



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τίτλος διπλωματικής εργασίας:

**Η ανάλυση του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού στη δικανική
τοξικολογία**

Καψάλη Θεοδώρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

**Δρ. Κοβάτση Λήδα
Ιατροδικαστής
Καθηγήτρια ΑΠΘ**

Λάρισα 2025



**UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

MSC TOXICOLOGY

Thesis:

**The analysis of Cerebrospinal Fluid in forensic
toxicology**

Kapsali Theodora

Supervising professor:

Dr. Kovatsi Leda

Larisa 2025

Τριμελής Επιτροπή:

- Κοβάτση Λήδα (επιβλέπουσα), Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας-Τμήμα Ιατρικής ΑΠΘ.
- Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας
- Τσιτσιμπίκου Χριστίνα, Γενικό Χημείο Κράτους , Εθνικό γραφείο στήριξης REACH & CLP

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	7
1.2 Παραγωγή, Κυκλοφορία και Απορρόφηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού	8
1.3 Σύσταση του εγκεφαλονωτιαίου Υγρού	9
1.4 Ο ρόλος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.....	10
2. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ως εναλλακτικό βιολογικό δείγμα στη Δικανική Τοξικολογία	11
2.1 Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα	11
2.2 Μεταθανάτια ανακατανομή	12
2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των εναλλακτικών δειγμάτων- εγκεφαλονωτιαίου υγρού.....	12
2.4 Συλλογή εγκεφαλονωτιαίου υγρού	13
2.5 Μέθοδοι ανάλυσης του ΕΝΥ στη δικανική τοξικολογία	15
3. Εφαρμογές χρήσης του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού στη δικανική τοξικολογία.....	16
3.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αιθανόλης.....	16
Ο ρόλος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού(ΕΝΥ) στον προσδιορισμό της μεταθανάτιας συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα	18
3.2 Θεραπευτικά φάρμακα και παράνομες ουσίες.....	22
3.3 Case reports.....	27
4. Νέες μέθοδοι για τον προσδιορισμό ξеноβιοτικών ουσιών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό	35
4.1 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας μεθόδου UHPLC-DAD για την ανάλυση άτυπων αντιψυχωσικών σε πλήρες αίμα, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό μετά από SPE.	35
4.2 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας απλής μεθόδου HPLC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης και δύο αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης στα μαλλιά, τα νύχια και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.	36
4.3 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών ξеноβιοτικών ουσιών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό	37
4.4 Ανάπτυξη και Επικύρωση μεθόδου UHPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό του γ-υδροξυβουτυρικού οξέος (GHB), πρόδρομων ουσιών και μεταβολιτών του σε διαφορετικά δείγματα	39
5. Επίλογος	41
6. Βιβλιογραφία.....	42

Περίληψη

Στη δικανική τοξικολογία είναι πολύ συχνή η χρήση εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων τόσο στην περίπτωση που τα συμβατικά δείγματα δεν είναι διαθέσιμα, αλλά και για την παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών σχετικά με τα αίτια του θανάτου. Μεταξύ άλλων, στα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα περιλαμβάνεται και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό περιβάλλει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό των σπονδυλωτών, και ο ρόλος του είναι η προστασία, η διατήρηση της ομοιόστασης, η παροχή απαραίτητων ουσιών και η εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Το ΕΝΥ μπορεί να περιέχει ποσότητα φαρμάκων, τοξικών ουσιών ή άλλων χημικών που χρησιμοποιούνται σε εγκληματικές πράξεις και σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων και αυτοκτονιών. Έτσι, η ανάλυσή του μπορεί να παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό της αιτίας του θανάτου. Μέσω εξειδικευμένων μεθόδων, είναι δυνατή η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ουσιών στο ΕΝΥ. Περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίες, καθώς οι ήδη υπάρχουσες παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους, που σχετίζονται, μεταξύ άλλων, με την περιοχή της δειγματοληψίας(κοιλίες του εγκεφάλου, νωτιαίος μυελός) και με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Σκοπός είναι να ενισχυθεί ο ρόλος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στη δικανική τοξικολογία, ώστε μέσω των πληροφοριών που αντλούνται από την ανάλυσή του, να είναι δυνατή η ασφαλής πρόβλεψη των επιπέδων των ουσιών σε άλλα σωματικά υγρά, όπως στο αίμα, και η ανάλυσή του να είναι σε μεγάλο βαθμό επαρκής για τη διαμόρφωση ιατροδικαστικής γνώμης. Η έρευνα του ΕΝΥ στο πεδίο της δικανικής τοξικολογίας συνεισφέρει στη διαλεύκανση εγκλημάτων σε νομικές υποθέσεις. Στην παρούσα εργασία για το εγκεφαλονωτιαίο υγρό παρατίθενται στοιχεία από μελέτες σχετικά με τη χρήση του για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ξеноβιοτικών ουσιών, πραγματικά περιστατικά αυτοψιών στις οποίες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και ανάλυσή του, καθώς και ορισμένες νέες τεχνικές για την αξιοποίησή του στη δικανική τοξικολογία.

Abstract

In forensic toxicology, the use of alternative biological samples is common when classical samples are unavailable and to provide supplementary information regarding the cause of death. Among other samples, cerebrospinal fluid (CSF) is also considered an alternative biological sample. CSF surrounds the brain and spinal cord of all vertebrates, and its role is to provide protection, maintain homeostasis, supply essential substances, and ensure the proper functioning of the Central Nervous System (CNS). CSF may contain drugs, toxic substances, or other chemicals that are used in crimes or in cases of poisoning and suicides. Therefore, its analysis provides crucial information for determining the cause of death or the occurrence of a toxic reaction in the body. Through specialized methods, it is possible to detect, identify, and quantify substances in CSF. More studies are needed, as existing ones show differences that relate to factors such as the sampling area (brain ventricles, spinal cord) and the methods used for qualitative and quantitative analysis. The aim is to strengthen its role in forensic toxicology so that, through the information obtained from CSF analysis, the levels of substances in other bodily fluids, such as blood, can be accurately predicted, and the analysis can be largely sufficient for forming a forensic opinion. Research on CSF in forensic toxicology contributes to the resolution of crimes and the accurate diagnosis of toxic manifestations in legal cases. In the present paper on cerebrospinal fluid, data from studies are presented regarding its use for the detection and quantification of xenobiotic substances, as well as real-life autopsy cases in which sampling and analysis of CSF were performed and some new techniques for its utilization in forensic toxicology.

1. Εισαγωγή

Στη δικανική τοξικολογία, τα εναλλακτικά βιολογικά δείγματα αποτελούν πολύτιμη πηγή πληροφοριών, ιδίως όταν τα συμβατικά δείγματα (αίμα, ούρα) δεν είναι διαθέσιμα ή κατάλληλα για ανάλυση, αλλά μπορούν να έχουν και συμπληρωματικό ρόλο για την ενίσχυση και επιβεβαίωση άλλων ιατροδικαστικών ευρημάτων. Εναλλακτικά δείγματα αποτελούν τα μαλλιά, τα νύχια, το σάλιο, ο ιδρώτας, το υαλοειδές υγρό, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και άλλα. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό συχνά χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις προχωρημένης αποσύνθεσης, καθώς είναι λιγότερο επιρρεπές σε προσβολή από βακτήρια και σε μεταθανάτιες μεταβολές. Η ανάλυσή του παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τοξικών ουσιών, φαρμάκων ή μεταβολιτών, ειδικά όταν οι ουσίες αυτές επηρεάζουν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ).[1] Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες εστιάζουν στην ανάπτυξη επικυρωμένων μεθόδων ανάλυσης του ENY με σκοπό τη βελτίωση της αξιοπιστίας του ως βιολογικό δείγμα, ώστε η ανάλυσή του να είναι καθοριστική για την πορεία της έρευνας απουσία σημαντικών ιατροδικαστικών στοιχείων.

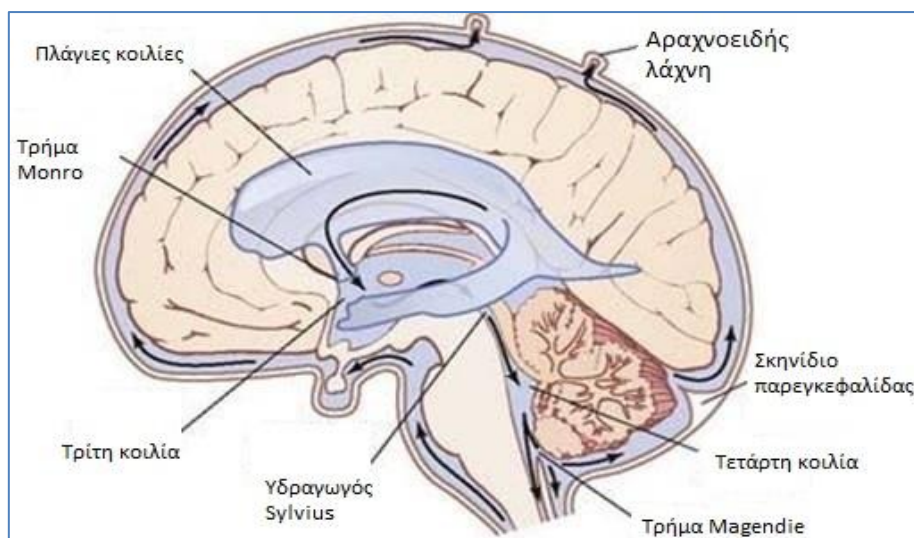
1.1 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι ένα υπερδιήθημα πλάσματος που βρίσκεται στις κοιλίες του εγκεφάλου καθώς και στους υπαραχνοειδείς χώρους του κρανίου και της σπονδυλικής στήλης. Εκτελεί ζωτικές λειτουργίες, όπως την παροχή θρεπτικών ουσιών στον εγκέφαλο, την απομάκρυνση των τοξινών και την προστασία του εγκεφάλου από τραυματισμούς. Η συνολική ποσότητα του ENY σε έναν ενήλικα υπολογίζεται γύρω στα 150 ml, εκ των οποίων τα 125 ml βρίσκονται στους υπαραχνοειδείς χώρους και τα υπόλοιπα 25 ml στις κοιλίες του εγκεφάλου. Το μεγαλύτερο μέρος του ENY παράγεται από το χοριοειδές πλέγμα, ενώ υπάρχουν και άλλες μικρότερης σημασίας πηγές. Στους ενήλικες, η παραγωγή του ENY κυμαίνεται από 400 έως 600 ml την ημέρα. Αυτή η συνεχής παραγωγή εξασφαλίζει την πλήρη ανανέωση του ENY περίπου τέσσερις με πέντε φορές την ημέρα στον μέσο ενήλικα. Μειωμένη λειτουργία του ENY μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μεταβολιτών, κάτι που παρατηρείται σε προχωρημένη ηλικία και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η σύνθεση του ENY ρυθμίζεται αυστηρά και οποιαδήποτε αλλαγή μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για διαγνωστικούς σκοπούς.[2]

1.2 Παραγωγή, Κυκλοφορία και Απορρόφηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Τα δύο τρίτα ή και περισσότερο από την ποσότητα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού προέρχεται με έκκριση από τα χοριοειδή πλέγματα που βρίσκονται στις τέσσερις κοιλίες του εγκεφάλου, και κυρίως στις δύο πλάγιες κοιλίες. Το χοριοειδές πλέγμα είναι ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο, απλό, κυβοειδές επιθήλιο, συνεχές, με επενδυματικά κύτταρα που επενδύουν τις κοιλίες του εγκεφάλου. Αυτό το απλό κυβοειδές επιθήλιο περιβάλλει συστάδες τριχοειδών αγγείων που επιτρέπουν τη διήθηση του πλάσματος.[3] Τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος στην κορυφή τους περιέχουν πυκνές μικρολάχνες. Διασυνδέονται μέσω στενών συνδέσεων, δημιουργώντας ένα φράγμα αίματος-ENY που βοηθά στον έλεγχο της σύνθεσης του ENY.[4] Επιπρόσθετα ποσά υγρού εκκρίνονται από όλες τις επενδυματικές επιφάνειες των κοιλιών και της αραχνοειδούς μήνιγγας, ενώ μια επιπλέον μικρή ποσότητα προέρχεται από τον ίδιο τον εγκέφαλο, από τον περιαγγειακό χώρο, ο οποίος περιβάλλει τα αιμοφόρα αγγεία που εισδύουν στον εγκέφαλο.[5]

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η κύρια κατεύθυνση ροής του υγρού από τα χοριοειδή πλέγματα και, στη συνέχεια από το σύστημα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Το υγρό που εκκρίνεται στις πλάγιες κοιλίες και στην τρίτη κοιλία, φέρεται με τον υδραγωγό του Sylvius προς την τέταρτη κοιλία, όπου και προστίθεται σε αυτό ένα ακόμα μικρό ποσό υγρού. Στη συνέχεια, εξέρχεται από την τέταρτη κοιλία από τρία τρήματα, τα δύο πλάγια τρήματα του Luschka και το τρήμα του Magendie, κατά τη μέση γραμμή, και εισέρχεται την παρεγκεφαλιδονωτιαία δεξαμενή, που αποτελεί ένα μεγάλο χώρο γεμάτο με εγκεφαλονωτιαίο υγρό, που βρίσκεται πίσω από τον προμήκη και κάτω από την παρεγκεφαλίδα. Η δεξαμενή αποτελεί συνέχεια του υπαραχνοειδούς χώρου, που περιβάλλει ολόκληρο τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Από εκεί, ολόκληρη σχεδόν η ποσότητα του ENY ρέει προς τα άνω, μέσα από αυτόν τον χώρο, προς τον εγκέφαλο. Από τον υπαραχνοειδή χώρο του εγκεφάλου το υγρό φέρεται προς πολλαπλές αραχνοειδείς λάχνες που προεξέχουν στο μείζονα οβελιαίο φλεβικό κόλπο, και σε άλλους φλεβικούς κόλπους. Τελικά, το υγρό αυτό αποχετεύεται προς το φλεβικό αίμα από την επιφάνεια αυτών των λαχνών.[1][5]



Σχήμα: Η ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού από τα χοριοειδή πλέγματα των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου προς τις αραχνοειδείς λάχνες που προεξέχουν στους φλεβώδεις κόλπους της σκληράς μήνιγγας.[5]

