consumo, i dati sui decessi connessi a queste sostanze sembrano nelle schede ufficiali essere pressoché inesistenti e, comunque, sottostimati. Alcuni eventi mortali legati soprattutto all'uso di cocaina potrebbero essere codificati erroneamente con codici di altro tipo. Ad esempio, codici relativi alle malattie ischemiche del cuore (tra le quali l'infarto miocardico) e alle malattie cerebrovascolari (tra le quali l'emorragia cerebrale e subaracnoidea).

Segnali forti che i decessi per cocaina sono in significativo incremento provengono però sia dal Registro Speciale (RS) del Ministero dell'Interno (Fig. 6), sia dai dati del Gruppo italiano Tossicologi Forensi (GTF) a seguito di accertamenti disposti dalla magistratura, sia dai dati sulle intossicazioni acute (anche fatali) dei Centri Antiveneni (CAV), sia dai mezzi di comunicazione, sia dalla letteratura internazionale. La Figura 6 riporta la percentuale dei decessi cocaina correlati, per anno secondo il RS. Come si può osservare, nell'arco di un solo quadriennio, si è registrato un incremento di quasi 12 punti percentuali.

RS: % di decessi correlati a cocaina



Al quadro appena tracciato, riguardante le morti direttamente causate dall'assunzione della cocaina, va affiancato il discorso riguardanti le morti attribuibili "indirettamente" all'uso della sostanza.

A tal proposito va sicuramente posto un accento sul problema della sicurezza stradale, o, meglio, della insicurezza stradale dovuta all'assunzione di cocaina, sola o associata ad altre sostanze d'abuso, che causa innumerevoli incidenti e costi sociali che ne derivano. I dati disponibili a riguardo nel nostro paese, sono parziali, ma ugualmente indicativi.

La Tabella 3 riporta il numero di decessi droga correlati (DDC) per causa e per sostanza. Come si può vedere, il rapporto tra cocaina e oppiacei, di circa 1:3 nell'overdose, si capovolge nelle cause indirette che non compaiono nei dati ufficiali.

Tab. 3

Università degli Studi di Milano, Dipartimento Tossicologia Forense

Casi con accertamento tossicologico post-mortem anno 2004

	Overdose	Incidenti stradali	Altre cause violente (suicidi, omicidi, etc.)
Cocaina	25	31	44
Oppiacei	73	9	18

Fonte: Relazione annuale al Parlamento sullo stato delle tossicodipendenze in Italia. Anno 2005

Scopo del lavoro

L'insieme dei dati presentati fornisce un'idea circa il "fenomeno cocaina" in Italia, fenomeno che ha portato all'aggravarsi di problemi di tipo sanitario e sociale. Sono in aumento le intossicazioni acute da cocaina con accessi ai Pronto Soccorso, le richieste di trattamento per abuso e dipendenza e i decessi correlati; si rileva inoltre un incremento di incidenti stradali e di comportamenti aggressivi-violenti.

Quanto detto giustifica l'interesse internazionale, e ovviamente nazionale, su tutto ciò che ruota attorno al monitoraggio, alla diagnosi, al trattamento e allo studio delle interazioni, in termini di farmacocinetica e farmacodinamica, della cocaina con altre sostanze psicoattive d'abuso (alcol compreso) e di farmaci di diffuso utilizzo.

L'aspetto analitico tossicologico riveste in tutto questo un ruolo significativo. La disponibilità di metodologie è ampia, ma per alcuni aspetti ancora insufficiente o inadeguata. Inufficiente perché, dal punto di vista del monitoraggio e screening, a causa della poliassunzione e dell'ingresso nel consumo di nuove sostanze, le singole sostanze risultano sotto soglia rispetto ai cut-off analitici generalmente usati nei metodi di screening che rilevano, tra l'altro, solo le classi più tradizionali di sostanze. Inadeguata perché, nel caso di metodologie idonee, come le cromatografie liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa, esse risultano eccessivamente laboriose perché possano essere utilizzate per scopi di ricerca clinica-epidemiologica indispensabili in un monitoraggio.

E' pertanto necessario cercare nuove strade che consentano di mantenere una elevata sensibilità e specificità per applicazioni in campo clinico-diagnostico e di ricerca, ma che consentano una sufficiente praticabilità per rispondere ad esigenze di monitoraggio.

Il lavoro presentato nella tesi è focalizzato proprio su questo obiettivo.

La ricerca è stata condotta presso il laboratorio della Dott.ssa T. Macchia, Reparto di Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping, Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. E' stata messa a punto una procedura analitica HS-SPME GC-MS dotata di elevata affidabilità ma anche di buona praticabilità.

Tale procedura è applicabile a diverse matrici biologiche e può essere utilizzata per finalità di monitoraggio, per applicazioni diagnostiche e di ricerca anche in studi di farmacocinetica.

L' idoneità della procedura in diversi ambiti è stata testata attraverso l'applicazione a campioni reali di diverse matrici biologiche.

Si ritiene utile, per sottolineare la versatilità del metodo allestito, ricapitolare le caratteristiche dei metodi di screening e di conferma.

Analisi iniziali (test di screening)

Test utilizzati al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata. Questi test permettono di escludere i campioni che risultano negativi, ossia quei campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze indagata oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off).

Le metodiche utilizzate sono, per la maggior parte, di tipo immunochimico in quanto dotate di caratteristiche quali elevata sensibilità, velocità di analisi, non necessità di pretrattamento del campione, possibilità di automazione. Ovviamente, se da una parte le elevate sensibilità escludono o riducono fortemente l'eventualità di falsi negativi, dall'altra l'evenienza di falsi positivi è molto verosimile, soprattutto per il principio su cui si basano questi metodi, cioè una reazione antigene-anticorpo che presenta spesso una specificità di gruppo. A causa, quindi, di queste possibili cross-reazioni, i risultati positivi necessitano di una conferma, mediante metodi diversi, altamente specifici, con limiti di rilevabilità generalmente inferiori al valore del cut-off utilizzato nello screening: tali caratteristiche sono proprie dei metodi cromatografici.

Tutte le case produttrici riportano nel kit per l'analisi di screening un valore di cut-off analitico confrontabile con quello indicato nella Tabella 4, che illustra i cut-off raccomandati dalla Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA).

Classe di sostanze	Concentrazione (ng/ml)
Oppiacei	2000
<u>Cocaina Metaboliti</u>	<u>300</u>
Cannabinoidi	50
Anfetamine ed Analoghi	1000
MDMA	500
Benzodiazepine	300
Metadone	300

Tab. 4 Concentrazione soglia (cut-off) nelle analisi di screening per la positività delle classi di sostanze nelle urine

Analisi di conferma

Le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. E' consigliabile eseguire l'analisi su una seconda aliquota del campione sul quale è stato effettuato il test iniziale. L'analisi di conferma si deve basare su principi fisici e chimici diversi da quelli dei test iniziali e deve essere di tipo quantitativo.

I campioni riservati all'analisi di conferma subiscono da prima un processo di estrazione degli analiti dalla matrice biologica al fine di purificare il campione e concentrare gli analiti stessi.

I processi estrattivi principalmente utilizzati sono:

- estrazione con solventi o miscele di solventi non miscibili con l'urina o con altra matrice (estrazione liquido-liquido)
- estrazione dell'urina o di altra matrice per ripartizione tra una fase solida e un solvente di eluizione (estrazione in fase solida, SPE).

I test di conferma sono generalmente basati su metodiche cromatografiche quali Gascromatografia (GC) e cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa. In tal modo si uniscono le caratteristiche di separazione proprie della cromatografia con la specificità propria della spettrometria di massa. Il valore

soglia (cut-off) dei test di conferma deve essere posto ad una concentrazione uguale o più bassa rispetto al cut-off dei test immunochimici quando viene confermato il singolo farmaco o il metabolita. Anche in questo caso sono riportati i cut-off raccomandati dalla Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA)(Tab. 5).

Classe di sostanze	Concentrazione (ng/ml)
Oppiacei	2000
<u>Cocaina Metaboliti</u>	<u>150</u>
Cannabinoidi	15
Anfetamine ed Analoghi	500
MDMA	500
Benzodiazepine	200
Metadone	300

Tab. 5 Concentrazione soglia (cut-off) nelle analisi di conferma per la positività delle classi di sostanze nelle urine

Utili indicazioni e soluzioni tecnico-analitiche per la determinazione della cocaina e metaboliti in diverse matrici biologiche con le più moderne tecniche cromatografiche sono contenute in numerosi lavori. La Tabella 6 riporta quelli più significativi per le procedure di trattamento del campione, le condizioni analitiche, le performance, le matrici biologiche adoperate. In alcuni dei lavori citati sono stati operati confronti con metodi immunochimici di screening.

Tab. 6. Tecniche, matrici biologiche e sensibilità analitica di metodi cromatografici per la determinazione di cocaina e suoi metaboliti.

Tecnica	Matrice	Sensibilità	Analita	Bibliografia	
HPLC-DAD	urine	µg/mL	0.08 0.15	cocaina benzoilecgonina	M.R.Brunetto e al., 2005
HPLC-UV	siero urine	µg/mL	0.5 1.0	benzoilecgonina benzoilecgonina	M.W. Linder e al., 2000
LC-MS-MS	capelli	LOQ pg/mg	10 16	cocaina benzoilecgonina	R.Kronstrand e al., 2004
GC-MS HS-SPME	saliva	LOQ ng/mL	5	cocaina	M.Yonamine e al, 2003
GC-MS	saliva	LOQ µg/L	2.5 2.5	cocaina benzoilecgonina	E.Kolbrich e al., 2003
GC-MS	siero saliva	LOD µg/L	8 20	cocaina, benzoilecgonina cocaina, benzoilecgonina	S.W.Toennes e al., 2005
GC-MS	urine	LOD ng/mL	1 2	benz.ecgonina, ecgonina metil estere, norcocaina cocaina, cocaetilene	R.De La Torre e al., 1995
GC-MS	sangue	LOD ng/mL	10	metilecgonidina, ecgonidina	K.B. Scheidweiler e al., 2003
GC-MS HS-SPME	capelli	LOQ ng/mg	1	cocaina	S.Gentili e al., 2004
GC-MS SPME	capelli	LOD ng/mg	0.1 0.5	cocaina, cocaetilene benzoilecgonina	F.Crossi Pereira deToledo e al., 2003
GC-MS SPME	capelli	LLOQ ng/mg	0.4	cocaina, cocaetilene	A.M.Bermejo e al., 2006
GC-PICI-MS	sudore	LLOQ ng/cerotto o ng/mL estr.	4 1.6	cocaina, benzoilecgonina, ecgonina metil estere	D.E. Moody e al., 2004
LC-MS	meconio	LOQ µg/g	0.0045 0.0013	p-idrossi benzoilecgonina* m-idrossi benzoilecgonina*	S.Pichini e al., 2005

* Si formano nel metabolismo fetale della cocaina e sono per questo considerate indicatori dell'esposizione intrauterina alla sostanza.

LOD (Limit of Detection) = Limite di rilevabilità; LOQ (Limit of Quantification) = Limite di quantificazione.

Fonte: Macchia e Gentili, 2007 [4]

Il nostro lavoro si pone a cavallo tra le procedure di screening e di conferma, consentendo l'applicazione per entrambe le finalità.

Materiali e metodi

Materiali

Lo standard di cocaina (1 mg/ml in methanol) è stato fornito dalla SigmaAldrich (Milano, Italia); la cocaina deuterata (coc-D3) (1 mg/ml in methanol), utilizzata come standard interno è stata fornita dalla S.A.L.A.R.S. (Como, Italia).

Acqua ultrapurificata è stata ottenuta dalla Milli-Q Unit (Millipore, Bedford, MA, USA). Acido cloridrico (HCl) e Carbonato di potassio (K_2CO_3), di grado analitico sono stati forniti da Carlo Erba (Milan, Italy).

Strumentazione

La strumentazione analitica è costituita da un Gas-Cromatografo 6890 Plus e da un rivelatore Spettrometro di massa 5973N (Agilent Technologies, Milano, Italia) (Fig. 8) equipaggiato con una colonna capillare colonna capillare Restek-5ms 13423 (5% PH ME Siloxane, lunghezza 30m, ID colonna 250 μ m, spessore film 0.30 μ m).

La strumentazione per campionamento manuale SPME usata è equipaggiata con una fibra di estrazione, ricoperta da 100 μ m polidimetilsilossano e un 110 VAC block heater ed è stata fornita da Sigma-Aldrich. Vials per spazio di testa (20 e 2.0 ml) e gli accessori sono stati forniti dalla Chromacol (London, UK). Il lavaggio dei capelli e l'estrazione con ultrasuoni sono stati effettuati in un bagno ad ultrasuoni T 310 fornito da Carlo Erba.



Fig. 8 Gas-Cromatografo 6890 Plus, Spettrometro di massa 5973N (Agilent Technologies, Milano, Italia)

Parametri strumentali

LA temperatura della colonna è stata mantenuta inizialmente a 60°C per 2 min, poi aumentata di 20°C/min fino a raggiungere 250°C infine tenuta at 250°C per 5 min. Le temperature della porta di iniezione, della sorgente ionica e della transfer line sono state settate a 250°C, 230°C e 280°C, rispettivamente. Il desorbimento termico è stato ottenuto a 250°C per 3 min all'interno del gas cromatografo. L'Elio (He) è stato usato come gas carrier con un flusso di 1 ml/min. E' stato usato l'iniettore in modalità splitless. Lo spettrometro di massa utilizza ionizzazione ad impatto elettronico. Lo spettro di massa è stato ottenuto sulla totalità degli ioni. I composti sono stati identificati mediante il tempo di ritenzione e l'abbondanza relativa di tre ioni di conferma del nostro analita (182, 82, 303). I dati quantitativi sono stati ottenuti in selected ion monitoring (SIM) per l'analita e per lo standard interno.

Curva di calibrazione

Soluzioni standard di cocaina (100 µg/ml) sono state preparate in metanolo e conservate a +4°C fino al momento dell'utilizzo. Una aliquota di ogni soluzione è stata mescolata ogni giorno di analisi, diluita e usata a concentrazioni finali di 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 ng/mg. La Cocaina D3 (100 µg/ml) è stata usata come standard interno (S.I.).

Campioni per analisi

Campioni di capelli sono stati ottenuti anonimamente su base volontaria da 54 giovani nell'area veneta. I capelli sono stati tagliati nel vertice posteriore della regione dello scalpo. I giovani reclutati per il presente studio analitico sono stati avvicinati da volontari di Organizzazioni Non-Governative (ONG) coinvolti nei programmi di informazione e prevenzione dell'abuso di sostanze stupefacenti nella regione Veneto.

Campioni negativi di capelli sono stati ottenuti dallo staff del laboratorio; una parte considerevole dei campioni bianchi è stata ottenuta da un singolo soggetto, una aliquota dei quali è stata inclusa come campione di controllo per ognuno dei giorni di analisi.

Campioni di sudore sono stati ottenuti anonimamente da 43 analisi di screening effettuate con supporti assorbenti del tipo DrugWipe® su automobilisti dell'area

lombarda. Il prelievo del campione è stato effettuato da personale delle forze di Polizia.

Campioni negativi di traspirato sono stati ottenuti dallo staff del laboratorio utilizzando sempre supporti assorbenti del tipo DrugWipe®.

Risultati e discussione

Verranno nel seguito descritte le diverse fasi della procedura analitica in base ai risultati ottenuti e alle scelte operative effettuate, discutendone i motivi alla luce della letteratura corrente.

Le fasi in cui si articola la procedura analitica, sono molteplici; tra queste, alcune più di altre risultano critiche e richiedono scelte determinanti e vincolanti, ad es.

- Trattamento del campione (separazione dalla matrice, concentrazione, frazionamento e, se necessario, derivatizzazione)
- Separazione
- Analisi
- Elaborazione dei dati ottenuti

Si riportano, per le diverse fasi, le ragioni delle scelte effettuate.

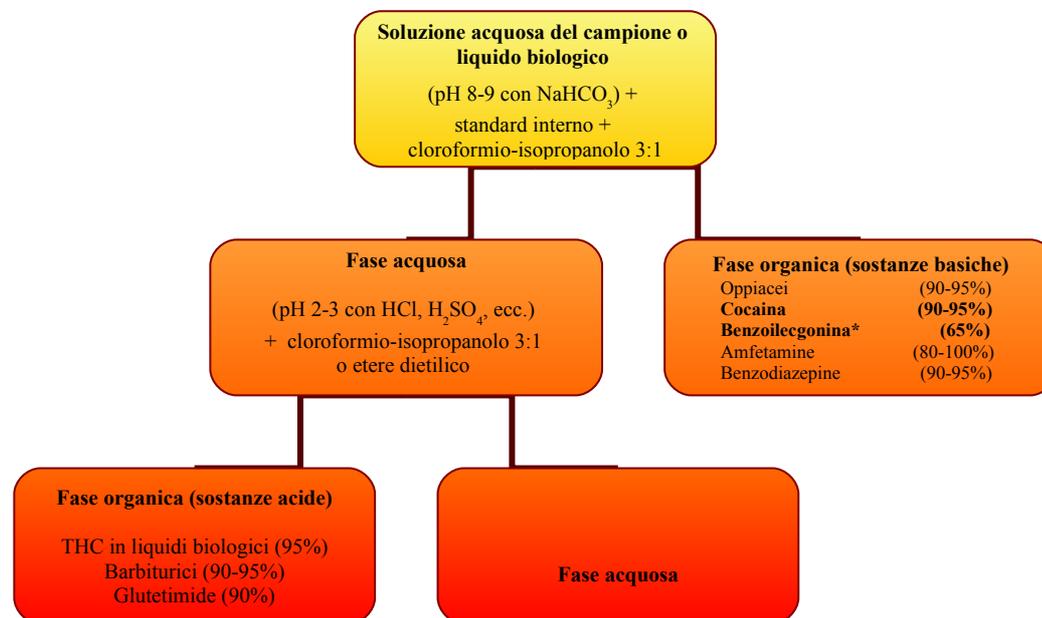
Trattamento del campione

L'analisi strumentale per la determinazione delle sostanze d'abuso in matrici biologiche è preceduta, nella gran parte dei casi, da un insieme di operazioni finalizzate all'isolamento dello xenobiotico dalla matrice.

Le procedure di preparazione attualmente utilizzate ricorrono spesso all'estrazione liquido-liquido (LLE), esse sono lunghe e laboriose e richiedono numerosi passaggi, ognuno dei quali può essere fonte di errore. Richiedono inoltre elevate quantità di solventi ai quali il laboratorista viene esposto.

Nell'analisi dei liquidi biologici, nei quali le principali sostanze di abuso si presentano in elevata percentuale in forma coniugata, è importante tenere presente la necessità di un'eventuale preventiva idrolisi per liberare la sostanza (specie i metaboliti) dal suo legame con l'acido glucuronico o con l'acido solforico che la rende idrosolubile e quindi non estraibile con solventi organici. La Figura 9 riporta il procedimento orientativo di un'estrazione liquido/liquido che comprende un elenco esemplificativo di sostanze estratte, con l'indicazione media della loro resa di estrazione.

Fig. 9 Linee guida orientative per un'estrazione liquido/liquido



*La **Benzoilecgonina** per il suo carattere anfotero si estrae con difficoltà in queste condizioni. La sua estrazione è più efficace con sistemi solido/liquido.

Fonte: Macchia e Gentili, 2007 [4]

Esistono rapporti volumetrici ottimali tra soluzione da estrarre e solvente estraente, da valutare volta per volta: generalmente essi sono nel rapporto di 1:1. E' buona regola effettuare l'estrazione più volte con volumi inferiori di solvente. L'introduzione dell'estrazione solido-liquido (SPE) ha ridotto molti dei problemi dei classici metodi LLE, essa infatti richiede tempi minori e utilizza minori quantità di solventi, ma resta comunque un procedimento laborioso. L'estrazione in fase solida (SPE) è una tecnica di preparazione del campione largamente diffusa e utilizza dispositivi monouso contenenti sostanze assorbenti con particelle impaccate di varia porosità. Questi metodi sono certamente più vantaggiosi dell'estrazione liquido/liquido, perché permettono in un solo passaggio la purificazione del campione senza la necessità di estrazioni a diversi pH, impiegando minori quantità di campione e di solventi. Gli analiti sono trasferiti sulla fase solida dove sono ritenuti e, successivamente, recuperati per eluizione attraverso un liquido, un fluido o desorbimento termico

nella fase gassosa. Le sostanze nel campione biologico possono essere così isolate, concentrate, purificate, e trasferite dalla complessa matrice biologica ad un diverso solvente o alla fase gassosa. I vantaggi di questa procedura sono tanti (basso costo, processare il campione richiede poco tempo, bassi volumi di solventi, procedure semplici, possibilità di automazione); ci sono però anche dei limiti. Tra questi, la non ottimale riproducibilità, i meccanismi di ritenzione possono influire sul recupero, limitata capacità di volume del campione.

Un approccio recente alla preparazione del campione è la microestrazione in fase solida (SPME). Inventata da Pawliszyn et al. nel 1989 [5], tale procedura integra il campionamento, l'estrazione, la concentrazione e l'iniezione del campione in un singolo passaggio senza l'uso di solventi. Gli analiti nel campione sono direttamente estratti e concentrati sulla fibra di estrazione.

Tale metodo estrattivo riduce i tempi di analisi, i costi e migliora i limiti di rilevabilità. Consente inoltre, riducendo al massimo l'interferenza della matrice, una maggiore pulizia del cromatogramma che verrà prodotto in fase analitica.

La SPME è in genere usata in combinazione con la gas cromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) per l'analisi di numerosi composti, in particolar modo quelli volatili e semi-volatili [6].

Per la SPME si utilizza una fibra di silice fusa ricoperta da un sottile strato di materiale assorbente. Tale fibra adsorbe gli analiti dalla matrice fino al raggiungimento di un equilibrio, la quantità di analiti assorbiti dipende dalla natura del materiale adsorbente e dal coefficiente di ripartizione dell'analita tra la matrice e la fibra stessa. Dopo l'estrazione, la fibra è trasferita, con l'ausilio di un supporto simile ad una siringa (holder), allo strumento analitico per la separazione, identificazione e quantificazione degli analiti [7].

I metodi usati nella preparazione del campione per l'analisi di sostanze stupefacenti o terapeutiche nei capelli, in genere prevedono estrazione o digestione della matrice (es. capelli) e il successivo prelievo da parte di una fase solida estraente. Tali metodi prevedono diversi passaggi successivi e un alto grado di esperienza al fine di ottenere risultati riproducibili.

La HS-SPME facilita di molto queste analisi.

Una fibra di silice fusa ricoperta da uno strato di 7-100 μm di materiale assorbente e protetta in un supporto di iniezione (holder) (Fig. 10), è esposta alla fase vapore nello spazio di testa di una vial. La fibra è esposta per un determinato tempo ad una data temperatura e assorbe le sostanze evaporate dal liquido o dal solido. Dopo di che la fibra è ritratta nel supporto che è trasferito nell'iniettore di una GC-MS dove la fibra è nuovamente esposta e, a causa delle alte temperature, le sostanze adsorbite in precedenza, vengono rilasciate, separate ed identificate [8]. La SPME può essere attuata in 3 modi differenti: estrazione diretta, in spazio di testa o estrazione con protezione di una membrana.

L'estrazione diretta prevede che la fibra sia immersa nel campione e venga a contatto diretto con gli analiti; per facilitare tale contatto può essere utile agitare la soluzione per facilitare il raggiungimento dell'equilibrio.

Nell'estrazione in spazio di testa gli analiti sono estratti dalla fase gassosa in equilibrio con il campione in un recipiente ermeticamente chiuso. Tale metodo protegge la fibra dagli effetti avversi causati dalle molecole non volatili ad alto peso molecolare presenti nel campione e permette modificazioni del campione da analizzare (es. pH) senza intaccare l'integrità della fibra stessa.

In questo tipo di estrazione la temperatura riveste un ruolo fondamentale: se, infatti, per gli analiti volatili l'equilibrio si raggiunge più velocemente nello spazio di testa che per contatto, per gli analiti poco volatili vale il discorso inverso, essi infatti sono presenti solo in minima parte in fase gassosa, per questo motivo è necessario un aumento di temperatura che ne favorisca il passaggio in fase gassosa. Altra procedura atta ad agevolare il passaggio in fase gassosa degli analiti è il "salting-out", ottenuto mediante l'aggiunta di sali la cui scelta è in funzione degli analiti da dosare. Nel nostro caso, il sale che meglio si presta all'analisi della cocaina è il carbonato di potassio (K_2CO_3).

Altra possibilità di condurre l'estrazione è quella di interporre una membrana tra la fibra e il campione, tale membrana funge da barriera che lascia passare gli analiti di interesse e protegge la fibra dagli effetti avversi causati dal contatto con molecole ad alto peso molecolare. Il processo estrattivo è quindi più lento dei precedenti in quanto gli analiti devono diffondere attraverso la membrana [7].

In considerazione delle particolarità dell'analita di nostro interesse e dell'intento di applicare il metodo anche al di fuori del contesto squisitamente di ricerca, agevolando la praticabilità, si è scelto di utilizzare i vantaggi forniti dall'SPME con estrazione in spazio di testa (HS-SPME).

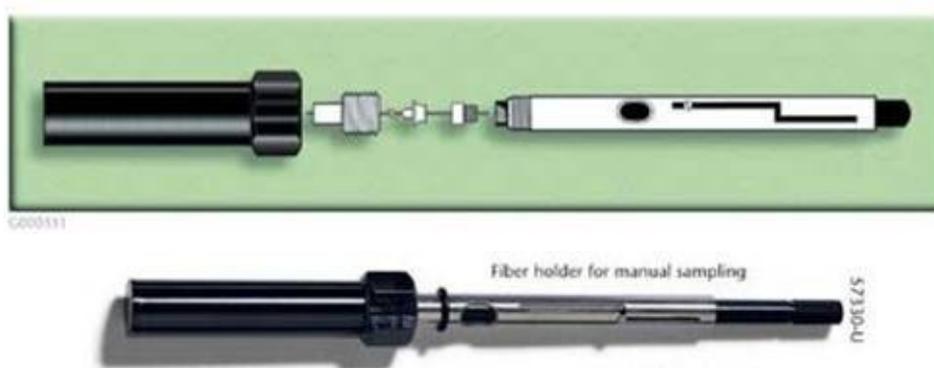


Fig. 10 Fiber holder per campionamento manuale

Per il rivestimento della fibra noi abbiamo utilizzato il Polidimetilsilossano (PDMS) in quanto il più utilizzato in laboratori che fanno uso di tali sistemi.

Diversi materiali adsorbenti sono stati utilizzati e sviluppati nel corso degli anni per ottimizzare l'estrazione di diversi tipi di analiti. La scelta del materiale di rivestimento è basata sulle caratteristiche di polarità e di volatilità degli analiti, seguendo il principio generale del “simile scioglie il simile”.

