

THE POSSIBILITIES OF APPLYING MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES TO FORENSIC TOXICOLOGY

Przemysław PIOTROWSKI, Tomasz GRZYBOWSKI, Karol ŚLIWKA

Chair and Department of Forensic Medicine, The Ludwik Rydygier Medical University, Bydgoszcz

ABSTRACT: The latest developments in DNA research have had an immediate impact on numerous life science disciplines. Among many applications of molecular genetics to forensic toxicology, the determination of species and geographic origin of illegal plants seems to be one of the most promising. This paper presents a variety of methods available for forensic DNA typing of narcotic plants (mainly *Cannabis sativa* L.). We also present recent findings concerning the action of xenobiotics on a molecular and genetic level, and discuss prospects for their use in forensic toxicology practice.

KEYWORDS: DNA; Forensic toxicology; Toxicogenetics; Pharmacogenetics; Molecular biology.

Problems of Forensic Sciences, vol. LIII, 2003, 7–21

Received 22 July 2003; accepted 7 August 2003

INTRODUCTION

The unusually rapid advances in science and technology observed in the second half of the last century have led to a situation today where the once rigid and clearly delineated boundaries between particular scientific disciplines have become blurred. It is difficult, at this point in time, to define the limits of application of such scientific fields as genetics, biochemistry or physiology. This is, among other things, linked to the fact that many scientific disciplines use the same techniques and research methodologies. A similar situation is also observed in the field of forensic toxicology. Until recently toxicological analysis was based exclusively on chemical or immunochemical methods. At present, these methods still constitute the basic analytical tools – though not the only ones – used by toxicologists. In recent years, the possibilities of applying molecular biology techniques to toxicology have been noticed. The application of these techniques to toxicology has become so common that it has given rise to a separate scientific discipline known as molecular toxicology or toxicogenetics, which deals with the study of the harmful action of chemical substances at the cellular and molecular levels.

The term “molecular biology techniques” is very broad. It encompasses genetic methods applied in the analysis of genetic material and also methods used in biochemistry and all immunological techniques. The aim of the present review is to show some applications of molecular biology methods, in particular the application of molecular genetics to forensic toxicology. The first part of the review looks at the application of molecular genetics methods to the identification of material of plant origin that has forensic toxicological significance. The second part is devoted to toxicogenetics and pharmacogenetics issues, and describes how achievements in these disciplines can be applied in forensic toxicology. Immunological techniques are very commonly used in toxicology; however, this is a very broad topic that requires separate discussion and will be omitted in the present article.

It should also be noted that application of genetics achievements to toxicology is not just a one-way process. Instrumental methods used for many years in chemical and toxicological analyses have found application in molecular genetics as well. A good example of this is mass spectrometry, used as a fast and accurate method for finding mutations in genes associated with mucoviscidosis [10].

APPLICATION OF DNA ANALYSIS TO FORENSIC TOXICOLOGY FOR IDENTIFICATION PURPOSES

Analysis of DNA polymorphism is currently commonly used, among other things, for human individualisation, kinship studies and taxonomical and phylogenetic analyses with the aim of classifying animals and plants (inter-species and intra-species) [2, 6, 19].

Plant material collected by the police is frequently delivered to toxicological and criminalistic laboratories in order to determine the species and to ascertain whether it contains narcotic substances. This material is in most cases crumbled and dried, which in practice makes it impossible to determine the species by the classical botanical approach based on macroscopic morphological features. Moreover, microscopic analysis based on observation of structures characteristic for hemp such as glandular trichomes (hairs), tubercles of calcium oxalate, and cystolithic hairs [1, 15] may not be sufficiently reliable. For example, those features taken into consideration in the microscopic method of identification of hemp have been described in more than 80 different plant species [16]. In such a case, chemical analysis can be carried out, e.g. a method based on chromatography enabling detection of the active substance, characteristic for the given plant [9]. However, if the amounts of delivered specimen are too small, chromatographic analysis becomes very difficult or even impossible to perform. Analytical difficul-

ties are also due to the fact that many chemical compounds, e.g. tetrahydrocannabinol (THC), are very sensitive to physical and chemical factors, and hence easily undergo degradation [18]. For this reason one should be aware that a negative result of a THC test does not unambiguously exclude the possibility that the analysed plant belongs to the *Cannabis* genus or that the analysed specimen had contained the sought substance before. Small and Beckstead analysed 350 specimens of the *Cannabis* genus for the presence of THC [26]. In as many as 117 cases THC was not detected. In cases where the above-mentioned methods do not give a reliable result, DNA analysis enables unambiguous classification of the analysed plant specimen. Linacre and Thorpe have described a DNA based method of marijuana (*Cannabis sativa*) identification [12]. Identification of this plant can be performed by analysis of chloroplast DNA (cpDNA). Because usually only small amounts of material are available for analysis, a necessary step is DNA amplification, commonly performed by PCR (polymerase chain reaction), a method enabling exponential amplification of the selected DNA fragment. PCR is a very convenient and relatively simple technique and, most importantly in the context of the discussed problems, the initial amount of the analysed sample necessary for the test can be very small. In the study by the above-mentioned authors, length analysis and sequence analysis of PCR products generated from *Cannabis sativa* DNA extracts was applied. Application of universal PCR primers for amplification of exon trnL5' and gene trnF (chloroplast tRNA genes) enabled kinship determination among studied plants as well as identification of DNA sequences characteristic for *Cannabis sativa*. The obtained results led to the design of PCR primers specific for this species and, consequently, optimisation of a specific test for marijuana identification.