1.3 Σύσταση του εγκεφαλονωτιαίου Υγρού

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι διήθημα πλάσματος αίματος και αποτελείται κυρίως από νερό (99%), με το υπόλοιπο 1% να περιλαμβάνει πρωτεΐνες, ιόντα, νευροδιαβιβαστές και γλυκόζη. Η χημική του σύνθεση και οι φυσικές του ιδιότητες είναι εν μέρει παρόμοιες με το πλάσμα, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε νερό, της ωσμωτικότητας και του pH. Χαρακτηρίζεται, ωστόσο, από χαμηλότερη περιεκτικότητα σε κυτταρικά συστατικά και πρωτεΐνες, καθώς και διαφορετική σύνθεση ηλεκτρολυτών από εκείνη του πλάσματος. Το ENY έχει υψηλότερη συγκέντρωση νατρίου, χλωρίου και μαγνησίου, αλλά χαμηλότερη συγκέντρωση καλίου και ασβεστίου. Σε αντίθεση με το πλάσμα, το ENY περιέχει μόνο ίχνη κυττάρων, πρωτεϊνών και ανοσοσφαιρινών. Κανένα κύτταρο δεν μπορεί να περάσει από τον φραγμό αίματος-ENY, αν και μικροί αριθμοί λευκών αιμοσφαιρίων συνήθως εισάγονται έμμεσα στο ENY. Ο φυσιολογικός αριθμός κυττάρων του ENY είναι χαμηλότερος από 5 κύτταρα/ml.[4] Παρά τις αλλαγές στη σύνθεση και τη ροή του αίματος, η σύνθεση του ENY διατηρείται σταθερή, γεγονός που παρέχει ένα σταθερό περιβάλλον για τη διατήρηση της φυσιολογικής νευρωνικής λειτουργίας.[2] Η περιεκτικότητα του ENY σε κυτταρικά συστατικά και ηλεκτρολύτες συχνά διαφέρει ανάλογα με την περιοχή συλλογής του. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση της σφαιρίνης και της λευκωματίνης είναι χαμηλότερη στο ENY που λαμβάνεται από τις κοιλίες του εγκεφάλου σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται από τον νωτιαίο μυελό. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, το συνολικό ιξώδες και η επιφανειακή τάση του ENY μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με την παθολογία.[1][6]

1.4 Ο ρόλος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Ο ρόλος του Εγκεφαλονωτιαίου υγρού είναι πολύ σημαντικός για την προστασία και την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος(ΚΝΣ).

- Πλευστότητα: το ΕΝΥ επιτρέπει στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό να αποκτήσουν άνωση, μειώνοντας το βάρος του εγκεφάλου από τα κανονικά του 1.500gr σε 50gr. Ο εγκέφαλος έτσι υφίσταται σε ουδέτερη πλευστότητα, η οποία του επιτρέπει να διατηρήσει την πυκνότητά του, χωρίς να επηρεάζεται από το βάρος του, που θα διέκοπτε την παροχή αίματος και θα προκαλούσε εκφυλισμό των νευρώνων στα χαμηλότερα τμήματα. Η μείωση του βάρους, παράλληλα, μειώνει τη δύναμη που εφαρμόζεται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και στα εγκεφαλικά αγγεία κατά τη διάρκεια μηχανικού τραυματισμού.
- Μηχανική προστασία: Το ΕΝΥ παρέχει υδρομηχανική προστασία του εγκεφάλου σε περιπτώσεις τραυματισμών. Λειτουργεί ως αντικραδασμική ασπίδα, προστατεύοντας τον εγκέφαλο από «σύγκρουση» με το κρανίο. Σε περιπτώσεις έντονου τραυματισμού, όπως σε ατυχήματα αυτοκινήτου ή αθλητικούς τραυματισμούς, το ΕΝΥ δεν μπορεί να προστατεύσει τον εγκέφαλο από την επαφή με το κρανίο, προκαλώντας αιμορραγία, εγκεφαλική βλάβη, και μερικές φορές το θάνατο.
- Παροχή θρεπτικών συστατικών- Απέκκριση παραπροϊόντων μεταβολισμού- διατήρηση ομοιόστασης: Ο κύριος αγωγός παροχής θρεπτικών συστατικών στον εγκέφαλο είναι ο σύνδεσμος Χοριοειδές πλέγμα- ΕΝΥ- Εξωκυττάριος χώρος εγκεφάλου (CP-CSF-ECSB). Τα βιοχημικά υποστρώματα που χρειάζεται ο εγκέφαλος μεταφέρονται από το αίμα, μέσω του χοριοειδούς πλέγματος, στο ΕΝΥ και στη συνέχεια διαχέονται στο διάμεσο χώρο για μεταφορά στις θέσεις δράσης τους εντός του εγκεφάλου. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπει και την ομοιοστατική ρύθμιση της κατανομής των νευροενδοκρινικών παραγόντων, η διαταραχή της οποίας προκαλεί βλάβες, όπως στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ένα σταθερό περιβάλλον είναι επιτακτική ανάγκη για τη διατήρηση της φυσιολογικής νευρωνικής λειτουργίας. Το ΕΝΥ βοηθά επίσης στην απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού του εγκεφάλου, όπως προϊόντα υπεροξειδωσης, γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, περίσσεια νευροδιαβιβαστών, βακτήρια, ιούς και άλλα περιττά μόρια. Η συσσώρευση τέτοιων περιττών μορίων, που παρατηρείται στη γήρανση και σε ορισμένες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, έχει αρνητική επίδραση στη λειτουργία του εγκεφάλου.
- Πρόληψη της ισχαιμίας του εγκεφάλου: Η πρόληψη της ισχαιμίας του εγκεφάλου γίνεται με μείωση της ποσότητας του ΕΝΥ στον περιορισμένο χώρο

στο εσωτερικό του κρανίου. Αυτό μειώνει την ολική ενδοκρανιακή πίεση και διευκολύνει την αιμάτωση. [1][2][4][7]

2. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ως εναλλακτικό βιολογικό δείγμα στη Δικανική Τοξικολογία

2.1 Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα

Σε μία ιατροδικαστική εξέταση, κρίσιμο βήμα είναι η επιλογή των κατάλληλων βιολογικών δειγμάτων που θα εξασφαλιστούν για ανάλυση. Το πρωταρχικό βιολογικό υλικό που πρέπει να ληφθεί είναι το περιφερικό αίμα, το οποίο λαμβάνεται απευθείας από τη μηριαία φλέβα. Δυστυχώς, υπό ορισμένες συνθήκες, δεν είναι δυνατή η συλλογή αίματος, για παράδειγμα, όταν έχει υπάρξει εκτεταμένος τραυματισμός.[8] Συνήθη βιολογικά δείγματα εκτός του περιφερικού αίματος από τη μηριαία φλέβα, είναι το αίμα από την καρδιά, τα ούρα, το περιεχόμενο χοληδόχου κύστης, το γαστρικό περιεχόμενο και ιστοτεμάχια από βασικά όργανα όπως το ήπαρ και οι νεφροί. Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα μπορεί να είναι το αρθρικό υγρό, το περικαρδιακό υγρό, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το υδατοειδές υγρό, εκκρίσεις (σίδος, ιδρώτας, δάκρυα), τρίχες, όνυχες και άλλα (θρόμβοι, αιματώματα). Οι παράγοντες που σχετίζονται με τη σωστή επιλογή των δειγμάτων είναι αφενός ο σκοπός της έρευνας (ποιοι αναλύτες είναι θεμιτό να προσδιοριστούν), η χρονική περίοδος που παρήλθε από το θάνατο (όταν είναι γνωστή), η κατάσταση που βρίσκεται το σώμα, αν δηλαδή είναι σε προχωρημένη σήψη ή αντίστοιχα αν υπάρχουν βαρείς τραυματισμοί, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία). Τα εναλλακτικά βιολογικά υλικά συλλέγονται σπάνια, συνήθως σε ειδικές περιστάσεις θανάτου που υποδεικνύουν την ανάγκη συλλογής πρόσθετου υλικού, είτε, όπως προαναφέρθηκε, σε περιπτώσεις που τα πρωταρχικά δείγματα είναι ελλιπή ή αλλοιωμένα, είτε για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος που προκύπτει από αυτά.[1] Συνήθως, η συγκέντρωση μιας ουσίας στο μεταθανάτιο αίμα χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο ρόλος της στο θάνατο, υποθέτοντας ότι είναι αντιπροσωπευτική και για την περιοχή δράσης της ουσίας. Η συνθήκη αυτή, ωστόσο, δε λαμβάνει υπόψιν της δεδομένα τοξικοκινητικής και φαρμακοκινητικής της ουσίας που σχετίζονται με την κυκλοφορία, την απορρόφηση, την κατανομή όσο το άτομο είναι εν ζωή και τη μεταθανάτια ανακατανομή της.[9] Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα στοιχεία που συλλέγονται από την ανάλυση των πρωταρχικών βιολογικών υλικών να είναι ελλιπή και να οδηγούν ορισμένες φορές σε εσφαλμένη ερμηνεία για τη συμβολή μιας ουσίας στο θάνατο.

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ουσιών σε διαφορετικά υποστρώματα είναι συχνά απαραίτητη για να προσδιοριστεί η πραγματική αιτία του θανάτου.[1][9][10]

2.2 Μεταθανάτια ανακατανομή

Τα επίπεδα ξενοβιοτικών (φαρμάκων και άλλων ουσιών) που μετρώνται στο αίμα μετά το θάνατο δεν αντανakλούν πάντα τα επίπεδα που υπήρχαν στον οργανισμό τη στιγμή του θανάτου. Εξαρτώνται από το ανατομικό σημείο λήψης του αίματος και τις μεταθανάτιες αλλαγές που επηρεάζουν τη διάχυση των ουσιών, οι οποίες εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητές τους, οι συνθήκες του περιβάλλοντος στις οποίες παρέμεινε το πτώμα και ο χρόνος που παρήλθε από τη στιγμή του θανάτου. Οι κύριοι μηχανισμοί μεταθανάτιας ανακατανομής των φαρμάκων περιλαμβάνουν τη διάχυση από όργανα που συγκεντρώνουν υψηλές ποσότητες αυτών (π.χ. ήπαρ), τη διάχυση από το γαστρικό περιεχόμενο και τη συσσώρευση σε τοπικές περιοχές (π.χ. από ένεση ή επιθέματα). Για την ιατροδικαστική τοξικολογία, η μεταθανάτια ανακατανομή συχνά αξιολογείται με τη σχέση συγκέντρωσης φαρμάκου μεταξύ αίματος από την καρδιά και περιφερικού αίματος. Η επίδραση της ανακατανομής στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι λιγότερο κατανοητή, αλλά σε γενικές γραμμές το ENY μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστο υλικό για τη μελέτη αυτής της διαδικασίας εάν δεν υπάρχει επιμόλυνση από αίμα και αν δεν έχει περάσει πολύς χρόνος από το θάνατο.[1][8]

2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των εναλλακτικών δειγμάτων- εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Η χρήση εναλλακτικών δειγμάτων στον τομέα της τοξικολογίας περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979, όταν χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση τριχών της κεφαλής για την τεκμηρίωση της χρόνιας έκθεσης σε φάρμακα. Έκτοτε, η χρήση των εναλλακτικών δειγμάτων έχει αποκτήσει τεράστια σημασία στην ιατροδικαστική τοξικολογία, καθώς και στην κλινική τοξικολογία και στον έλεγχο ντόπινγκ.[11]

Τα εναλλακτικά δείγματα παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά (αίμα, ούρα) που χρησιμοποιούνται συνήθως στη δικανική τοξικολογία. Η νοθεία τους είναι δύσκολη και πολλές φορές μπορούν να δώσουν περισσότερες πληροφορίες για τη δράση ουσιών στον οργανισμό, όπως παραδείγματος χάριν το ENY που πολλές φορές είναι πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα για φάρμακα που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό σύστημα. Παράλληλα, κάποια από αυτά (όπως το ENY) είναι προστατευμένα σε κοιλότητες και έτσι η αλλοίωσή τους και η προσβολή από

βακτήρια είναι πιο δύσκολη, καθώς το περιεχόμενο τους επηρεάζεται πιο δύσκολα από φαινόμενα μεταθανάτιας ανακατανομής και σήψης.[11] Ορισμένα από αυτά παρέχουν στοιχεία για έκθεση σε ουσίες σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα από τη στιγμή του θανάτου, όπως οι τρίχες που μπορούν να δώσουν πληροφορίες ακόμα και για πολυετή έκθεση σε μία ουσία ανάλογα με το μήκος τους. Το ENY είναι ένα βιολογικό δείγμα αρκετά προστατευμένο, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες ακόμα και σε προχωρημένη σήψη και είναι ιδανικό για τον προσδιορισμό ουσιών και φαρμάκων που επιδρούν στον εγκέφαλο, καθώς, όπως προαναφέρθηκε, είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της ομοιόστασης στο περιβάλλον του εγκεφαλικού ιστού. [1][8][9][11]

Τα βασικά μειονεκτήματα των εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων είναι συνήθως ο περιορισμένος όγκος συλλογής τους και οι μικρές συγκεντρώσεις των ξενοβιοτικών ουσιών, ανάλογα πάντα και με το χρόνο μεταξύ της πρόσληψης αυτών και του θανάτου. Σε πολλές περιπτώσεις, η συλλογή του ENY είναι δύσκολη ή ακόμη και αδύνατη, ειδικά σε άτομα με νευρολογικές παθήσεις ή σε θύματα με σοβαρές κρανιακές κακώσεις. Επίσης, υπάρχουν ηθικά και νομικά ζητήματα γύρω από την εκτέλεση αυτής της διαδικασίας, ειδικά σε περίπτωση θανόντων. Παράλληλα, συνήθως η ποσότητα του ENY που μπορεί να ληφθεί είναι περιορισμένη, και η επαναληψιμότητα της συλλογής είναι εξαιρετικά δύσκολη. Αυτό καθιστά την ανάλυση πιο δύσκολη, καθώς η ποσότητα που συλλέγεται μπορεί να μην είναι αρκετή για να διεξαχθούν πολλαπλές ή επαναλαμβανόμενες εξετάσεις. Ως εκ τούτου, απαιτούνται τεχνικές υψηλής ευαισθησίας για την ολοκλήρωση της ανάλυσης. Τέλος, παράγοντες όπως η ηλικία, η γενική κατάσταση της υγείας του ατόμου, η χορήγηση φαρμάκων και η παρουσία άλλων ουσιών στον οργανισμό μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση και την ποσότητα του ENY καθιστώντας το λιγότερο αξιόπιστο για ορισμένες αναλύσεις. [11]