Alcuni di questi rivestimenti sono basati su tecnologia sol-gel, tra cui il Glicole polietilenico (PEG), Carbowax 20M-modified silica, Polidimetilsilossano–Polivinilalcol (PDMS-PVA), Propiltrimetossisilano (PTMOS) e Metiltrimetossisilano (MTMOS), e una gran varietà di eteri corona.

Il polidimetilsilossano (PDMS) è il materiale di rivestimento più versatile; esso è una fase liquida non-polare ed è resistente a temperature superiori ai 300°C, estrae in maniera molto soddisfacente gli analiti non polari e può essere applicato anche nelle estrazioni di analiti polari [9]. Tale versatilità e l'ampia diffusione di questo tipo di rivestimento, il che permette una facile applicazione del nostro metodo a numerosi laboratori, ha fatto ricadere la nostra scelta su fibre che avessero polidimetilsilossano quale materiale assorbente.

La cinetica di estrazione da parte della fibra è fortemente influenzata da diversi fattori quali: geometria, quantità di campione, parametri della fibra, ecc.

Il tempo di estrazione è prolungato proporzionalmente allo spessore della fibra e al coefficiente di distribuzione delle molecole dell'analita di interesse nel campione. Tale tempo può essere ridotto mediante tecniche di agitazione (meccanica, ultrasuoni, ecc.) e, in caso di agitazione perfetta, il tempo dipende solo dalla geometria della fibra e dal coefficiente di distribuzione dell'analita sulla fibra. Il tempo di estrazione è comunque indipendente dalla concentrazione dell'analita nel campione.

Le fasi stazionarie sono immobilizzate mediante interazioni di non legame, legami parzialmente crociati o legami altamente crociati. Fasi non legate sono realizzate con solventi organici miscibili in acqua; un leggero rigonfiamento può occorrere quando usate con solventi non polari. Fasi legate sono compatibili con la maggior parte dei solventi organici, ad eccezione di alcuni solventi non polari (esano, diclorometano). Fasi parzialmente legate sono stabili nella gran parte dei solventi miscibili in acqua.

Prima di poter utilizzare una nuova fibra è necessario che essa venga condizionata, sottoponendola alla temperatura massima di desorbimento per 0.5-4 ore. Per poterla utilizzare per la GC-MS sono necessari per il condizionamento gas carrier altamente purificati, perché alcune fasi estrattive possono essere facilmente ossidate da tracce di ossigeno. Le fibre possono essere riutilizzate diverse volte (20-150 o più) a seconda della matrice da analizzare [10].

Procedure per il rivestimento della fibra

- *Tecnologia sol-gel*: tecnica comune per preparare in proprio i rivestimenti per la fibra; prevede l'incorporazione di componenti organici in strutture polimeriche organiche in condizioni termiche moderate. In generale, il processo sol-gel, prevede la formazione di una rete di legami inorganici in sospensione colloidale (sol) e la gelificazione del sol per formare una rete in fase liquida continua (gel). Mediante questa tecnologia possono essere prodotti a temperatura ambiente materiali costituiti da ossidi inorganici con adeguate proprietà di durezza, resistenza chimica e termica, polarità e porosità. I precursori della sintesi di questi

colloidi sono elementi metallici circondati da vari ligandi reattivi; gli alcossidi metallici, come l'alcossisilano tetrametossisilano (TMOS) o il tetraetossisilano (TEOS) sono i più comuni perché reagiscono prontamente con l'acqua.

Le reazioni coinvolte sono generalmente tre: idrolisi (R1), condensazione acquosa (R2) e condensazione alcolica (R3)(Fig.11).

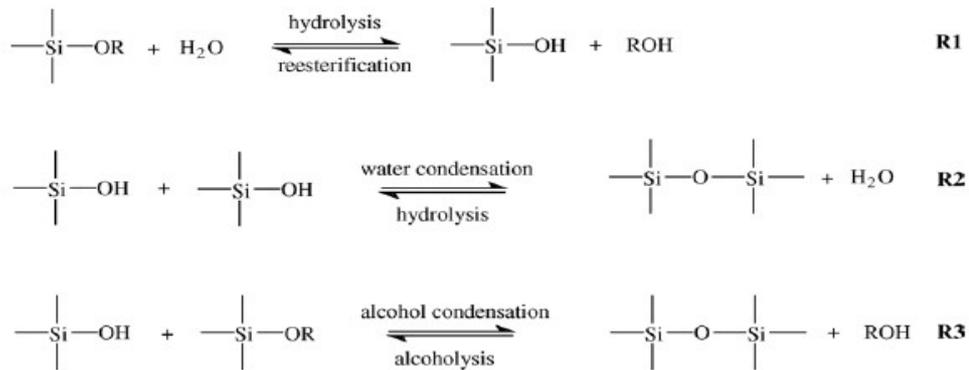


Fig. 1. Basic steps in sol-gel coating technology.

Fig. 11 Reazioni per rivestimento sol-gel

- *Procedura elettrochimiche*: procedura alternativa per la produzione di fibre, basata su metodi elettrochimici per il deposito del rivestimento sul materiale di supporto che, in questo caso, deve essere conduttore. Gli approcci più comuni sono la potenziometria e la voltamperometria ciclica.

- *Deposito fisico*: immersione del materiale di supporto nella soluzione di polimero, frequentemente seguito da alcuni trattamenti termici o procedure di condizionamento per la stabilizzazione del polimero, è un modo molto veloce e comodo per ottenere la copertura della fibra. Il risultato che si ottiene sono fibre molto resistenti all'instabilità meccanica. Questo tipo di rivestimento è stabile per circa 150 cicli di estrazione/desorbimento con riproducibilità del 5.6% [11].

Procedura di estrazione

Avendo deciso di dedicare l'attenzione all'HS-SPME, abbiamo utilizzato l'estrazione su fibra, più versatile per i nostri scopi e che presenta minori problemi

di inquinamento del campione e di pretrattamento rispetto all'estrazione "In-tube".

La fibra è immersa direttamente nello spazio di testa di una vial contenente la soluzione dell'analita da estrarre. Dopo il raggiungimento dell'equilibrio (da pochi minuti a diverse ore, a seconda delle proprietà dell'analita da misurare) o dopo un tempo definito, la fibra è estratta e trasferita alla porta di iniezione del GC o all'iniettore modificato dell'HPLC. L'analita è quindi desorbito termicamente dal calore dell'iniettore GC.

Estrazione su fibra: Il campione è posto in una vial, sigillata con un tappo con un setto. Mediante l'holder che contiene la fibra si fora il setto, a questo punto si espone la fibra, per immersione nel campione o nello spazio di testa. Alla fine dell'estrazione la fibra viene ritratta nell'holder e poi estratta dal setto, quindi inserita nell'iniettore del GC (Fig. 12).

Estrazione "In-tube": La "In-tube" SPME usa una colonna capillare open-tubular come dispositivo per l'SPME. Con questa tecnica, i composti organici nei campioni acquosi, sono direttamente estratti sulla fase stazionaria interna di una colonna capillare e poi desorbiti mediante un flusso di fase mobile o mediante un solvente desorbente.

Sebbene il concetto alla base dei metodi "su fibra" e "in-tube" sia lo stesso, vi sono significative differenze tra questi; l'estrazione degli analiti è effettuata sulla superficie esterna della fibra (modello su fibra) e sulla superficie interna (modello in-tube). Nelle in-tube SPME è necessario evitare un'ostruzione del capillare di estrazione e il particolato deve essere rimosso dal campione prima dell'estrazione. Inoltre la fibra deve essere maneggiata con cautela a causa della sua fragilità, problema che non si presenta con l'estrazione in-tube. Altra differenza tra i due metodi riguarda la possibilità di sdoppiamento dell'assorbimento e dell'iniezione col metodo "in-tube", ciò non è possibile con la fibra, perché gli analiti sono desorbiti durante l'iniezione quando la fase mobile passa sulla fibra. Col metodo "in-tube" l'allargamento del picco è minore perché gli analiti sono completamente desorbiti prima dell'iniezione [10].

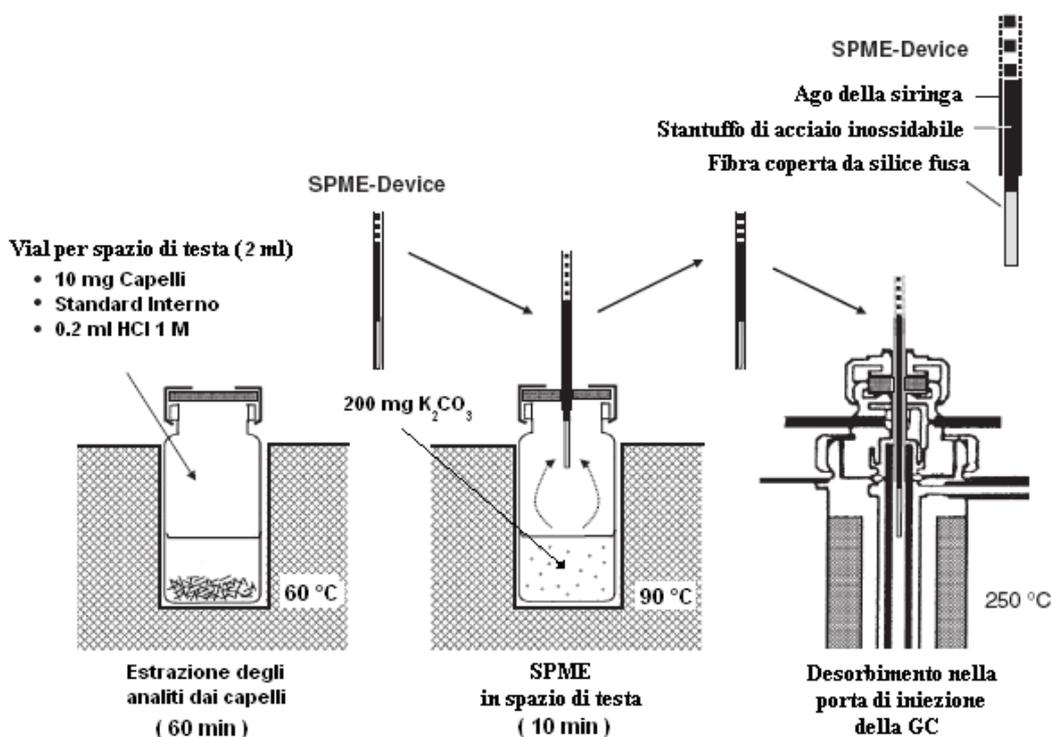


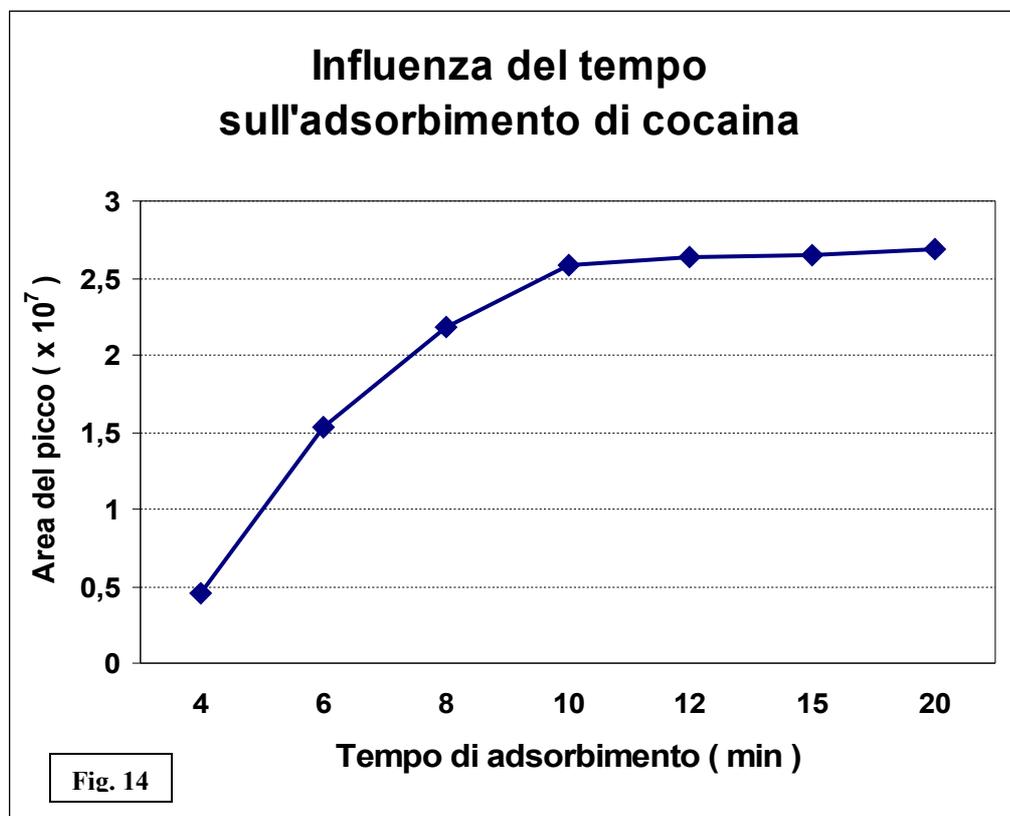
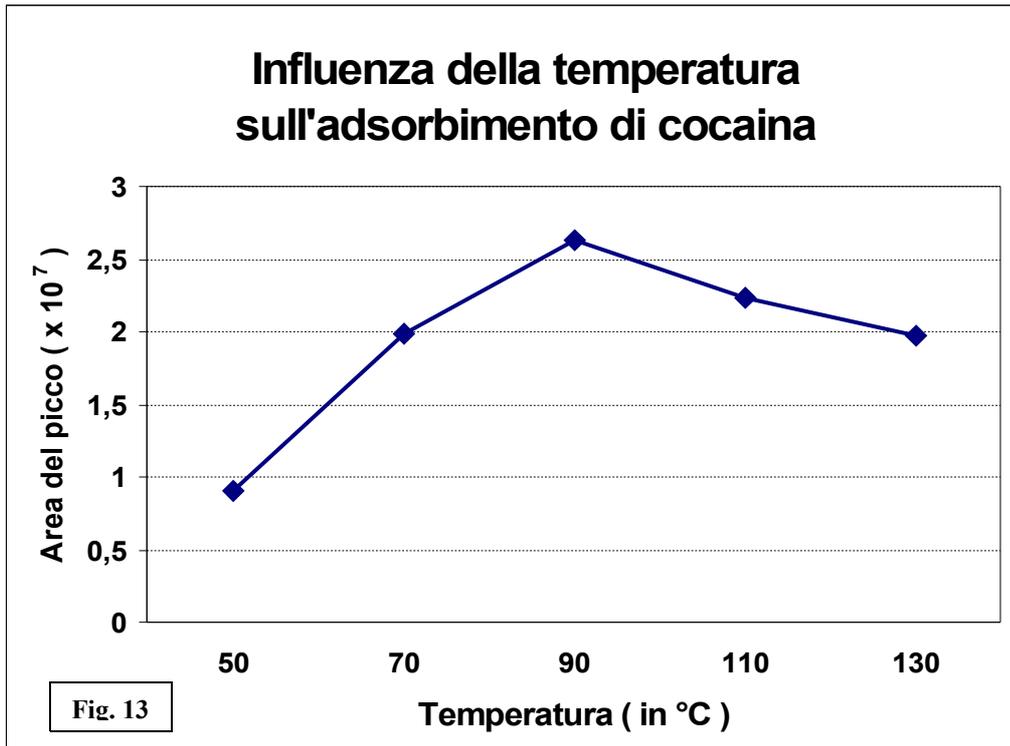
Fig. 12 Procedura di estrazione su fibra nella microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME)

FONTE: Sporkert e Pragst, 2000 [8]

Temperatura di adsorbimento e tempo di adsorbimento

Sono fattori fondamentali per la sensibilità del metodo. Se da un lato un aumento della temperatura comporta una maggiore concentrazione delle sostanze nella fase vapore, dall'altro lato l'assorbimento sulla fibra è ridotto e l'idrolisi degli analiti nel mezzo alcalino diviene più probabile.

Nel corso delle nostre ricerche abbiamo provveduto a evidenziare la dipendenza della risposta in relazione alla temperatura di adsorbimento (Fig. 13) e al tempo di esposizione per la cocaina (Fig. 14). In funzione dei risultati ottenuti abbiamo scelto di effettuare l'analisi a 90°C per un tempo di 10 min, in quanto il miglior compromesso rilevato.



Scelta del sale per il *salting-out*

Nella letteratura riguardante l'HS-SPME sono numerosi i Sali che sono stati adoperati per facilitare il passaggio nello spazio di testa e quindi l'estrazione degli analiti, tra essi segnaliamo il cloruro di sodio (NaCl) il carbonato di sodio (Na_2CO_3), il solfato d'ammonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), solfato di sodio (Na_2SO_4), e il carbonato di potassio (K_2CO_3). Proprio quest'ultimo è stato quello che nelle nostre analisi preliminari ha mostrato le migliori rese per quanto riguarda la cocaina, nostro analita di interesse; la quantità di tale sale adoperata è stata 200 mg.

Derivatizzazione

Nell'analisi SPME la fibra può essere sottoposta a sostanze che derivatizzino gli analiti adsorbiti in modo da dare dei vantaggi di diverso tipo al momento dell'analisi [12]. La derivatizzazione può essere necessaria e viene usata per la trasformazione chimica degli analiti in una forma più adatta all'analisi. Mediante la derivatizzazione si può aumentare la volatilità e/o diminuire la polarità di alcuni analiti e aumentare così l'efficienza, la selettività e la rilevabilità. Tale approccio rende possibile l'identificazione di sostanze con scarsa rilevabilità cromatografica, molto reattive o termicamente instabili.

Tre procedure sono attualmente in uso per effettuare la derivatizzazione: derivatizzazione diretta, derivatizzazione sulla fibra SPME e derivatizzazione nell'iniettore GC.

- *La derivatizzazione diretta (o in situ)* è spesso quella preferita per la SPME, in questo caso un agente derivatizzante è aggiunto alla matrice del campione, avviene la derivatizzazione e la fibra SPME estrae gli analiti derivatizzati. Questa operazione è utilizzata al fine di ottenere derivati più volatili dagli analiti polari presenti in soluzione. A tale scopo possono essere utilizzati solo un numero limitato di agenti derivatizzanti poiché molti di essi sono instabili nelle più comuni matrici acquose.

- *La derivatizzazione su fibra* può essere effettuata in due momenti:

- Dopo l'estrazione, in questo caso i composti estratti vengono esposti all'agente derivatizzante in fase gassosa per un tempo stabilito.

- Prima dell'estrazione, in questo caso l'agente derivatizzante è caricato prima sulla fibra e questa viene poi esposta al campione da analizzare, in questo modo gli analiti vengono estratti e simultaneamente convertiti in analoghi con maggiore affinità per la fibra.

- *La derivatizzazione nell'iniettore* si basa sullo stesso principio di quella *in situ*, con la differenza che in questo caso viene effettuata alle temperature elevate dell'iniettore GC [6,8,9].

Il metodo messo a punto da noi non necessita di derivatizzazione per l'analisi della cocaina, ma tale procedura può risultare utile nel caso in cui in una stessa corsa analitica si vogliano processare anche altre molecole (come nel caso dell'analisi simultanea della cocaina con altre sostanze di abuso, che abbiamo messo a punto (Tab.7 e Fig.15).

Composto	Tempo di ritenzione (min)	Ioni m/z
A	9.04	*86, 118, 91
MA	9.58	*58, 100, 91
MDA	11.09	*162, 135, 221
Ketamina	11.18	*180, 182, 209
MDMA	11.55	*58, 162, 100
MDE	11.77	*72, 162, 114
MBDB	11.87	*72, 176, 114
MDPA (S.I.)	12.14	*86, 162, 128
Metadone	12.81	*72, 294, 91
Cocaina	13.24	*182, 82, 303
Cocaetilene	13.67	*196, 82, 272

Tab 7. HS-SPME-GC-MS Tempi di ritenzione e ioni di riconoscimento su campione di capelli addizionati con A, MA, MDA, MDMA, MDE, MBDB, ketamina, metadone, cocaina, cocaetilene e MDPA come S.I

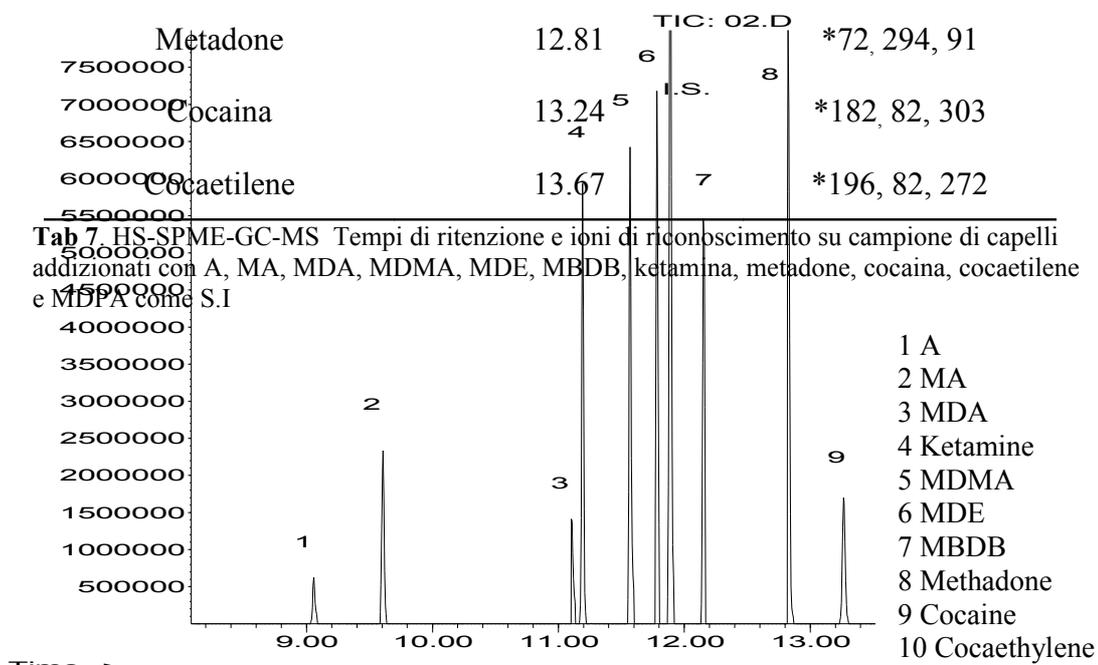


Fig.15 HS-SPME-GC-MS SIM cromatogramma di un campione di capelli addizionato con soluzioni 2 ng/mg di A, MA, MDA, MDMA, MDE, MBDB, ketamina, metadone, cocaina, cocaetilene e 10 ng di MDPA come S.I.

Desorbimento

Il desorbimento degli analiti dalla fibra avviene nella porta di iniezione del gascromatografo. L'efficienza di tale desorbimento termico dipende dalla volatilità dell'analita, dallo spessore del rivestimento della fibra, dalla profondità dell'iniezione, dalla temperatura e dal tempo di esposizione. Un foro stretto nell'iniettore è essenziale per garantire un flusso costante e la fibra deve essere esposta immediatamente dopo l'inserimento dell'ago di supporto nell'iniettore. In genere la temperatura ideale per il desorbimento è circa quella di evaporazione dell'analita meno volatile, in pratica comunque la temperatura deve essere 10-20°C più bassa del limite della fibra.

Vi sono due tecniche per rimuovere gli analiti dalla fibra: desorbimento dinamico e statico. Nel desorbimento dinamico gli analiti sono rimossi dalla fibra dal flusso della fase mobile. Se gli analiti sono fortemente adsorbiti sulla fibra, essa può essere immersa nella fase mobile o in un altro solvente forte per un tempo determinato prima dell'iniezione. In entrambi i casi è auspicabile un'estrazione rapida e completa nella minore quantità possibile di solvente.

Nel metodo “in-tube” gli analiti estratti sul rivestimento del capillare possono essere facilmente desorbiti dal flusso della fase mobile [9].

Identificazione

L'individuazione degli analiti è stata ottenuta in scan, la cocaina, in base alla rampa di temperatura da noi impostata, ha un tempo di ritenzione di 9.45 minuti; altrettanto accade, ovviamente, per lo standard deuterato. Nella Figura 16 sono mostrati i picchi relativi alla cocaina e alla cocaina D3, riferiti rispettivamente agli ioni m/z 182 e 185.

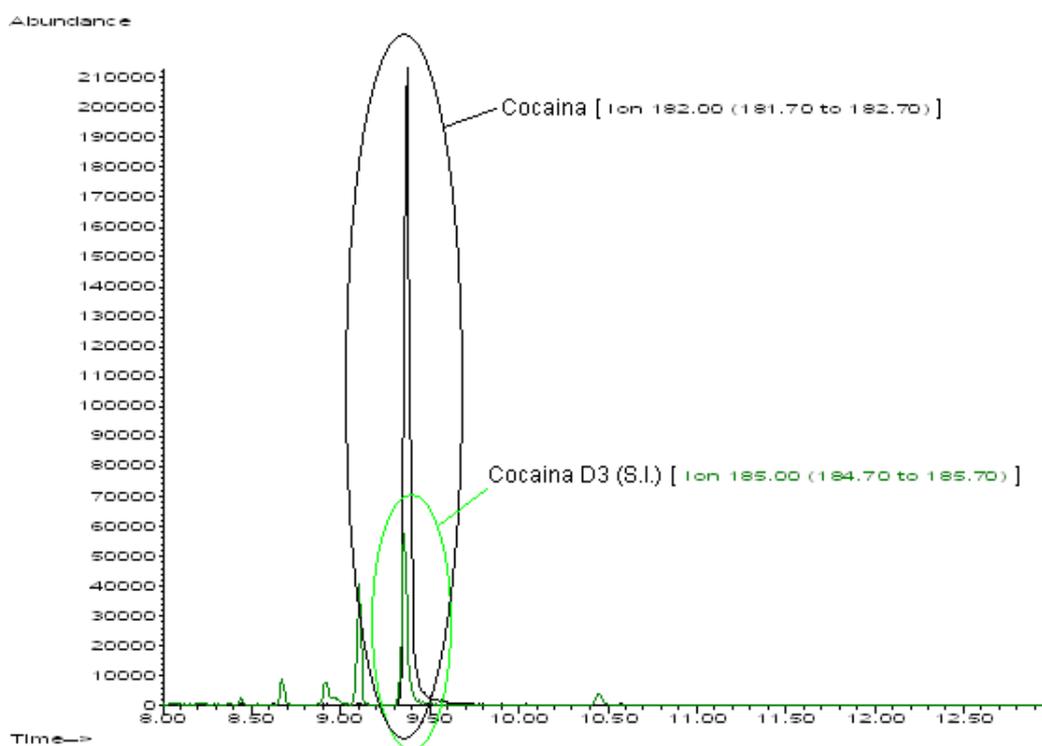


Fig. 16 Cromatogramma per Cocaina e Cocaina D3 (S.I.) ottenuto in scan e riferito agli ioni 182 e 185 rispettivamente.