In other studies, species identification of the aforementioned plant was carried out by analysis of internal transcribed spacer sequences – ITS 1 and ITS 2 of the nuclear ribosomal DNA (n-rDNA) [22, 24, 25]. The above-cited authors also report that these DNA segments can be analysed by restriction digestion [23]. However, they argue that automatic DNA sequencing is a better method, giving more accurate results.

Hsieh et al. [7] described the first microsatellite DNA characteristic for the *Cannabis* genus. Microsatellite DNA sequences, also known as short tandem repeats (STR), are very popular DNA markers commonly used, e.g. for analysis of human DNA in identification studies. The above-mentioned authors report that analysis of STR sequences of *Cannabis sativa* can be successfully used for identification of this plant. In turn, Gilmore et al. report that STR analysis can provide, amongst other things, information about the agrotype (different varieties exist – fibrous, oily and narcotic) and geographical origins of a plant [5].

The high sensitivity of the above methods of molecular biology enables detection of tiny amounts of plant material remaining, for instance, in pockets of drug dealers and also on objects or banknotes used by individuals who have contact with drugs of plant origin.

Hemp is a plant characterised by very high variability. For this reason, plants belonging to this genus are distinguished by an enormous abundance of types, forms and variants with significant biological, morphological and usage differences [20]. Thanks to this variability, it is possible to determine the geographical origins of *Cannabis* specimens collected by the police. Also in this case, DNA analysis is a very convenient tool. Jagdish et al. proved that not only is it possible to differentiate between plant species (by this method), but also that specimens of *Cannabis sativa* collected from different plantations (populations) reveal different DNA sequences [8]. The study encompassed specimens originating from three Australian populations, one population from Papua New Guinea and two additional specimens of *Humulus lupulus*. Analysis was based on the RAPD-PCR technique, which is commonly used for DNA analysis performed on individuals belonging to the same species. The authors state that this method is reliable for differentiation of *Cannabis sativa* samples originating from different sources. Gillan et al. carried out individual identification of *Cannabis sativa* specimens by high performance liquid chromatography (HPLC) and by genetic methods. It turned out that genetic methods give a more reliable result and enable differentiation of particular specimens in cases where HPLC analysis has failed [4].

As was mentioned above, DNA analysis can be applied to identification studies of practically all organisms. Lee et al. applied DNA analysis to identification of hallucinogenic fungi from the *Panaeolus* and *Psilocybe* families [11]. ITS rDNA analysis was again used in these cases.

OPPORTUNITIES FOR APPLICATION OF TOXICOGENETIC AND PHARMACOGENETIC TECHNIQUES TO FORENSIC TOXICOLOGY

Another issue connected with application of molecular biology techniques to toxicology is the damaging effect of chemical compounds on the structure and function of DNA, and also the influence of genetic polymorphism (and hence individual variability) on the sensitivity of an organism to a particular substance. It has been known for many years that different chemical compounds interact with genetic material. Molecular toxicology tries to find out the mechanism of the toxic action of chemical compounds at molecular and cellular levels and also its effect on the whole organism. In addition to examination of genetic material, molecular toxicology is also concerned with the study of other cellular structures and processes, for exam-

ple, assessment of the influence of xenobiotics on the release of inflammatory mediators. Pharmacogenetics is a related branch. This discipline focuses on, among other things, genetic conditions determining the efficiency and toxicity of medicines and interactions between medicines and genetic material. It is worth noting that knowledge of the structure and function of human genes has revolutionised research carried out on many different disease processes and contributed to rationalisation of use of many drugs.