2.4 Συλλογή εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Οι περιοχές από τις οποίες μπορεί να γίνει η συλλογή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού για τη χρήση του στη δικανική τοξικολογία είναι το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου και ο νωτιαίος μυελός. Κατά τη χρήση του ENY στη δικανική τοξικολογία πρέπει να δίνεται σημαντική προσοχή στην περιοχή από την οποία θα γίνει η συλλογή του δείγματος, καθώς, όπως προαναφέρθηκε, μεταξύ αυτών υπάρχουν ορισμένες διαφορές. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό που συλλέγεται από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου διαφέρει στη βιοχημική σύνθεση από αυτό που συλλέγεται από το νωτιαίο μυελό. Δεν αντιπροσωπεύει το επίπεδο των ηλεκτρολυτών σε κανένα άλλο

σωματικό υγρό, καθώς έχει διαφορετική σύσταση, η οποία θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.[6] Παράλληλα, είναι λιγότερο απομονωμένο σε σχέση με το ENY που περιβάλλει το νωτιαίο μυελό και επομένως υφίσταται μεγαλύτερες μεταθανάτιες αλλαγές, ενώ είναι πιο πιθανή η επιμόλυνσή του με αίμα από τα αγγεία (για παράδειγμα σε περιπτώσεις ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας) και κατ' επέκταση η μόλυνσή του με βακτήρια (που μέσω μεταβολισμού μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή ουσιών που μπορεί να παρεμποδίσουν τη λήψη σωστών αποτελεσμάτων). Τέλος, ο εγκεφαλικός ιστός αποσυντίθεται αμέσως μετά το θάνατο. Μερικές φορές, η συλλογή καθαρού ENY από τις κοιλίες δεν είναι δυνατή λόγω της επίδρασης της σήψης επί του εγκεφαλικού ιστού.[1][6][8]

Λήψη ENY από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου

Ένας εύκολος τρόπος λήψης του ENY είναι η υποϊνιακή παρακέντηση. Μετά την κάμψη του λαιμού με το πηγούνι στο στήθος, γίνεται παρακέντηση προς τη γέφυρα της μύτης (η βελόνα περνά διαδοχικά από το δέρμα, τον υποδόριο ιστό και την οπίσθια ινιακή μεμβράνη). Η βελόνα εισάγεται στο χώρο της παρεγκεφαλομυελικής δεξαμενής μετά από διάτρηση της ινιακής μεμβράνης σε βάθος περίπου 2 εκατοστών, και από εκεί συλλέγεται το ENY. Όταν συλλέγεται υγρό με υποϊνιακή παρακέντηση, υπάρχει σχετικά χαμηλός κίνδυνος μόλυνσης του δείγματος με αίμα. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί επίσης να ληφθεί από τις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου. Μετά το άνοιγμα της κρανιακής κοιλότητας, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό λαμβάνεται απευθείας εισάγοντας τη βελόνα μέσα στην πλάγια κοιλία. Δείγμα επίσης μπορεί να ληφθεί από την τρίτη κοιλία αφαιρώντας τον εγκέφαλο από το κρανίο και τρυπώντας τον στη βάση, εισάγοντας τη βελόνα κάθετα σε βάθος περίπου 10-20 χιλιοστών στο πίσω μέρος της μαστοειδούς απόφυσης. Υπάρχουν επίσης τρόποι συλλογής όπως η παρακέντηση της σκληράς μήνιγγας μεταξύ των ημισφαιρίων ή η συλλογή υγρού από τις πλάγιες κοιλίες. [1][12][13]

Λήψη ENY από το νωτιαίο μυελό

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό από το νωτιαίο μυελό μπορεί να ληφθεί μέσω τυπικής οσφυονωτιαίας παρακέντησης όπως αυτή πραγματοποιείται σε ζωντανούς ανθρώπους, με την εισαγωγή μιας βελόνας στον υπαραχνοειδή χώρο της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης μεταξύ του τέταρτου και πέμπτου σπονδύλου, τρυπώντας διαδοχικά τον κίτρινο σύνδεσμο της σπονδυλικής στήλης, τη σκληρά μήνιγγα και το νωτιαίο μυελό. Η δειγματοληψία είναι καλύτερο να γίνεται στην αρχή της νεκροτομής καθώς η λήψη πραγματοποιείται από την ραχιαία επιφάνεια του σώματος. Υπάρχει επίσης μια μέθοδος συλλογής ENY από την οσφυϊκή χώρα, με πρόσθια προσπέλαση. Μετά την αφαίρεση των οργάνων του θώρακα και της κοιλιάς, γίνεται παρακέντηση μέσω του μεσοσπονδύλιου δίσκου μεταξύ των σπονδύλων και λαμβάνεται το ENY. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται

λιγότερο συχνά, επειδή κατά τη διάρκεια της ιατροδικαστικής διερεύνησης, δεν αφαιρούνται πάντα όλα τα όργανα. Επιπλέον, εγκυμονεί κινδύνους για την καθαρότητα του δείγματος, καθώς είναι πιο πιθανό να επιμολυνθεί με αίμα. Μια άλλη μέθοδος συλλογής ENY είναι η προσεκτική αναρρόφησή του με μια μακριά βελόνα από το νωτιαίο κανάλι μετά το άνοιγμα του κρανίου και την αφαίρεση του εγκεφάλου. Αυτή η διαδικασία φαίνεται να είναι μια από τις απλούστερες και ταχύτερες, αλλά ενέχει επίσης κίνδυνο επιμόλυνσης του ENY με αίμα.[1][8][13][14]

Η μόλυνση του ENY με αίμα μπορεί, δυστυχώς, να οδηγήσει στη μεταβολή της συγκέντρωσης των ξеноβιοτικών ουσιών και την προσβολή του από βακτήρια που πιθανώς να έχουν αναπτυχθεί στο μεταθανάτιο αίμα. Ωστόσο, ελλείψει άλλων σωματικών υγρών, ακόμη και τέτοια δείγματα μπορεί να είναι πολύτιμα λόγω της δυνατότητας ποιοτικής ανίχνευσης ουσιών που υπάρχουν στο αίμα και στο ENY την ώρα του θανάτου.[1]

2.5 Μέθοδοι ανάλυσης του ENY στη δικανική τοξικολογία

Όπως προαναφέρθηκε, το ENY συχνά συλλέγεται σε μικρές ποσότητες και παράλληλα η περιεκτικότητά του σε ορισμένες ουσίες μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή. Έτσι, για την ανάλυσή του είναι αναγκαίο να χρησιμοποιούνται μέθοδοι υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τις προς μέτρηση ουσίες. Παλαιότερα για τη μέτρηση της αιθυλικής αλκοόλης στο ENY χρησιμοποιούνταν η μέθοδος Windmark. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε διαβητικούς ασθενείς, να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι μη ειδική για την αιθανόλη, καθώς, ορισμένες άλλες ουσίες (για παράδειγμα αμίνες, αμίδια, αιθέρες, ακετόνη, κετονοσώματα), μπορούν να μειώσουν την αποτελεσματικότητα και την αξιοπιστία της.[1] Στα περισσότερα εργαστήρια, επί του παρόντος, χρησιμοποιείται μόνο η τεχνική Headspace Gas Chromatography (HS-GC), η οποία είναι εξειδικευμένη παραλλαγή της Αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) που αναλύει πτητικές ενώσεις απευθείας από τον υπερκείμενο χώρο (headspace) του δείγματος. Έτσι, απαιτεί λιγότερη επεξεργασία του δείγματος και καθίσταται εξαιρετική μέθοδος για ιδιαίτερα πτητικές ενώσεις, όπως η αιθανόλη. Όπως και η GC, μπορεί να ανιχνεύσει επιπλέον ενώσεις που συνδέονται με μικροβιακή δράση (π.χ. ισοπροπανόλη). Απαιτεί, ωστόσο, υψηλού κόστους εξοπλισμό, ενώ παράλληλα δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τα συγκριτικά αποτελέσματα αίματος και ENY που αναλύονται με αυτήν τη μέθοδο. Στην περίπτωση ανίχνευσης και προσδιορισμού φαρμάκων και ψυχοδραστικών ουσιών στο ENY, η ανάλυση πραγματοποιείται με υγρή και αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-

MS/MS και Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry, GC-MS αντίστοιχα). Οι δύο αυτές τεχνικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες.[1][8][14-23] Τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσονται καινούριες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας πολύ υψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών αναλυτών στο ίδιο δείγμα, μειώνοντας τον χρόνο της ανάλυσης και τον όγκο δείγματος που θα απαιτούνταν για τον προσδιορισμό διαφορετικών ουσιών αν γίνονταν ξεχωριστά. Η UHPLC είναι μια πιο εξελιγμένη έκδοση της HPLC και προσφέρει γρηγορότερες, πιο ακριβείς αναλύσεις με μεγαλύτερη ευαισθησία, αλλά απαιτεί πιο εξελιγμένο εξοπλισμό. Η παράλληλη χρήση ανιχνευτών υψηλής ευαισθησίας (DAD, MS/MS) αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, καθιστώντας τη σημαντικό εργαλείο σε τοξικολογικές αναλύσεις.[24-26] Για την προκατεργασία του βιολογικού υλικού, χρησιμοποιούνται ευρέως η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE). Δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των τεχνικών αυτών στο συγκεκριμένο βιολογικό υλικό. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από το ENY χαρακτηρίζονται από ελάχιστη επίδραση του υποστρώματος (matrix effect) που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα των μετρήσεων ειδικότερα σε ποσοτικές αναλύσεις. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, διότι σε άλλου είδους δείγματα που λαμβάνονται κατά τη νεκροτομή, η σύστασή τους μπορεί να έχει αλλοιωθεί ως αποτέλεσμα μεταθανάτιων διεργασιών. [1][8][14-23]

3. Εφαρμογές χρήσης του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού στη δικανική τοξικολογία

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) έχει ιδιαίτερο ρόλο ως εναλλακτικό υλικό στη δικανική τοξικολογία. Μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την παρουσία και τη συγκέντρωση τοξικών ουσιών, φαρμάκων και μεταβολιτών τους που εμπλέκονται σε περιπτώσεις θανάτων, δηλητηριάσεων ή εγκληματικών ενεργειών.

3.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αιθανόλης

Η αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη, είναι οργανική χημική ένωση με τον μοριακό τύπο C_2H_6O . Ανήκει στις ψυχοδραστικές ουσίες και η κατανάλωσή της σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει δηλητηρίαση.[27][28] Η μέθη που προκαλείται

από την κατανάλωση αιθανόλης είναι συχνά η αιτία για θανάτους από ατυχήματα, αυτοκτονίες και εγκληματικές ενέργειες όπως αποδεικνύεται από αστυνομικές αναφορές και αρχεία ατυχημάτων και επειγόντων περιστατικών.[8][27][29][30] Καθώς αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα σε πολλά τροχαία συμβάντα, στις περισσότερες χώρες έχουν θεσπιστεί αυστηροί νόμοι σχετικά με τα επιτρεπτά όρια της συγκέντρωσης αλκοόλης στο αίμα κατά την οδήγηση. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το άρθρο 42 του Κώδικα Οδικής Κυκλοφορίας, το επιτρεπτό όριο αιθανόλης ορίζεται στα 0,5 γραμμάρια ανά λίτρο αίματος, στην περίπτωση μέτρησης με την μέθοδο αιμοληψίας, ή 0,25 χιλιοστά του γραμμαρίου ανά λίτρο εκπνεόμενου αέρα, στην περίπτωση μέτρησης με αλκοολόμετρο, όρια τα οποία γίνονται ακόμα πιο αυστηρά σε ορισμένες περιπτώσεις όπως στους κατόχους επαγγελματικής άδειας οδήγησης.[31] Η αιθανόλη βρίσκεται στην κορυφή της λίστας των ψυχοδραστικών ουσιών που μελετώνται στη μεταθανάτια τοξικολογία και η ανάλυση και ερμηνεία της συγκέντρωσής της στο αίμα (Blood Alcohol Concentration, BAC) είναι συχνά καθοριστική για τον προσδιορισμό της αιτίας και των συνθηκών του θανάτου, ειδικά όταν η αιτία θανάτου είναι ασαφής ή όταν υπάρχει υποψία ότι έπαιξε κάποιο ρόλο η αιθανόλη. Ο στόχος είναι να προσδιοριστεί εάν υπήρχε αιθανόλη στον νεκρό τη στιγμή του θανάτου και η συγκέντρωσή της και εάν αυτή συνέβαλε ή προκάλεσε το θάνατο, είτε λόγω δηλητηρίασης, είτε επηρεάζοντας την αντίληψη και τη συνείδηση του θύματος.[27][30]

Τέτοια συμπεράσματα είναι συχνά αμφιλεγόμενα και απαιτείται προσοχή λόγω διαφόρων μεταθανάτιων αλλαγών στη συγκέντρωση της αιθανόλης. Η μεταθανάτια παραγωγή της αιθανόλης είναι πολύ συχνά ένα εμπόδιο στη σωστή ανάλυση και ερμηνεία των τοξικολογικών ευρημάτων. Μετά το θάνατο, τα βακτήρια στο σώμα μέσω ζύμωσης διαθέσιμων υδατανθρακικών υποστρωμάτων, μπορούν να παράξουν αιθανόλη, ειδικά σε περιπτώσεις αποσύνθεσης. Η μεταθανάτια ενδογενής παραγωγή της αιθανόλης εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που έχει παρέλθει από τη στιγμή του θανάτου και το βαθμό σήψης (ως συνάρτηση πολυάριθμων μεταβλητών όπως η θερμοκρασία και η υγρασία στο περιβάλλον που βρέθηκε ένα πτώμα, και ο τύπος και ο αριθμός των μικροοργανισμών που έχουν αναπτυχθεί στο πτώμα). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αυξημένα επίπεδα αιθανόλης, καθιστώντας δύσκολο τον προσδιορισμό της προέλευσης της μετρούμενης αιθανόλης στο αίμα, αν δηλαδή καταναλώθηκε πριν από το θάνατο ή αν παρήχθη μετά θάνατον.[8][30][32]