Nella Figura 17 gli spettri della cocaina e dello standard deuterato sono mostrati separatamente:

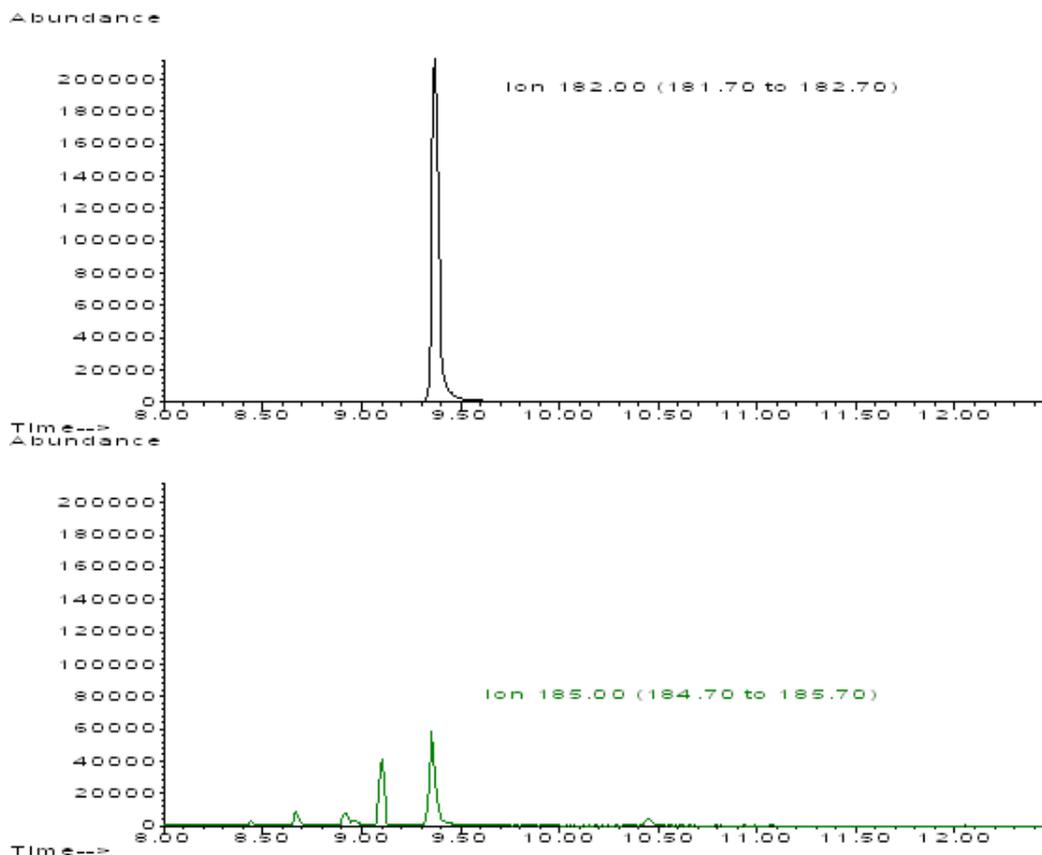


Fig. 17 Cromatogramma per Cocaina (sopra) e Cocaina D3 (S.I.) (sotto) ottenuto in scan e riferito agli ioni 182 e 185 rispettivamente.

Quantificazione

La tecnica HS-SPME è stata utilizzata inizialmente per le analisi qualitative o semi-quantitative (screening). Anche le analisi quantitative sono però possibili, esse richiedono alcuni accorgimenti (es. l'uso di uno standard interno) analoghi a quelli usati per le altre analisi quantitative per quel che riguarda la preparazione del campione e l'analisi strumentale. Per analisi su matrici semplici, ad esempio gas o liquidi semplici, può essere utilizzata una calibrazione esterna; per matrici complesse, la calibrazione deve essere effettuata mediante uno standard interno.

La riproducibilità e la precisione possono essere aumentate mediante controlli accurati del tempo e della temperatura durante l'estrazione.

I dati quantitativi sono stati ottenuti in *selected ion monitoring* (SIM) con riferimento agli ioni 182, 82 e 303. La Figura 18 riporta uno spettro di massa della

cocaina nel quale si possono distinguere chiaramente i picchi degli ioni più abbondanti.

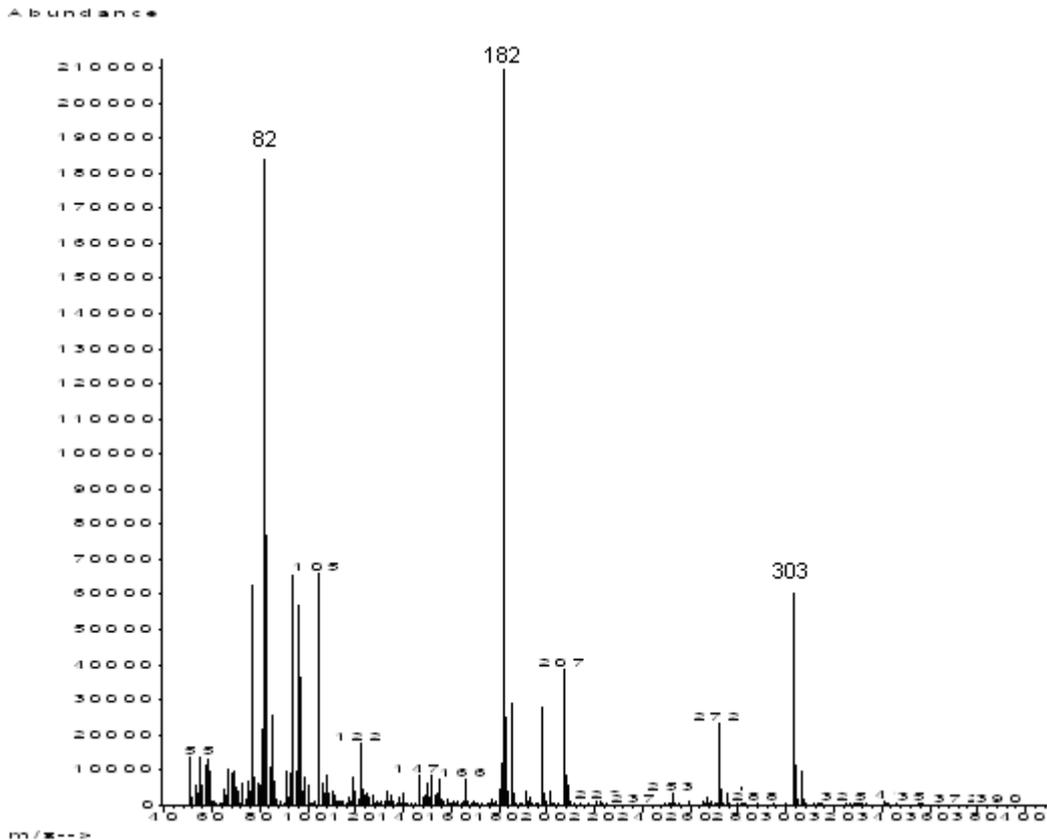


Fig. 18 Spettro di massa della Cocaina

Calibrazione e standard

I metodi classici di calibrazione possono essere utilizzati per effettuare un'analisi quantitativa, essi prevedono: l'uso di uno standard esterno (curva di calibrazione), l'uso di uno standard interno o il metodo dell'aggiunta standard; ognuno di questi metodi ha vantaggi e svantaggi.

La costruzione di una curva di calibrazione prevede la preparazione di soluzioni standard in matrici organiche o nella matrice del campione, per ottenere la relazione tra la risposta dello strumento (come altezza/ampiezza del picco) e la concentrazione dello standard. Per tale metodo è necessario che le condizioni di

analisi rimangano le stesse sia per il campione che per lo standard e che, nel caso vi sia un effetto della matrice, sia preparato un bianco della matrice.

La curva di calibrazione è la relazione che lega la risposta del metodo di analisi al rapporto tra la concentrazione dell'analita e la concentrazione dello standard interno. Lo standard interno dovrebbe essere una sostanza con proprietà chimico-fisiche del tutto simili a quelle dell'analita in esame. Inoltre non deve essere un metabolita dell'analita o un farmaco che possa essere assunto e non deve interferire con la corsa cromatografica. L'intervallo di misura deve includere le concentrazioni che si trovano generalmente in vivo. Si valuta quindi se l'equazione che lega le due variabili è lineare e se la retta ha intercetta vicino a zero. Se il metodo permette la determinazione simultanea di più analiti per ciascuno di essi deve essere generata una appropriata curva di calibrazione.

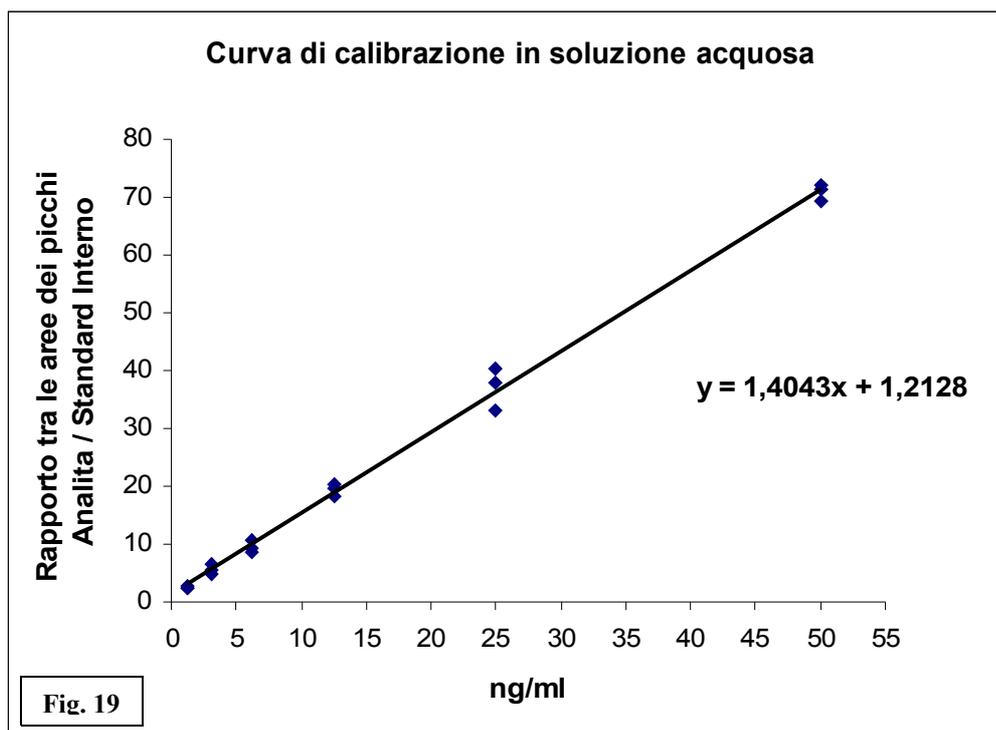
Il metodo dello standard interno viene utilizzato prevalentemente in cromatografia. Innanzitutto viene effettuata una curva di calibrazione su soluzioni a contenuto noto di analita a cui viene aggiunta la stessa quantità di standard interno. Si costruisce il grafico riportando in ascissa la concentrazione di analita e in ordinata il rapporto tra il segnale misurato per l'analita rispetto a quello dello standard interno (nel nostro caso il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici). Tipicamente i grafici dose/risposta approssimano una linea retta, come è auspicabile, anche se, a causa di errori associati al processo di misurazione, non tutti i dati si trovano esattamente su una retta. L'equazione che identifica la retta è generalmente del tipo:

$$y = a + bx$$

Nel nostro caso abbiamo proceduto su due strade parallele nella scelta dello standard, in un caso abbiamo utilizzato una standard interno deuterato (Cocaina-D3) (S.A.L.A.R.S., Como, Italia) per l'analisi della sola sostanza.

In un secondo momento, nell'applicazione del metodo ad un più ampio spettro di sostanze, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare uno standard che potesse permetterci una quantificazione di tutte le sostanze, la nostra scelta, dopo diverse prove, è ricaduta sulla Metilendiossipropilamfetamina (MDPA) (S.A.L.A.R.S., Como, Italia).

Nell'analisi dei campioni su matrice acquosa che abbiamo effettuato per giungere alla messa a punto della metodica, abbiamo effettuato 3 replicati per ogni valore di concentrazione (1.25 ng/ml, 3.13 ng/ml, 6.25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25.0 ng/ml, 50.0 ng/ml). Da tali dati abbiamo ottenuto la curva di calibrazione rappresentata in Figura 19.



Oltre alle concentrazioni sopra riportate (1.25–50.00 ng/ml), abbiamo provveduto a verificare se la linearità fosse mantenuta anche a concentrazioni maggiori di analita, fino a 200 ng/ml. La linearità è effettivamente verificata anche a tali concentrazioni, abbiamo però preferito restringere la nostra curva di calibrazione a valori di concentrazione bassi, proprio per la finalità che si propone questo lavoro, ovvero quello di fornire un metodo che possa essere utile anche nell'ambito degli studi di farmacocinetica. Investigando quindi concentrazioni molto basse di analita, che sono concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quelle che di solito si riscontrano in vivo.

Convalida della metodica

Le metodiche analitiche che vengono utilizzate per l'analisi di conferma della presenza delle sostanze d'abuso e/o dei loro metaboliti nelle matrici biologiche devono essere validate prima di poter entrare nella routine di un laboratorio.

La convalida ha lo scopo di documentare le caratteristiche del metodo analitico al fine di permettere una valutazione obiettiva dei risultati. Per tale scopo deve essere approntata una specifica descrizione del protocollo di analisi. Ciascun passaggio della procedura deve essere analizzato per determinare tutte quelle variabili che possono influenzare la stima dell'analita nella matrice biologica.

Il risultato di un'analisi chimica è un'informazione costituita da:

- Un numero
- Un'incertezza
- Un'unità di misura

Nello schema di validazione devono essere valutati i seguenti parametri:

Specificità

Indica la capacità del metodo di differenziare e quantificare l'analita senza subire interferenze da parte di altre sostanze, note e non, presenti nel campione. Un test statistico permetterà poi di valutare se esistono differenze significative tra i dati ottenuti da un'analisi effettuata in presenza ed una seconda analisi effettuata in assenza di sostanze note diverse dall'analita del campione (metaboliti, prodotti di degradazione, altri xenobiotici).

Se il metodo permette la determinazione simultanea di più analiti, la specificità deve essere testata per ogni analita.

Limite di rilevazione (LOD) e Limite di quantificazione (LOQ)

Il LOD è la minima concentrazione di un analita che si può distinguere da un campione bianco. Rappresenta, quindi, la più bassa concentrazione per valutare qualitativamente la presenza o l'assenza di un analita.

In teoria, per valutare il LOD è necessario eseguire un numero adeguato di misurazioni replicate del bianco, in modo da stimare la distribuzione del segnale ad esso relativo (per ipotesi affetto da rumore Gaussiano). E' quindi possibile

individuare il minimo segnale significativo (S_s) e in base a questo decidere la presenza/assenza dell'analita.

Se indichiamo con μ_B il valore del segnale del fondo e con σ_B la deviazione standard, il minimo segnale significativo può essere espresso come :

$$S_S = \mu_B + 3 \sigma_B$$

Da cui si ha che:

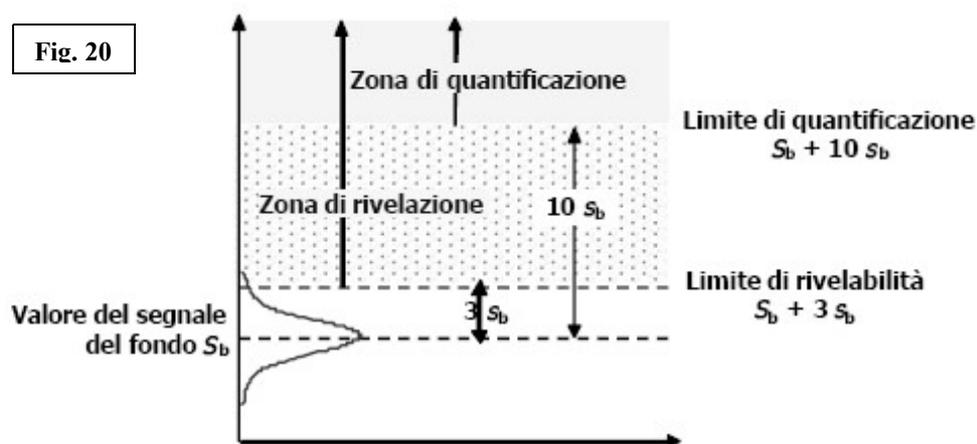
$$LOD = 3 \sigma_B$$

Il LOQ è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere calcolata con una precisione e una accuratezza prestabilita. Un'analisi può essere effettuata solo se il segnale è 10 volte maggiore della deviazione standard del bianco:

$$LOQ = 10 \sigma_B$$

La deviazione standard (σ) della risposta di cinque campioni bianchi viene quindi utilizzata per la determinazione del LOQ (10σ) e del LOD (3σ) (Fig. 12).

In definitiva quando un segnale è maggiore del limite di rilevabilità (LOD) possiamo dire che l'analita è presente nel campione, ma per stabilire il limite oltre il quale è legittimo eseguire misure quantitative è necessario definire il limite di quantificazione (LOQ).



La nostra metodica analitica ha mostrato una buona linearità anche nel range 1-200 ng/ml ($y = 1.21 + 1.40x$). In termini di sensibilità, nelle condizioni descritte e con un volume di campione (soluzione acquosa) di 200 μ l : il limite di

identificazione (LOD) è di 1.6 ng/ml e il limite di quantificazione (LOQ) è di 4.8 ng/ml e l'errore standard 0.74.

Precisione e accuratezza

La precisione è la misura dell'errore casuale e viene definito come l'accordo tra le misure ripetute di uno stesso campione. Si esprime come coefficiente di variazione percentuale (CV%) o deviazione standard relativa (R.D.S.) delle misure ripetute. La precisione determinata per ogni concentrazione non dovrebbe eccedere il 15% del CV eccetto per il LOQ, dove non deve superare il 20%.

L'accuratezza è la misura dell'errore sistematico o BIAS e definisce l'accordo tra un valore misurato ed un valore vero. I valori medi dell'accuratezza non dovrebbero eccedere il 15% del valore atteso eccetto nel caso del LOQ in cui si può avere una deviazione più o meno del 20%.

Un dato per valutare l'accuratezza del metodo analitico è il recupero; esso viene calcolato dal confronto dei risultati ottenuti da campioni di controllo ai quali sono stati aggiunti sia l'analita in questione che lo standard interno prima della manipolazione del campione ed i campioni di controllo ai quali viene aggiunto inizialmente solo lo standard interno mentre il prodotto viene aggiunto al termine della manipolazione. Il recupero dell'analita può non essere del 100%, ma dovrebbe essere consistente, preciso e riproducibile. Il recupero viene calcolato comparando i risultati ottenuto dall'estrazione di tre concentrazioni (bassa, media e alta).

Applicazione del metodo analitico su matrici biologiche

Il metodo così messo a punto, è stato applicato a campioni reali di diverse matrici biologiche. In particolare matrici biologiche cosiddette "alternative", come quella cheratinica ed il traspirato o sudore.

Le analisi tossicologiche si avvalgono di diverse matrici biologiche che da sole, o in abbinamento tra loro, consentono di esprimere una diagnostica appropriata alle diverse finalità per le quali è richiesta. Va subito precisato che il sangue (considerato un "tessuto" più che un fluido) rappresenta ancora oggi la matrice di elezione per rilevare l'attualità d'uso.

Ciascuna matrice biologica presenta vantaggi e limiti, la sua idoneità risponde a criteri di finalizzazione dell'indagine, alle caratteristiche di farmacocinetica delle sostanze, alle metodologie analitiche da adoperare, alla praticabilità del prelievo nel contesto operativo del momento. Nella Tabella 8 vengono sintetizzate peculiarità e limiti delle matrici biologiche più utilizzate al di fuori del sangue.

Tab. 6 Caratteristiche delle principali matrici biologiche utilizzate oltre al sangue.

Caratteristiche	urine	saliva	sudore	capelli
• Finestra rilevazione	2-3 giorni	poche ore	1 settimana	mesi/anni
• Tecnica analitica pr.	immunochem. + GC/MS	GC/MS + immun	GC/MS	GC/MS
• Durata analisi	+ o +++	+++	+++	++++
• Costo	+ o +++	+++	+++	++++
• Tipo di misura	incremento	incremento	cumulativo	cumulativo
• Adulterazione	possibile	difficile	difficile	+ difficile
• Conservazione	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C	T. amb.
• Prelievo	invasivo	non-invasivo	non-invasivo	non-invasivo
• Analiti principali	metaboliti	sost. madre	sost. madre	sost. madre
• Conc.nella matrice	elevata	bassa	bassa	bassa

Per una corretta interpretazione dell'analisi delle sostanze nei liquidi biologici, prescindendo dalle condizioni individuali, bisogna comunque tener conto dei numerosi fattori che influenzano il risultato. Tra questi: la quantità e lo schema metabolico della sostanza assunta; la frequenza dell'uso; il tempo intercorso tra il prelievo e l'ultima assunzione; la sensibilità della metodica e la scelta del cut-off; il tipo di matrice biologica esaminata, la concomitante assunzione di più sostanze, la presenza di sostanze o condizioni interferenti.

Un risultato positivo implica solamente che il soggetto ha assunto la sostanza, ma non fornisce altre informazioni sulla dose, sul momento di assunzione, sulle modalità di uso o abuso.

La possibilità di ottenere più facilmente un campione di urine, in consistente quantità, rende questa matrice ampiamente utilizzata nello screening per ogni finalità. In ambito clinico, la analisi tossicologica in urine riguarda

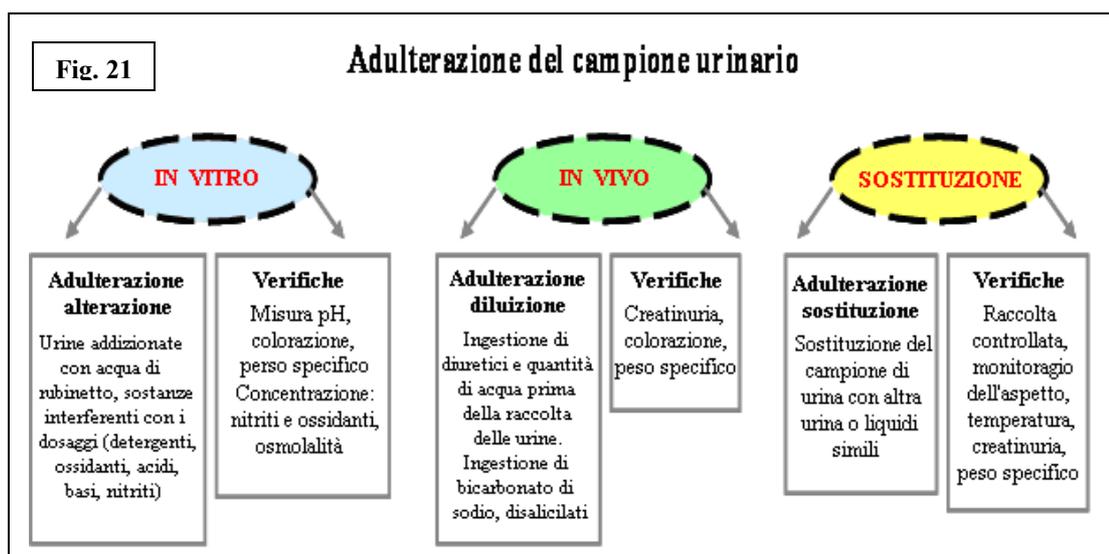
l'identificazione della sostanza, prevalentemente dei metaboliti, più che la quantificazione la quale risente di notevole variabilità inter- ed intra-individuale.

A livello di screening, infatti, il valore quantitativo di per sé non è significativo al fine di determinare l'epoca di assunzione, la dose assunta, il grado di dipendenza e di performance del soggetto, l'intensità della cura necessaria, il rispetto del contratto terapeutico durante il trattamento.

L'interpretazione di un test urinario deve tener conto di vari fattori, non ultimi i tempi di rilevabilità della sostanza e dei suoi metaboliti. I metaboliti della cocaina vengono eliminati con diversa rapidità nelle urine, ma sono tutti generalmente escreti entro due giorni dall'ultima assunzione. Dopo tale periodo, non si rilevano tracce urinarie. La finestra di rilevabilità varia anche in funzione della via di assunzione della cocaina, dall'abitudine assuntiva (la quantità di metaboliti escreti aumenta anche del 50% nella condizione di assunzione cronica), dalle caratteristiche dei metodi utilizzati per lo screening e la conferma (in particolare dei loro cut-off), dall'associazione con altre sostanze, dalle caratteristiche del campione esaminato (la quota escreta di sostanza e metaboliti è pH dipendente, ad eccezione della benzoilecgonina che è una molecola anfotera). Una dose di 20 mg di cocaina per via endovenosa può essere rilevata al massimo fino ad 1,5 giorni. Dosi di strada, assunte per altra via, sono rilevabili sino ad 1 settimana; dosi molto elevate sino a 3 settimane [13,14] La concentrazione di cocaina e metaboliti varia in termini quantitativi, e talvolta qualitativi, a seconda della via di assunzione per differenze nell'assorbimento, nel metabolismo e nell'escrezione. Tali differenze si possono riflettere nei risultati dell'analisi urinaria. Dopo la somministrazione di singole dosi bioequivalenti di cocaina per via endovenosa, intranasale e per fumo, la cocaina si presenta con il suo picco nel primo campione raccolto entro 1 ora e scompare (al di sotto del limite di rilevazione pari a 1 ng/mL) entro 24 ore. La benzoilecgonina risulta il metabolita a più elevata concentrazione e rappresenta il 39%, 30% e 16% della dose assunta rispettivamente con le tre diverse modalità per le quali la somma di ecgonina metil estere e di 6 metaboliti minori corrisponde, rispettivamente, al 18%, 15% ed 8%. La anidroecgonina metil estere è presente in tracce, 0.02%, nelle urine a seguito di assunzione per fumo [15].