Different reactions of various organisms, both intra-species and inter-species, to the same chemical compound are a very common phenomenon. An example of this is interspecies differences in reactions to isoprene [27]. This phenomenon is based on both environmental factors and individual sensitivity related to genetic polymorphism. Effects of variation between enzymes involved in drug metabolism are visible in all ethnic groups in relation to many drugs. Deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase causes enhanced sensitivity to anti-malaria drugs and primaquine, while reduced activity of serum cholinesterases can cause incorrect prolongation of the succinylcholine effect [10]. Warfarin – an anticoagulant and derivative of coumarin, is an excellent example of this phenomenon. Pharmacogenetic studies have shown extreme differences after warfarin administration to individuals revealing simultaneously distinct DNA sequences of genes encoding protein receptors and enzymes involved in metabolism of this drug [14]. Similar data are reported by Oldenburg et al. [17], who describe the genetic predisposition to bleeding during anticoagulation therapy. Individual differences in response to the applied medicine constitute a significant problem. It is now known that these differences often have a genetic background, which significantly affects pharmacological processes such as absorption, metabolism and elimination of a drug [29]. Potential application of pharmacogenetic studies to forensic toxicology will be based on differences in response by particular individuals to chemical compounds. This response is partially determined by polymorphism of genes involved in metabolic pathways control. This polymorphism can therefore be responsible for dramatic and unpredictable pharmacological effects. Linder and Valdes noticed that genetic variation can selectively influence pharmacodynamic response after application of a particular drug [13]. Study of these polymorphisms and, consequently, assessment of individual sensitivity to a particular medicine, could make possible clarification of the cause of death in cases where chemical and toxicological analyses reveal drug presence at concentrations generally considered as therapeutic.

A frequent and fundamental problem in toxicological investigations is xenobiotic detection, which is usually linked to the fact that the xenobiotic is present in the analysed specimen at very low concentrations or is even absent (e.g. because of fast elimination). Usually, however, even if a xenobiotic

is not present in the specimen, results of its actions remain. Depending on the type of poison, these results can be observed as macro or microscopic changes, but also changes in genetic material. In such a case, determination of specific interactions of different substances (e.g. drugs) with genetic material could enable confirmation of the previous presence of a particular xenobiotic in the organism. Brown et al. used DNA analysis for assessment of the toxic effect of cigarette smoke on rat lungs [3]. The authors emphasise the fact that although histopathological analysis will certainly continue to be the basic method applied for determination of toxicity of this factor, the harmful effect of cigarette smoke can be also studied by: determination of DNA adducts in respiratory tracts (using monoclonal antibodies or mass spectrometry), detection of chromosomal aberrations in macrophages of pulmonary vesicles and analysis of DNA synthesis in epithelial lining of nasal concha. Moreover, techniques of molecular toxicology applied to assess changes on a cellular and molecular level are more sensitive than traditional histopathological methods. It is well known that many chemical substances cause structural or functional disturbances at the level of genetic material. For example, paraquat, a well-known herbicide causes chromosomal aberrations in mice [21]. Ascertaining such effects could make it possible to confirm the action of a particular xenobiotic, in spite of a lack of possibility of detecting it by chemical methods. The only condition that must be fulfilled is that these effects are specific.

The search for characteristic interactions between xenobiotics and genetic material, investigations carried out into the influence of chemical substances on gene expression and the search for genetic polymorphisms can be the source of much important information for toxicologists, clarifying the mechanism of poisonings. They can also be a very helpful tool in assessment of risk degree in diagnosis of both acute and chronic intoxications, which are sometimes the cause of death and are difficult to diagnose with traditional analytical methods used in toxicology.

SUMMARY

There is no data available in the literature showing direct application of toxicogenetic and pharmacogenetic analysis to forensic toxicology and certainly, at present, this type of analysis is not routinely used in toxicology. However, in the light of above mentioned findings concerning mechanisms of toxic action of chemical compounds at the molecular level and the influence of genetic polymorphism on the response of an organism to a particular xenobiotic, one may suppose that in the near future forensic toxicology will make use of the discussed methodologies.

The presented data support the idea of application of molecular biology techniques to toxicology for a few reasons:

- Firstly, genetic material is a very reliable marker, enabling unambiguous determination of species and individual identification.
- Receiving only a small amount of plant material is not an obstacle to positive identification. This is attested to by the fact that detection of Cannabis traces on skin is possible by analysis of genetic material [28].
- Analysis may be performed on fresh material and also dried or heavily crushed specimens.
- DNA analysis enables not only determination of the species, but can also define type, variety and form of plants that are traded illegally. Thanks to this, police can obtain very significant information about geographical origins of the collected specimens and, consequently, ascertain smuggling routes and distribution paths in a country.
- In cases of low concentrations of toxic substances, which are below the threshold of traditional methods, finding out about their specific interactions with genetic material could create the possibility of diagnosing intoxications.
- In the case of rapid elimination of a xenobiotic from an organism, identification of DNA damage that is specifically caused by the particular toxin can confirm its previous presence in an organism.