Η ερμηνεία της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε μεταθανάτια δείγματα απλοποιείται χάρη σε μια πολύ μεγαλύτερη επιλογή μεταξύ σωματικών υγρών και ιστών που είναι διαθέσιμα για δειγματοληψία. Ένα από τα κρίσιμα βήματα κατά τη διάγνωση και την ερμηνεία της κατάστασης μέθης κατά τη στιγμή του θανάτου είναι η εξασφάλιση των κατάλληλων βιολογικών δειγμάτων για τις τοξικολογικές μετρήσεις.[33] Το αίμα είναι ένα δείγμα όχι τόσο καλά απομονωμένο από

εξωτερικούς παράγοντες και παράλληλα ευαίσθητο σε βιοχημικές και μεταθανάτιες αλλαγές. Έτσι, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε ένα σώμα που βρίσκεται σε προχωρημένη σήψη ίσως δεν είναι επαρκής λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη συγκέντρωσή της αιθανόλης στο αίμα. Παράλληλα, στην περίπτωση που η αιθανόλη παραμένει μη απορροφημένη στο στομάχο τη στιγμή του θανάτου, αυξάνεται η πιθανότητα συνεχιζόμενης τοπικής διάχυσής της στους περιβάλλοντες ιστούς. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα κρανιακό τραύμα συχνά καθιστά ένα άτομο αναισθητο αρκετές ώρες πριν από το θάνατο, και κατά το χρονικό διάστημα αυτό η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα συνεχίζει να μειώνεται λόγω του μεταβολισμού στο ήπαρ. Αυτές λοιπόν είναι μερικές περιπτώσεις κατά τις οποίες διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα και, κατά συνέπεια, καθιστούν χρήσιμη την ταυτόχρονη συλλογή άλλων βιολογικών δειγμάτων.[8][30][34][35] Τα τελευταία χρόνια αυξάνονται οι έρευνες για την πιθανή χρήση των εναλλακτικών βιολογικών δειγμάτων (ήπαρ, εγκέφαλος, σκελετικός μυς, σπλήνας, μυελός των οστών, αρθρικό υγρό, χολή) στην τοξικολογική ανάλυση της αιθανόλης συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. [36]

Ο ρόλος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού(ENY) στον προσδιορισμό της μεταθανάτιας συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα

Το ENY, λόγω των ιδιοτήτων του, αποτελεί μία πολύτιμη εναλλακτική λύση ως δείγμα για τη μεταθανάτια ανάλυση της αιθανόλης, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις θανάτων που μπορεί να σχετίζονται με την κατανάλωση αιθανόλης. Όπως προαναφέρθηκε, η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη συγκέντρωσή της στο αίμα. Το ENY, προερχόμενο είτε από το κοιλιακό σύστημα του εγκεφάλου είτε από το νωτιαίο μυελό είναι αφενός πιο αποστειρωμένο και αφετέρου πιο απομονωμένο βιολογικό υλικό και, κατά συνέπεια, πιο δύσκολα ευάλωτο σε βακτηριακές μολύνσεις. Παράλληλα, είναι λιγότερο επιρρεπές στο φαινόμενο της ανακατανομής της αιθανόλης που μπορεί να συμβαίνει στο σώμα μετά το θάνατο, καθιστώντας το πιο αξιόπιστο υγρό για τοξικολογική ανάλυση, ειδικά σε περιπτώσεις όπου υπάρχει υποψία μεταθανάτιας ανακατανομής. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι το ENY αντανακλά το χημικό περιβάλλον του εγκεφάλου και, επειδή η αιθανόλη επηρεάζει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, οι συγκεντρώσεις αιθανόλης στο ENY μπορεί να παρέχουν καλύτερη εκτίμηση των επιπτώσεων της αιθανόλης στην εγκεφαλική λειτουργία τη στιγμή του θανάτου. Σχετικά με αυτό, υπάρχει διαφοροποίηση στην ποιότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μεταξύ δειγμάτων εγκεφαλικού ιστού και εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Η μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης

στον εγκέφαλο είναι πιθανό να παρουσιάσει διαφοροποιήσεις ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση. Οι απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον εγκέφαλο προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, αναφέρεται ότι κυμαίνονται από 0,31 μέχρι 8,00, γεγονός που δεν πρέπει να προκαλεί εντύπωση αν ληφθεί υπόψη η ανομοιογενής δομή του εγκεφάλου[37]. Από την άλλη πλευρά, οι απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προς την αντίστοιχη στο αίμα, έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται μεταξύ 0,90 και 1,18, ανάλογα με τον χρόνο που έχει περάσει από την κατανάλωση του αλκοολούχου ποτού και την κινητική φάση του μεταβολισμού της αιθανόλης. Έτσι, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί ένα υλικό κατάλληλο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. [30][33][34][36-38]

Μελέτες:

Στη συνέχεια, παρατίθενται δύο σύγχρονες μελέτες στις οποίες γίνεται μέτρηση της αιθανόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα με τη μέθοδο της Αέριας χρωματογραφίας υπερκείμενης φάσης (Headspace Gas Chromatography) και η συσχέτιση της συγκέντρωσης μεταξύ των δύο αυτών βιολογικών δειγμάτων. Στην πρώτη μελέτη χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό προερχόμενο από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου, ενώ στη δεύτερη από το νωτιαίο μυελό.

Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020 από τους G. Thelander, F.C. Kugelberg, και A.W. Jones πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση της σχέσης μεταξύ της αιθανόλης στο αίμα και της αντίστοιχης συγκέντρωσης σε εναλλακτικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του ENY. Τα δείγματα προέρχονταν από νεκροτομές που πραγματοποιήθηκαν στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία της Ουψάλα, της Στοκχόλμης, του Γκέτεμποργκ, του Λινκόπινγκ και του Λουντ. Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν από τη μηριαία φλέβα, ενώ το ENY από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου. Έπειτα από κατάλληλη αποθήκευση, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ιατροδικαστικής τοξικολογίας του Λινκόπινγκ για ανάλυση. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στα βιολογικά δείγματα προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης Headspace (Headspace Gas Chromatography, HS-GC) σε δύο διαφορετικά μηχανήματα, χρησιμοποιώντας την n-propanol και την t-butanol ως εσωτερικά πρότυπα. Οι αποκρίσεις HS-GC ήταν γραμμικές από 0,10 έως 4,0 g/L και συγκεντρώσεις <0,10 g/L αναφέρθηκαν ως αρνητικές (δεν ανιχνεύθηκαν), καθώς είναι χαμηλότερες του LOQ (Limit of Quantification, κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης) της μεθόδου. Η σχέση που προέκυψε για το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης που συσχετίζει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα με την αντίστοιχη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι της μορφής $y=ax+b$, όπου y ορίστηκε η

συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα και x η συγκέντρωση της αιθανόλης στο ENY, καθώς ο σκοπός της μελέτης ήταν να ελεγχθεί η δυνατότητα πρόβλεψης της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα γνωρίζοντας τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο ENY. Παρουσιάστηκαν, επίσης, αποτελέσματα σχετικά με το λόγο της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο μηριαίο αίμα προς την αντίστοιχη στο εναλλακτικό δείγμα (στις περιπτώσεις που και οι δύο συγκεντρώσεις ήταν ανιχνεύσιμες—μεγαλύτερες από 0,1g/L). [23]

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια πολύ ισχυρή θετική σχέση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο ENY και της αντίστοιχης στο αίμα, με την τιμή συντελεστή συσχέτισης Pearson να είναι η μεγαλύτερη μεταξύ των υπολοίπων δειγμάτων και να πλησιάζει στο +1 ($r=0.98$), και με πολύ στενά όρια εμπιστοσύνης 95%. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση της αιθανόλης σε ένα εναλλακτικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα που ελήφθη από την μηριαία φλέβα, τα όρια εμπιστοσύνης ήταν πιο εκτεταμένα, αποδεικνύοντας ότι μια τέτοια πρόβλεψη ενέχει τον κίνδυνο σφάλματος. Η τιμή του λόγου της συγκέντρωσης αιθανόλης στο ENY προς την αιθανόλη του αίματος ήταν 1,19, δείχνοντας ότι στο ENY η αιθανόλη είναι κατά 20-30% αυξημένη σε σχέση με το αίμα. Ο λόγος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της συγκέντρωσης στο αίμα γνωρίζοντας την συγκέντρωση στο ENY, ωστόσο, προτιμάται η μέθοδος γραμμικής παλινδρόμησης που λαμβάνει υπόψιν και τη στατιστική αβεβαιότητα της μεθόδου. [23]

Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Paulina Wachholz, Rafał Skowronek, Natalia Pawlas [8], και δημοσιεύτηκε τον Οκτώβριο του 2022, η οποία ενίσχυσε το συμπέρασμα της προηγούμενης για τη σημασία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στο μεταθανάτιο προσδιορισμό της αιθανόλης. Στη μελέτη αυτή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό συλλέχθηκε από το νωτιαίο μυελό, με παράλληλη συλλογή αίματος (από τη μηριαία φλέβα) και επιπρόσθετων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν δείγματα από 45 αυτοψίες. Τα δείγματα από τις αυτοψίες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε περιπτώσεις στις οποίες εντοπίστηκε αιθανόλη και στο αίμα και στον ENY και δεν είχαν υποστεί σήψη. Τα δείγματα από αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν και για τη στατιστική ανάλυση για τη συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα και στο ENY. Η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε τις περιπτώσεις στις οποίες έγινε ανίχνευση αιθανόλης μόνο στα δείγματα αίματος και εκείνες στις οποίες οι μεταθανάτιες αλλοιώσεις είχαν ξεκινήσει πριν τη δειγματοληψία. Έπειτα από κατάλληλη αποθήκευση και επεξεργασία των δειγμάτων, η συγκέντρωση αιθανόλης μετρήθηκε με Αέρια χρωματογραφία Headspace με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας(HS-GC-FID) και χρήση εσωτερικού

προτύπου για τον περιορισμό των σφαλμάτων εξαιτίας της παρουσίας άλλων πτητικών ενώσεων. [8]

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δείχνουν θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης αιθανόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα με συντελεστή Pearson $r=0,9503$. Στο 60% των περιπτώσεων η συγκέντρωση στο ENY ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το αίμα, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε μόνο στα ζεύγη δειγμάτων όπου ανιχνεύθηκε η μικρότερη και η μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης. Η εξίσωση για το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης που προέκυψε είναι η εξής: $y=ax+b$, όπου y είναι η συγκέντρωση αιθανόλης στο ENY και x είναι η συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα. Ωστόσο, η σχέση αυτή δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα από γνωστή συγκέντρωση στο ENY ή αντίστροφα, καθώς αυτό θα συνεπαγόταν μεγάλη αβεβαιότητα στο ληφθέν αποτέλεσμα.[8]

Όσον αφορά την ομάδα δειγμάτων που η αιθανόλη προσδιορίστηκε μόνο στο αίμα, στις πρώτες επτά περιπτώσεις, η συγκέντρωση στο αίμα δεν ήταν σημαντική. Ωστόσο, η τελική περίπτωση (στην οποία βρέθηκε στατιστικά σημαντική συγκέντρωση αιθανόλης) μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε σύγκριση με το αίμα, είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητο σε βιοχημικές και μεταθανάτιες αλλαγές. Σε αυτό το δείγμα ανιχνεύθηκε και σημαντική ποσότητα η-προπανόλης, υποδηλώνοντας μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης [32]. Μέσω της ακριβούς μελέτης αυτών των περιπτώσεων και της πρόσθετης ανάλυσης του υαλοειδούς και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αιθανόλη που βρέθηκε σε αυτές τις 8 περιπτώσεις είναι ενδογενούς παραγωγής.[8][32]

Τα αποτελέσματα των δύο μελετών συμφωνούν στην ύπαρξη ισχυρής θετικής συσχέτισης στη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Όπως προαναφέρθηκε, στην πρώτη μελέτη το ENY συλλέχθηκε από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου, ενώ στη δεύτερη από το νωτιαίο μυελό. Αυτό σημαίνει ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι ένα πολύτιμο εναλλακτικό βιολογικό δείγμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιθανόλης σε μεταθανάτιες τοξικολογικές μελέτες, ανεξάρτητα από την περιοχή συλλογής. Παρότι η μέση BAC μπορεί να προβλεφθεί από το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με καλή ακρίβεια χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση στο ENY, υπάρχει σημαντική αβεβαιότητα για την εκτιμώμενη τιμή σε κάθε μεμονωμένη νέα περίπτωση. Ανάλογα με τη φαρμακοκινητική φάση της αιθανόλης κατά τη στιγμή του θανάτου, οι διαφορές των συγκεντρώσεων αυτής σε διαφορετικά σωματικά υγρά μπορεί να είναι σημαντικές. Πιθανές εξηγήσεις αυτού του φαινομένου είναι η ευρέως διαδεδομένη υπόθεση ότι η αλκοόλη διαχέεται σύμφωνα με το νόμο του Fick με απλή διάχυση

και ότι, κατά τη φάση απορρόφησης, διαχέεται μέσω των σωματικών υγρών σύμφωνα με το μοτίβο αίμα- εγκεφαλονωτιαίο υγρό- υαλοειδές υγρό- λέμφος, ενώ κατά τη φάση αποβολής η σειρά αντιστρέφεται. Ο κύριος λόγος για την ανάλυση της αιθανόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό στην μεταθανάτια τοξικολογία είναι η παροχή αποδεικτικών στοιχείων και η ενίσχυση του συμπεράσματος του επιπέδου μέθης στο οποίο μπορεί να βρισκόταν ο νεκρός τη στιγμή του θανάτου.[1][8][23][32]