Un aspetto tecnico importante della diagnostica di laboratorio è rappresentato dall'individuazione e gestione dei falsi negativi. La delicatezza della questione è facilmente intuibile se consideriamo lo sviluppo del drug testing in urine per finalità sempre più ampie (doping compreso) ed il parallelo fiorire di un mercato di adulteranti, prodotti di sostituzione per “alterare” il campione urinario, indirettamente “sabotare” la fase analitica e produrre un risultato negativo. Si comprende, di conseguenza, come l'individuazione in fase preanalitica di campioni alterati o contraffatti rappresenti un aspetto essenziale per l'attendibilità/ utilità della diagnosi di laboratorio. Questo punto è importante perché implica una serie di considerazioni sulle modalità e condizioni di prelievo del campione e sulla definizione di parametri obiettivi, quali temperatura, pH, peso specifico, che possano escludere una sofisticazione o sostituzione delle urine. Esistono diverse sostanze che aggiunte al campione possono renderlo negativo, soprattutto a un'analisi con metodi immunochimici: cloruro, bicarbonato, ipoclorito di sodio, succo di limone, detergenti liquidi, acqua ossigenata. Per la facilità con cui tali “manomissioni” possono essere operate, non è superfluo sottolineare la necessità di un'adeguata catena di custodia che inizi già dal momento del prelievo.

La Figura 21 riporta le principali condizioni che alterano il campione urinario e le più diffuse verifiche per individuare un campione non idoneo.



Nella Tabella 7 sono indicate le più diffuse modalità di contraffazione del campione, le possibili verifiche da effettuare per la sua individuazione ed i livelli decisionali di alcuni parametri secondo le indicazioni SAMHSA [16].

Tab. 7 Secondo le indicazioni SAMHSA, un campione di urina è da considerare:

- diluito se	creatinina	< 20 mg/dL
	peso specifico	< 1.003
- sostituito se	creatinina	< 5 mg/dL
	peso specifico	< 1.001 o > 1.020
- adulterato se	pH	< 3 o > 11
	conc. Nitriti	> 500 µg/mL

Allo scopo di individuare adulterazioni nei campioni da analizzare, ci sono pratiche dettate dal buon senso (come la concentrazione per evaporazione naturale dei campioni sospetti), suggerite da linee guida (come la determinazione della creatinina urinaria), promosse da associazioni scientifiche e organismi internazionali [16,17].

L'adulterazione delle urine può essere ottenuta anche con l'aggiunta di sostanze biologicamente attive come le proteasi. Si tratta di enzimi che agiscono su amminoacidi o gruppi funzionali o su proprietà fisiche. Un esempio è la papaina, ottenuta dal lattice della papaia, che può idrolizzare esteri e ammidi. Il suo potenziale d'uso, come adulterante, è elevato in funzione della sua stabilità anche a temperatura ambiente, perché non produce anomalie nell'aspetto del campione, è poco costosa, di facile reperibilità. Tuttavia, uno studio accurato [18] rileva che la papaina ha forti effetti distorcenti su THC e benzodiazepine, ma non sulla cocaina.

La tecnologia è andata sviluppando sistemi sempre più accurati per l'identificazione delle sostanze d'abuso e, conseguentemente, dei loro assuntori. L'analisi nelle urine continua ad essere la più diffusamente utilizzata, ma

l'impiego di matrici alternative offre alcuni vantaggi e, nel tempo, ha consentito lo sviluppo di procedure a buon livello di performance e standardizzazione.

I limiti delle matrici alternative sono progressivamente ridotti dalla ricerca analitica e dalla tecnologia, il consenso su aspetti particolarmente delicati quali i cut-off, la costruzione e l'interpretazione dei risultati è in fase di consolidamento nella comunità scientifica internazionale e negli Organismi regolatori. Si propongono linee guida che procedono parallelamente a quelle per il drug testing nelle urine. Tra i problemi tecnici per una maggiore diffusione di queste matrici (utili a coprire diverse finestre temporali di rilevazione): necessità di appositi materiali per il controllo di qualità; standardizzazione delle procedure anche al fine di escludere contaminazioni passive; cut-off idonei e condivisi (Fig. 22); conoscenze scientifiche esistenti sulla disposizione delle sostanze e le cinetiche nelle matrici alternative; nuove tecniche analitiche per lo screening e le conferme; biomarkers per la normalizzazione dei risultati del test (come la creatinina per le analisi in urine); maggiori conoscenze sulla relazione tra concentrazioni e tempodose-frequenza dell'assunzione; interpretazione dei risultati discordanti rispetto alle analisi in urine.

Al momento, in campo clinico, il capello, e il sudore risultano maggiormente considerati soprattutto in relazione ai trattamenti. Dispositivi di ultima generazione per la rilevazione on-site di sostanze nel sudore iniziano ad essere adoperati anche come pre-screening in ambito di urgenza e di trattamento. In quest'ultimo contesto, ad es., un test settimanale per la cocaina attraverso cerotto per il sudore, rileva l'uso di cocaina più del monitoraggio trisettimanale delle urine. Alla stessa stregua, l'analisi del capello sembra più efficace delle urine nel rilevare l'uso di cocaina, ma soprattutto nell'identificare soggetti con problemi seri di abuso [19].

Proposed initial screening and confirmatory cutoffs for alternative specimens

Drug/analyte (ng/mL)	Hair (pg/mg)		Oral fluid (ng/mL)		Sweat patch (ng/patch)		Urine (ng/mL)	
	Screen	Confirm	Screen	Confirm	Screen	Confirm	Screen	Confirm
Marijuana metabolites	1						50	
Marijuana (parent)			4		4			
THC (parent drug)				2		1		
THCA (metabolite)		0.05						15
Cocaine								
Cocaine metabolites	500		20		25		150	
Cocaine		500 ^a		8 ^b		25 ^b		
Benzoylcegonine		50		8		25		100
Cocaehtylene		50						
Norcocaine		50						
Opiate metabolites ^c	200		40		25		2000	
Morphine		200		40		25		2000
Codeine		200		40		25		2000
6-Acetylmorphine		200 ^d		4		25		10
Phencyclidine	300		10		20		25	
Phencyclidine		300		10		20		25
Amphetamines ^e	500		50		25		500	
MDMA	500		50		25		500	
Amphetamine		300		50		25		250
Methamphetamine		300 ^f		50 ^g		25 ^g		250 ^h
MDMA (ecstasy)		300		50		25		250
MDA		300		50		25		250
MDEA		300		50		25		250

^a Laboratories are permitted to initial test all specimens for 6-acetylmorphine (6-AM) using the appropriate cutoff for each matrix.

^b Methamphetamine is the target analyte.

^c BZE/cocaine ratio ≥ 0.05 or cocaethylene ≥ 50 pg/mL or norcocaine ≥ 50 pg/mL.

^d Specimen must also contain morphine at a concentration ≥ 200 pg/mg.

^e Must contain amphetamine ≥ 50 pg/mg.

^f A confirmatory test must be performed for either cocaine or BZE.

^g Must contain amphetamine \geq LOD.

^h Must contain amphetamine ≥ 100 ng/mL.

Fig. 22 Fonte: Bush, 2007 [20]

Il metodo analitico messo a punto e validato in matrice acquosa, ha mostrato la sua applicabilità anche nelle suddette matrici biologiche non convenzionali. Passiamo ora ad analizzare le matrici biologiche alle quali abbiamo applicato il nostro metodo analitico, e come abbiamo proceduto per ognuna di esse.

Analisi della matrice cheratinica per l'individuazione di abuso di cocaina

I capelli differiscono dalle altre matrici biologiche utilizzate per le analisi tossicologiche poiché essi presentano una finestra di rilevabilità delle sostanze (da mesi ad anni) che permette una investigazione retrospettiva delle assunzioni e delle dipendenze. Nel corso del tempo l'analisi dei capelli ha assunto un ruolo sempre più importante all'interno delle tecnologie e metodi per l'identificazione delle sostanze inorganiche prima e organiche poi.

Il nostro metodo è stato testato su questa matrice per verificare la sua applicabilità per diversi ambiti di ricerca.

Condizioni operative e parametri analitici e strumentali

Abbiamo proceduto ponendo 10 mg di capelli lavati addizionati di 5 µl di Standard Interno (Cocaina D3 5 µg/ml), in una vial di vetro a chiusura meccanica per spazio di testa da 20 ml contenente 200 µl di HCL 1M, chiudendo ermeticamente e riscaldando per 60 minuti a 60°C in termostato. Dopo il raffreddamento, abbiamo separato l'estratto e lo abbiamo trasferito in una vial in vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 200 mg di carbonato di potassio (K₂CO₃). Nello spazio di testa della vial abbiamo esposto la fibra per l'adsorbimento a 90°C per 5 minuti in blocco riscaldante dopo di che si è trasferita, mediante l'holder, nell'iniettore del Gas Cromatografo.

I metodi strumentali utilizzati nell'analisi del capello sono adatti ad una identificazione ed ad una quantificazione certe. Il metodo più utilizzato per l'analisi del capello è la Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS). I vantaggi di questa tecnica sono l'alta risoluzione e l'elevata specificità, infatti le sostanze vengono separate dalla loro diversa volatilità e affinità per la colonna e, grazie al rivelatore, generano uno spettro che le identifica univocamente. In pratica dopo aver ottenuto l'estratto dai capelli, la nostra analisi applicata alla matrice cheratinica è proseguita come l'equivalente analisi su soluzione acquosa. Gli spetti di massa ottenuti in *scan* mettono in evidenza la presenza di altre sostanze tipicamente incorporate nei capelli, che vengono anche esse estratte con la soluzione di HCl. Tali sostanze peraltro non interferiscono

nell'analisi. In Figura 23 è mostrato lo spettro di massa di una delle nostre analisi sulla matrice cheratinica

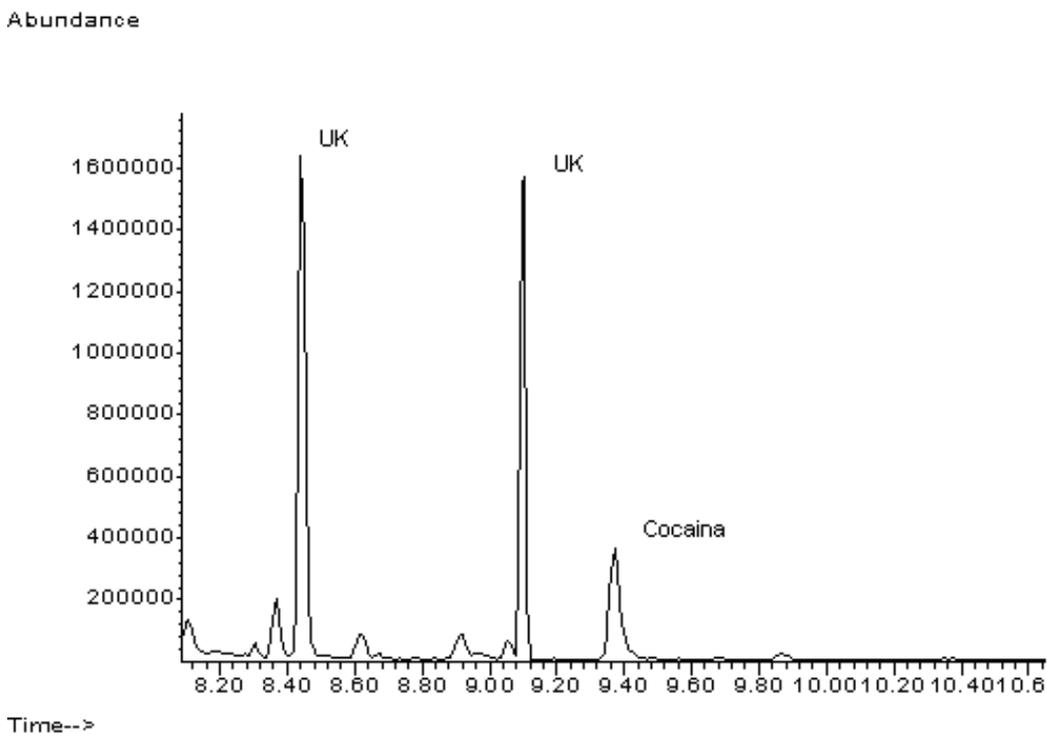
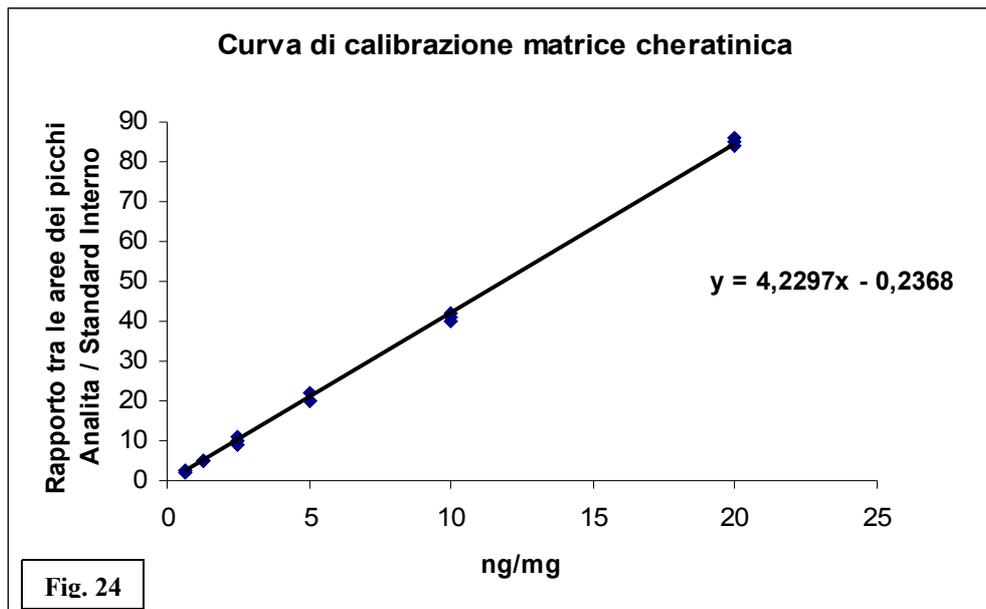


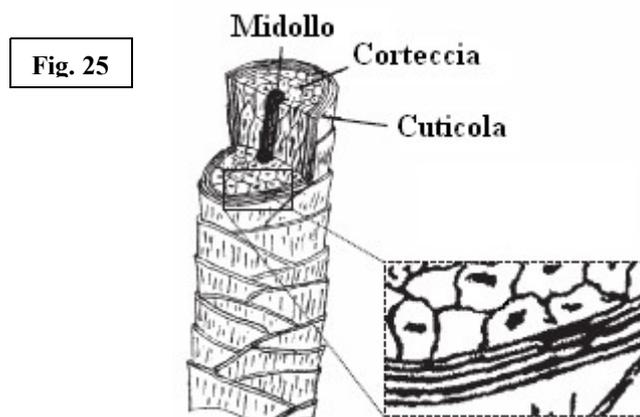
Fig. 23 Spettro di massa della cocaina in matrice cheratinica

Nell'analisi dei campioni su matrice cheratinica che abbiamo effettuato per giungere alla messa a punto della metodica, abbiamo effettuato 3 replicati per ogni valore di concentrazione (0.65 ng/mg, 1.25 ng/mg, 2.50 ng/mg, 5.00 ng/mg, 10.00 ng/mg, 20.0 ng/mg). Da tali dati abbiamo ottenuto la curva di calibrazione rappresentata in Figura 24.



La linearità che ne è risultata è: per la matrice cheratinica ($y = - 0.24 + 4.23x$) con LOD 0.27 ng/mg e LOQ 0.81 ng/mg e l'errore standard 0.38.

Il capello è una fibra non omogenea, che consta di strati di cellule cheratinizzate che nell'insieme costituiscono 3 strutture concentriche: la cuticola, la corteccia e il midollo (Fig. 25).

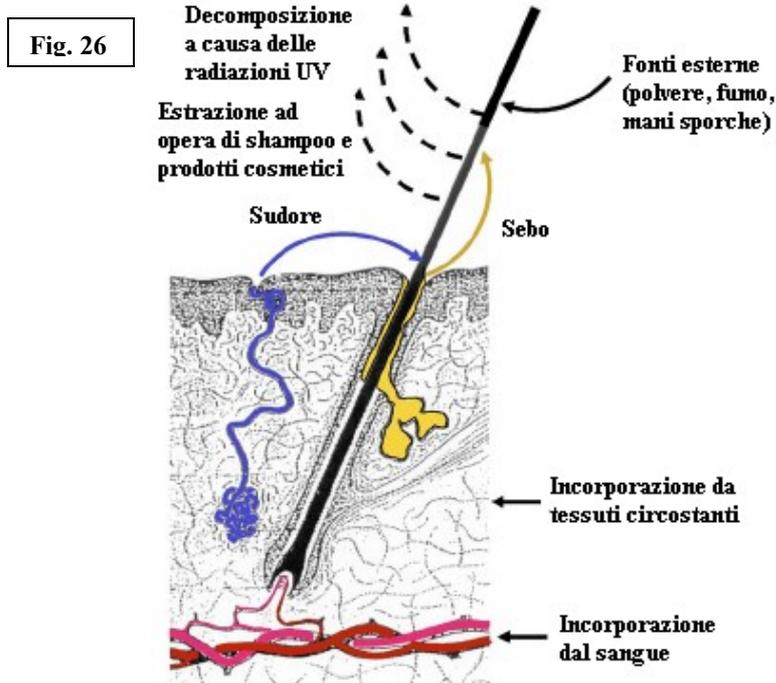


I capelli si originano dal follicolo situato 3-5 mm sotto la superficie della pelle, tale follicolo è irrorato da un ricco sistema di vasi capillari che provvedono alla crescita del capello apportando i metaboliti necessari. Il centro germinativo

intorno al bulbo pilifero è formato da cellule della matrice (cheratinociti e melanociti) presenti alla base della membrana. Questa associazione dà origine ai differenti strati del fusto del capello. Ogni capello ha inoltre collegata una ghiandola sebacea con il dotto posto nella parte superiore della radice per assicurare che il capello in maturazione sia bagnato dal sebo per 2 o 3 giorni prima di raggiungere la superficie della pelle. Le ghiandole sudoripare eccrine sono vicine ma separate dalla radice del capello, esse bagnano il fusto del capello e possono contribuire all'incorporazione di molecole idrofiliche. A differenza delle ghiandole sebacee, esse emergono direttamente sulla superficie della pelle. La crescita del capello è ciclica, composta da fasi anagen (crescita attiva), catagen (transizione) e telogen (stasi). La lunghezza individuale dei capelli dipende dalla durata della fasi e dall'entità di crescita che è mediamente di 1-1.5 cm al mese.

Incorporazione ed eliminazione delle droghe nei capelli

Il meccanismo di incorporazione delle sostanze xenobiotiche nel capello non è ancora conosciuto nei dettagli, ma sono sufficientemente noti i fattori legati alle caratteristiche del capello che incidono sulla relazione dose-concentrazione rilevabile. Tra questi fattori, ad esempio, il colore, la razza, trattamenti cosmetici, colorazioni, spessore del fusto. I modelli di incorporazione assumono che le sostanze passino nei capelli tramite diffusione passiva dai capillari sanguigni alle cellule germinative e finiscano nella zona di cheratinizzazione del follicolo pilifero. Il più importante meccanismo alternativo proposto è la diffusione dalle secrezioni di sudore e sebo sul capello già in fase di crescita. In realtà un meccanismo non esclude l'altro, quindi probabilmente sono compartecipi nel processo di incorporazione (Fig. 26).



Dal punto di vista strutturale sono 3 i fattori che influenzano l'incorporazione delle droghe: il contenuto di melanina dei capelli, la lipofilicità e la basicità delle sostanze. In linea generale, l'incorporazione delle droghe nei capelli dal sangue è regolata dai principi farmacologici della distribuzione. Le molecole lipofile organiche possono facilmente penetrare le membrane e diffondere in base al gradiente, le molecole idrofile e gli ioni sono invece bloccati dalle membrane.

Per quanto detto è evidente che la ionizzazione delle molecole è un fattore discriminante per l'assorbimento delle stesse, e, in tal senso, il pKa delle molecole e il pH della matrice cellulare sono fondamentali.

La ritenzione e la stabilità delle droghe nei capelli è da considerarsi buona, ciò è dimostrabile analizzando segmenti di capelli presi a distanze scalari dalla radice: anche sui segmenti più lontani, la percentuale di sostanze rilevate è simile quantitativamente ai segmenti più "giovani", o aumenta la concentrazione dei prodotti del metabolismo a spese di quella della molecola originaria. Fattori che possono invece inficiare le analisi a distanza di tempo sono i trattamenti cosmetici che danneggino la cuticola del capello o l'esposizione prolungata ai raggi UV.

Applicazione del metodo all'analisi sui capelli

Le concentrazioni delle sostanze e loro metaboliti nei capelli sono di gran lunga inferiori a quelle rilevabili nelle urine; di conseguenza, l'analisi richiede una sensibilità dell'ordine dei nano-e picogrammi, una specificità per le sostanze lipofile e l'assenza di effetti matrice. L'analisi delle droghe nei capelli è utilizzata in particolar modo in tossicologia forense. Proprio per questo motivo l'analista deve essere certo del risultato della sua analisi e che l'intero processo, dal campionamento all'analisi, deve essere ben organizzato per evitare ogni potenziale errore.

Dopo aver effettuato il prelievo del campione, si provvede alla segmentazione dei capelli in dimensioni adatte all'analisi, in genere non più di 2 o 3 cm. Dopo questa operazione si procede alla decontaminazione da agenti esterni mediante solventi che non danneggino la struttura dei capelli e non estraggano le droghe da essi. Nel nostro caso abbiamo effettuato un lavaggio per 5 minuti con acqua deionizzata e successivamente per 5 minuti con acetone in bagno ad ultrasuoni. I campioni lavati sono stati poi asciugati sotto flusso di azoto a temperatura ambiente.

Separazione delle droghe dai capelli

Attualmente non vi sono metodi diretti per l'individuazione di sostanze organiche nella matrice, per questo motivo bisogna procedere all'estrazione mediante solubilizzazione o digestione dei capelli stessi. I metodi più utilizzati per questo tipo di operazione sono riassunti nella Tabella 8.

- *Estrazione con metanolo*: compatibile praticamente con tutte le droghe, si effettua in bagno ad ultrasuoni. Il metanolo, idrofilo, penetra la matrice del capello e permette la liberazione delle droghe per diffusione; inoltre, essendo un solvente organico, scioglie i composti neutri e lipofili. Lo svantaggio di questo tipo di estrazione è che essa è spesso incompleta o comunque minore rispetto ad altri tipi di estrazioni.

- *Estrazione con soluzioni acquose acide o tamponate*: soluzioni di HCl (da 0.1M a 1.0M) o di tampone fosfato (pH 6.4 o 7.6) sono utilizzate per estrarre le droghe basiche (oppioidi, cocaina e metaboliti, amfetamina, ecc.). Questa tecnica permette un recupero maggiore rispetto al metanolo ma può causare una parziale idrolisi delle droghe.

- *Digestione con NaOH*: per le droghe che sono stabili in ambiente alcalino è conveniente l'estrazione con una soluzione di NaOH 1.0M ad 80°C per un'ora. Tale estrazione ben si concilia con l'automazione con microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME) per le sostanze semivolatili.

Tipo di Digestione	Vantaggi	Svantaggi
Enzimatica		<ul style="list-style-type: none"> ● Controllo delle temperatura pH e attività enzimatica ● ripetibilità non ottimale ● estrazione successiva del campione
Basica (NaOH 1.0 M)	<ul style="list-style-type: none"> ● Completa dissoluzione della matrice ● adatta per cannabinoidi, benzodiazepine e nicotina 	<ul style="list-style-type: none"> ● Idrolisi di Eroina, 6-mam e cocaina ● estrazione successiva del campione
Acida (HCl 0.1 M)		<ul style="list-style-type: none"> ● non completa dissoluzione della matrice ● non adatta per la ricerca degli oppiacei ● estrazione successiva del campione
Alcol Metilico	<ul style="list-style-type: none"> ● assenza di processi di idrolisi ● applicabile con metodi d'analisi sensibili e specifici ● no estrazione successiva del campione 	<ul style="list-style-type: none"> ● non completa dissoluzione della matrice ● potere estrattivo basso

Tab.8 Metodi di estrazione degli analiti dalla matrice cheratinica

L'unica metodica esente da fenomeni di idrolisi è quella in alcol metilico, ma attualmente non è più in uso dato lo scarso potere estrattivo.

Attualmente la metodica estrattiva di elezione è quella in ambiente acido in quanto non determina la completa distruzione dei biomarcatori, tale metodica è stata utilizzata anche da noi nello svolgimento delle analisi.

Interpretazione dei risultati analitici

Dopo l'analisi viene la fase di interpretazione dei risultati ottenuti per comprendere il tipo di abuso (occasionale o cronico), il periodo e il tipo di droghe.

Questa fase richiede un esame critico ed esperto circa la variabilità della crescita dei capelli, la farmacologia delle sostanze e il tipo di capello stesso.

Assunzione di droga o contaminazione esterna

Obiezioni frequenti circa i risultati dell'analisi riguardano la possibilità che l'individuo non abbia assunto sostanze stupefacenti, ma sia stato in ambienti nei quali i suoi capelli siano stati esposti passivamente al fumo o a polvere dovuti alla presenza di gente che fa uso di stupefacenti. Allo scopo di distinguere una contaminazione passiva da un consumo attivo si effettua una analisi sulle soluzioni di lavaggio ottenute durante la decontaminazione. Una prova inequivocabile dell'origine sistemica della droga è l'identificazione di metaboliti, a meno che questi non siano dovuti all'idrolisi della molecola. Ad esempio i metaboliti della cocaina: benzilecgonina, ecgoninametilistere e norcocaina, possono essere tipicamente identificate nei capelli di assuntori di cocaina, e, nel caso vi sia un concomitante uso di alcool, si trova anche cocaetilene (Fig. 27). Dei metaboliti citati però, solo la norcocaina e la cocaetilene sono esclusivamente endogeni, mentre benzilecgonina e ecgoninametilistere possono essere generati anche da idrolisi esogena.