References:

1. Ankus G., Sokołowska-Jabłońska Z., Oznaczenie zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu w ziele konopi w policyjnych laboratoriach kryminalistycznych w aspekcie ustawy „O przeciwdziałaniu narkomanii”, cz. I, *Problemy Kryminalistyki* 2001, nr 233, s. 38–44.
2. Bataille M., Crainic K., Leterreux M. [et al.], Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation, *Forensic Science International* 1999, vol. 99, pp. 165–170.
3. Brown B. G., Bombick B. R., McKarns S. C. [et al.], Molecular toxicology endpoints in rodent inhalation studies, *Experimental and Toxicologic Pathology* 1995, vol. 47, pp. 183–191.
4. Gillan R., Cole M. D., Linacre A. [et al.], Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study, *Science and Justice* 1995, vol. 35, pp. 169–177.
5. Gilmore S., Peakall R., Robertson J., Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations, *Forensic Science International* 2003, vol. 131, pp. 65–74.
6. Henrion B., Chevalier G., Martin F., Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers, *Mycological Research* 1994, vol. 98, pp. 37–43.

7. Hsieh H. M., Hou R. J., Tsai L. C. [et al.], A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*, *Forensic Science International* 2003, vol. 131, pp. 53–58.
8. Jagadish V., Robertson J., Gibbs A., RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources, *Forensic Science International* 1996, vol. 79, pp. 113–121.
9. Jądrzak R., Biskupski M., Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w analizie kannabinoli, *Problemy Kryminalistyki* 1999, nr 224, s. 26–29.
10. Jorde L. B., Genetyka medyczna, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2000.
11. Lee J. C. I., Cole M., Linacre A., Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by DNA test. A preliminary test for hallucinogenic fungi, *Forensic Science International* 2000, vol. 112, pp. 123–133.
12. Linacre A., Thrope J., Detection and identification of *Cannabis* by DNA, *Forensic Science International* 1998, vol. 91, pp. 71–76.
13. Linder M. W., Genetic mechanism for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant Warfarin, *Clinica Chimica Acta* 2001, vol. 308, pp. 9–15.
14. Linder M. W., Valdes R. Jr., Genetic mechanism for variability in drug response and toxicity, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, vol. 25, pp. 405–413.
15. Mitosinka G. T., Thornton J. T., Hayes T. L., The examination of cystolithic hairs of *Cannabis* and other plants by means of the scanning electron microscope, *Journal of Forensic Science International* 1972, vol. 12, pp. 521–529.
16. Nakamura G. R., Forensic aspects of cystolith hairs of *Cannabis* and other plants, *Journal of AOAC* 1969, vol. 52, pp. 5–16.
17. Oldenburg J., Kriz K., Wuillemin W. A. [et al.], Genetic predisposition to bleeding during anticoagulant therapy: evidence for common founder mutations (FIXVal-10 and FIXThr-10) and an independent CpG hotspot mutation (FIXThr-10), *Thrombosis and Haemostasis* 2001, vol. 85, pp. 454–457.
18. Parker J. M., Borke M. L., Block L. H. [et al.], Decomposition of cannabidiol in chloroform solution, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1974, vol. 63, pp. 970–971.
19. Parson W., Pegoraro K., Niederstatter H. [et al.], Species identification by means of the cytochrome b gene, *International Journal of Legal Medicine* 2000, vol. 114, pp. 23–28.
20. Poradnik plantatora lnu i konopi, Szalkowski Z. [red.], Wydawnictwo Instytutu Włókien Naturalnych, Poznań 1994.
21. Rios A. C., Salvadori D. M., Oliveira S. V. [et al.], The action of the herbicide paraquat on somatic and germ cells of mice, *Mutation Research* 1995, vol. 328, pp. 113–118.
22. Siniscalco-Gigliano G., Identification of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) using restriction profiles of the internal transcribed spacer II (ITS2), *Science and Justice* 1998, vol. 38, pp. 225–230.

23. Siniscalco-Gigliano G., Preliminary data on the usefulness of internal transcribed spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. identification, *Journal of Forensic Science* 1999, vol. 44, pp. 475–477.
24. Siniscalco-Gigliano G., Caputo P., Cozzolino S., Ribosomal DNA analysis as a tool for the identification of *Cannabis sativa* L. specimens of forensic interest, *Science and Justice* 1997, vol. 37, pp. 171–174.
25. Siniscalco-Gigliano G., Di Finizio A., The *Cannabis sativa* L. fingerprint as a tool in the forensic investigations, *Bulletin on Narcotics* 1997, vol. 49, pp. 1–10.
26. Small E., Beckstead H.D., Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*, *Lloydia* 1973, vol. 36, pp. 144–165.
27. Watson W. P., Cottrell L., Zhang D. [et al.], Metabolism and molecular toxicology of isoprene, *Chemico-Biological Interactions* 2001, vol. 135–136, pp. 223–238.
28. Wilkinson M., Linacre A. M. T., The detection and persistence of *Cannabis sativa* DNA on skin, *Science and Justice* 2000, vol. 40, pp. 11–14.
29. Wolf C. R., Smith G., Pharmacogenetics, *British Medical Bulletin* 1999, vol. 55, pp. 366–386.