3.2 Θεραπευτικά φάρμακα και παράνομες ουσίες

Ο προσδιορισμός των φαρμάκων και των παράνομων ουσιών στη δικανική τοξικολογία είναι απαραίτητος για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων σε εγκληματολογικές έρευνες, καθώς επιτρέπει την κατανόηση των αιτιών θανάτου ή των συνθηκών που οδήγησαν σε ατυχήματα και εγκλήματα. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φαρμάκων στο αίμα, τα ούρα ή άλλα βιολογικά δείγματα επιτρέπει την εκτίμηση της πιθανής τοξικότητας ή της υπερβολικής δόσης που μπορεί να έχει προκαλέσει βλάβες στον οργανισμό ή το θάνατο. Επιπλέον, βοηθά στην αναγνώριση του είδους των ουσιών που μπορεί να έχουν εμπλακεί σε εγκληματικές ενέργειες, όπως η παράνομη χορήγηση ουσιών ή η χρήση φαρμάκων που μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια συνείδησης ή σε ανικανότητα για υπεράσπιση. Οι μεταθανάτιες αλλαγές, όπως η ανακατανομή φαρμάκων από το αίμα σε άλλους ιστούς, καθιστούν δύσκολη την εκτίμηση των συγκεντρώσεων του φαρμάκου κατά τη στιγμή του θανάτου μόνο από την ανάλυση του μεταθανάτιου αίματος, και έτσι είναι αναγκαία η εξασφάλιση επιπλέον δειγμάτων. Τα σωματικά υγρά, είναι σημαντικά βιολογικά δείγματα όχι μόνο ως εναλλακτικά του αίματος αλλά και για τη διερεύνηση της μεταθανάτιας ανακατανομής των φαρμάκων και για τη φαρμακοκινητική/ τοξικοκινητική τους ανάλυση. [39][40]

Οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ή μέσω του χοριοειδούς πλέγματος, και επομένως να ανιχνευθούν. Στην κλινική ιατρική, έχει αναφερθεί η ανίχνευση διαφόρων φαρμάκων στο ENY, όπως αντιεπιληπτικά και οπιοειδή. Στην εγκληματολογική τοξικολογία, ωστόσο, οι μελέτες για τις συγκεντρώσεις θεραπευτικών φαρμάκων στο ENY μετά το θάνατο είναι περιορισμένες.[39]

Μελέτες:

Βασικό αντικείμενο μελέτης είναι η δυνατότητα χρήσης του ENY ως εναλλακτικό δείγμα του αίματος, για τον προσδιορισμό των φαρμάκων και ουσιών που υπήρχαν

στον οργανισμό τη στιγμή του θανάτου. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ανεπαρκείς συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων στο ENY και στο αίμα για πολλά φάρμακα, υποδηλώνοντας ότι το ENY δεν είναι κατάλληλο εναλλακτικό υλικό για ποσοτική ανάλυση. Ωστόσο, η ανάλυσή του μπορεί να είναι χρήσιμη σε φάρμακα όπως τα αντιπυρετικά (ακεταμινοφαίνη, ιβουπροφαίνη), το τοπικό αναισθητικό λιδοκαΐνη, ψυχοτρόπα/αντισπασμωδικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένης της φαινοβαρβιτάλης και των βενζοδιαζεπινών, χημειοθεραπευτικά φάρμακα και οπιοειδή.[16][39]

Το 2007 δημοσιεύθηκε η μελέτη των Engelhart και Jenkins οι οποίοι ανέλυσαν δείγματα αίματος και ENY από αυτοψίες στην κομητεία Cuyahoga του Οχάιο. Η ανάλυση του ENY πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας(GC/MS), και χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα ENY που δεν είχαν επιμολυνθεί με αίμα. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τη χρησιμότητα του ENY για την ανίχνευση βασικών και όξινων ουδέτερων φαρμάκων στη μεταθανάτια ανάλυση και να περιγράψει τη σχέση των συγκεντρώσεων τους στο ENY και στο αίμα ως βοήθημα στον προσδιορισμό της αιτίας θανάτου. Στα δείγματα ανιχνεύθηκαν συνολικά 49 φάρμακα, τα οποία ανήκουν στις βενζοδιαζεπίνες, στα αντισπασμωδικά, ηρεμιστικά, αντικαταθλιπτικά, οπιοειδή, αναισθητικά, αντισταμινικά, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και άλλα. [39]

Έδειξαν, λοιπόν, ότι βασικά και όξινα ουδέτερα φάρμακα μπορούν να ανιχνευθούν στο ENY, ενώ διαπίστωσαν ότι ορισμένα από αυτά είναι πιο πιθανό να ανιχνευθούν στο ENY σε σχέση με άλλα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή τους στο αίμα. Θα περίμενε κανείς τα λιπόφιλα φάρμακα να περνούν στο ENY από το αίμα πιο εύκολα από τα υδρόφιλα. Για παράδειγμα, ο απομεθυλιωμένος μεταβολίτης της αμιτριπτυλίνης, η νορτριπτυλίνη, ανιχνεύτηκε λιγότερο συχνά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό από τη μητρική ένωση. Ωστόσο, άλλοι παράγοντες πρέπει να παίζουν ρόλο στη μεταφορά, επειδή άλλες υδρόφιλες ενώσεις, όπως η καρισσοπροδόλη, επέδειξαν σχετικά υψηλή μεταφορά στο ENY. Υψηλά φορτισμένα μόρια σε φυσιολογικό pH, όπως η ναπροξένη, εμφάνισαν χαμηλές αναλογίες συγκέντρωσης ENY/αίματος. Γενικά, οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στο ENY ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο αίμα, με ορισμένες εξαιρέσεις (π.χ. λιδοκαΐνη). Ωστόσο, ο βαθμός στον οποίο η συγκέντρωση ήταν χαμηλότερη ήταν διαφορετικός μεταξύ των αυτοψιών, ενώ, παράλληλα, οι υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα δε συνοδεύονταν απαραίτητα από αυξημένες συγκεντρώσεις στο ENY. Για παράδειγμα, σε 2 περιπτώσεις με συγκεντρώσεις διαζεπάμης στο αίμα 1,95mg/L, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο ENY ήταν στο μεσαίο-χαμηλό εύρος των 0,30 και 0,09mg/L, αντίστοιχα, ενώ μια άλλη περίπτωση με συγκέντρωση διαζεπάμης στο αίμα 0,38mg/L είχε συγκέντρωση στο ENY ίση με 0,21mg/L. Αντίθετα, η υψηλότερη συγκέντρωση διφαινοδραμίνης(DPH) στο αίμα (8,80mg/L), αν και δεν εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση στο ENY (2,13 mg/L), ήταν αυξημένη σε σύγκριση με άλλες

περιπτώσεις (εύρος συγκέντρωσης στο ENY 0,02-2,24mg/L). Ωστόσο, η τρίτη υψηλότερη συγκέντρωση αίματος 4,28mg/L είχε συγκέντρωση ENY μόνο 0,55mg/L. Για τη φαινοβαρβιτάλη, η περίπτωση με την υψηλότερη συγκέντρωση αίματος 85,8mg/L είχε επίσης την υψηλότερη συγκέντρωση ENY στα 71,1 mg/L. Παράλληλα, σε ορισμένα φάρμακα η υψηλότερη και χαμηλότερη συγκέντρωση στο αίμα συνοδευόταν από παρόμοια αναλογία συγκέντρωσης ENY/αίματος. Για παράδειγμα, παρόμοια αναλογία λήφθηκε για την αμιτριπτυλίνη σε δύο περιπτώσεις με συγκεντρώσεις στο αίμα 2,35 και 0,35mg/L. Για τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, οι αναλογίες κυμαίνονταν από 0,03-2,93. Φάνηκε να μην υπάρχει τρόπος να προβλεφθεί ποια ήταν η πιο κατάλληλη αναλογία για χρήση σε μια άγνωστη περίπτωση. Σε περιπτώσεις με υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στο αίμα δεν παρατηρήθηκαν απαραίτητα χαμηλότερες αναλογίες.[39]

Η μέση αναλογία συγκέντρωσης στο ENY/αίμα για την πλειονότητα των φαρμάκων στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν ήταν από 0,05 έως 0,50. Όπως προαναφέρθηκε, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι προβληματική, καθώς οι φυσικοχημικές ιδιότητες, η φαρμακοκινητική και η τοξικοκινητική των φαρμάκων, σε συνδυασμό με την έλλειψη πληροφοριών σχετικά με το χρόνο που μεσολαβεί από τη λήψη του φαρμάκου έως το θάνατο μπορούν να οδηγήσουν σε μεγάλες διακυμάνσεις στις μετρήσεις των διαφορετικών αυτοψιών. Ωστόσο, μπορούν να εξαχθούν αρκετά συμπεράσματα. Τα θεραπευτικά φάρμακα είναι ανιχνεύσιμα στο ENY και οι μετρούμενες συγκεντρώσεις εμπίπτουν στην αναλυτική ικανότητα των σημερινών τεχνολογιών. Οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου είναι κατά κύριο λόγο υψηλότερες στο αίμα από ότι στο ENY, με αποτέλεσμα οι αναλογίες ENY/αίμα να είναι <1,0. Επίσης, φάνηκε ότι δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στο αίμα και στο ENY. Τέλος, οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο ENY δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων στο αίμα, ειδικότερα στις περιπτώσεις απουσίας άλλων ιατροδικαστικών ευρημάτων.[39]

Μία παρόμοιας έκτασης μελέτη δημοσιεύθηκε το 2015 από τους Tominaga et al., οι οποίοι ανέλυσαν δείγματα από 103 αυτοψίες και μέτρησαν τη συγκέντρωση διαφόρων ξενοβιοτικών (πίνακας) τόσο στο αίμα όσο και στο ENY.[16] Στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για τα φάρμακα τα οποία ανιχνεύθηκαν σε περισσότερες από 5 περιπτώσεις και περιελάμβανε υπολογισμό των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης και απεικόνιση σε διαγράμματα τύπου scatter για την αποτύπωση της συσχέτισης των συγκεντρώσεων στο αίμα και στο ENY μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων αυτοψίας. Στη μελέτη αυτή το ENY είχε συλλεχθεί από το κεντρικό κανάλι του νωτιαίου μυελού με παρακέντηση, και η συγκέντρωση των φαρμάκων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της Αέριας χρωματογραφίας/

Φασματομετρίας μάζας (GC/MS). Έδειξαν, λοιπόν, ότι η συγκέντρωση των ψυχοδιεγερτικών φαρμάκων αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης, στο αίμα και στο ENY έχουν σχεδόν τέλεια συσχέτιση. Οι ουσίες αυτές έχουν μεγάλους όγκους κατανομής (Vd) και μπορούν εύκολα να κατανεμηθούν στους ιστούς του σώματος συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και να απεκκριθούν στις σωματικές εκκρίσεις και στα ούρα χωρίς βιολογικό μετασχηματισμό. Έτσι, ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης (ενδοφλέβια ή από το στόμα), μπορούν εύκολα να περάσουν στο ENY από το αίμα.[41-44] Η συγκέντρωση της καφεΐνης και της ακεταμινοφαΐνης στο ENY ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με το αίμα. Ο λόγος της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών στο ENY προς την αντίστοιχη στο αίμα ήταν περίπου 0,3-1,2. Η κατανομή της καφεΐνης, που έδειξε ελαφρώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο ENY σε σχέση με το αίμα, είναι σύμφωνη με τη φαρμακοκινητική της ουσίας, που περιλαμβάνει πλήρη και ταχεία απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα σχεδόν 100% με μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα εντός 30-60 λεπτών μετά την πρόσληψη.[45-47] Τα ευρήματα για την ακεταμινοφαΐνη μπορεί να οφείλονταν στο ότι ο θάνατος στις περισσότερες περιπτώσεις είχε επέλθει πριν αποκατασταθεί η ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων στο αίμα και στο ENY μετά τη λήψη του φαρμάκου, καθώς, σύμφωνα με κλινικές μελέτες, η ακεταμινοφαΐνη εισέρχεται γρήγορα στο ENY, ανάλογα με τη συγκέντρωση της λευκωματίνης στο πλάσμα και τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood Brain Barrier, BBB) και οι συγκεντρώσεις του ENY παραμένουν χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις στο αίμα για περίπου 5-6 ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση, φθάνουν σε παρόμοια επίπεδα και στη συνέχεια ξεπερνούν τις συγκεντρώσεις στο αίμα.[48][49] Η συγκέντρωση της φαινοβαρβιτάλης στο ENY βρέθηκε επίσης μικρότερη σε σχέση με το αίμα στις περισσότερες περιπτώσεις, εκτός από εκείνες στις οποίες τα επίπεδα ήταν πολύ υψηλά και σε μία περίπτωση που λόγω κρανιακού τραύματος το ENY είχε επιμολυνθεί με αίμα και η συγκέντρωση ήταν ίδια στα δύο βιολογικά υγρά. Περίπου η μισή ποσότητα της φαινοβαρβιτάλης (40–60%) υπάρχει ως μορφή δεσμευμένη στις πρωτεΐνες του πλάσματος και μεταφέρεται με αργό ρυθμό στο ENY και στον εγκεφαλικό ιστό. Αυτό μπορεί να προκαλέσει τη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων του ENY και του αίματος.[50] Η κατανομή του φαρμάκου μπορεί να διαφέρει στις περιπτώσεις υπερδοσολογίας. Στην περίπτωση αυτή, η φαρμακοκινητική περιλαμβάνει παρατεταμένη φάση απορρόφησης στο εν ζωή άτομο, με αυξημένες συγκεντρώσεις ελεύθερου, μη δεσμευμένου από πρωτεΐνες φαρμάκου στο αίμα, με διαταραγμένο μεταβολισμό και απέκκριση και διαφορετική διακίνηση στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση του φαρμάκου και στο ENY.[16][50] Τα περισσότερα από του στόματος ψυχοφάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των παραγώγων φαινοθειαζίνης (προμεθαζίνη και χλωροπρομαζίνη), καθώς και τα από του στόματος φάρμακα για το κρυολόγημα, συμπεριλαμβανομένης της χλωροφαινιραμίνης και της

διυδροκωδεΐνης, έδειξαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο ENY σε σχέση με το αίμα. Μεταξύ αυτών των φαρμάκων, οι συγκεντρώσεις προμεθαζίνης και χλωροπρομαζίνης είχαν αναλογία συγκεντρώσεων ENY/αίματος 0,1. Οι αντίστοιχες αναλογίες των από του στόματος χορηγούμενων φαρμάκων για το κρυολόγημα, συμπεριλαμβανομένης της χλωροφαινιραμίνης και της διυδροκωδεΐνης είχαν εύρος 0,2-0,8. Αυτές οι κατανομές φαρμάκων μπορεί να προκληθούν από την αργή μεταφορά του φαρμάκου στο ENY λόγω των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων που περιλαμβάνουν δέσμευση με πρωτεΐνες πλάσματος, υδροφιλικότητα και μεγάλο χρόνο ημιζωής.[16][51] Επιπλέον, η αναλογία της συγκέντρωσης ENY/αίμα του φλεβικού αναισθητικού μιδαζολάμης στο ENY ήταν περίπου 0,1. Οι μετρήσεις των παραπάνω ουσιών είχαν μικρές διακυμάνσεις από αυτοψία σε αυτοψία. Στην περίπτωση σημαντικής υπερδοσολογίας ορισμένων ουσιών, αυτές οι συσχετίσεις ήταν διαφορετικές, ωστόσο, το γεγονός και μόνο της παρουσίας αυτών των ενώσεων στο ENY μπορεί να είναι πολύτιμη πληροφορία απουσία άλλων σωματικών υγρών. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ορισμένων φαρμάκων, όπως οι βενζοδιαζεπίνες, η ολανζαπίνη, η μεθυλεφεδρίνη, η προποφόλη, η κεταμίνη και η ισονιαζίδη. Το τοπικό αναισθητικό λιδοκαΐνη έδειξε μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.[1][16]

Οι συγγραφείς προσπάθησαν να συσχετίσουν τα ποσοτικά και στατιστικά αποτελέσματα με στοιχεία από τη φαρμακοκινητική/τοξικοκινητική των φαρμάκων, αλλά και με άλλα ιατροδικαστικά ευρήματα και στοιχεία σχετικά με το χρόνο του θανάτου.