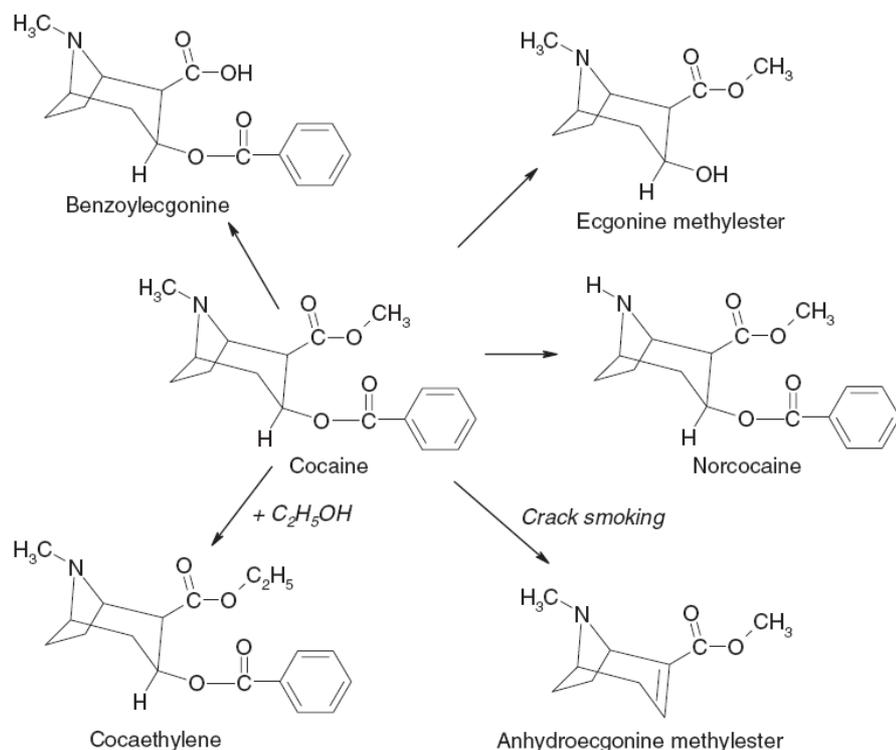


Fig. 27

Interpretazione della concentrazione nei capelli

Come detto in precedenza non vi è una diretta correlazione tra diversi individui tra la dose assunta e la frequenza di assunzione e la concentrazione nei capelli. Per questa ragione si utilizzano dei valori medi rilevati su assuntori abituali e ci si riferisce a tali valori per valutare i risultati.

Interpretazione del periodo di assunzione

La matrice cheratinica è l'unica in grado di fornirci un'informazione aggiuntiva, rispetto alle altre, circa l'uso o l'abuso di sostanze. Infatti, per la sua particolare ciclicità di crescita, il capello ci permette di stabilire, con buona approssimazione, il periodo di utilizzo della sostanza, se esso è limitato nel tempo, o la continuità nell'assunzione. In condizioni ideali la posizione delle molecole nel campione di capelli può essere usata per calcolare la data di assunzione in base a dati riguardanti la velocità di crescita, la data di campionamento e la lunghezza del capello ancora attaccato al capo. Ovviamente vi sono diversi fattori che possono modificare tale calcolo: crescita rallentata, assorbimento nella matrice modificato, sudorazione diversa nel corso del tempo; questi sono fattori generali, vi sono poi fattori individuali quali la velocità di assorbimento, la farmacocinetica e l'utilizzo cronico o acuto della sostanza.

Peli pubici, ascellari e corporei

Rispetto ai capelli i peli di altre parti del corpo possono presentare una concentrazione maggiore di droghe, ciò è dovuto al differente ciclo vitale di questi peli che, avendo un periodo di crescita più lento, restano maggiormente esposti al sudore e al sebo nella fase di crescita; oltre a ciò, un ruolo importante è svolto dalla differente pigmentazione, dalla minore esposizione alla luce, agli agenti atmosferici e ai trattamenti cosmetici.

Applicazioni pratiche

Le droghe interferiscono pesantemente con le attività fisiche e/o psichiche dell'individuo. Questi effetti hanno conseguenze serie su numerose attività comuni, dalla sicurezza sul posto di lavoro all'abilità alla guida.

Tra le applicazioni del test sul capello, la rilevazione della esposizione a droghe in utero, l'esposizione passiva dei bambini in casa di consumatori, nel campo giudiziario, sul luogo di lavoro, per le problematiche legate alla patente, nei trattamenti di detossificazione, in campo clinico nei casi in cui la finestra di rilevazione delle urine e del sangue (da un'ora a massimo 2-3 giorni per i metaboliti) non sia sufficiente per l'inquadramento diagnostico.

In genere l'uso e l'abuso di droghe diminuisce l'abilità di guida, per questo i test antidroga fanno parte della procedura per conseguire o rinnovare la patente di guida in Germania e Italia.

Nei controlli antidoping, generalmente effettuati sulle urine, l'analisi delle sostanze stupefacenti nei capelli è stata introdotta nel 1999; questo tipo di analisi è risultata essere utile soprattutto per quelle sostanze il cui uso è espressamente vietato in determinati periodi (es. nel periodo delle gare) per verificare se determinate sostanze (es. anabolizzanti steroidei) sono invece utilizzate durante gli allenamenti.

In definitiva il test sul capello rappresenta un marker biologico affidabile per valutare l'esposizione quantitativa e temporale alle sostanze d'abuso, cosa che sangue, urina, traspirato e saliva non sono in grado di indicare. Di conseguenza, questa analisi ha una indubbia ed esclusiva utilità diagnostica [21].

La curva di calibrazione ottenuta nel nostro lavoro è stata utilizzata per analizzare dei campioni reali, prelevati anonimamente e su base volontaria da 54 giovani nell'area veneta. Tale raccolta di campioni è stata effettuata da volontari di Organizzazioni Non-Governative, coinvolti in iniziative di informazione e prevenzione dell'abuso di sostanze stupefacenti. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 9: dei 54 campioni analizzati, 36 sono risultati positivi alla cocaina, di questi 18 avevano un valore di concentrazione di sostanza superiore al LOQ, e quindi si è potuta effettuare anche una stima quantitativa. Il range dei valori quantificati va da 0.99 a 50.00 ng/mg.

Campione	Esito	ng/mg	Campione	Esito	ng/mg
1	-		28	+	< 0,81
2	+	< 0,81	29	+	9.06
3	+	< 0,81	30	+	< 0,81
4	-		31	+	< 0,81
5	+	1.25	32	+	4.08
6	-		33	+	12.05
7	+	3.12	34	-	
8	+	1.08	35	+	< 0,81
9	+	< 0,81	36	-	
10	-		37	+	0,99
11	-		38	+	< 0,81
12	-		39	+	< 0,81
13	+	< 0,81	40	+	1.36
14	-		41	-	
15	+	< 0,81	42	-	
16	+	50,00	43	+	3.03
17	+	3,00	44	-	
18	-		45	+	1,80
19	+	< 0,81	46	-	
20	+	< 0,81	47	+	2.33
21	-		48	+	< 0,81
22	+	< 0,81	49	+	12.28
23	-		50	+	3,65
24	+	1.00	51	-	
25	-		52	+	2,98
26	+	< 0,81	53	+	2,60
27	+	< 0,81	54	+	1,00

Tab. 9 Esito delle analisi su campioni reali (v. testo)

Analisi del traspirato per l'individuazione di abuso di cocaina

Tra le matrici biologiche alternative, il sudore (traspirato) comincia ad essere utilizzato, se pur con le dovute cautele, per rilevare la presenza di cocaina (come di altre sostanze d'abuso) in medicina d'urgenza, nel trattamento, sui luoghi di lavoro, in ambito militare, in ambito giudiziario e nei controlli dei conducenti per la sicurezza stradale. Il metodo di prelievo è il meno invasivo fra quelli disponibili, sono remote le possibilità di adulterare il campione, c'è un'ampia finestra di rilevabilità. L'identificazione della sostanza madre e dei metaboliti, le basse concentrazioni degli analiti, il tempo di rilevazione, le relazioni tra dose e concentrazione rappresentano aspetti importanti per valutare l'analisi della cocaina nel sudore. Altro elemento rilevante è rappresentato dal cut-off sulla scelta del quale, la comunità scientifica ha a lungo discusso per trovare un accordo.

Recentemente la Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) ha proposto un cut-off di 25 ng/cerotto per lo screening di cocaina/metabolita nel sudore e 25 ng/cerotto per la conferma di cocaina o benzoilecgonina [22].

Condizioni operative e parametri analitici e strumentali

Nell'applicazione del nostro metodo al traspirato, abbiamo concentrato la nostra attenzione a supporti assorbenti del tipo DrugWipe® (Fig. 28) sui quali, oltre ad effettuare le prove per la validazione del metodo, abbiamo effettuato delle analisi di campioni reali, come illustreremo in seguito.



Fig. 28 Dispositivo DrugWipe® per analisi di screening su traspirato

Separazione delle droghe dal traspirato e analisi

Per la raccolta del campione biologico, vengono utilizzati i dispositivi di campionamento visti in precedenza, essi sono costituiti da una parte plastica che supporta fisicamente 2 cartoncini assorbenti (*pad*). Tali *pad* sono la parte che realmente assorbe il campione e perciò sono stati l'oggetto della nostra analisi.

Nel caso dell'analisi sul sudore, non sono necessari particolari pretrattamenti, come ad esempio quelli effettuati sui capelli per estrarre gli analiti di interesse, questo perché l'estrazione avviene contestualmente all'adsorbimento sulla fibra. Dopo aver rimosso i *pad* dai relativi supporti li abbiamo posti in una provetta di vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 200 mg di carbonato di potassio (K_2CO_3), 5 μ l di Standard Interno (Cocaina D3 5 μ g/ml). Dopo aver chiuso ermeticamente la provetta, si è proceduto ad esporre la fibra per l'adsorbimento a 90°C per 5 minuti in blocco riscaldante, dopo di che l'abbiamo trasferita, mediante l'holder, nell'iniettore del Gas Cromatografo (Fig. 29).

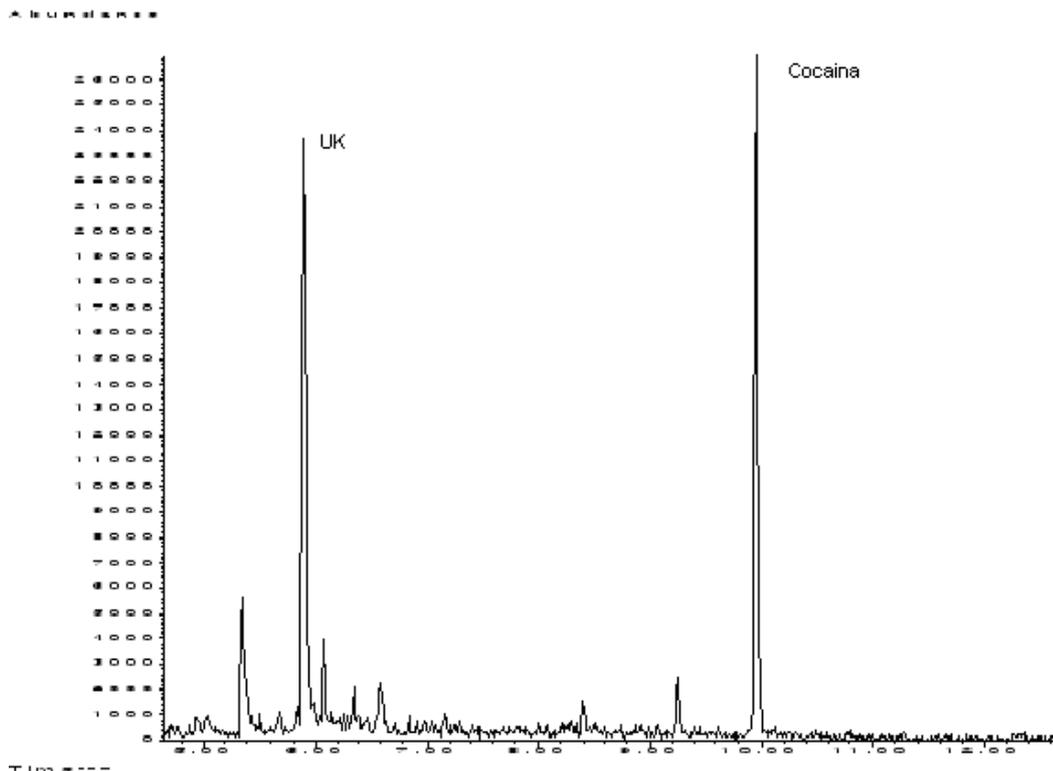
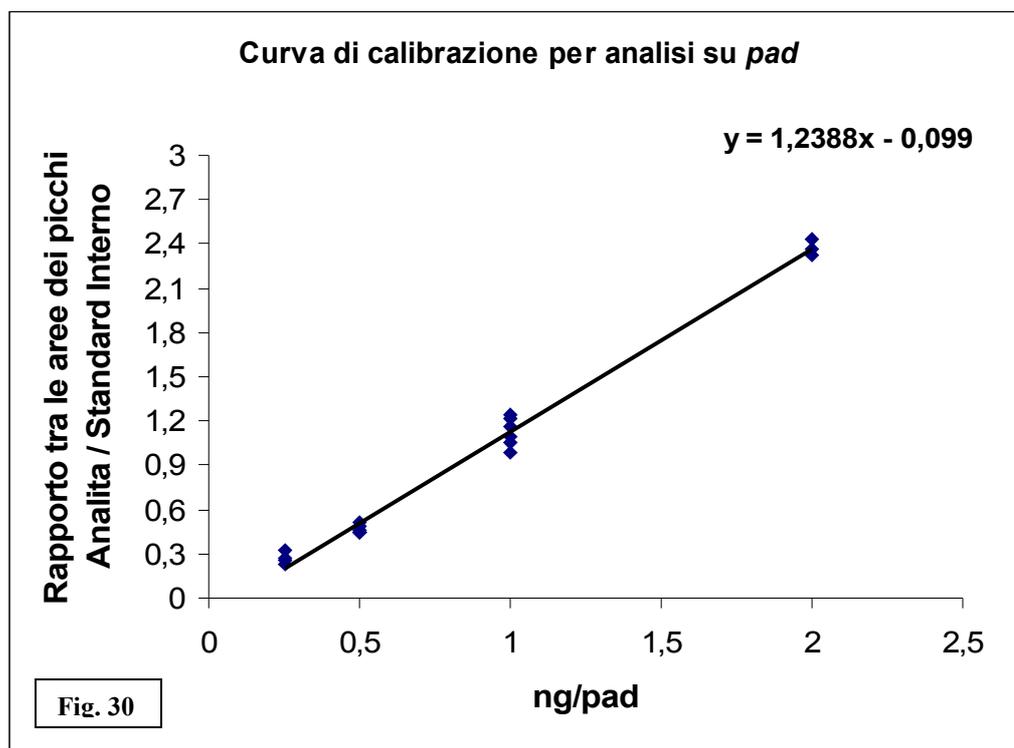


Fig. 29 Cromatogramma per la cocaina nel traspirato

Rilevamento e quantificazione

Nell'analisi dei campioni su traspirato, che abbiamo effettuato per giungere alla messa a punto della metodica, abbiamo effettuato 3 replicati per valori di concentrazione 0.25 ng/pad e 2.00 ng/pad e 5 replicati per valori di 0.50 ng/pad e 1.00 ng/pad. Da tali dati abbiamo ottenuto la curva di calibrazione rappresentata in Figura 30 la cui linearità è $y = - 0.10 + 1.24x$ con LOD 0.31 ng/pad e LOQ 0.93 ng/pad e l'errore standard 0.13.



Applicazioni pratiche

La curva di calibrazione ottenuta dal nostro lavoro è stata utilizzata per analizzare dei campioni reali di sudore ottenuti anonimamente da 43 analisi di screening effettuate con supporti assorbenti del tipo DrugWipe® su automobilisti dell'area lombarda. Il prelievo del campione è stato effettuato da personale delle forze di Polizia.

Abbiamo così anche provveduto a verificare quanto tali strumenti “on-site” e rapidi, basati su metodi immunochimici siano affidabili (in termini di falsi-

positivi). Dei 43 campioni risultati positivi al DrugWipe® ben 42 sono stati verificati dalle analisi gascromatografiche, e in 23 casi, la quantità di cocaina rilevata superava il LOQ. (Tab. 10)

DRUGWIPE				HS-SPME GC/MS				DRUGWIPE				HS-SPME GC/MS			
Campione	Esito	Esito	ng / pad	Campione	Esito	Esito	ng / pad	Campione	Esito	Esito	ng / pad	Campione	Esito	Esito	ng / pad
1	+	+	< 1 ng	23	+	+	5 ng	23	+	+	5 ng	23	+	+	5 ng
2	+	+	< 1 ng	24	+	+	2.5 ng	24	+	+	2.5 ng	24	+	+	2.5 ng
3	+	+	< 1 ng	25	+	+	3 ng	25	+	+	3 ng	25	+	+	3 ng
4	+	+	< 1 ng	26	+	+	2,7 ng	26	+	+	2,7 ng	26	+	+	2,7 ng
5	+	+	< 1 ng	27	+	+	4 ng	27	+	+	4 ng	27	+	+	4 ng
6	+	+	25 ng	28	+	+	3 ng	28	+	+	3 ng	28	+	+	3 ng
7	+	+	10 ng	29	+	+	286 ng	29	+	+	286 ng	29	+	+	286 ng
8	+	+	7 ng	30	+	+	128 ng	30	+	+	128 ng	30	+	+	128 ng
9	+	+	< 1 ng	31	+	+	< 1 ng	31	+	+	< 1 ng	31	+	+	< 1 ng
10	+	+	534 ng	32	+	+	< 1 ng	32	+	+	< 1 ng	32	+	+	< 1 ng
11	+	+	3.7 ng	33	+	+	38 ng	33	+	+	38 ng	33	+	+	38 ng
12	+	NEGATIVO		34	+	+	< 1 ng	34	+	+	< 1 ng	34	+	+	< 1 ng
13	+	+	10 ng	35	+	+	< 1 ng	35	+	+	< 1 ng	35	+	+	< 1 ng
14	+	+	600 ng	36	+	+	< 1 ng	36	+	+	< 1 ng	36	+	+	< 1 ng
15	+	+	146 ng	37	+	+	< 1 ng	37	+	+	< 1 ng	37	+	+	< 1 ng
16	+	+	15 ng	38	+	+	< 1 ng	38	+	+	< 1 ng	38	+	+	< 1 ng
17	+	+	< 1 ng	39	+	+	< 1 ng	39	+	+	< 1 ng	39	+	+	< 1 ng
18	+	+	5 ng	40	+	+	< 1 ng	40	+	+	< 1 ng	40	+	+	< 1 ng
19	+	+	< 1 ng	41	+	+	< 1 ng	41	+	+	< 1 ng	41	+	+	< 1 ng
20	+	+	67 ng	42	+	+	85 ng	42	+	+	85 ng	42	+	+	85 ng
21	+	+	4 ng	43	+	+	5.2 ng	43	+	+	5.2 ng	43	+	+	5.2 ng
22	+	+	< 1 ng												

Range 2,5 - 600 ng/pad

LOD = 0,3 ng/pad

LOQ = 1,0 ng/pad

DRUGWIPE

43

HS-SPME GC-MS

42

Tab. 10 Esito delle analisi su campioni reali (v. testo)

Incorporazione delle droghe nel sudore

I meccanismi di incorporazione delle sostanze nel sudore non sono ancora completamente chiariti. La sostanza, non ionizzata, passerebbe per diffusione passiva dai capillari alle ghiandole sudoripare. Al basso pH del sudore, le sostanze possono ionizzarsi accumulandosi nel campione, possono attraversare gli strati (derma ed epiderma) della pelle (Fig. 31) ed essere raccolte in superficie con appositi dispositivi come cerotti protetti da contaminazioni esterne attraverso una pellicola, oppure da piccole superfici assorbenti che vengono strofinati sulla pelle.

Schema della pelle e del tessuto sottocutaneo

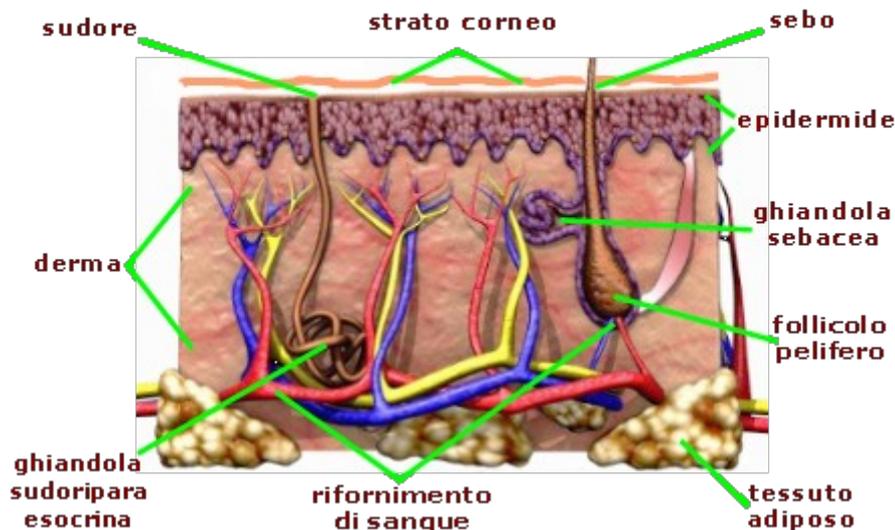


Fig. 31

Occorre però tener presenti fattori di variabilità come la diversa produzione di sudore, la possibile contaminazione ambientale, la perdita di sostanze per degradazione del dispositivo di raccolta o per riassorbimento attraverso la pelle, fattori legati all'escrezione delle sostanze e loro metaboliti nel sudore. Uno studio condotto recentemente [23], ha fatto per primo chiarezza su molti di questi aspetti. E' stata studiata la relazione tra dose somministrata e concentrazione di cocaina e

metaboliti nel sudore. E' stata utilizzata una metodica con estrazione in fase solida e gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa per l'analisi quantitativa di cocaina, benzoilegonina, ecgonina metil estere, cocaetilene, norcocaina, m-idrossicocaina, p-idrossicocaina, p- idrossibenzoilecgonina, m-idrossibenzoilecgonina.

I risultati riflettevano l'escrezione della sostanza somministrata e sono stati valutati in relazione al cut-off pari al LOQ del metodo (2,5 ng/cerotto) ed al cut-off di 25 ng/cerotto del SAMHSA.

La cocaina era l'analita primario (97%), e spesso il solo (59%) rilevato nel sudore; la ecgonina metil estere era più frequente rispetto alla benzoilecgonina e a concentrazione più elevata. Cocaina e ecgonina metil estere sono state rilevate già entro 1-2 ore; la benzoilecgonina non prima delle 4-8 ore. La maggior parte delle molecole era comunque escreta entro 24 ore dalla somministrazione.

In base ai risultati, lo studio conclude che l'analisi del sudore rappresenta un metodo efficace e attendibile per il monitoraggio dell'uso di cocaina.

Interazione farmacologica tra cocaina e altre sostanze

Il poliabuso di sostanze è molto diffuso tra i consumatori di agenti psicoattivi. I consumatori abituali di cocaina non fanno eccezione. La cocaina anzi è una tra le droghe d'abuso che maggiormente viene associata ad altre sostanze.

Una delle combinazioni più diffuse è quella con alcol. Questa particolare interazione sembra prolungare e potenziare l'effetto euforizzante della cocaina e indurre allo stesso tempo anche un'amplificazione della sensazione di benessere psicofisico. L'alcol inoltre sembra servire a ridurre il malessere psicologico, ansia, depressione, abbassamento del tono dell'umore, che si instaura con l'astinenza.

Le basi farmacologiche di questi effetti, unitamente alla tossicità di questo poliabuso, sembrano derivare dall'azione del cocaetilene, il metabolita farmacologicamente attivo che si forma nell'organismo con l'assunzione combinata di cocaina e alcol.

La cocaetilene agisce con meccanismi farmacologici analoghi a quelli della cocaina. Essa blocca il trasportatore della dopamina aumentando così le concentrazioni sinaptiche di questo neurotrasmettitore nelle vie dopaminergiche del cervello. A differenza della cocaina, la cocaetilene sembra inibire meno marcatamente la pompa di ricattura della serotonina. Le funzioni serotoninergiche controllano, inibendole, quelle dopaminergiche. Se, quindi, l'attività dei sistemi serotoninergici cala, si attenua il controllo e l'inibizione dell'attività dopaminergica. Di conseguenza, aumentando l'attività dopaminergica in misura nettamente superiore rispetto a quella serotoninergica, la cocaetilene possiede un'azione euforizzante più marcata rispetto a quella della cocaina. La maggiore durata degli effetti della cocaina in casi di assunzione combinata con alcol sembra inoltre dipendere dalla lenta eliminazione della cocaetilene dal tessuto cerebrale.

La tossicità della cocaetilene è comunque maggiore della cocaina. La cocaetilene possiede potenti effetti cardiotoxici, mentre l'accumulo e la lentezza del metabolismo della cocaetilene nel fegato sembrano avere effetti tossici sulle cellule epatiche.

Relativamente diffusa è l'assunzione di cocaina in combinazione con l'eroina. Questa combinazione è talora ricercata in quanto sembra attenuare la disforia che interviene con l'esaurimento degli effetti della cocaina o nell'astinenza. La

combinazione cocaina-eroina è tuttavia estremamente pericolosa in quanto comporta rischi fatali di blocco respiratorio e collasso cardiocircolatorio.

Anche la combinazione cocaina/amfetamine è estremamente pericolosa, dato che le due sostanze agiscono entrambe potenziando la trasmissione dopaminergica e quindi espongono a enormi rischi di overdose con crisi di ansia, panico, deliri, allucinazioni, esplosioni di aggressività.

Assai raramente nel mercato illecito gli stupefacenti vengono commercializzati allo stato puro. Di solito i campioni illeciti contengono le sostanze di abuso o la miscela di esse insieme ad altre sostanze variamente attive e uno o più diluenti inerti tra i quali zuccheri, amidi ed altro.

Le aggiunte vengono fatte sulla base di diversi criteri e con numerose finalità : aumentare i profitti, tramite l'aggiunta di sostanze inerti poco costose e facilmente reperibili, al fine di aumentare il peso complessivo della preparazione; funzione di semplici diluenti hanno sostanze normalmente presenti sul mercato farmaceutico ottenibili spesso senza ricetta medica (prodotti "da banco"). Con questo tipo di scelta si spiega la presenza pur occasionale di sostanze farmaceutiche prive di caratteristiche di abuso nelle miscele di strada; potenziare l'effetto della droga primaria, simulandone l'azione, o migliorarne l'effetto mediante aggiunta di sostanze variamente attive che rendono più gradita e/o meno dannosa (limitando gli effetti indesiderabili) l'assunzione della droga primaria in quantità anche rilevanti; ostacolare o interferire nel riconoscimento chimico della sostanza illecita da parte degli organi investigativi o di controllo.

L'impiego nel taglio di sostanze quali gli anestetici locali ha lo scopo di surrogare la cocaina con molecole dotate di analoghe proprietà anestetico-locali e quindi difficilmente distinguibili da essa a un esame organolettico. Inoltre la cocaina, da sola o con altre sostanze più o meno stupefacenti, è rilevata in compresse commercializzate come "ecstasy" con conseguente assunzione inconsapevole da parte di chi crede di assumere altra sostanza.