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA OSIĄGNIĘĆ BIOLOGII MOLEKULARNEJ W TOKSYKOLOGII SĄDOWEJ

Przemysław PIOTROWSKI, Tomasz GRZYBOWSKI, Karol ŚLIWKA

WSTĘP

Niezwykłe intensywny postęp nauki i techniki, jaki miał miejsce w drugiej połowie minionego wieku, sprawił, że w chwili obecnej zatarły się, niegdyś sztywne i jasno wyznaczone granice między poszczególnymi dyscyplinami naukowymi. Trudno dziś ustalić granice zainteresowania takich dziedzin nauki, jak genetyka, biochemia czy fizjologia. Związane jest to między innymi z faktem, iż wiele dyscyplin naukowych korzysta z tych samych technik i metod badawczych. Podobnie rzecz ma się w odniesieniu do toksykologii sądowej. Do niedawna analiza toksykologiczna opierała się wyłącznie na metodach chemicznych czy immunochemicznych. W chwili obecnej metody te nadal stanowią podstawowe, lecz nie jedyne narzędzie analityczne w rękach toksykologa – analityka. W ostatnich latach zwrócono uwagę na możliwości wykorzystania szeroko rozumianych technik biologii molekularnej w toksykologii. Stosowanie tychże technik w toksykologii stało się na tyle powszechne, że obecnie – jako zupełnie odrębna dyscyplina naukowa – funkcjonuje toksykologia molekularna czy toksykogenetyka, która zajmuje się badaniem szkodliwego działania substancji chemicznych na poziomie komórkowym i molekularnym.

Pojęcie „technik biologii molekularnej” jest zagadnieniem bardzo obszernym. Do tychże technik należy zaliczyć zarówno metody genetyczne związane z szeroko rozumianą analizą materiału genetycznego, metody wykorzystywane w biochemii oraz wszystkie metody immunologiczne. Celem prezentowanej pracy jest wskazanie niektórych zastosowań technik biologii molekularnej, a w szczególności genetyki molekularnej w toksykologii sądowej. W pierwszej części omówione zostanie wykorzystanie metod genetyki molekularnej do celów identyfikacji materiału pochodzenia roślinnego, istotnego z punktu widzenia toksykologii sądowej. Druga część pracy poświęcona jest zagadnieniom toksykogenetyki i farmakogenetyki, ze zwróceniem uwagi na możliwość wykorzystania osiągnięć tych dyscyplin naukowych w toksykologii sądowej. Techniki immunologiczne, jakkolwiek stanowią bardzo powszechne narzędzie w analizie toksykologicznej, są zagadnieniem bardzo obszernym i wymagają odrębnego omówienia. Z tego powodu zostaną pominięte w niniejszej pracy.

Należy również zaznaczyć, że nie tylko toksykologia korzysta z osiągnięć genetyki. Metody instrumentalne stosowane od wielu lat w analizie chemiczno-toksykologicznej znajdują również zastosowanie w genetyce molekularnej. Na przykład spektrometria mas jest wykorzystywana jako szybka i dokładna metoda do wykrywania mutacji w genach mukowiscydozy [10].

WYKORZYSTANIE ANALIZY DNA W TOKSYKOLOGII SĄDOWEJ DO CELÓW IDENTYFIKACYJNYCH

Obecnie powszechnie wykorzystuje się badanie polimorfizmu DNA między innymi do celów identyfikacji osobniczej człowieka, ustalania pokrewieństwa oraz w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych prowadzonych w celu klasyfikacji zwierząt i roślin (międzygatunkowej i wewnątrzgatunkowej) [2, 6, 19].