Φαίνεται ότι για τα περισσότερα φάρμακα δεν υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ της συγκέντρωσής τους στο αίμα και στο ENY. Η αναλογία τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες και η ικανότητα να μεταφέρονται στο ENY, η φαρμακοδυναμική/φαρμακοκινητική, η μεταθανάτια ανακατανομή που σχετίζονται με την ίδια την ουσία, αλλά και παράγοντες όπως η δόση και η εφάπαξ ή παρατεταμένη χορήγηση, το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της πρόσληψης και του θανάτου καθώς και το μεταθανάτιο διάστημα, ο χρόνος, δηλαδή, που παρήλθε από το θάνατο μέχρι τη δειγματοληψία και την ανάλυση. Παρότι η πρόβλεψη της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο αίμα γνωρίζοντας την αντίστοιχη στο ENY δεν είναι ασφαλής, η ανίχνευσή του στο ENY μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πληροφορία για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αιτία του θανάτου. Επομένως, το ENY, υπό συνθήκες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό δείγμα του αίματος ή ως συμπληρωματικό δείγμα για την αξιολόγηση της φαρμακοκινητικής/τοξικοκινητικής και μεταθανάτιας ανακατανομής συγκεκριμένων φαρμάκων.[16][39][40-51]

Κατηγορία	Ουσίες της κατηγορίας
Διεγερτικά	Μεθαμφεταμίνη
	Αμφεταμίνη
Ναρκωτικά/αντιβηχικά αναλγητικά	Ακεταμινοφαίνη
	Καφεΐνη
	Διυδροκωδεΐνη
	Χλωροφαινιραμίνη
Βαρβιτουρικά	Φαινοβαρβιτάλη
	Σεκοβαρβιτάλη
Παράγωγα Φαινοθειαζίνης	Προμεθαζίνη
	Χλωροπρομαζίνη
	Λεβομεπρομαζίνη
Βενζοδιαζεπίνες	Μιδαζολάμη
	Εσταζολάμη
Υπνωτικά	Ζολπιδέμη
Αντικαταθλιπτικά	Ολανζαπίνη
	Μιανσερίνη
	Μιρταζαπίνη
Αναισθητικά	Λιδοκαΐνη
	Θειαμιλάλη
	Προποφόλη
	Κεταμίνη
Άλλα	Διφαινυδραμίνη
	Μεθυλεφεδρίνη
	Ισονιαζίδη

Πίνακας: Σύνολο ξενοβιοτικών ουσιών οι οποίες προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν στη μελέτη των Tominaga et al.(2015).[16]

3.3 Case reports

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν ολοένα και περισσότερες αναφορές για θανατηφόρες δηλητηριάσεις από την έκθεση σε ξενοβιοτικές ουσίες. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες περιπτώσεις αυτοψίας, στις οποίες, εκτός από κλασικά βιολογικά δείγματα όπως το αίμα και τα ούρα, αναλύθηκε και το ENY για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών και τον προσδιορισμό του ρόλου τους στην εμφάνιση τοξικότητας και στο θάνατο.

Case report 1: MDMA-MDEA

Οι περιπτώσεις θανάτου από υπερβολική χρήση συνθετικών φαρμάκων είναι πολύ συχνές, ωστόσο, συνήθως είναι αποτέλεσμα ατυχήματος και όχι απόπειρας αυτοκτονίας. Το 2004 δημοσιεύθηκε από τους K. Libiseller et al. η μελέτη ενός περιστατικού αυτοκτονίας μετά από χρήση ενός συνδυασμού 3,4 μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνης (MDMA) και 3,4 μεθυλενοδιοξυαιθυλαμφεταμίνης (MDEA), η συγκέντρωση των οποίων μετρήθηκε σε διάφορα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Τα δισκία έκσταση τα οποία κατασχέθηκαν από την αστυνομία λίγες μέρες νωρίτερα περιείχαν επίσης MDMA και MDEA, καταδεικνύοντας ότι ο θάνατος προκλήθηκε από την κατάποση των συγκεκριμένωνσκευασμάτων. Προσδιορίστηκαν σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (4,1mg/L MDMA, 2,3mg/L MDEA) σε σύγκριση με τον ορό (13,3mg/L MDMA, 7,3mg/L MDEA). Με βάση την προαναφερθείσα μελέτη των Tominaga et al, η συγκέντρωση των χημικών ενώσεων αυτών στο ENY και στο αίμα θα έπρεπε να έχουν πολύ καλή συσχέτιση (ως παράγωγα αμφεταμίνης), ωστόσο κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις. Αυτό, πιθανώς οφείλεται σε ατελή διαδικασία απορρόφησης και κατανομής των ουσιών στον οργανισμό. Οι συγκεντρώσεις στα ούρα (13,0mg/L MDMA, 5,7mg/L MDEA) ήταν παρόμοιες με αυτές στον ορό και επομένως υποδηλώνουν πρόωρη φάση αποβολής των ουσιών και επιβεβαιώνουν το προηγούμενο σενάριο. Μια τέτοια ολοκληρωμένη ανάλυση δείχνει ότι το ENY μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών και τοξικοκινητικών διεργασιών.[18]

Case report 2: Φουρανυλ-φεντανύλη

Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του 2017 του Ευρωπαϊκού Κέντρου Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας (European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction, EMCDDA), τα συνθετικά οπιοειδή αποτελούν την τέταρτη πιο δημοφιλή κατηγορία ουσιών μεταξύ των νέων ψυχοδραστικών ουσιών. [52] Οι ουσίες αυτές μιμούνται τις επιδράσεις ουσιών όπως η μορφίνη και η ηρωίνη και οι χρήστες μπορούν εύκολα να τις προμηθευτούν σε χαμηλή τιμή μέσω του διαδικτύου. Τα 28 από τα 38 συνθετικά οπιοειδή είναι εξαιρετικά ισχυρά ανάλογα φεντανύλης. Η φεντανύλη είναι ένας ισχυρός αγωνιστής υποδοχέων μ-οπιοειδών με ισχύ 80-100 φορές υψηλότερη από τη μορφίνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ανάλογα φεντανύλης συνδέονται ακόμα πιο ισχυρά με τον υποδοχέα. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, αρκετές χιλιάδες θάνατοι έχουν συσχετιστεί με τυχαία ή/και εκούσια υπερδοσολογία με φαιντανύλη και ανάλογα φεντανύλης. Στη συγκεκριμένη υπόθεση, ένας 53χρονος άνδρας βρέθηκε νεκρός στο σπίτι με μια βελόνα τοποθετημένη στη φλέβα. Στο δωμάτιο ανακαλύφθηκε μια πλαστική

σακούλα που περιείχε λευκή σκόνη (που αργότερα αναγνωρίστηκε ως προϊόν με βάση τη φουρανυλ-φεντανύλη). Οι Francesca Freni et al δημοσίευσαν την ανάλυση της συγκέντρωσης φουρανυλ-φεντανύλης και του μεταβολίτη της 4-ανιλινο-N-φαινετυλ-πιπεριδίνη (4-ANPP) σε αίμα, ούρα, γαστρικό περιεχόμενο, χολή και εγκεφαλονωτιαίο υγρό που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της αυτοψίας από το θύμα. Έπειτα από επεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), πραγματοποιήθηκαν ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις με Υγρή χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας(LC–MS/MS).[19]

Η φουρανυλ-φεντανύλη υφίσταται σημαντική μεταθανάτια ανακατανομή. Η ουσία ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε όλα τα βιολογικά υγρά που συλλέχθηκαν. Η συγκέντρωση της φουρανυλ-φεντανύλης στο ENY ήταν παρόμοια με εκείνη που μετρήθηκε στο αίμα (2,6ng/mL). Οι συγκεντρώσεις του 4-ANPP στο καρδιακό αίμα, στο μηριαίο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν αντίστοιχα 93,5ng/mL, 50,4ng/mL και 10,2ng/mL. Το ENY δεν είχε ξαναχρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ουσίας αυτής. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν τη σημασία του ως εναλλακτικό δείγμα στον προσδιορισμό της αιτίας του θανάτου, ειδικά σε περιπτώσεις που σχετίζονται με ουσίες οι οποίες υφίστανται μεταθανάτια ανακατανομή.[19]

Case report 3: U-47700

Υπάρχουν αρκετές κλινικές αναφορές και αναφορές περιστατικών που σχετίζονται με θανατηφόρα αναπνευστική καταστολή μετά την κατάχρηση του συνθετικού οπιοειδούς trans-3,4-διχλωρο N-(2 (διμεθυλαμινο)κυκλοεξυλ)-N-μεθυλβενζαμιδίου (U-47700). Η αναφερόμενη συγκέντρωση του U-47700 στο περιφερικό αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,01μg/mL και 1,46μg/mL. Αυτές οι τιμές εξαρτώνται από τον τρόπο χορήγησης και από το εάν το φάρμακο χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα. [17]

Ένας 51χρονος Αυστραλός (61 κιλά, 175 εκ., δείκτη μάζας σώματος 19,9) ταξίδευε από την Πολωνία στη Ζυρίχη με μία στάση στο Βερολίνο. Βρέθηκε ανίσθητος στο μπάνιο του ξενοδοχείου όπου διέμενε. Στο καπάκι του καθίσματος της τουαλέτας βρέθηκαν σύνεργα χρήσης ναρκωτικών με λευκή σκόνη και σύριγγα με ίχνη αίματος. Οι προσπάθειες ανάνηψης απέτυχαν. Μετά τη νεκροψία υπήρχαν ενδείξεις για τα αίτια θανάτου, που περιελάμβαναν οίδημα στον εγκέφαλο, υπερυδάτωση των πνευμόνων και υπεραιμία των εσωτερικών οργάνων (καρδιά, σπλήνας, ήπαρ, νεφροί), ενώ παρατηρήθηκε αιχμή από σύριγγα στο δεξιό καρπό. Μεταξύ άλλων δειγμάτων συλλέχθηκε και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (δεν αναφέρεται η περιοχή συλλογής), το οποίο αναλύθηκε με Υγρή χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας (LC/MS). Η παρούσα μελέτη των Strehmel et al. που

δημοσιεύτηκε το 2018 ήταν η πρώτη αναφορά περιστατικού που παραθέτει τις κατανομές συγκεντρώσεων του U-47700 σε διάφορα δείγματα μετά από ενδοφλέβια ένεση. Βρέθηκε λοιπόν ότι η συγκέντρωσή της ουσίας στο περιφερικό αίμα (0,29μg/mL) ήταν χαμηλότερη σε σχέση με το ENY (0,4μg/mL).[17]

Case report 4: 3,4-μεθυλενοδιοξυपुरοβαλερόνη (MDPV)

Η 3,4-μεθυλενοδιοξυपुरοβαλερόνη (MDPV) είναι ένα ψυχοδραστικό συνθετικό ανάλογο της καθινόνης, ενός διεγερτικού του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η πρόσφατη δημοτικότητα του ως ψυχαγωγικό ναρκωτικό στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει οδηγήσει σε πολυάριθμες αναφορές στα κέντρα ελέγχου δηλητηριάσεων σε όλη τη χώρα. Όπως συμβαίνει και με άλλες συνθετικές καθινόνες, η χρήση του MDPV μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Το MDPV πιστεύεται ότι δρα αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης. Η μελέτη των John F. Wyman et al περιγράφει την περίπτωση έκθεσης ενός 39χρονου άνδρα σε MDPV, που είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατό του. Μετρήθηκαν οι μεταθανάτιες συγκεντρώσεις του MDPV σε διάφορους ιστούς και σωματικά υγρά με Αέρια χρωματογραφία /Φασματοσκοπία μάζας (GC/MS) μετά από κατεργασία τους με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE). Η συγκέντρωση του MDPV στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό βρέθηκε παρόμοια με τη συγκέντρωση στο αίμα (0,41 και 0,44μg/ml αντίστοιχα).[20]

Case report 5: Κοκαΐνη και βενζοϋλεκγονίνη

Η μελέτη των Alvear et al. που δημοσιεύθηκε το 2014 περιγράφει την επικύρωση μεθόδου για την ποσοτική ανάλυση της συγκέντρωσης της κοκαΐνης και του βασικού μεταβολίτη της, βενζοϋλεκγονίνης (BZE), σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα πέραν του συμβατικού αίματος, με σκοπό τη συστηματική χρήση τους σε ιατροδικαστικές υποθέσεις στις οποίες υπάρχει υποψία ή γνώση για τη λήψη παράνομων ουσιών. Στη μελέτη αυτή το θύμα ήταν ένας άνδρας 22 ετών με ύψος 1,72μ., και δείκτη μάζας σώματος 23,66. Η νεκροψία και δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 11,5 ώρες μετά το θάνατο. Η ακριβής συνθήκη του θανάτου ήταν η ασφυξία με απαγχονισμό (αυτοκτονία), χωρίς εμφανή συμμετοχή τρίτων. Μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν συμπεριλήφθηκε και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η ιατροδικαστική έκθεση, ωστόσο, ανέφερε τα αποτελέσματα μόνο για το αίμα από τη μηριαία φλέβα. Έπειτα από κατεργασία με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE), τα δείγματα αναλύθηκαν με Αέρια Χρωματογραφία/ Φασματομετρία Μάζας (GC/MS). Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της κοκαΐνης και της βενζοϋλεκγονίνης ήταν παρόμοιες στο περιφερικό αίμα και στο ENY, ενώ οι τιμές