Infine si deve tener presente che l'associazione della cocaina a sostanze quali eroina e morfina (speed ball), che ne mitigano gli effetti eccitanti, è ricercata, soprattutto quando autosomministrata per via endovenosa.

L'aspetto fisico delle miscele di strada varia solo leggermente in relazione al tipo di sostanze presenti, in quanto generalmente queste sostanze sono polveri bianche, fini, asciutte ad occhio indistinguibili dalla cocaina stessa.

Dalla composizione delle miscele spacciate nel traffico illecito deriva una serie di conseguenze di carattere tossicologico, sanitario e legale. Infatti, oltre agli effetti tossici ascrivibili alla sostanza stupefacente in sé, va rilevata la patologia riconducibile agli effetti di adulteranti e diluenti, a processi infettivi caratteristici nei tossicodipendenti, alle lesioni locali dovute alla modalità di assunzione.

L'Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze (OEDT) riporta che recenti evidenze dimostrano la presenza, nei reperti di cocaina, di vari adulteranti insoliti rispetto al passato. Negli ultimi due anni, anche in Italia, attraverso analisi di sequestri di cocaina, è stata rilevata la presenza di antidolorifici, antistaminici come la idrossizina e antibiotici, antielmintici come il levamisole.

Il “caso” Cocaina + Atropina

Dalla fine del 2004 in Italia, come in altri paesi europei (es. Francia, Olanda, Belgio, Austria, Regno Unito), sono state riportate diverse intossicazioni serie e anomale da cocaina, in alcuni casi letali. Quasi tutti i soggetti hanno avuto bisogno di ricovero ospedaliero, per un numero limitato di essi è stata necessaria la rianimazione. La sintomatologia era in tutti i casi molto simile: allucinazioni, incontenibile eccitazione, seria alterazione della coscienza e dello stato di vigilanza, sintomi psicotici, convulsioni in alcuni soggetti, tachicardia, ipertensione, crisi respiratorie, secchezza delle fauci, difficoltà urinarie, midriasi molto marcata e persistente. Nella quasi totalità dei soggetti l'analisi tossicologica in urine e siero ha rilevato la presenza di cocaina e di atropina a concentrazioni diverse. La presenza di atropina, a concentrazioni non trascurabili, è stata anche rilevata in alcuni reperti di strada.

I casi in Italia tra il 2004 ed il 2007 sono quasi tutti stati registrati dai Centri Antiveleto della Lombardia; casi meno gravi, ma ugualmente insoliti, sono stati registrati in interventi del 118 in soggetti che avevano fatto uso di cocaina per vie di assunzione diverse.

L'Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze (OEDT) di Lisbona ha attivato la procedura di allerta rapida (Early Warning System) prevista dalla decisione del Consiglio d'Europa del 2005 sulla Joint Action allertando le autorità di tutti i paesi della UE circa l'elevato rischio, potenzialmente letale, sulla salute pubblica di tale miscela e diffondendo indicazioni per una rapida diagnosi.

Alla miscela cocaina-atropina è stato dato in Belgio il nome gergale di "cristallina" e così si è continuato a chiamarla in altri paesi. Si presume che l'atropina sia stata intenzionalmente aggiunta alla cocaina prima dello spaccio e che accidentalmente sia stata sovradosata. Sappiamo che l'atropina a dosi più elevate di quelle terapeutiche induce accelerazione del ritmo cardiaco, confusione mentale, allucinazioni, stato comatoso per deficit respiratorio.

La pericolosità dell'associazione cocaina-atropina è spiegabile nel seguente modo. La cocaina è una sostanza con azione simpaticomimetica indiretta, cioè determina il rilascio, all'interno dell'organismo, di importanti concentrazioni di adrenalina e noradrenalina, mediatori chimici del così detto sistema simpatico, quella parte del sistema nervoso autonomo responsabili delle reazioni di stress, fuga, allarme, difesa.

L'adrenalina e la noradrenalina eccitano sia l'apparato cardiovascolare (aumento della pressione arteriosa, tachicardia) sia quello nervoso centrale (eccitazione, agitazione, delirio, convulsioni). L'eccitazione neurologica e cardiologica sono la causa della importante tossicità acuta della cocaina che può portare a morte proprio con questi meccanismi cardiologici (aritmie, arresto cardiaco, infarto del miocardio) e neurologici (convulsioni, incidenti vascolari cerebrali)

L'atropina blocca gli effetti della parte del sistema nervoso autonomo chiamato parasimpatico, sistema in continuo equilibrio con quello simpatico e responsabile delle fasi di recupero delle energie conseguenti all'attività del simpatico. Quando il parasimpatico è attivo c'è depressione del cervello (sonno), attività dell'apparato digerente (digestione) e riposo cardiaco e muscolare.

Il blocco del parasimpatico da parte dell'atropina inibisce l'attività di riposo indotta dal parasimpatico e sposta l'equilibrio parasimpatico/simpatico in favore del simpatico. Per questo motivo i sintomi sono del tutto simili a quelli che si

ottengono con la stimolazione del simpatico (tachicardia, aritmie cardiache, convulsioni).

Semplificando, cocaina e atropina producono gli stessi effetti su cuore e cervello anche se con due meccanismi diversi. Le loro azioni combinate e sommate sono quindi in grado di determinare gravissimi stati di eccitazione del sistema cardiocircolatorio (tachicardie e aritmie refrattarie e maligne, ipertensione arteriosa, infarto del miocardio) e del cervello (allucinazioni, delirio, convulsioni)

La pericolosità estrema del cocktail deriva, quindi, proprio da questi effetti di sommazione e di potenziamento reciproco.

La morte può avvenire, quasi sempre, per una tachiaritmia maligna cardiaca (fibrillazione ventricolare, tachicardia ventricolare). Queste aritmie indotte da sostanze eccitanti, anche se tempestivamente trattate con mezzi adeguati (defibrillazione, cardioversione, farmaci) possono resistere alle terapie e condurre la vittima a morte.

Conclusioni

In base ai risultati ottenuti, la procedura analitica ha dimostrato un buon livello di affidabilità ma anche una ragionevole praticabilità che ne consente l'utilizzo in settori diversi di applicazione, dalla ricerca all'epidemiologia. Il metodo non necessita di derivatizzazione della cocaina e consente in un unico run di determinare, in aggiunta alla cocaina, altre sostanze oggetto di abuso quali Amfetamina (A), Metamfetamina (MA), Metilen-diossiamfetamina (MDA), Metilen-diossimetamfetamina (MDMA), Metilen-diossietamfetamina (MDE), N-metil-1-(1,3-benzodiossol-5-il)-2-butanamina (MBDB), Ketamina, Metadone, e prodotti del metabolismo come la Cocaetilene.

Nel lavoro vengono discussi problemi quali il cut-off, i tempi di permanenza e rilevabilità della cocaina e dei suoi metaboliti nelle diverse matrici e la conseguente adeguatezza dei metodi analitici di scelta.

E' stato infine trattato l'aspetto dell'applicabilità del metodo messo a punto nel monitoraggio del trattamento e in studi di farmacocinetica. Attraverso l'analisi di campioni reali, il metodo ha mostrato la sua applicabilità anche in matrici biologiche non convenzionali, quali capelli e traspirato, matrici che sempre più diffusamente sono e verranno utilizzate, non solo nell'ambito di ricerca, ma anche in ambito amministrativo e legale (lavoro e sicurezza stradale) secondo le indicazioni della Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA).

Le caratteristiche di performance del metodo, lo rendono idoneo al monitoraggio di interventi terapeutici anche sperimentali.

Ad oggi non vi è un singolo farmaco che sia stato approvato dall'FDA per il trattamento della dipendenza da cocaina. Molti studi sono in corso per valutare l'idoneità di alcuni farmaci. In appendice si riporta una sintesi della letteratura a riguardo.

Il metodo presentato verrà utilizzato nel progetto "Valutazione dell'efficacia del Baclofen nel trattamento della dipendenza da cocaina: trial clinico in doppio cieco, controllato e randomizzato" che è attualmente in corso.

Bibliografia

1. Jeffcoat AR, Perez-Reyes M, Hill JM, et al. *Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking*. Drug Metab Dispos 1989;17:153–9.
2. Avico U, Macchia T, Dell'Utri A, Mancinelli R, Gentili S, Guiducci MS, Simeoni MT *La determinazione delle droghe d'abuso*. Brescia: Class International; 1991.
3. Relazione annuale al Parlamento sullo stato delle tossicodipendenze in Italia nel 2006.
4. Macchia T, Gentili S *La diagnosi di laboratorio: Aspetti tecnici*. Dipartimento del Farmaco - Istituto Superiore di Sanità.
5. Belardi RP, Pawliszyn J *Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns*. Water Quality Research Journal of Canada. Vol. 24, no. 1. 1989.
6. Stashenko E, Martinez JR [Derivatization and solid-phase microextraction](#). Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 2004.
7. Pawliszyn J *Solid phase microextraction*. Adv Exp Med Biol. 2001;488:73-87.
8. Sporkert F, Pragst F *Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds*. Forensic Science International 107 (2000) 129–148.
9. Ouyang G, Pawliszyn J [SPME in environmental analysis](#). Anal Bioanal Chem DOI 10.1007/s00216-006-0460-z.
10. Vas G, Vékey K [Solid-phase microextraction a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis](#). J. Mass Spectrom. 2004; 39: 233–254.
11. Dietz C, Sanz J, Camara C *Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques*. Journal of Chromatography A, 1103 (2006) 183–192.
12. Pawliszyn J *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH 1997; 247 pages. ISBN 0-471-19034-9.
13. Vandevenne M, Vandenbussche H, Verstraete A *Detection time of drugs of abuse in urine*. Acta Clin. Belg. 55(6): 323-33, 2000.

14. Hamilton HE, Wallace JE, Shimek ELJr, Land P, Harris SC, Christenson JC *Cocaine and benzoylecgonine extraction in humans.* J.Forensic Sci. 22(4): 697-707, 1997.
15. Cone EJ, Tsadik A, Oyler J, Darwin WD *Cocaine Metabolism and Urinary Excretion After Different Routes of Administration.* Ther. Drug. Monit., 20 (5): 556-560, 1998.
16. SAMHSA, HHS *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs.* General Register 70 (15) January 255, 2005.
17. Borriello R, Caligara M, Chiaretti M, Ferrara SD, Gagliano-Candela R, Gigli F, Licata M, Procaccianti P *Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze d'abuso in campioni biologici.* Boll.Farmacodip. e Alcolis., XXV (1-2) 2002.
18. Burrows DL, Nicolaides A, Rice PJ, Dufforc M, Johns DA, Ferslew KE *Papain: A. Novel Urine Adulterant.* J. Anal. Toxicol.. 29: 275-295, 2005.
19. Cone EJ *Legal, Workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale.* Forensic. Sci. Interm. 121: 7-15, 2001.
20. Bush Donna M *The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: Current status and future considerations* Forensic Science International, 2007.
21. Klein J, Karaskov T, Koren G *Clinical application of hair testing for drugs of abuse – the Canadian ex perience.* Forens. Sci. Int. 107: 281-288, 2000.
22. US Department of Health and Human Services *Proposed revision to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs.* Fed. Regist. 69: 19673-732, 2004.
23. Kacinko SL, Barnes AJ, Schwilke EW, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA *Disposition of Cocaine and its Metabolites in Human Sweat after Controlled Cocaina Administration.* Clinical Chemistry 51(11): 2085-2094, 2005.

APPENDICE

DIPENDENZA DA COCAINA E TRATTAMENTI

La conoscenza dei meccanismi d'azione della cocaina è la premessa fondamentale sia per lo sviluppo di trattamenti farmacologici ma anche per la messa a punto di strategie preventive.

Nell'approcciarci al discorso sulla dipendenza da cocaina e sulle possibili terapie atte a limitare tale fenomeno, è opportuno sottolineare la differenza esistente tra soggetti che utilizzano saltuariamente la sostanza e soggetti che ne sono dipendenti.

Una ricerca condotta negli USA [1] basata sui dati del National Comorbidity Survey, che dispone di un campione rappresentativo della popolazione degli Stati Uniti, ha messo in luce come per la cocaina il 5-6% dei consumatori diviene dipendente già nel primo anno di consumo, la maggior parte entro i primi tre anni, il 15-16% entro i dieci anni dal primo uso (contro il 12-13% nel caso del consumo di alcol e l'8% nel caso della marijuana).

La dipendenza da sostanze è un tipico esempio di interazione tra fattori genetici e ambientali nel quale l'influenza dei fattori genetici è largamente prevalente [2]. Studi di epidemiologia genetica condotti sui gemelli dimostrano che i fattori genetici contribuiscono per una percentuale che, a seconda degli studi, va dal 63% [3] al 78% [4] della varianza dell'abuso di cocaina. Percentuali simili si ottengono anche per altre sostanze d'abuso come la cannabis [5] e la stessa caffeina [6].

Al contrario dell'abuso e della dipendenza, il semplice uso di sostanze risulta determinato prevalentemente da fattori ambientali piuttosto che genetici. Nel caso della cocaina, l'uso appare dipendente solo per il 39% da fattori genetici e per il resto da fattori ambientali [4]. Lo stesso trend si osserva nel caso del semplice uso di cannabis [5]. Questa dicotomia dimostra la fondamentale differenza tra i meccanismi alla base dell'uso di sostanze e del loro abuso.

Proviamo a vedere alcuni dati generali. Per esempio il 33% dei soggetti che fuma diventa un fumatore cronico, il 23% dei soggetti che sperimentano eroina diventa dipendente da eroina e il 17% di coloro che sperimentano cocaina diventano dipendenti da cocaina. Leggendo questi dati sono due le domande che sorgono. Quali sono i fattori di rischio che conducono un soggetto che ha sperimentato la sostanza almeno una volta a sviluppare dipendenza, e quali sono i fattori che consentono ad un soggetto che ha sperimentato la sostanza di non sviluppare dipendenza? Le indagini compiute su gemelli e famiglie dimostrano che c'è una componente genetica. Se si trattasse solamente di fattori genetici allora per esempio le campagne di prevenzione non dovrebbero essere in grado di modificare i comportamenti assuntivi e quando un gemello monozigote prova una sostanza e ne diventa dipendente allora anche l'altro dovrebbe diventare dipendente dopo averla provata. Naturalmente non è così. C'è indubbiamente una "eterogeneità genetica" secondo la quale geni diversi o combinazione di geni producono fenotipi simili in individui differenti, o anche una "oligogenic inheritance", cioè una ereditabilità di pochi geni è necessaria per spingere qualcuno dalla normalità di un fenotipo verso uno spettro problematico.

Visto che ad oggi l'approccio farmacogenetico non ha applicazioni di cui possano fare uso i clinici nella loro pratica, è bene che proviamo ad accennare ad alcuni aspetti di fondo. Un primo punto essenziale può essere sintetizzato in due diversi termini in lingua inglese quali "serendipity" e "design". Per "serendipity" intendiamo la scoperta casuale a cui la storia ci ha abituati (gli antibiotici per esempio vengono anche da questo tipo di eventi). Possiamo tradurre il termine inglese "design" con "disegnare". La ricerca ci ha insegnato che i "recettori" altro non sono che proteine e come tali sono codificate da geni o da gruppi di geni. L'idea di fondo è quella di arrivare ad identificare questi geni perché una volta conosciuti sarà possibile produrre farmaci specifici, appunto "disegnati" per interagire con tali proteine. Nel nostro cervello la proteina "X" che svolge la funzione di recettore per la molecola "Y" ha in realtà tutta una serie di sottotipi che vengono espressi in maniera selettiva in diverse aree del cervello. Quindi la nostra proteina recettore "X" avrà per il esempio il sottotipo "X1" in un'area cerebrale e il sottotipo "X2" in un'altra area cerebrale. Uscendo da esempi generici e entrando in ambito specifico sappiamo che la dopamina si "aggancia" ai recettori "D" che hanno cinque sottotipi conosciuti, denominati appunto "D1", "D2", "D3", "D4", e "D5". Il "D2" è molto presente nello striato mentre "D3" e "D4" sono più presenti nel sistema limbico e corticale. Al fine di produrre minori effetti di tipo extrapiramidale, effetti dovuti al blocco dei recettori "D2" la ricerca farmacogenomica tenta di produrre farmaci che siano in grado di legarsi particolarmente ai "D3" e "D4".

I farmaci attualmente in commercio sono costituiti da molecole a basso peso molecolare che, come è stato detto, svolgono la loro funzione legando le proteine recettoriali. Quando si arriverà a conoscere le sequenze degli aminoacidi delle proteine e ancor più le sequenze nucleotidiche degli acidi nucleici, si potrà "disegnare" e sintetizzare brevi peptidi o nucleotidi che avranno specifiche attività farmacologiche e bassa tossicità.

La ricerca sugli aspetti genetici dei Disturbi Correlati all'Uso di Sostanze è in continua evoluzione e nell'aprile del 2006 sono stati pubblicati alcuni studi su questo tema [7, 8]. Per quanto riguarda gli aspetti genetici va certamente segnalato che se siamo ancora lontani dalla possibilità di identificare uno specifico gene all'origine della dipendenza, sono invece progredite le ricerche nell'ambito della farmacogenetica [9-12]. La predisposizione a sviluppare la dipendenza da cocaina sarebbe correlata alla concentrazione dei recettori D2 dopaminergici. Una elevata concentrazione dei D2, geneticamente determinata, avrebbe un ruolo protettivo rispetto alla suscettibilità per l'addiction alla cocaina [13]. Considerando ancora più specificamente l'azione neuro-farmacologica della cocaina, che è quella di bloccare il transporter della dopamina (DAT), riducendo il reuptake della dopamina stessa a livello pre-sinaptico, risulta del tutto plausibile che proprio le varianti geniche implicate nel determinare la concentrazione delle strutture deputate al reuptake siano coinvolte nella vulnerabilità per la dipendenza da cocaina. In accordo con questa ipotesi, l'associazione di un polimorfismo del transporter della dopamina con la dipendenza da cocaina è stata evidenziata in un campione della popolazione brasiliana [14].

Un'altra importante osservazione degli studi di epidemiologia genetica effettuati sui gemelli è che il fattore genetico che contribuisce all'abuso appare essere comune a tutte le sostanze d'abuso, indipendentemente dalla loro pericolosità e

capacità di dare dipendenza e quindi indipendentemente dal fatto di essere categorizzate come droghe “pesanti” o “leggere” [3]. Così, non è stato evidenziato alcun fattore genetico specifico per una specifica classe di droghe; al contrario, droghe caratterizzate da meccanismi d’azione primari molto diversi, come la cannabis e la cocaina o gli oppiacei, avevano in comune un unico fattore genetico. Questi risultati indicano che la dipendenza è determinata in larga misura da fattori geneticamente trasmissibili comuni a tutte le droghe. Tale conclusione è del tutto consistente con la nozione che la dipendenza è raramente ristretta ad una sola sostanza ma assume di regola le caratteristiche della politossicodipendenza (“polidrug abuse”). Inoltre tale conclusione è in accordo con il fatto che la familiarità dell’abuso di sostanze non è specifica per una classe di sostanze ma si estende a tutte le sostanze d’abuso e spesso si associa a disturbi della personalità e a disturbi psichiatrici (comorbidità).

Nella vita delle persone ci sono dei “fattori di rischio” che sono “modificabili” e altri che sono “immodificabili”. Per esempio l’essere donna comporta i rischi specifici del genere femminile come il cancro della cervice uterina mentre l’essere maschi comporta il rischio di cancro della prostata. Il genere e l’età sono certamente fattori “non modificabili”. Il National Institute of Drug Abuse (NIDA) ha esemplificato questo modello con un disegno che rappresenta una “bilancia”. Essere figli di persone alcoliste per esempio è certamente un “fattore di rischio” per sviluppare alcolismo, ma nella vita di una persona con questo fattore di rischio possono intervenire diversi fattori protettivi che controbilanciano il rischio.

Nell’ambito delle tossicodipendenze possiamo segnalare due diversi modelli quali il “modello morale” e il modello del “Brain disease”. Secondo il modello morale l’uso di sostanza è un “vizio” da cui è facile liberarsi nel momento in cui ci si mette la buona volontà e chi non se ne libera è perché non ci mette buona volontà. Il modello del “Brain Disease” indica invece la tossicodipendenza è una malattia del cervello. Secondo il modello “balance” l’uso di sostanza avviene con maggiori probabilità in soggetti che presentano alcuni fattori di rischio che non è possibile riassumere in maniera esaustiva in questa sede ma che possiamo provare ad accennare: familiarità per uso di sostanze compreso l’alcol, genere maschile, presenza di eventi stressanti soprattutto nell’infanzia (con successivo sviluppo di disturbo post traumatico da stress), uso precoce di sostanze non prescritte, deficit dell’attenzione che esordisce nell’infanzia [15-18].

L’osservazione che esistono determinanti genetici della vulnerabilità alla tossicodipendenza comuni a tutte le droghe e a condizioni di interesse psichiatrico indica in maniera chiara la direzione nella quale indirizzare gli studi sui fattori genetici delle tossicodipendenze. Tali fattori andranno ricercati tra quelle caratteristiche che le droghe hanno in comune tra di loro e che sono importanti per la tossicodipendenza in generale.

La constatazione che la tossicodipendenza mostra caratteristiche comuni indipendentemente dalla categoria farmacologica alla quale le droghe appartengono suggerisce da un lato il fatto che le droghe possiedano specifiche proprietà farmacologiche comuni e, d’altra parte, che sostanze dotate delle stesse proprietà farmacologiche possano avere in comune proprietà di indurre tossicodipendenza. La tossicodipendenza si configura come un disturbo della motivazione, che viene indirizzata in maniera compulsiva verso l’assunzione della droga, la quale fornisce la motivazione fondamentale al comportamento del

tossicodipendente. Pertanto, una proprietà comune a tutte le droghe è costituita dalle loro proprietà motivazionali. Tali proprietà, tuttavia, si osservano anche in soggetti naive e non sono specifici dell'abuso e della dipendenza da sostanze dato che si esprimono anche nel semplice uso. È possibile tuttavia, che con l'uso ripetuto della sostanza d'abuso, alcune proprietà ad esse comuni costituiscano la base per lo sviluppo dell'abuso e della dipendenza. Nell'uomo i farmaci e le sostanze d'abuso hanno la capacità di provocare euforia ed elevare il tono dell'umore. Questa proprietà è particolarmente spiccata nel caso degli psicostimolanti come amfetamina e cocaina, che alleviano il senso di fatica e riducono la tendenza al sonno e la fame, aumentando la capacità di attività fisica e il desiderio sessuale. Nel caso di altre sostanze, come la morfina e suoi analoghi (eroina e metadone), dei barbiturici, dell'alcol e delle benzodiazepine, le proprietà euforizzanti possono essere oscurate da effetti deprimenti e sedativi tipici di queste molecole ma sono presenti soprattutto a dosi basse e nella fase iniziale dell'effetto farmacologico. Altre sostanze, come i principi della Cannabis e la nicotina, hanno proprietà psicostimolanti intermedie tra quelle degli psicostimolanti propriamente detti e delle sostanze con attività sedativa e deprimente.

Farmacologia comportamentale

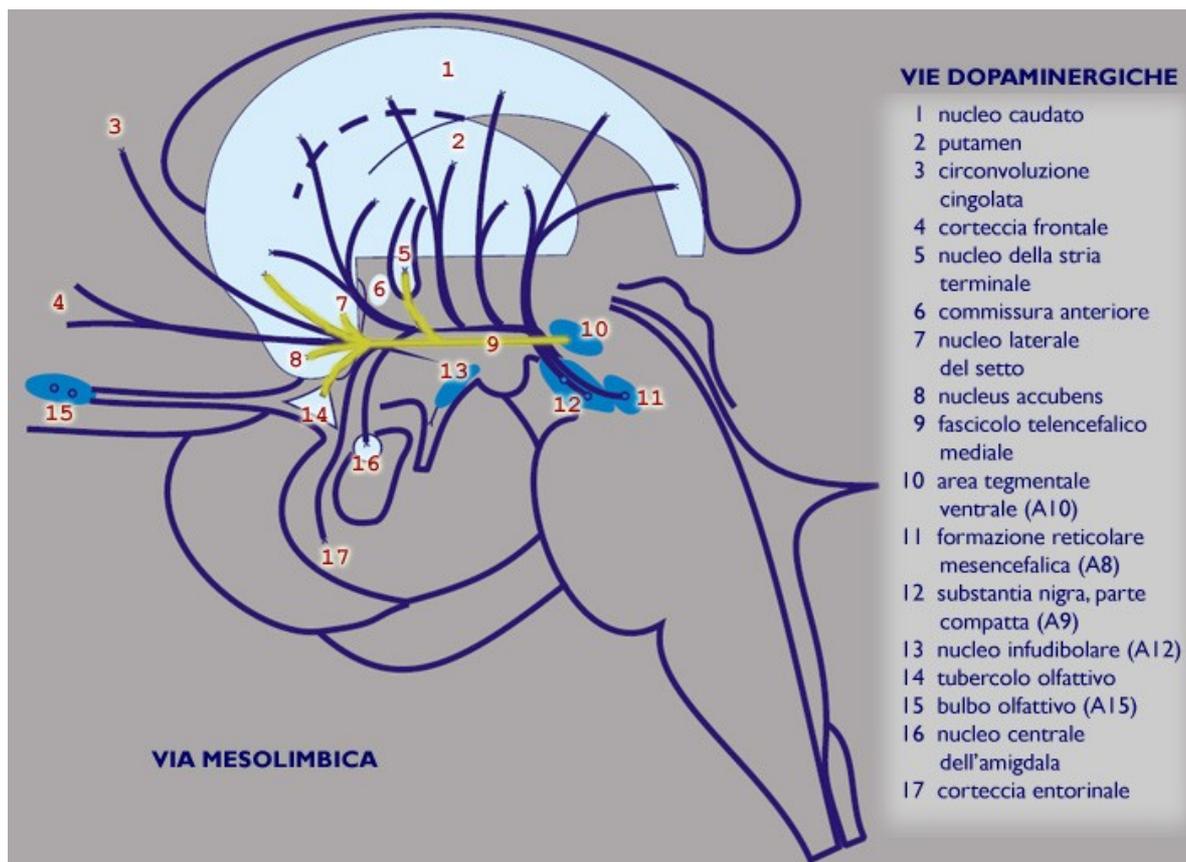
La maggior parte delle sostanze d'abuso (tranne certi allucinogeni) ha in comune la proprietà di provocare stimolazione psicomotoria negli animali di laboratorio. Questo effetto assume aspetti diversi a seconda della specie animale ma in generale consiste in stato di allerta, aumento della reattività agli stimoli esterni, dell'attività locomotoria ed esploratoria. L'azione stimolante sul comportamento motorio degli animali è particolarmente spiccata nel caso della cocaina, classico psicostimolante, ma si osserva anche dopo assunzione di sostanze tipicamente deprimenti come alcol, barbiturici e narcotici analgesici. Per tali sostanze, l'effetto psicomotorio si manifesta entro un determinato ambito di dosi e di tempi dalla somministrazione. Questo effetto stimolante sul comportamento spontaneo può considerarsi analogo all'effetto euforizzante che si osserva nell'uomo. Altra proprietà comune a tutte le sostanze d'abuso è quella di agire come rinforzo positivo, aumentando la probabilità di comportamenti che hanno come conseguenza la presentazione e l'assunzione della sostanza. Così gli animali di laboratorio si autosomministrano quelle stesse sostanze di cui l'uomo fa oggetto di abuso e per raggiungere lo scopo sono capaci di apprendere e attuare complicate procedure (comportamento operante). Questa proprietà delle sostanze di abuso si osserva non solo nei primati, ma anche in mammiferi meno evoluti filogeneticamente come i roditori. Così, l'animale da esperimento, preparato con cateteri impiantati cronicamente endovena e connessi ad una pompa ad infusione azionata dalla pressione di una leva, impara rapidamente ad iniettarsi l'eroina a intervalli regolari, secondo una cadenza che dipende dalla concentrazione del farmaco e ha come fine quello di mantenere un costante effetto farmacologico; l'anfetamina e la cocaina, due psicostimolanti, al contrario, vengono autosomministrate dall'animale da esperimento in maniera saltuaria, cioè a "tornate" (binges) nel corso delle quali la frequenza delle somministrazioni viene aumentata fino a livelli talmente elevati da provocare uno stato di eccitazione comportamentale così intenso da essere incompatibile con una corretta autosomministrazione; ciò provoca un'interruzione della autosomministrazione

fino a quando non siano cessati gli effetti del farmaco e il soggetto non si sia ripreso; allorché questo avviene, ha inizio un'altra tornata. Il fatto che gli animali manifestino nei confronti delle sostanze d'abuso un comportamento simile a quello dell'uomo indica che i meccanismi alla base della tossicodipendenza sono legati a proprietà biologiche la cui invarianza si è mantenuta nel corso di una lunga evoluzione filogenetica così da essere comuni all'animale e all'uomo.