Do laboratoriów toksykologicznych oraz kryminalistycznych często dostarczany jest materiał roślinny zabezpieczony przez policję, celem stwierdzenia, jaka to roślina oraz czy zawiera ona substancje narkotyczne. Najczęściej materiał taki jest rozdrobniony i wysuszony, co praktycznie uniemożliwia ustalenie gatunku rośliny klasycznymi metodami botanicznymi opartymi na makroskopowych cechach morfologicznych. Natomiast analiza mikroskopowa oparta na obserwacji charakterystycznych dla ziela konopi elementów (włosów wydzielniczo-główkowych, gruzłów szczawianu wapnia, włosów cystolitowych) [1, 15] może być zbyt mało wiarygodna. Opisano na przykład ponad 80 różnych gatunków roślin charakteryzujących się tymi samymi cechami, co konopie, które brane są pod uwagę w mikroskopowym sposobie oznaczania tej rośliny [16]. W takiej sytuacji możliwe jest przeprowadzenie analizy chemicznej np. z wykorzystaniem technik chromatograficznych, które umożliwią wykrycie substancji czynnej, charakterystycznej dla danej rośliny [9]. Jednak w sytuacji, gdy do badań zostanie dostarczona zbyt mała ilość materiału, jego przygotowanie do analizy chromatograficznej jest bardzo utrudnione, a często wręcz niemożliwe. Trudności analityczne wynikają również z faktu, iż wiele związków chemicznych, jak na przykład tetrahydrokannabinol (THC), jest bardzo wrażliwych na czynniki fizyczne oraz chemiczne i w związku z tym łatwo ulega degradacji [18]. Dlatego należy pamiętać, że ujemny wynik analizy w kierunku obecności THC nie jest jednoznaczny z tym, że dana roślina nie należy do rodzaju *Cannabis* oraz że wcześniej materiał ten nie zawierał poszukiwanej substancji. Small i Beckstead badali 350 okazów omawianego rodzaju w kierunku obecności THC [26]. Aż w 117 przypadkach nie stwierdzono obecności THC. W sytuacji, gdy powyższe metody nie dają pewnego wyniku, analiza DNA umożliwia jednoznaczne sklasyfikowanie badanej rośliny. O możliwości identyfikacji wspomnianych już konopi siewnych (*Cannabis sativa*) na podstawie badania DNA donoszą Linacre i Thorpe [12]. Identyfikację tej rośliny można przeprowadzić na podstawie analizy chloroplastowego DNA (cpDNA). Koniecznym etapem analizy jest amplifikacja DNA, gdyż zwykle do badań dostarczana jest niewielka ilość materiału. Do tego celu powszechnie wykorzystuje się PCR (ang. polymerase chain reaction) – technikę, która umożliwia wykładnicze namnażanie wybranego przez eksperymentatora fragmentu DNA. PCR jest techniką bardzo wygodną i stosunkowo łatwą do zastosowania, a co najważniejsze w omawianych badaniach, wyjściowa ilość badanego materiału genetycznego może być bardzo mała. W badaniach wspomnianych autorów wykorzystano analizę wielkości i sekwencji produktów PCR otrzymanych z ekstraktów *Cannabis sativa* przy użyciu uniwersalnych starterów dla eksonu trnL5' i genu trnF (geny chloroplastowego tRNA), co umożliwiło ustalenie pokrewieństwa badanych roślin oraz identyfikację charakterystycznych dla *Cannabis sativa* sekwencji DNA. Dzięki temu zaprojektowano specyficzne dla tej rośliny startery, które następnie wykorzystano do stworzenia specyficznego testu umożliwiającego identyfikację omawianej rośliny.

Z kolei w innych badaniach do identyfikacji tej samej rośliny wykorzystano analizę wewnętrznych transkrybowanych sekwencji rozdzielających – ITS 1 i ITS 2 (ang. Internal Transcribed Spacer I, II) jądrowego rybosomalnego DNA (n-rDNA) [22, 24, 25]. Cytowani autorzy donoszą również o możliwości zastosowania technik analizy restrykcyjnej w badaniach powyższych fragmentów DNA [23], jednak przekonują, że automatyczne sekwencjonowanie DNA jest metodą lepszą, choćby z powodu uzyskiwania dokładniejszych wyników.

Hsieh i in. [7] opisali pierwszy mikrosatelitarny DNA rodzaju *Cannabis*. Mikrosatelity, czyli krótkie powtórzenia tandemowe STR (ang. short tandem repeat), są bardzo popularnymi markerami DNA wykorzystywanymi powszechnie np. do analizy ludzkiego DNA w celach identyfikacyjnych. Jak donoszą wymienieni autorzy, analiza sekwencji STR *Cannabis sativa* może być z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji tej rośliny. Z kolei Gilmore i in. donoszą, iż analiza STR może dostarczyć między innymi informacji o agrotypie (istnieją odmiany włókniste, oleiste i narkotyczne) i pochodzeniu geograficznym [5].

Czułość wspomnianych metod biologii molekularnej może pozwolić na wykrywanie śladowych ilości materiału pozostającego na przykład w kieszeniach osób handlujących narkotykami, a także na przedmiotach i banknotach, którymi posługują się osoby mające kontakt z narkotykami pochodzenia roślinnego.

Konopie są roślinami charakteryzującymi się bardzo dużą zmiennością. Fakt ten sprawia, że rośliny z tego rodzaju wyróżniają się ogromnym bogactwem typów, form i odmian o znacznych różnicach biologicznych, morfologicznych i użytkowych [20]. Dzięki tej właściwości możliwe jest ustalenie pochodzenia geograficznego zabezpieczanych przez policję roślin z rodzaju *Cannabis*. Również w tym przypadku bardzo wygodnym narzędziem jest analiza DNA. Jagadish i in. dowiedli, że możliwe jest nie tylko odróżnienie gatunków roślin, ale także wykazali, że okazy *Cannabis sativa* pochodzące z różnych upraw (populacji) posiadają odmienną sekwencję DNA [8]. Badaniom poddano próby z trzech populacji australijskich i jedną z populacji pochodzącej z Papui Nowej Gwinei oraz dwie próby *Humulus lupulus*. W badaniach wykorzystano powszechnie stosowaną do badania DNA w obrębie tego samego gatunku technikę RAPD-PCR. Według autorów jest to dobra metoda umożliwiająca odróżnienie prób *Cannabis sativa* pochodzących z różnych źródeł. Gillan i in. przeprowadzali identyfikację osobniczą okazów *Cannabis sativa* za pomocą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz przy użyciu technik genetycznych. Okazało się, że metody genetyczne dają pewniejszy wynik, umożliwiając rozróżnienie okazów w przypadkach, gdy analiza HPLC była nieskuteczna [4].