στα υπόλοιπα υποστρώματα έδειξαν ανομοιόμορφη κατανομή των ουσιών, αποδεικνύοντας τη σημασία του ENY στην ποσοτικοποίησή τους.[53]

Case report 6: συνθετικά κανναβινοειδή 5F-MDMB-PICA και 4F-MDMB-BINACA

Τα συνθετικά κανναβινοειδή (Synthetic Cannabinoids, SCs) αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ομάδες νέων ψυχοδραστικών ουσιών με συνεχείς καταγραφές περιστατικών κατάχρησης στην Ευρώπη. Οι ουσίες αυτές δρουν ως μιμητές της τετραϋδροκανναβινόλης (THC) και συχνά η αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς της THC είναι ισχυρότερη. Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η δημοτικότητα μερικών νέων συνθετικών κανναβινοειδών, όπως τα 5F-MDMB-PICA και 4F-MDMB-BINACA. Εξαιτίας της ισχυρής τους δράσης, συνήθως η δόσεις τους είναι πολύ χαμηλές. Παράλληλα, ο καταβολισμός τους είναι ταχύς, με αποτέλεσμα επιπλέον μείωση των συγκεντρώσεών τους, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίησή τους στα βιολογικά υγρά. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η δυνατότητα προσδιορισμού των μεταβολιτών τους, οι οποίοι δρουν στον οργανισμό και μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι ένα πολύ σημαντικό βιολογικό δείγμα για τον προσδιορισμό των συνθετικών κανναβινοειδών.[54]

Η δημοσίευση των Tokarczyk et al. περιγράφει την ανάλυση μεταθανάτιων βιολογικών δειγμάτων (αίμα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό) που ελήφθησαν από έναν άντρα 33 ετών, λιποβαρή, ο οποίος έχασε τις αισθήσεις του έπειτα από χρήση συσκευής καπνίσματος με άγνωστες ουσίες. Στο σημείο βρέθηκαν ένας γυάλινος σωλήνας και δύο σβώλοι που αποδείχθηκε ότι περιείχαν 5F-MDMB-PICA και 4F-MDMB-BINACA. Κατά την ιατροδικαστική εξέταση δεν παρατηρήθηκαν σημάδια τραυματισμού. Τα δείγματα αίματος και ούρων αναλύθηκαν και για άλλες ουσίες. Και στα δύο δείγματα ανιχνεύθηκε αιθανόλη, ενώ τα αποτελέσματα για τετραϋδροκανναβινόλη, αμφεταμίνες, οπιοειδή, βενζοδιαζεπίνες και κοκαΐνη ήταν αρνητικά. Ακολούθησαν περαιτέρω ειδικές αναλύσεις για συγκεκριμένες ουσίες.[54]

Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με χρήση ακετονιτριλίου και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η διαλογή και οι ποσοτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με Υγρή χρωματογραφία με διαδοχική Φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία μάζας με ανιχνευτή χρόνου πτήσης (LC-Q/TOF). Το 5F-MDMB-PICA ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε όλα τα αναλύόμενα δείγματα, με συγκεντρώσεις 0,9ng/mL (αίμα), 0,1ng/mL (ούρα), ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό η συγκέντρωση ήταν τουλάχιστον τριπλάσια από εκείνη του αίματος (3,2ng/mL). Το 4F-MDMB-BINACA ανιχνεύθηκε μόνο στο εγκεφαλονωτιαίο

υγρό με συγκέντρωση 0,1ng/mL. Οι κύριοι μεταβολίτες και των δύο ενώσεων βρέθηκαν σε όλα τα αναλυόμενα σωματικά υγρά. Τα στοιχεία αυτά αποδεικνύουν τη χρησιμότητα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνθετικών κανναβινοειδών και του ρόλου τους στο θάνατο.[54]

Case report 7: 1,4-βουτανοδιόλη (1,4-BD)

Η 1,4-βουτανοδιόλη (1,4-BD) είναι μεταβολικό πρόδρομο μόριο του γ-υδροξυβουτυρικού οξέος (GHB). Μετά την πρόσληψη, η 1,4-BD μετατρέπεται ταχέως *in vivo* σε GHB. Οι κύριες επιδράσεις της 1,4-BD συνδέονται με τον μεταβολίτη GHB και τις κατασταλτικές επιδράσεις του στο ΚΝΣ.[55] Το γ-υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB, ή 4 υδροξυβουτανοϊκό οξύ), είναι ένα λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας, το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο του βασικού νευροδιαβιβαστή ανασταλτικού τύπου γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Παράγεται ενδογενώς στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική ως αναισθητικό και ως θεραπεία για την καταπληξία, τη ναρκοληψία και τον αλκοολισμό. Το νατριούχο άλας του GHB, το sodium oxybate, είναι εγκεκριμένο σε ορισμένες χώρες ως θεραπευτικός παράγοντας (Xyrem®) για τη θεραπεία της καταπληξίας που σχετίζεται με τη ναρκοληψία και, σε άλλες, είναι ένα επικουρικό φάρμακο (Alcover®) για αποτοξίνωση σε αλκοολικά άτομα. Από τη δεκαετία του 1980, το GHB άρχισε να χρησιμοποιείται ως ψυχαγωγικό και διεγερτικό μέσο, ενώ τα τελευταία χρόνια η παράνομη χρήση του έχει διευρυνθεί ως υποκατάστατο στεροειδών ορμονών στον αθλητισμό και ως δηλητήριο. Τα συμπτώματα που προκαλεί η χρήση του, όπως η χαλάρωση, η ευφορία, η ερωτική διέγερση, η απώλεια συνείδησης και η βραχεία αμνησία έχουν καταστήσει το GHB και τις πρόδρομες ενώσεις του, γ-βουτυρολακτόνη (GBL) και 1,4-βουτανοδιόλη (1,4-BD), ένα μέσο για εγκλήματα όπως η σεξουαλική παρενόχληση και ο βιασμός. Για το λόγο αυτό είναι πλέον ευρέως γνωστό ως «χάπι του βιασμού». Μεγάλες δόσεις των ουσιών αυτών μπορούν να οδηγήσουν σε πολύ σοβαρή τοξικότητα με βαριά συμπτώματα, ακόμα και το θάνατο. Η ψυχοτρόπος δράση του, η τοξικότητα και η χρήση του σε εγκληματικές ενέργειες καθιστούν κρίσιμο τον προσδιορισμό του σε βιολογικά δείγματα για ιατροδικαστικούς σκοπούς.[26][55-62]

Το 2001 η επιτροπή του ΟΗΕ για τα ναρκωτικά (Commission on Narcotic Drugs, CND) πρόσθεσε το GHB στο Παράρτημα IV της Σύμβασης των Ηνωμένων Εθνών του 1971 για τις Ψυχοτρόπες Ουσίες. Σε πολλές χώρες δεν υπάρχουν περιορισμοί για το εμπόριο των ενεργών μεταβολικών προδρόμων ουσιών 1,4-BD και GBL, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία, γεγονός που έχει οδηγήσει σε αυξανόμενη δημοτικότητα και αναδυόμενη κατάχρηση αυτών των ουσιών αντί του GHB.[55]

Η δημοσίευση των Fischer et al. περιγράφει ένα πραγματικό περιστατικό στο οποίο μεταξύ των δειγμάτων που ελήφθησαν για ανάλυση ήταν και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ένας 51χρονος βρέθηκε νεκρός στο κρεβάτι του. Στον πάγκο της κουζίνας βρέθηκε ένα γυάλινο μπουκάλι με την ένδειξη «Butandiol 1,4» (χωρητικότητας 250 mL) καθώς και μια σύριγγα (χωρητικότητας 5mL) χωρίς κάνουλα. Σύμφωνα με την αστυνομική έκθεση, δεν εντοπίστηκαν σημάδια παραβίασης στο διαμέρισμα, ούτε σημάδια πάλης/άσκησης βίας. Ο θανών ήταν γνωστός χρήστης ψυχοδραστικών ουσιών και έπασχε από κατάθλιψη χωρίς καμία άλλη αναφερόμενη ασθένεια. Επιπλέον, ένας φίλος του θανόντος ενημέρωσε την αστυνομία ότι ο θανών χρησιμοποιούσε συχνά 1,4-BD για να εξασφαλίσει έναν «καλό ύπνο». Πριν από το θάνατό του, ο εκλιπών δεν έδειξε τάσεις αυτοκτονίας. Το μεταθανάτιο διάστημα παρέμεινε άγνωστο.[55]

Παράλληλα με τις ιστολογικές εξετάσεις που έγιναν σε όργανα, πραγματοποιήθηκαν και τοξικολογικές εξετάσεις για την παρουσία της 1,4- BD σε ούρα, γαστρικό υγρό και στο περιεχόμενο του μπουκαλιού που βρέθηκε στην κουζίνα και του GHB σε δείγματα μηριαίου και καρδιακού αίματος, ούρων, υαλοειδούς και εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Παράλληλα συλλέχθηκαν και τρίχες από το οπίσθιο μέρος του κεφαλιού και αναλύθηκαν και για τις δύο ενώσεις. Τα δείγματα αίματος και ούρων αναλύθηκαν και για την παρουσία άλλων ουσιών. Η ανάλυση για το GHB στο ENY και στα υπόλοιπα δείγματα πραγματοποιήθηκε με Αέρια χρωματογραφία Headspace συζευγμένη με Φασματομετρία μάζας, έπειτα από κατεργασία τους με Δυναμική Εκχύλιση Στερεάς Φάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία 1,4-BD και GHB σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα για άλλες ψυχοτρόπες ουσίες συμπεριλαμβανομένης και της αιθανόλης ήταν αρνητικά. Η συγκέντρωσή του GHB στο ENY ήταν 420mg/L, ίδια με εκείνη του μηριαίου και καρδιακού αίματος (390 και 420mg/L αντίστοιχα). [55]

Case report 8: Μεθυλική αλκοόλη ή μεθανόλη

Η μεθανόλη (CH_3OH), γνωστή επίσης ως μεθυλική αλκοόλη, χρησιμοποιείται ευρέως ως διαλύτης σε διάφορες βιομηχανίες. Παρά τους κανόνες ασφαλείας που πρέπει να τηρούνται στις βιομηχανίες για την ασφάλεια και την προστασία από επικίνδυνες ουσίες, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις ατυχημάτων που έχουν εκθέσει τους εργαζόμενους σε μεγάλες ποσότητες μεθανόλης. Παράλληλα, η μεθανόλη είναι ένα παραπροϊόν της απόσταξης κατά την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, ιδιαίτερα εκείνων που προέρχονται από φρούτα ή άλλα συστατικά πλούσια σε πηκτίνη. Δυστυχώς η λανθασμένη τεχνική, η παράλειψη απομάκρυνσης της μεθανόλης από το τελικό προϊόν, η έλλειψη ποιοτικού ελέγχου και η παράνομη νοθεία που πολλές φορές χαρακτηρίζουν την παραγωγή κατώτερης ποιότητας και

πιο οικονομικών ποτών, μπορούν να οδηγήσουν στην αυξημένη ακούσια κατανάλωση μεθανόλης. Η δηλητηρίαση από μεθανόλη παραμένει ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Οι τοξικές επιπτώσεις της μεθανόλης οφείλονται στη μετατροπή της σε φορμαλδεΐδη και στη συνέχεια σε μυρμηκικό οξύ από τη αλκοολική αφυδρογονάση και την αλδεϋδική αφυδρογονάση, αντίστοιχα, προκαλώντας μεταβολική οξέωση και βλάβη στα όργανα. Η κατάποση ακόμη και μικρών ποσοτήτων μεθανόλης μπορεί να είναι θανατηφόρα, με την θανατηφόρα δόση να κυμαίνεται από 300 έως 1000mg/kg. Η δηλητηρίαση από μεθανόλη μπορεί να προκαλέσει μόνιμες επιπλοκές στην υγεία, όπως νευροπάθεια του οπτικού νεύρου. Οι βλάβες που προκαλούνται είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με έγκαιρη θεραπεία. Η θεραπεία περιλαμβάνει συνήθως χορήγηση ουσιών όπως η αιθυλική αλκοόλη και η φορμεπιζόλη, οι οποίες ανταγωνίζονται την πρόσδεση της μεθανόλης στην αλκοολική αφυδρογονάση μειώνοντας το μεταβολισμό της, καθώς και αιμοδιάλυση. Η φορμεπιζόλη θεωρείται το πιο αποτελεσματικό αντίδοτο λόγω της ισχυρής συγγένειάς της με την αλκοολική αφυδρογονάση. Η αυξημένη συχνότητα περιστατικών δηλητηρίασης από μεθανόλη είτε από ατυχήματα στο εργασιακό περιβάλλον είτε από κατανάλωση κατώτερης ποιότητας αλκοολούχων ποτών καθιστά αναγκαίο τον προσδιορισμό της σε κλινικά και μεταθανάτια βιολογικά δείγματα.[63]

Η δημοσίευση των Tomsia et al. περιγράφει την ποσοτικοποίηση της κατανομής της μεθανόλης και του μυρμηκικού οξέος σε μεταθανάτια βιολογικά δείγματα ιστών και σωματικών υγρών που συλλέχθηκαν από 19 θύματα μαζικής δηλητηρίασης με βιομηχανική μεθανόλη μετά από κατανάλωση παράνομων αλκοολούχων ποτών στην περιοχή της Σιλεσίας (Πολωνία) μεταξύ Απριλίου και Ιουνίου 2022. Τα 5 από τα 19 θύματα είχαν λάβει θεραπεία για την απομάκρυνση της μεθανόλης πριν από το θάνατό τους. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν αίμα από τη μηριαία φλέβα, ούρα, υαλοειδές υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, χολή και ιστοτεμάχια από τους μύες, το ήπαρ, τους νεφρούς, το σπλήνα και τον εγκέφαλο. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID). Τα αποτελέσματα έδειξαν ευρεία κατανομή των δύο ουσιών σε όλα τα βιολογικά δείγματα. Η μεθανόλη ανιχνεύτηκε στα 14 και το μυρμηκικό οξύ στα 13 από τα 19 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης της συγκέντρωσης των δύο ουσιών σε κάθε δείγμα με εκείνη του αίματος. Για τη μεθανόλη το βιολογικό δείγμα με το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης ήταν το ENY ($r=0,997$), ενώ για το μυρμηκικό οξύ ο μυϊκός ιστός.[63]

4. Νέες μέθοδοι για τον προσδιορισμό ξενοβιοτικών ουσιών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό

4.1 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας μεθόδου UHPLC-DAD για την ανάλυση άτυπων αντιψυχωσικών σε πλήρες αίμα, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό μετά από SPE.