Il fatto che le sostanze d'abuso possiedano proprietà di rinforzo positivo suggerisce che esse agiscano su meccanismi comuni a quelli degli stimoli gratificanti naturali, come il cibo, l'acqua, il sesso.

Lo studio delle basi neurobiologiche della motivazione inizia, intorno agli anni Cinquanta del XX secolo, con gli esperimenti di J Olds e P. Milner, i quali osservarono che ratti portatori di elettrodi cerebrali impiantati cronicamente e in grado di comandare il passaggio di corrente mediante la pressione di una leva, si autostimolavano quando gli elettrodi si trovano in corrispondenza di specifiche aree cerebrali. In altre aree, al contrario, l'animale evitava di autostimolarsi o premeva una leva per interrompere il passaggio di corrente. Altre aree, infine, apparivano neutre dal punto di vista motivazionale dato che l'animale non attuava alcun comportamento volto a ottenere o evitare la stimolazione cerebrale, ma si mostrava del tutto indifferente a essa.

Le aree cerebrali da cui sono più facilmente ottenibili le risposte di autostimolazione sono situate lungo il decorso del fascio mediale del proencefalo. In questo fascio corrono neuroni che utilizzano neurotrasmettitori diversi, ma a svolgere il ruolo principale nel comportamento di autostimolazione sono quelli che utilizzano come trasmettitore la dopamina. Tali neuroni originano dal tegmento mesencefalico a livello di tre gruppi localizzati nel nucleo rubrale (A8), nella substantia nigra pars compacta (A9) e nell'area ventrale del tegmento (A10). I neuroni che originano dall'area A10 proiettano ad aree limbiche (nucleo accumbens septi, tubercolo olfattorio, amigdala, ippocampo, corteccia prefrontale prelimbica) e formano il sistema dopaminergico mesolimbico; i neuroni che originano dall'area A9 ed A8 terminano nel nucleo caudato-putamen e costituiscono il sistema dopaminergico mesostriatale.



Tutte le più importanti sostanze d'abuso dagli analgesici narcotici, agli psicostimolanti (anfetamina e cocaina), alla nicotina, all'alcol, ai barbiturici e al d9-tetraidrocannabinolo (il principio attivo della Cannabis), hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina in un'area terminale del sistema mesolimbico, il nucleo accumbens del setto [19] e in particolare nella sua parte ventro-mediale, la shell [20,21]. I meccanismi attraverso i quali le sostanze d'abuso sono in grado di aumentare le concentrazioni extracellulari di dopamina sono diversi a seconda della classe farmacologica cui ciascuna sostanza appartiene. Così la cocaina blocca il reuptake della dopamina da parte delle terminazioni nervose, l'anfetamina libera la dopamina dalle terminazioni riversandola nel liquido extracellulare, l'eroina e altri narcotici morfino-simili (morfina e metadone), l'alcol, il d9-tetraidrocannabinolo e la nicotina, stimolano l'attività elettrica dei neuroni dopaminergici favorendo la liberazione fisiologica della dopamina.

Evidentemente, la capacità di stimolare la trasmissione dopaminergica nella shell del nucleo accumbens costituisce una caratteristica fondamentale delle sostanze d'abuso. A questa proprietà delle sostanze d'abuso è stata assegnata una funzione fondamentale sia per i loro effetti acuti sia per i loro effetti a lungo termine, in relazione alla genesi della tossicodipendenza. La stimolazione della trasmissione dopaminergica nella shell del nucleo accumbens è il substrato degli effetti euforizzanti delle sostanze d'abuso e della loro capacità di indurre uno stato di eccitazione incentiva che facilita il comportamento motivato da stimoli condizionati a rinforzi primari sia naturali (cibo, acqua, sesso) che farmacologici.

La liberazione di dopamina nella shell dell'accumbens da parte delle sostanze d'abuso ha anche la capacità di facilitare l'apprendimento incentivo. In tal modo stimoli altrimenti neutri dal punto di vista motivazionale e quindi incapaci di attrarre l'attenzione e l'interesse del soggetto acquisiscono proprietà incentive del comportamento motivato, quando vengono opportunamente associati a stimoli gratificanti come i rinforzi primari come le sostanze d'abuso.

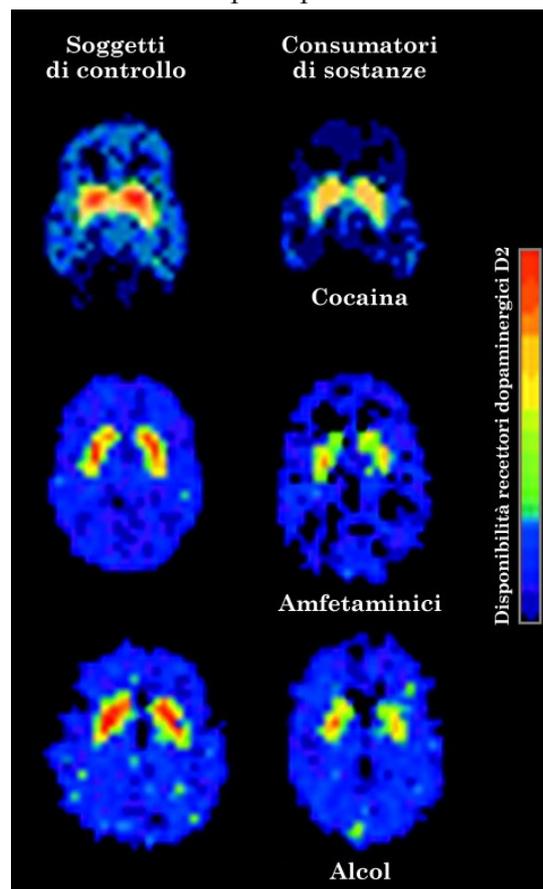
Le sostanze d'abuso, pur avendo in comune con stimoli primari non farmacologici (es. un cibo particolarmente gustoso) la proprietà di liberare dopamina nella shell del nucleo accumbens del setto non sono soggette ad abitudine dopo esposizione ripetuta, al contrario degli stimoli naturali. A questa proprietà non-adattativa della stimolazione della trasmissione dopaminergica nella shell del nucleo accumbens da parte delle sostanze d'abuso è stato attribuito un ruolo fondamentale nella genesi della tossicodipendenza [22].

Le sostanze d'abuso producono importanti effetti sulla dopamina anche dopo interruzione dell'esposizione (astinenza). Studi sugli animali di laboratorio hanno dimostrato nell'astinenza dopo trattamenti ripetuti con morfina, cocaina o alcol, una profonda depressione della trasmissione dopaminergica. Questa si manifesta con riduzione delle concentrazioni extracellulari di dopamina nel nucleo accumbens e come sindrome depressiva caratterizzata da sedazione, riduzione della motilità e della reattività agli stimoli esterni e in un aumento della soglia all'autostimolazione elettrica del fascio mediale del proencefalo (un effetto considerato come indice di una ridotta capacità funzionale dei meccanismi centrali della gratificazione). Le modificazioni della neurotrasmissione dopaminergica e la relativa anedonia sono verosimilmente un aspetto di una condizione di dipendenza della neurotrasmissione dopaminergica instauratasi come meccanismo adattivo alla cronica stimolazione della trasmissione stessa da parte della sostanza d'abuso.

In tali condizioni il più efficace antidoto all'anedonia e alla depressione della trasmissione dopaminergica è la stessa sostanza verso cui si è instaurata la dipendenza o un suo analogo. Così si instaurerebbe un circolo vizioso che lega l'individuo alla sostanza d'abuso.

Aspetti neurobiologici e clinici

Gli oppiacei stimolano i neuroni dell'area ventrale tegmentale che proiettano i loro assoni nel nucleo accumbens rilasciando dopamina. Al contrario gli psicostimolanti, dunque la cocaina così come le amfetamine stimolano la corteccia prefrontale. La nostra capacità di provare piacere è legata al fatto che il nucleo accumbens possa ricevere dopamina e più dopamina c'è più intenso è il piacere. Attività tradizionalmente piacevoli come quella sessuale o come



l'alimentazione stimolano il rilascio di dopamina nella così detta "shell" cioè nella porzione esterna del nucleo accumbens. È interessante notare che l'attività sessuale come quella alimentare si autolimitano. Non proviamo piacere continuando a mangiare dopo che lo stomaco è pieno così come non proviamo piacere continuando l'attività sessuale dopo l'orgasmo.

La continua assunzione di cocaina porta al così detto "crash". Va detto che l'uso cronico di cocaina porta ad "apprendimenti associativi" per cui stimoli che per altri soggetti sono normali portano invece l'assuntore di cocaina ad attivare la ricerca della sostanza.

Non solo non esiste un farmaco sostitutivo per la cocaina ma anche le varie terapie psicofarmacologiche sperimentate non si sono rivelate efficaci. Dalla clinica dunque arriva una importante spinta perché s'individuino trattamenti farmacologici in grado per lo meno di alleviare condizioni sintomatiche legate all'uso acuto della sostanza. Bloccando il "reuptake" della dopamina, la cocaina di fatto produce un aumento del numero di molecole di cocaina nel terminale presinaptico. Alcuni autori parlano di "inondazione" di dopamina nel nucleo accumbens e il sintomo che viene generato da questa inondazione è l'euforia. Un altro effetto della cocaina è l'inibizione dell'uptake dell'adrenalina e questo sarebbe all'origine di sintomi quali tachicardia, ipertensione, sudorazione, tremori, midriasi. Il continuo uso di cocaina rende necessario la catabolizzazione della dopamina che paradossalmente dopo essere stata abbondante viene ora a mancare. Il fenomeno che allora avviene è denominato "up-regulation" post-sinaptico e una delle interpretazioni correnti è che questa "up-regulation" possa spiegare almeno in parte sia il "craving" che il "crash". Un soggetto che presenta "craving" per cocaina produce una serie di comportamenti atti a procurarsi la sostanza. Per "crash" invece s'intende una condizione clinica di forte astenia che può essere poi complicata da produzione sintomatiche psichiatriche anche di carattere psicotico.

Provando a osservare l'andamento clinico dell'uso di cocaina si osserva la fase di "binge" in cui il soggetto si abbuffa di sostanza ottenendo un intenso piacere associato ad euforia. In genere un quarto d'ora o mezz'ora dopo il "binge" si osserva il "crash" che può durare qualche giorno associato o meno al "craving". La così detta fase di "estinzione" avviene quando il soggetto riesce a mantenere l'astensione dalla sostanza per 60-90 giorni. La difficoltà a mantenere l'astensione da sostanza è in relazione al fatto che in genere, ma soprattutto nell'uso cronico, dopo il "crash" compaiono sintomi quali disforia e ansia, che portano il soggetto a usare di nuovo la sostanza perché quella è la maniera più sicura di risolvere i sintomi.

Basi molecolari

Le sostanze d'abuso e i loro principi attivi agiscono primariamente a livello del Sistema Nervoso Centrale come agonisti diretti o indiretti di recettori di membrana per i neurotrasmettitori fisiologicamente utilizzati dai neuroni per comunicare tra loro. Così, mentre la cocaina stimola indirettamente, attraverso l'inibizione del reuptake della dopamina, i recettori dopaminergici, l'eroina stimola direttamente i recettori oppioidi. Il segnale generato dalla stimolazione di questi recettori viene trasdotto dalla membrana cellulare all'interno della cellula attraverso la produzione intracellulare di molecole diffusibili, i secondi messaggeri (AMP ciclico, inositolo trifosfato, calcio), che a loro volta innescano una cascata di enzimi fosforilanti proteine (kinasi). I substrati proteici di queste

kinasi sono molteplici e la loro fosforilazione può produrre effetti immediati (effetti comportamentali acuti) attraverso la fosforilazione di canali ionici voltaggio-dipendenti, ed effetti a lungo termine, attraverso la fosforilazione di proteine che diventano capaci di traslocare nel nucleo e di agire come fattori di trascrizione. Questi fattori di trascrizione (pCREB, pERK, pELK) attivano la sintesi di una serie di fattori (geni immediati precoci, IEG) come il FOS, il Jun, che attivano a loro volta la trascrizione di altre proteine importanti per la neurotrasmissione (es. la sintesi della preprodinorfina, il precursore di un tipo di oppioidi endogeni). Alternativamente o parallelamente, l'aumento del calcio intracellulare induce la liberazione di neurotrofine (BDNF, NGF, GDNF, FGF) che agiscono su recettori di membrana ad attività tirosinica su vari substrati proteici. Si ritiene che l'attivazione da parte delle sostanze d'abuso di questa complessa cascata di fosforilazioni proteiche sia il substrato di processi di neuroplasticità sinaptica che si esprimono con varie modificazioni adattative indotte da tali sostanze, come tolleranza, dipendenza fisica e sensitizzazione comportamentale.

L'esposizione ripetuta alle sostanze d'abuso modifica la morfologia delle spine dendritiche [23] ; tali effetti sarebbero mediati dall'azione delle sostanze d'abuso sui fattori di trascrizione cerebrali e sarebbero a loro volta il substrato morfologico della sensitizzazione comportamentale. Tuttavia, la morfina e i farmaci psicostimolanti, pur producendo ambedue sensitizzazione comportamentale e modificando in maniera simile l'espressione dei fattori di trascrizione, provocano effetti opposti sulla morfologia delle spine dendritiche.

La dipendenza è definita dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come un forte desiderio o senso di compulsione ad assumere una sostanza, difficoltà nel controllarne l'uso, la presenza di stati di astinenza, la tolleranza all'uso della sostanza, l'abbandono di interessi e piaceri alternativi e il persistente uso della sostanza, nonostante il danno a sé stesso e agli altri. (WHO, 2006).

Si possono distinguere tre principali teorie della tossicodipendenza [24]:

Secondo la teoria del processo opponente la dipendenza è direttamente correlata all'evitare il malessere connesso all'astinenza causata dall'interruzione dell'assunzione di sostanze d'abuso dopo una cronica esposizione ad esse [25]. In tal modo la droga viene inizialmente consumata per i suoi effetti piacevoli, ma dopo esposizione cronica la sua mancanza produce uno stato di malessere psichico simile alla depressione, che solo la sostanza d'abuso può eliminare. La continua esposizione alla sostanza d'abuso provocherebbe l'attivazione di un processo antiedonico che si oppone ai suoi effetti piacevoli. In mancanza della sostanza d'abuso il processo opponente avrebbe come risultato quello di spostare in basso la regolazione del livello edonico individuale e del tono dell'umore, producendo uno stato di anedonia. Il soggetto sarebbe quindi costretto a consumare la sostanza d'abuso per contrastare gli effetti antiedonici del processo opponente la sostanza.

A meno di postulare un'irreversibilità del processo opponente, questa ipotesi, pur attraente, non spiega la durata pressoché illimitata della condizione di dipendenza psichica. Infatti, percorrendo in senso inverso lo stesso cammino attraverso il quale la sostanza d'abuso induce dipendenza, il tossicodipendente dovrebbe poter facilmente ritornare alla condizione di non dipendenza. È ben noto, al contrario, che trattamenti di questo tipo, a volte efficaci nei confronti della dipendenza

fisica, sono privi di efficacia nei confronti della dipendenza comportamentale o psichica. Un'altra inadeguatezza di questa teoria è la difficoltà di spiegare il fatto che stimoli condizionati alla sostanza d'abuso sono in grado di provocare craving anche dopo molti anni di astinenza.

Secondo la teoria della sensitizzazione incentiva, la ripetuta esposizione alle sostanze d'abuso produce una sensitizzazione della responsività del sistema neuronale della motivazione (sistema dopaminergico mesolimbico) [26]. La sensitizzazione del sistema mesolimbico produrrebbe quell'abnorme aumento delle proprietà incentive di stimoli condizionati alla sostanza d'abuso che, secondo questa teoria, costituisce l'essenza della tossicodipendenza. La teoria della sensitizzazione incentiva presenta anch'essa alcuni punti deboli. Una prima incongruenza deriva dal fatto che l'osservazione che l'esposizione alla sostanza d'abuso induce sensitizzazione agli effetti incentivi della sostanza d'abuso non estende necessariamente questa proprietà agli stimoli a essa condizionati. Inoltre, dato che il meccanismo della sensitizzazione è di natura non associativa, la sua azione dovrebbe applicarsi a tutti gli stimoli condizionati indipendentemente dal fatto che siano associati alla sostanza d'abuso o ad altri rinforzi. Se così fosse il tossicodipendente dovrebbe manifestare craving in risposta a qualsiasi stimolo condizionato. Ciò tuttavia non corrisponde all'elevata specificità degli stimoli condizionati alla sostanza d'abuso nell'indurre craving. Un'altro problema di questa teoria riguarda la proprietà delle sostanze d'abuso di indurre sensitizzazione comportamentale, che non si osserva nell'uomo.

La teoria dell'apprendimento incentivo non fa derivare le abnormi proprietà incentive degli stimoli condizionati alla sostanza d'abuso da un meccanismo non-associativo come la sensitizzazione, ma da un meccanismo di apprendimento associativo [22]. Secondo questa teoria gli stimoli condizionati alla sostanza d'abuso acquisiscono eccessive proprietà incentive a causa di un abnorme processo di apprendimento incentivo che deriverebbe dalle caratteristiche peculiari della liberazione di dopamina nella shell del nucleo accumbens da parte delle sostanze d'abuso. Infatti questo effetto non è sottoposto, nel caso delle sostanze d'abuso, ad abitudine. Ciò fa sì che l'esposizione ripetuta alla sostanza d'abuso rinforzi in maniera abnorme l'associazione tra sostanze d'abuso e stimoli a esse contingenti, così da conferire a questi stimoli eccessive proprietà incentive. Questa teoria, al contrario delle due precedenti, rende conto sia della ben nota specificità di stimolo del craving, sia della efficacia praticamente indefinita degli stimoli condizionati alla sostanza d'abuso nell'indurre craving.

Attualmente non vi è evidenza circa trattamenti efficaci per la dipendenza da cocaina.

La ricerca di tali tipi di trattamenti è complicata dalla tendenza dei cocainomani ad essere poliassuntori, ovvero ad associare l'assunzione della cocaina ad altre sostanze, in genere oppioidi, che spesso mascherano gli eventuali benefici della terapia. Alcune ricerche [27] suggeriscono che la combinazione di farmacoterapia e psicoterapia ha un effetto maggiore nei trattamenti per la disassuefazione.

Diverse terapie farmacologiche sono state sviluppate, in gran parte sulla base di modifiche alla trasmissione dopaminergica cerebrale. In generale la farmacoterapia ha seguito due strategie principali. La somministrazione di antagonisti ai recettori dopaminergici, con lo scopo di neutralizzare gli effetti gratificanti della cocaina; o, al contrario, ricercando l'effetto opposto mediante agenti che facilitino la trasmissione dopaminergica. Tali agenti sono in genere usati per prevenire la deplezione

dopaminergica osservata durante la non assunzione di cocaina o per ridurre il craving durante l'astinenza. Altri agenti farmacologici, attivi sulla trasmissione serotonergica o noradrenergica, sono stati testati come trattamenti terapeutici potenziali. Oggi però, il trattamento più innovativo testato è il vaccino. Lo scopo di tale vaccino è bloccare gli effetti positivi ricercati nella cocaina, in modo da ridurre l'abuso [28].

Differenti passaggi sono stati individuati nel processo di dipendenza. Essi sono caratterizzati dall'azione di specifici neurotrasmettitori su differenti strutture cerebrali e su circuiti neuronali.

Nella prima fase, l'iniziazione all'uso, la dopamina sembra che svolga un ruolo fondamentale negli effetti di rinforzo acuto della droga, con l'area tegumentale ventrale e il nucleo Accumbens come primarie aree di interesse.

Nella fase successiva, l'uso continuativo della droga, diversi neurotrasmettitori sono coinvolti, come la dopamina nel nucleo Accumbens, l'ormone di rilascio della corticotropina nell'amigdala e il glutammato nei circuiti frontali-cingolati.

Nella terza fase, l'astinenza, il glutammato e la noradrenalina nel locus coeruleus, sembrano essere fondamentali.

Nell'ultima fase, la recidiva dopo l'astinenza, la corteccia orbitofrontale e l'amigdala sono regioni importanti del cervello, con la noradrenalina e l'ormone di rilascio della corticotropina coinvolti nel sistema di stress-indotto del cervello, e l'acido gamma-aminobutirrico (GABA) e il glutammato sono coinvolti nel sistema compulsivo e di assuefazione.

Da quanto detto appare chiaro che ci sono diversi modi di intervenire nel processo della dipendenza da cocaina. Ad esempio bloccando il processo di gratificazione generato dalla cocaina.

Sostanze per la prevenzione della recidiva

A differenza dell'astinenza da oppioidi, quella da cocaina presenta sintomi di minore intensità e in genere non necessita di farmaci. Negli ultimi 20 anni un gran numero di farmaci, appartenenti a diverse classi, sono stati testati per valutarne l'efficacia nella prevenzione della recidiva e per la promozione di una astinenza stabile nei soggetti cocainomani. Le molecole testate appartengono alle seguenti classi:

- Agonisti dei recettori dopaminergici (es. bromocriptina, pergolide, d-amfetamina)
- Agonisti parziali dei recettori dopaminergici (es. terguride, BP897)
- Inibitori del reuptake della dopamina (es. amantadina, mazindol, metilfenidato e diversi antidepressivi triciclici)
- Inibitori del metabolismo della dopamina (es. selegilina, disulfiram)
- Antagonisti della dopamina (es. aloperidolo, flufenazina, flupentixolo, ritanserina, risperidone, ecopipam)
- Composti GABAergici (es. baclofen, gabapentin, tiagabina, lamotrigina, valproato, carbamazepina, topiramato)
- Antagonisti β -adrenergici (es. propranololo, labetalolo)
- Oppioidi (es. naltrexone, buprenorfina, ciclazone)
- Inibitori della sintesi del cortisolo e antagonisti dei recettori glucocorticoidi (es. ketoconazolo, metirapone, desametasone)
- Bloccanti i canali del calcio (es. nimodipina, isradipina)
- Antidepressivi (es. desimipramina, imipramina, fluoxetina, venlavaxina, bupropione, gepirone, selegilina)

Negli studi pubblicati dagli anni 70 ad oggi si è visto che la percentuale dropout dagli studi era variabile tra lo 0 e l'84%, ma in generale la proporzione dei pazienti che hanno portato a termine le ricerche è del tutto simile tra quelli che hanno assunto il principio attivo e il placebo. Lo stesso vale per l'analisi dei campioni di urina positivi alla cocaina: non sono state osservate differenze significative tra il placebo e i vari principi attivi, a qualunque dosaggio.

Una descrizione dettagliata di ogni classe di sostanze è necessaria per comprenderne i meccanismi e i potenziali benefici terapeutici.

- **Antagonisti dei recettori dopaminergici**

Ad oggi non vi sono risultati circa l'efficacia degli antagonisti ai recettori dopaminergici nel trattamento della dipendenza da cocaina. Alcuni studi clinici hanno però indicato che tali principi attivi, in particolare quelli agenti sui recettori D2 della dopamina, come i classici neurolettici, possono parzialmente bloccare gli effetti soggettivi della cocaina nell'uomo e potenzialmente ridurre l'assunzione [29,30]. Tale approccio terapeutico presenta però due problemi principali. Innanzitutto, la somministrazione cronica di tali agenti che inducono anedonia ed effetti motori extrapiramidali indesiderati, causa un elevato dropout dal trattamento [31]. Secondariamente, il trattamento con antagonisti dopaminergici può portare ad un aumento della sensibilità dei recettori postsinaptici, che, indirettamente, può aumentare gli effetti soggettivi della cocaina e la tendenza all'abuso [32].

A questa classe di farmaci appartiene la bromocriptina che agisce sia attraverso una stimolazione dopaminergica postsinaptica, sia bloccando gli effetti euforizzanti della cocaina, poiché è anche un agonista competitivo a livello postsinaptico. Alcuni autori hanno suggerito che questo farmaco potrebbe essere utile al mantenimento dell'astinenza da cocaina e nel contrastare il craving, tuttavia l'uso della bromocriptina è limitato dall'alta incidenza di effetti collaterali, quali cefalea e disturbi gastrointestinali agli alti dosaggi che sono necessari per bloccare il craving [33]. Uno studio condotto confrontando l'efficacia della bromocriptina e della desimipramina (antidepressivo) su pazienti cocainomani ha dimostrato in maniera paradossale che ambedue le sostanze sono ugualmente capaci di incidere sul craving, mentre solo la prima si è dimostrata utile nell'attenuazione dei sintomi depressivi [34]. In alternativa alla bromocriptina è possibile utilizzare la Pergolide, un farmaco più specifico dal punto di vista recettoriale, più potente e ad azione più prolungata.