Jak wspomniano wcześniej, badanie DNA może zostać wykorzystywane do identyfikacji praktycznie wszystkich organizmów. Lee i in. zastosowali analizę DNA do identyfikacji grzybów halucynogennych z rodziny *Panaeolus* i *Psilocybe* [11]. Do tego celu również wykorzystano badanie sekwencji ITS rDNA.

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA OSIĄGNIĘĆ TOKSYKOGENETYKI I FARMAKOGENETYKI W TOKSYKOLOGII SĄDOWEJ

Kolejnym zagadnieniem związanym z wykorzystaniem osiągnięć biologii molekularnej w toksykologii jest szkodliwe działanie substancji chemicznych na strukturę i funkcję DNA, a także wpływ polimorfizmu genetycznego i wynikającej z niego

zmienności osobniczej na wrażliwość organizmu na daną substancję. Od wielu lat wiadomo, że różnorodne związki chemiczne wchodzą w interakcje z materiałem genetycznym. Toksykologia molekularna stara się odpowiedzieć na pytanie, jaki jest mechanizm toksycznego działania związków chemicznych na poziomie molekularnym i komórkowym oraz jaki jest efekt tego działania dla całego organizmu. Poza badaniem materiału genetycznego, toksykologia molekularna zajmuje się również badaniem innych struktur i czynności komórek, jak np. oceną uwalniania mediatorów zapalenia pod wpływem ksenobiotyków. Pokrewną gałęzią nauki jest farmakogenetyka. Przedmiotem zainteresowania tej dyscypliny są między innymi uwarunkowania genetyczne decydujące o skuteczności i toksyczności leków oraz interakcje lek – materiał genetyczny. Należy zaznaczyć, że poznawanie struktury i funkcji ludzkich genów zrewolucjonizowało badania nad wieloma procesami chorobowymi oraz przyczyniło się do zrjonalizowania stosowania licznych leków.

Zróznicowana odpowiedź różnych organizmów na ten sam związek chemiczny – tak w obrębie tego samego gatunku, jak i międzygatunkowa – jest zjawiskiem bardzo powszechnym. Przykładem mogą być międzygatunkowe różnice w reakcji organizmów na izopren [27]. U podłoża tego zjawiska leżą zarówno czynniki środowiskowe, jak i wrażliwość osobnicza wynikająca z polimorfizmu genetycznego. Efekty zmienności w obrębie enzymów metabolizujących leki są widoczne we wszystkich grupach etnicznych w odniesieniu do wielu leków. Niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej powoduje podwyższoną wrażliwość na leki przeciwmalaryczne i primachinę, a obniżona aktywność cholinesteraz osoczowych może dawać nieprawidłowe przedłużenie działania sukcyńlocholiny [10]. Dobrze udokumentowanym przykładem dotyczącym takiego zjawiska jest warfaryna – lek z grupy antykoagulantów, pochodnych kumaryny. Badania farmakogenetyczne wykazały skrajne różnice po podaniu warfaryny przy równocześnie odmiennych sekwencjach w genach kodujących białka receptorowe i enzymy biorące udział w metabolizmie tego leku [14]. Podobnie Oldenburg i in. [17] donoszą o genetycznych predyspozycjach do krwawień podczas terapii przeciwzakrzepowej. Różnice indywidualne w odpowiedzi na zastosowany lek stanowią istotny problem. Dziś już wiadomo, że różnice te mają często podłoże genetyczne, które istotnie wpływa na przebieg procesów farmakologicznych takich jak wchłanianie, metabolizm i wydalanie leku [29]. Ewentualne zastosowanie badań farmakogenetycznych w toksykologii sądowej wynikać będzie z różnic w odpowiedzi danego osobnika na związki chemiczne, która to odpowiedź jest częściowo determinowana przez polimorfizm genów kontrolujących między innymi szlaki metaboliczne. Ten właśnie polimorfizm może być przyczyną dramatycznych i nieprzewidywalnych efektów farmakologicznych. Linder i Valdes zwracają uwagę na fakt, iż polimorfizm genetyczny może selektywnie wpływać na odpowiedź farmakodynamiczną po zastosowaniu danego leku [13]. Zbadanie tych polimorfizmów, a w konsekwencji ustalenie wrażliwości osobniczej na dany lek, dałoby możliwość wyjaśniania przyczyny zgonu w sytuacji, gdy analiza chemiczno-toksykologiczna wykazuje obecność leku w stężeniach powszechnie uznawanych za terapeutyczne.

W badaniach toksykologicznych częstym i praktycznie zasadniczym problemem jest wykrycie ksenobiotyku, co zwykle wiąże się z jego obecnością w bardzo małych stężeniach lub nawet nieobecnością w badanym materiale (wynikająca z np. szybkiej eliminacji). Zwykle jednak, mimo nieobecności ksenobiotyku w organizmie, pozos-

tają skutki jego działania. W zależności od rodzaju trucizny mogą to być zmiany makro- lub mikroskopowe, ale także skutki w postaci zmian w materiale genetycznym. W takiej sytuacji ustalenie specyficznych interakcji różnorodnych substancji (np. leków) z materiałem genetycznym dałoby możliwość potwierdzania wcześniejszej obecności danego ksenobiotyku w organizmie. Brown i in. wykorzystali badanie DNA do oceny toksycznego działania dymu tytoniowego na płuca szczurów [3]. Autorzy podkreślają, że choć badania histopatologiczne z pewnością nadal będą stanowiły podstawową metodę oceny szkodliwości omawianego czynnika, to poprzez oznaczanie adduktów DNA w drogach oddechowych (z użyciem przeciwciał monoklonalnych lub z wykorzystaniem spektrometrii mas), wykrywanie aberracji chromosomowych w makrofagach pęcherzyków płucnych oraz badanie syntezy DNA w wyściółce nabłonkowej małżowin nosowych, możliwe jest badanie szkodliwego działania omawianego czynnika. Zwłaszcza, że techniki toksykologii molekularnej stosowane do oceny zmian na poziomie komórkowym i molekularnym są bardziej czułe niż tradycyjne metody histopatologiczne. Wiadomo, że wiele substancji chemicznych powoduje wystąpienie zaburzeń strukturalnych bądź funkcjonalnych w obrębie materiału genetycznego. Przykładem może być parakwat – znany herbicyd, który wywołuje aberracje chromosomowe u myszy [21]. Ustalenie takich oddziaływań dałoby możliwość potwierdzania działania określonego ksenobiotyku mimo braku możliwości wykrycia go metodami chemicznymi. Jedynym warunkiem jest to, by oddziaływania te były specyficzne.

Poszukiwanie charakterystycznych interakcji ksenobiotyków z materiałem genetycznym, badanie wpływu substancji chemicznych na ekspresję genów oraz poszukiwanie polimorfizmów genetycznych może dostarczyć toksykologom wielu ważnych informacji wyjaśniających mechanizm zatrać. Może być także niezwykle pomocnym narzędziem w ocenie stopnia narażenia, w diagnostyce zarówno ostrych, jak i przewlekłych zatrać, które nierzadko są przyczyną zgonu i są trudne do zdiagnozowania tradycyjnymi metodami analitycznymi stosowanymi w toksykologii.

PODSUMOWANIE

W literaturze przedmiotu brakuje danych wskazujących na bezpośrednie zastosowanie badań toksykogenetycznych i farmakogenetycznych w toksykologii sądowej i z pewnością w chwili obecnej tego typu badania nie są stosowane rutynowo. Jednak w świetle przytoczonych osiągnięć w poznawaniu mechanizmów toksycznego działania związków chemicznych na poziomie molekularnym oraz wpływu polimorfizmu genetycznego na odpowiedź organizmu na dany ksenobiotyk można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości toksykologia sądowa sięgnie do omawianych metod.

Przedstawione dane zachęcają do wdrażania technik biologii molekularnej do toksykologii z kilku powodów:

- Po pierwsze, materiał genetyczny jest bardzo wiarygodnym markerem pozwalającym jednoznacznie określić przynależność gatunkową i osobniczą.
- Niewielka ilość dostarczonego materiału roślinnego nie jest przeszkodą do pomyślnego przeprowadzenia badań identyfikacyjnych, o czym świadczyć może fakt, iż dzięki analizie materiału genetycznego możliwe jest wykrycie śladów *Cannabis* na skórze [28].

- Analizie można poddać zarówno materiał świeży, jak i wysuszony oraz dowolnie rozdrobniony.
- Analiza DNA umożliwia określenie przynależności nie tylko gatunkowej, ale także określenie typu, odmiany czy formy roślin, których obrót jest nielegalny. Dzięki temu możliwe jest pozyskanie niezwykle istotnych dla organów ścigania informacji, takich jak geograficzne pochodzenie zabezpieczonego materiału, a w konsekwencji ustalanie szlaków przemytniczych i dróg dystrybucji na terenie kraju.
- Przy niskich stężeniach substancji toksycznych, nie dających się oznaczyć tradycyjnymi metodami, poszukiwanie specyficznych interakcji z materiałem genetycznym stworzyłyby możliwość diagnozowania zatrucia.
- W przypadku szybkiej eliminacji ksenobiotyku z organizmu określenie specyficznych uszkodzeń DNA umożliwi potwierdzenie wcześniejszej obecności danej substancji w ustroju.