- **Agonisti dopaminergici**

L'effetto acuto della cocaina è l'incremento della trasmissione dopaminergica, invece per assunzione cronica si ha una diminuzione della concentrazione della dopamina nel cervello. Durante l'iniziale periodo di astinenza dopo l'assunzione di cocaina, i soggetti possono manifestare **sintomi quali depressione, affaticamento, irritabilità, anoressia e disturbi del sonno**. Una strategia di trattamento è quindi quella di somministrare degli agonisti parziali, più o meno potenti ma con effetto totale ridotto che possano avere azione agonista, cioè dare l'effetto dell'aumento della dopamina, nella fase della anedonia, con aumento del tono dell'umore e, viceversa, effetto quasi di antagonista quando il soggetto assume cocaina, modulando l'effetto della sostanza, tramite l'azione farmacologica.

L'amantadina è uno dei farmaci sperimentati per questo tipo di terapia, essa agisce attraverso il rilascio di dopamina dalle vescicole presinaptiche. In pazienti cocainomani il trattamento con amantadina ha mostrato risultati contrastanti: alcuni hanno dimostrato una diminuzione significativa dell'abuso di cocaina rispetto ai pazienti ai quali venisse somministrato il placebo [35] altri studi invece hanno dimostrato che l'amantadina non riduce il comportamento di self-administration [36].

- **Inibitori del metabolismo della dopamina**

Alcuni autori hanno posto la loro attenzione sulla possibile efficacia degli Inibitori delle Monoamino Ossidasi (MAO-inibitori), in quanto aumentano l'attività dopaminergica cerebrale.

Disulfiram e selegilina producono un aumento delle concentrazioni di dopamina a livello cerebrale attraverso una inibizione degli enzimi che catabolizzano la dopamina, rispettivamente la dopamina-beta-idrossilasi e la monoamino-ossidasi-B. La selegilina è stata studiata come farmaco con evidenze di funzionamento nel trattamento della dipendenza da cocaina ma in fase III di uno studio clinico controllato non ha mostrato conferme della sua efficacia [37]. Il Disulfiram è un farmaco usato nel trattamento dell'alcoldipendenza con effetto aversativo dovuto ad una attività di blocco dell'enzima acetaldeide-deidrogenasi a livello epatico. Gli studi sugli animali suggeriscono che il disulfiram, come la cocaina, aumenta l'attività del neurotrasmettitore dopamina. A livello centrale il disulfiram provoca un aumento dell'attività della dopamina attraverso un incremento dei tassi di dopamina dovuto all'inibizione dell'enzima che la catabolizza (dopamina-beta-idrossilasi). Il disulfiram, agendo in pratica da agonista dopaminergico, sarebbe in grado di diminuire il craving e la sensazione di "high" prodotta dalla cocaina. Il disulfiram ha mostrato di avere effetti nel ridurre il consumo di cocaina in osservazioni cliniche e in preliminari studi clinici. In uno studio per confrontare l'efficacia del disulfiram con quella del placebo nel ridurre il consumo di cocaina e per confrontare l'efficacia della terapia cognitivo comportamentale (CBT) e della psicoterapia interpersonale (IPT) nel ridurre il consumo di cocaina, disulfiram e placebo sono stati confrontati associati ai due approcci psicoterapici risultando la terapia con disulfiram e CBT efficace nel trattamento dei soggetti cocaino-dipendenti. Disulfiram è risultato avere un effetto diretto sull'uso di cocaina non mediato dalla azione sui comportamenti di consumo alcolico. È stata anche rilevata una differente risposta rispetto al sesso negli individui che hanno partecipato allo studio risultando una maggiore risposta al trattamento nei maschi rispetto alle femmine [38,39].

È stato proposto che individui con differenti geni per la sintesi dell'enzima che idrolizza la dopamina (dopamina-beta-idrossilasi -DBH) possano rispondere in modi diversi al trattamento ed è in corso uno studio a cura del National Institute on Drug Abuse (NIDA) per valutare le differenti risposte al trattamento in soggetti che presentano differenze geniche per il DBH [40].

Ulteriore possibilità di trattamento potrebbe essere la prescrizione di MAO-inibitori non selettivi, fenelzina e tranilcipromina, considerati, nei cocainomani, farmaci non del tutto sicuri, per la possibilità di una pericolosa interazione con la cocaina. D'altra parte, proprio questa azione "disulfiram-simile" potrebbe essere un efficace deterrente dalla prosecuzione dell'uso di cocaina.

- **Antidepressivi**

Mentre l'assunzione acuta di cocaina accresce i livelli intercellulari di dopamina, serotonina e norepinefrina bloccando il reuptake a livello sinaptico, l'abuso cronico porta ad una down-regulation del sistema monoaminico. La depressione che segue l'uso di cocaina e il craving sembrano essere legati a tale down-regulation. In base a tali considerazioni teoriche si è giunti alla sperimentazioni di antidepressivi per il trattamento della dipendenza da cocaina. L'uso di tali farmaci accresce il livello di monoamine e può alleviare la sintomatologia da astinenza da cocaina così come il craving mediante l'azione antidepressiva. Gli antidepressivi testati sono: triciclici, MAO-inibitori e inibitori selettivi del reuptake della serotonina.

Per quanto riguarda gli antidepressivi triciclici, la desimipramina, in particolare, inibisce la ricaptazione dei neurotrasmettitori come la noradrenalina agendo attraverso una down-regulation postsinaptica dei recettori per dopamina e noradrenalina. Essa è in grado di alleviare alcuni sintomi da astinenza associati alla dipendenza e di ridurre il desiderio per la cocaina. La desimipramina è risultata efficace nell'aumentare la permanenza di soggetti cocainomani all'interno di un programma terapeutico, ma non si è rivelata efficace nel determinare una significativa riduzione dell'assunzione di cocaina [41]. La desimipramina, dunque, potrebbe essere un farmaco di ausilio nell'ambito di un trattamento più ampio della sindrome di astinenza da cocaina.

D'altronde anche recenti trial con antidepressivi moderni quali paroxetina, pentoxifillina, riluzolo, pramipexolo e venlafaxina [42], fluoxetina [43] e nefazodone [44] non hanno dimostrato effetti positivi di questi farmaci su soggetti dipendenti da cocaina.

- **Stimolanti**

In linea teorica, seguendo l'esempio del trattamento di mantenimento con metadone, anche per la cocaina si potrebbe pensare di utilizzare uno stimolante per ridurre il craving per la sostanza. Purtroppo al momento non esistono stimolanti che possono essere utilizzati in terapia in quanto rispondenti ai criteri dei farmaci anticraving. Le amfetamine, infatti, possiedono una forte proprietà di rinforzo e non sono in grado, utilizzate a lungo termine, di ripristinare una situazione di normalità per le funzioni fisiologiche sregolate dall'uso di cocaina. Allo stato attuale della ricerca, l'aver utilizzato stimolanti nel trattamento dell'addiction alla cocaina ha portato, in realtà, ad un peggioramento del craving. Spesso la dipendenza è stata associata ad altre condizioni psicopatologiche, alcune volte considerate come preminenti, quasi come cause stesse della dipendenza. Seguendo questa ipotesi è stata suggerita una terapia dell'abuso di cocaina maggiormente mirata tenendo conto delle primitive diagnosi psichiatriche. È stato così notato un miglioramento del craving per la cocaina, in seguito alla somministrazione di metilfenidato, nei soggetti con diagnosi di disturbo da deficit di attenzione ed un netto peggioramento negli altri. Il metilfenidato è stato usato anche per valutare le variazioni neuroormonali in corso di astinenza da cocaina. Sono stati misurati i livelli di secrezione della prolattina e dell'ormone della crescita durante l'astinenza indotta da metilfenidato. La somministrazione di metilfenidato fa aumentare la secrezione di prolattina e di GH (che rispetto alla prolattina è un marker meno sensibile). Il craving viene esacerbato durante l'astinenza indotta da metilfenidato.

La desamfetamina, stereoisomero dell'amfetamina con maggiori proprietà stimolanti, è stata testata come potenziale agente terapeutico nella dipendenza da cocaina. Uno

studio iniziale ha mostrato come l'utilizzo di tale sostanza portasse ad una effettiva diminuzione dell'assunzione di cocaina [45], un ulteriore studio ha evidenziato una percentuale di ritenzione nel trattamento uguale per il gruppo trattato con la desamfetamina e quello trattato col placebo, ma un migliore outcome (minori campioni di urine positivi a cocaina) [46].

- **Agonisti GABAergici e antagonisti glutamatergici**

Molti studi stanno valutando gli effetti di sostanze ad attività GABA-ergica nel trattamento dei disturbi correlati alla cocaina. L'Acido Gamma-Aminobutirrico (GABA) è un neurotrasmettitore ad attività inibitoria a livello delle sinapsi del Sistema Nervoso Centrale. Le sostanze che agiscono come agonisti dei GABA-recettori o che incrementano la quantità disponibile di acido gamma-aminobutirrico a livello recettoriale producono effetti di rilassamento, ansiolisi e anticonvulsivanti.

Le sostanze che agiscono sui recettori del GABA appartengono a svariate classi di molecole: alcol, benzodiazepine e barbiturici, baclofen, carbamazepina, fenitoina, valproato, gabapentin, gabazina (SR-95531), acido gamma-idrossi-butirrico (GBH), propofol, zolpidem, zopiclone, progabide, tiagabina e vigabatrin.

Negli animali da laboratorio, il potenziamento della attività del GABA porta ad una inibizione dell'autosomministrazione di cocaina e ad una inibizione dei comportamenti di ricerca della cocaina. Allo stesso modo negli umani si è osservato che la terapia GABA-ergica può essere efficace sia nell'induzione dell'astensione, sia nella fase di prevenzione delle ricadute nel trattamento della dipendenza da cocaina. Ma queste supposizioni necessitano di ulteriori studi in quanto l'utilizzo di alcuni farmaci di questa categoria ha dato risultati dubbi e uno studio che valutava l'efficacia di gabapentin associato a terapia individuale settimanale di prevenzione delle ricadute non ha dato riscontro di efficacia superiore al placebo [47].

Il Baclofen è un derivato dell'acido gamma-ammino-butirrico e funziona come GABA-B agonista; è utilizzato come miorilassante. Come GABA-agonista il baclofen può ridurre la quantità di dopamina rilasciata a livello del nucleo accumbens come risultato della stimolazione della cocaina o del craving per la cocaina. Negli esperimenti il baclofen ha mostrato di ridurre il craving provocato dall'esposizione a ricordi condizionati di precedenti esperienze di consumo di cocaina [48]. Il baclofen quindi potrebbe essere un utile farmaco per il trattamento dell'astinenza da cocaina e come supporto per la prevenzione delle ricadute.

I farmaci che agiscono sulle funzioni regolate dal Glutamato sono oggetto di studi per il coinvolgimento dei circuiti del glutamato nelle regioni del cervello collegate ai fenomeni della ricompensa e per l'evidenza dell'induzione di una disregolazione glutamatergica indotta dalla cocaina. Inoltre è sempre più chiaro che le funzioni glutamatergiche sono alla base di numerosi aspetti clinici della dipendenza da cocaina inclusa l'euforia, l'astinenza, il craving e le disfunzioni delle esperienze di piacere [49]. Ricerche supportate dal National Institute on Drug Abuse (NIDA) hanno prodotto evidenze che sostanze che ricostituiscono le concentrazioni di glutamato nel cervello in modelli animali con dipendenza compulsiva per la cocaina possono contribuire a ridurre la vulnerabilità alle ricadute [50].

Il Modafinil, è un farmaco prescritto per il trattamento della narcolessia e testato in alcuni studi ha mostrato di avere una attività nel ridurre la dipendenza da cocaina. Non sono chiari i meccanismi di funzionamento del farmaco ma in vitro ha mostrato la capacità di inibire il reuptake della dopamina. Il modafinil attiva i circuiti del glutamato inibendo il GABA. Si ritiene che il modafinil presenti meno potenziale di

abuso rispetto agli altri stimolanti dovuto alla assenza di significativi effetti euforizzanti e piacevoli.

Alcuni studi limitati hanno evidenziato che il modafinil può avere effetti nel contribuire a migliorare gli esiti clinici quando combinato a trattamenti psicosociali per la cura della dipendenza da cocaina [51].

Ciò che risulta da questa panoramica sui farmaci utilizzabili è che ancora ci si muove a livello di tentativi. Non possediamo certezze, ma solo impressioni ed opinioni. D'altra parte bisogna considerare, per fortuna, che evidenze di efficacia sostengono anche altri tipi di intervento, sebbene anche in questo caso di entità limitata.

Fra gli approcci più accreditati ricordiamo quelli basati su tecniche cognitivo-comportamentali del tipo contingency management e prevenzione delle ricadute. Nel caso del contingency management si tratta di tecniche che utilizzano stimoli gratificanti alternativi a quelli forniti dalla cocaina, che vengono "guadagnati" dal paziente che si astiene dall'uso della stessa. Spesso si tratta di "vaucer" convertibili in denaro, beni o servizi. Nel caso degli interventi di prevenzione della ricaduta, si tratta di analizzare i fattori che nel singolo paziente sono associati alla ricaduta nell'uso (emozioni sgradevoli, emozioni positive, conflitti familiari, disponibilità di denaro, etc.) e trovare soluzioni alternative all'uso di cocaina. A tutt'oggi, lo stato dell'arte del trattamento a lungo termine del cocainismo è tale da prevedere l'associazione di tecniche comportamentali, riabilitative e farmacologiche dipendenti più dalla preferenza individuale del terapeuta che dalla dimostrata evidenza di superiorità.

IMPLICAZIONI PER LO SVILUPPO DEI FARMACI E PROSPETTIVE FUTURE

Finora non c'è stato un singolo farmaco che sia stato approvato dall'FDA per il trattamento della dipendenza da cocaina. La psicoterapia, nonostante la sua efficacia parziale, è ancora il fondamento del trattamento. Comunque, il crescente numero di consumatori di cocaina, specialmente tra gli adolescenti, e l'alto tasso di ricaduta fra chi si rivolge ai servizi per un trattamento, hanno reso estremamente urgente la ricerca di una cura efficace. Gli studi pubblicati sui farmaci per la dipendenza da cocaina negli anni '70 e nei primi anni '80 si sono principalmente concentrati sugli agonisti della dopamina, per esempio amantadina e bromocriptina, così come sugli anti-depressivi, principalmente la desipramina. Ma i risultati di questi studi variano grandemente a causa della differenza dei criteri di selezione dei pazienti, della differente metodologia e delle differenti misure dell'esito. Una recente metanalisi di alcuni di questi studi ha mostrato che la maggior parte di tali agenti sono inefficaci. È anche chiaro dai dati che, nonostante i risultati siano stati largamente negativi, c'erano alcuni sottogruppi di pazienti che rispondevano positivamente a questi farmaci. Il perché non è ben chiaro, forse è da ricercare nell'eterogeneità della popolazione oggetto di queste ricerche.

C'è un generale accordo sul fatto che tutti gli individui cocaino-dipendenti differiscano nella risposta allo stress, nella capacità di sperimentare il piacere, nell'auto-stima e nel comportamento di ricerca del rischio. Queste differenze,

accoppiate con una alta percentuale di comorbidità psichiatrica (es. depressione, ansia, deficit dell'attenzione, disturbo bipolare e disturbi di personalità), rendono questa popolazione tutto fuorché un gruppo omogeneo. L'identificare specifici marcatori biologici o alterazioni biologiche che possano essere utilizzati per caratterizzare diversi sottogruppi tra i consumatori cronici di cocaina, potrebbe essere utile per:

- individuare specifici agenti farmacologici per i vari sottogruppi di utilizzatori di cocaina, che possano ottimizzare l'esito di questi studi;
- determinare la lunghezza del trattamento;
- prevenire la ricaduta, iniziando il trattamento al primo segno di un aumento o della riemergenza di un determinato marcatore;
- riconoscere il carattere genetico o biologico che predispone certi individui a diventare dipendenti dalla cocaina

È risultato evidente dalla ricerca che la maggior parte dei dati biologici indagati negli studi riguardavano il sistema della dopamina. In misura minore, studi più recenti hanno esplorato anche altri sistemi, per esempio quello della serotonina.

il trattamento dell'abuso di cocaina rappresenta attualmente un campo aperto per la sperimentazione farmacologica. A differenza di altre forme di dipendenza, come eroinismo o anche alcolismo, nel caso della cocaina, i vari farmaci utilizzati hanno mostrato, al massimo, un'efficacia modesta. Tuttavia alcune linee di ricerca sembrano promettenti e tali da indurre ad un cauto ottimismo circa le prospettive future. Un approccio terapeutico alternativo potrebbe essere quello di agire sulla farmacocinetica della cocaina, piuttosto che interferire con la funzione dei recettori ai quali si lega. Si eviterebbe in questo modo di alterare un complesso equilibrio tra recettori e neurotrasmettitori endogeni. Due possibili strumenti terapeutici in tal senso, sono costituiti da un vaccino contro la cocaina e dall'uso di enzimi capaci di accelerare l'eliminazione di tale sostanza dall'organismo.

Per quanto riguarda il vaccino, ricordiamo che la molecola della cocaina non possiede proprietà immunogene. Perché il sistema immunitario possa reagire con la produzione di anticorpi specifici è necessario un legame covalente con una molecola proteica. Il vaccino in ultima analisi è costituito proprio da una proteina in grado di legare la cocaina. Il complesso cocaina-proteina trasportatrice avrebbe una doppia funzione: sia stimolare i linfociti T (T-helper) a produrre fattori che stimolano la produzione di anticorpi, sia consentire la reazione crociata della cocaina con le immunoglobuline espresse sulla superficie dei linfociti B attivandoli nella creazione di anticorpi specifici anti-cocaina. Il meccanismo d'azione di questi anticorpi legati alla cocaina, sembra dipendere esclusivamente dall'ingombro sterico, poiché l'immunocomplesso è troppo grande per attraversare la barriera ematoencefalica. È verosimile che egli anticorpi non siano sufficienti a neutralizzare tutta la cocaina assunta, ma gli studi preclinici sembrano indicare che la riduzione della quantità di cocaina in grado di attraversare la barriera ematoencefalica possa essere sufficiente a ridurre drasticamente il "rush" che accompagna l'effetto della sostanza e quindi la sua appetibilità. Un probabile limite alla terapia è rappresentato dal tempo di necessario perché la cocaina assunta si leghi ai suoi anticorpi. Per alcune vie di somministrazione, come quella endovenosa o inalatoria, è possibile che il lasso di tempo intercorrente fra l'assunzione della sostanza ed il suo arrivo al cervello sia troppo breve per consentire un'adeguata neutralizzazione dell'effetto. D'altra parte, lo stesso paziente potrebbe, come è stato dimostrato per gli oppiacei, superare la

protezione anticorpale aumentando la dose di cocaina assunta; cioè la concentrazione della quota non legata agli anticorpi e quindi in grado di raggiungere il cervello. Un'alternativa farmacologica, potrebbe essere quella di agire direttamente sulla molecola della cocaina, facilitandone l'eliminazione dall'organismo. Questo effetto può essere ottenuto mediante la somministrazione di un enzima capace di accelerare il metabolismo della cocaina, riducendone quindi gli effetti. La principale via metabolica per la cocaina nei primati è rappresentata dall'idrolisi, che da origine a due metaboliti: la benzoilecgonina e l'ecgonina-metil-estere. Gli enzimi più importanti che nell'uomo metabolizzano la cocaina sono due carbossilesterasi epatiche e la butirrilcolinesterasi. Partendo da alcune osservazioni cliniche, è stata dimostrata una correlazione inversa tra la gravità dei sintomi acuti provocati dalla cocaina (ischemia e convulsioni) e l'attività della butirrilcolinesterasi plasmatica. L'aumento della butirrilcolinesterasi nel plasma ha come conseguenza l'aumento dei metaboliti della cocaina, in particolare della ecgonina-metil-estere. Questo metabolita della cocaina sembra essere il meno attivo farmacologicamente e possedere addirittura un'azione vasodilatatoria. Si potrebbe quindi pensare al possibile uso della butirrilcolinesterasi come trattamento dell'abuso e dipendenza da cocaina. Dati i presupposti esistenti, la sostanza dovrebbe essere non solo priva di tossicità, ma addirittura protettiva nei confronti degli effetti tossici della cocaina, della quale potrebbe antagonizzare l'effetto vasocostrittore. Nel trattamento d'emergenza la somministrazione endovenosa dell'enzima potrebbe ridurre la durata d'azione della cocaina. Nel trattamento cronico, la riduzione degli effetti gratificanti potrebbe contribuire all'estinzione del comportamento di ricerca e d'uso della sostanza stessa. A tal proposito di notevole interesse l'osservazione che l'attività esterasica a carico della cocaina può essere svolta da anticorpi monoclonali sviluppati verso l'intermedio tetraedico che si forma in corso della sua idrolisi. Gli studi sin'ora condotti hanno dimostrato che uno di tali anticorpi è in grado di proteggere per circa 48 ore il ratto dagli effetti letali acuti della cocaina [52].

Bibliografia Appendice

1. Wagner et al, 2002. *From first Drug Use to Drug Dependence: Developmental Periods of Risk for Dependence upon Marijuana, Cocaine, and Alcohol.*
2. Moffitt, 2005. *The new look of behavioral genetics in developmental psychopathology: gene-environment interplay in antisocial behaviors.*
3. Kendler et al, 2003. *Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins.*
4. Van den Bree, 1998. *Genetic and environmental influences on drug use and abuse/dependence in male and female twins.*
5. Kendler e Prescott, 1998. *Cannabis Use, Abuse, and Dependence in a Population-Based Sample of Female Twins.*
6. Kendler e Prescott, 1999. *Caffeine Intake, Tolerance, and Withdrawal in Women: A Population-Based Twin Study.*
7. Schifano F, 2004. *Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities.*
8. Lachman HM, 2006. *An overview of the genetics of substance use disorders.*
9. Saxon AJ et al, 2005. *Genetic determinants of addiction to opioids and cocaine.*
10. Kreek MJ et al, 2005. *Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments.*

11. Kreek MJ et al, 2004. *Genes associated with addiction: alcoholism, opiate, and cocaine addiction.*
12. Kuhar MJ et al, 2005. *Cocaine- and amphetamine- regulated transcript peptides play a role in drug abuse and are potential therapeutic targets.*
13. Nader e Czoty, 2005. *PET Imaging of Dopamine D2 Receptors in Monkey Models of Cocaine Abuse: Genetic Predisposition Versus Environmental Modulation*
14. Guindalini et al, 2006. *A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample*
15. Gerra et al, 2005. *Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents.*
16. Gerra et al, 2005. *Serotonin transporter promoter polymorphism genotype is associated with temperament, personality traits and illegal drugs use among adolescents.*
17. Gerra et al, 2004. *Substance use among high-school students: relationships with temperament, personality traits, and parental care perception.*
18. Gerra et al, 2004. *Association between low-activity serotonin transporter genotype and heroin dependence: behavioral and personality correlates.*
19. Di Chiara e Imperato, 1988. *Drugs Abused by Humans Preferentially Increase Synaptic Dopamine Concentrations in the Mesolimbic System of Freely Moving Rats.*
20. Pontieri et al, 1996. *Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs.*
21. Tanda et al, 1997. *Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ_1 Opioid Receptor Mechanism.*
22. Di Chiara, 1998. *A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use.*
23. (Ballesteros-Yáñez, et al, 2007. *Chronic cocaine treatment alters dendritic arborization in the adult motor cortex through a CBI cannabinoid receptor-dependent mechanism.*
24. Di Chiara, 2006. *NEUROBIOLOGIA DELLA DIPENDENZA DA COCAINA, COCAINA* Manuale di aggiornamento tecnico scientifico
25. Koob e Le Moal, 2005. *Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction.*
26. Robinson e Berridge, 1993. *The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction.*
27. San Molina e Arranz, 2001. *Aproximación terapéutica de la dependencia de cocaína.*
28. Martell et al, 2005. *Vaccine Pharmacotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence.*
29. [Berger](#) et al, 1989. *Treatment of cocaine abuse with mazindol.*
30. Sherer et al, 1989. *Effects of intravenous cocaine are partially attenuated by haloperidol.*
31. Decker e Ries, 1993. *Differential diagnosis and psychopharmacology of dual disorders.*

32. Goldfrank e Hoffman, 1991. *The cardiovascular effects of cocaine.*
33. Eiler et al, 1995. *Double-blind comparison of bromocriptine and placebo in cocaine withdrawal.*
34. Giannini e Billett, 1987. *Bromocriptine-desipramine protocol in treatment of cocaine addiction.*
35. Kampman et al, 2000. *Amantadine in the treatment of cocaine-dependent patients with severe withdrawal symptoms.*
36. Shoptaw et al, 2002. *A screening trial of amantadine as a medication for cocaine dependence.*
37. Gorelik et al, 2004. *Agents in development for the management of cocaine abuse.*
38. Kathleen et al, 2004. *Efficacy of Disulfiram and Cognitive Behavior Therapy in Cocaine-Dependent Outpatients: a Randomized Placebo-Controlled Trial.*
39. Whitten, 2005. *Disulfiram reduces Cocaine Abuse.*
40. Cfr.: ClinicalTrials.gov. NCT00149630 *Pharmacogenetics of Disulfiram for Cocaine.*
41. Campbell et al, 2003. *Comparison of desipramine or carbamazepine to placebo for crack cocaine-dependent patients.*
42. Ciraulo et al, 2005. *Efficacy screening trials of paroxetine, pentoxifylline, riluzole, pramipexole and venlafaxine in cocaine dependence.*
43. Schmitz et al, 2001. *Fluoxetine treatment of cocaine-dependent patients with major depressive disorder.*
44. Lambert Passos et al, 2005. *Nefazodone in out-patient treatment of inhaled cocaine dependence: a randomized double-blind placebocontrolled.*
45. Grabowski, 2001. *Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: A double-blind randomized clinical trial.*
46. Shearer et al, 2003. *Pilot randomized double blind placebo controlled study of dex-amphetamine for cocaine dependance.*
47. Bisaga et al, 2006. *A Randomized placebo-controlled trial of gabapentin for cocaine dependence.*
48. Kampman, 2005. *Medications for cocaine.*
49. Dackis e O'Brien, 2003. *Glutamatergic Agents for Cocaine Dependence.*
50. Hollon, 2004. *Brain Glutamate Concentration Affect Cocaine Seeking.*
51. Dackis et al, 2005. *A Double- Blind, Placebo-Controlled Trial of Modafinil for Cocaine Dependence.*
52. Metz B et al. 1998. *A catalitic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats.*

Ai miei cari
e a chi oggi è felice per me.

Gustavo

Gustavo Neza