Τα αντιψυχωσικά, γνωστά και ως νευροληπτικά, είναι κατηγορία ψυχοτρόπων φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κυρίως για τη διαχείριση της ψύχωσης (συμπεριλαμβανομένων των παραληρημάτων, των ψευδαισθήσεων, της παράνοιας ή της διαταραγμένης σκέψης), κυρίως στη σχιζοφρένεια αλλά και σε μια σειρά από άλλες ψυχωσικές διαταραχές.[64] Τα άτυπα αντιψυχωσικά είναι μία κατηγορία νεότερων αντιψυχωσικών φαρμάκων που διαφέρουν από τα παλαιότερα (που ονομάζονται τυπικά) στο ότι είναι λιγότερο πιθανό να προκαλέσουν απώλεια κινητικού ελέγχου σε ασθενείς. Παρότι χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά φάρμακα, τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει αρκετές περιπτώσεις κατάχρησής τους με αποτέλεσμα το θάνατο. Τα τέσσερα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα άτυπα αντιψυχωσικά στην Ελλάδα είναι η ισπεριδόνη, η κουετιαπίνη, η αμισουλπρίδη και η αριπιπραζόλη. Το 2012, σε δημοσίευση τους οι Konatsi et al. περιγράφουν την ανάπτυξη και επικύρωση νέας μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Πολύ Υψηλής Απόδοσης με χρήση ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων(UHPLC-DAD) για την ποσοτικοποίηση αυτών των φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα (ολικό αίμα, ούρα), συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. [24]

Η μέθοδος προτείνει την προκατεργασία 200μl δείγματος ENY με 200μl ακετονιτριλίου για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), με αποτέλεσμα οι προς ανάλυση ουσίες να είναι επαναδιαλυτοποιημένες σε 200ml μεθανόλης. Ακολουθεί έγχυση 10μl του τελικού διαλύματος στη χρωματογραφική στήλη. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το Ceftiofur (CFU). Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες δημιουργήθηκαν με εμβολισμό (spike) δειγμάτων ENY που προέρχονταν από αυτοψίες με γνωστό ιστορικό μη χρήσης των συγκεκριμένων φαρμάκων. Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση παρασκευάστηκαν με διαλύτη μεθανόλη και διαφορετικές συγκεντρώσεις των προς εξέταση φαρμάκων από 0,05 έως 10ng/μl, με σκοπό να καλύπτουν τόσο τις θεραπευτικές όσο και τις τοξικές συγκεντρώσεις κάθε φαρμάκου στο αίμα. Τα δείγματα βιολογικών υλικών που αναλύθηκαν συλλέχθηκαν από αυτοψίες στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, και προέρχονταν από άτομα τα οποία ήταν γνωστό ότι τους είχαν συνταγογραφηθεί και χορηγηθεί τα συγκεκριμένα φάρμακα. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε όσον αφορά τη

γραμμικότητα, την επιλεκτικότητα, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη σταθερότητα. Σχετικά με την ευαισθησία, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου είναι χαμηλά (σε ng/μl) (αμισουλπρίδη: LOD=0.8 και LOQ=2.61, αριπιπραζόλη: LOD=0.21 και LOQ=0,64, κουετιαπίνη: LOD=0,24 και LOQ=0,73, ρισπεριδόνη: LOD=0,24 και LOQ=0,71). Η ανάλυση για την επιλεκτικότητα της μεθόδου έδειξε απουσία παρεμβολής από τη μήτρα, τόσο για το ENY, όσο και για τα δείγματα αίματος και ούρων.[24]

Η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε πραγματικά θετικά δείγματα που ελήφθησαν από αυτοψίες στο ίδιο εργαστήριο. Ένα δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού αναλύθηκε, το οποίο η μέθοδος έδειξε ότι περιείχε 0,07ng/μl κουετιαπίνης. Καθώς η τιμή αυτή βρίσκεται κάτω από το LOQ της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του δείγματος και επανάληψη της ανάλυσής του.[24]

Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη, απλή, σταθερή και αξιόπιστη για χρήση είτε στην κλινική είτε στην ιατροδικαστική τοξικολογία. Μάλιστα, σύμφωνα με τους συγγραφείς, είναι η μόνη διαθέσιμη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των φαρμάκων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.[24]

4.2 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας απλής μεθόδου HPLC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης και δύο αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης στα μαλλιά, τα νύχια και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Η σεροτονίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου που εμπλέκεται στη σωστή λειτουργία του, τη διάθεση και τα συναισθήματα, ενώ η χαμηλή διαθεσιμότητά της στις νευρικές συνάψεις συνδέεται με την κατάθλιψη. Οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης είναι φάρμακα τα οποία μπλοκάρουν τους υποδοχείς σεροτονίνης, εμποδίζοντας την επαναπρόσληψή της και διατηρώντας τα επίπεδά της στις συνάψεις σε φυσιολογικά επίπεδα. Δρουν έτσι ως αντικαταθλιπτικά. Παρότι αυτά τα φάρμακα χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα, συχνά η ταυτόχρονη πρόσληψή τους με άλλα φάρμακα και ουσίες μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα, ακόμα και το θάνατο. Αυτό καθιστά αναγκαία τη δυνατότητα προσδιορισμού τους στα μεταθανάτια βιολογικά δείγματα. Το 2011, οι Samanidou et al. προχώρησαν στην ανάπτυξη και επικύρωση νέας απλής μεθόδου UHPLC για τον προσδιορισμό τεσσάρων φαρμακευτικών ουσιών με δράση αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης (βενλαφλαξίνη,

παροξετίνη, δουλοξετίνη, φλουοξετίνη) σε τρία εναλλακτικά μεταθανάτια βιολογικά δείγματα, τα μαλλιά, τα νύχια και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.[25][65]

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης των υπό εξέταση ουσιών με την ομογενοποίηση κατάλληλης ποσότητας φαρμακευτικών σκευασμάτων που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο σε μεθανόλη. Τα πρότυπα διαλύματα κάθε ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση παρασκευάστηκαν με επιπλέον αρραίωση των παραπάνω σε μεθανόλη με πέντε τελικές συγκεντρώσεις μεταξύ 0,5 και 10ng/μl. Δείγματα ENY τα οποία δεν περιείχαν τα εν λόγω φάρμακα λήφθηκαν από αυτοψίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η προκατεργασία τους για τη χρήση στη μέθοδο γίνεται με αρραίωση 1:3 σε ακετοννυτρίλιο. Σε αυτό το στάδιο, τα δείγματα ENY που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών εμβολίστηκαν επιπλέον με τα πρότυπα διαλύματα σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί φυγοκέντρωσή τους, ξήρανση του υπερκειμένου σε ρεύμα αζώτου, επαναδιαλυτοποίησή τους σε μεθανόλη και έγχυση μικρής ποσότητας στη χρωματογραφική στήλη. Ο προσδιορισμός των εκλούμενων ουσιών έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας στα 235nm.[25]

Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε όσον αφορά τη γραμμικότητα, την επιλεκτικότητα, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη σταθερότητα της μεθόδου. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν 0,2 και 0,6ng/μl για τη βενλαφλαξίνη, 0,1 και 0,3ng/μl για την παροξετίνη, 0,7 και 2,1ng/μl για τη δουλοξετίνη και 0,4 και 1,2ng/μl για τη φλουοξετίνη αντίστοιχα.[25]

Η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε πραγματικά δείγματα από μαλλιά και νύχια από ασθενή ο οποίος ελάμβανε φλουοξετίνη, όχι όμως σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Συμπερασματικά, είναι μία μέθοδος με απλή και γρήγορη επεξεργασία δειγμάτων και δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό για τον προσδιορισμό των διαφορετικών ουσιών. Είναι δυνατό, επομένως, να χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αντικαταθλιπτικών αυτών φαρμάκων σε μεταθανάτια δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού.[25]

4.3 Ανάπτυξη και Επικύρωση νέας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών ξενοβιοτικών ουσιών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Τον Οκτώβριο του 2024 οι Alexandra Dimitrova et al. προχώρησαν στην επικύρωση μιας ευαίσθητης αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των ναρκωτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους (κοκαΐνη, κεταμίνη, αμφεταμίνη,

MDPV, 6-μονοακετυλομορφίνη, μορφίνη, κωδεΐνη και μεθαδόνη) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μέσω Υγρής χρωματογραφίας- διαδοχικής Φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS). Το ENY που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από το σύστημα κοιλιών του εγκεφάλου από πτώματα με γνωστό διάστημα από το θάνατο 3 ημέρες χωρίς εγκεφαλικά τραύματα ή γνωστές νευρολογικές/μεταβολικές ασθένειες και χωρίς εξωτερικά/εσωτερικά σημάδια προχωρημένης σήψης. Στη συνέχεια εμβολίστηκε (spike) με τα προς ανάλυση ναρκωτικά και τους μεταβολίτες τους, με σκοπό την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών αναλυτών στο κάθε δείγμα. Η προκατεργασία του δείγματος που προτείνει η μέθοδος αυτή είναι η χρήση ακετονουτρυλίου όγκου από 200 έως 500μL και θερμοκρασίας -25°C έως +20°C με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Protein Precipitation, PP). Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση της τεχνικής τριπλού τετραπόλου MS/MS επιτυγχάνοντας δύο μεταπτώσεις για την κάθε εξεταζόμενη ουσία. Εξασφάλισαν έτσι υψηλότερη ευαισθησία από προηγούμενες μελέτες με ελάχιστα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) από 0,05 έως 5ng/ml. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της νέας μεθόδου είναι ο χαμηλός όγκος απαιτούμενου δείγματος(200μl) και η απλή και γρήγορη προκατεργασία του. Παράλληλα, φαίνεται να είναι πιο σύντομη και με μικρότερο κόστος από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε προαναφερθείσες μελέτες, στις οποίες η κατεργασία του δείγματος έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και υγρού-υγρού (LLE) χρησιμοποιώντας διαφορετικό διαλύτη ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε εξεταζόμενης ουσίας.[21]

Case report

Η μέθοδος που επικυρώθηκε εφαρμόστηκε σε ένα πραγματικό περιστατικό, αποδεικνύοντας ότι είναι κατάλληλη για μεταθανάτιες αναλύσεις. Μια 40χρονη γυναίκα βρέθηκε νεκρή σε γνωστή περιοχή διακίνησης ναρκωτικών στη Φλωρεντία. Για την εξακρίβωση της αιτίας του θανάτου και τον αποκλεισμό της παρέμβασης τρίτων, παραγγέλθηκε νεκροτομή και τοξικολογική έρευνα από την εισαγγελική αρχή. Τα αποτελέσματα της νεκροτομής έδειξαν αιφνίδιο θάνατο από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η γυναίκα, έπασχε από ψυχιατρικές διαταραχές και είχε ιστορικό κατάχρησης ψυχοδραστικών ουσιών, ιδίως ηρωίνης και κοκαΐνης. Λάμβανε θεραπεία για βενζοδιαζεπίνες και μεθαδόνη. Για την τοξικολογική ανάλυση συλλέχθηκαν δείγματα κεντρικού αίματος και ENY. Το αίμα αναλύθηκε σύμφωνα με μια προηγουμένως δημοσιευμένη διαδικασία. Για το ENY εφαρμόστηκε η προαναφερθείσα επικυρωμένη μέθοδος. Και τα δύο δείγματα ήταν θετικά για λοραζεπάμη, μεθαδόνη, κοκαΐνη και βενζοϋλεγκονίνη με υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από άλλες μελέτες σχετικά με τις αναλογίες συγκέντρωσης στο αίμα/ENY για αυτές τις ουσίες, εκτός από την κοκαΐνη και τον κύριο μεταβολίτη της βενζοϋλεγκονίνη που είναι >1. Ωστόσο, σύμφωνα με

τα αποτελέσματα της εφαρμογής αυτής της μεθόδου οι αναλογίες ήταν ~0,5 και ~0,7, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ENY από ότι στο αίμα. Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για την καλύτερη αξιολόγηση της κατανομής των ουσιών.[21]

Η μέθοδος αυτή για τη μέτρηση φαρμάκων/ ψυχοδραστικών ουσιών στο ENY μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τις ιατροδικαστικές υποθέσεις, τόσο λόγω της ευαισθησίας όσο και της δυνατότητας ταυτόχρονης μέτρησης ουσιών με διαφορετικές ιδιότητες. Παράλληλα, διευκολύνει και προωθεί τη χρήση του ENY ως εναλλακτικό δείγμα στη δικανική τοξικολογία. [21]

4.4 Ανάπτυξη και Επικύρωση μεθόδου UHPLC–MS/MS για τον προσδιορισμό του γ-υδροξυβουτυρικού οξέος (GHB), πρόδρομων ουσιών και μεταβολιτών του σε διαφορετικά δείγματα

Καθώς το GHB αποτελεί και ενδογενή ουσία του οργανισμού, σε μία ιατροδικαστική εξέταση, εκτός από την ανίχνευσή του, είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί αν η παρουσία του είναι ενδογενής ή εξωγενής. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάλυση διαφορετικών βιολογικών υγρών σε κάθε περιστατικό. Έχει προταθεί ότι σε εν ζωή άτομα τιμές υψηλότερες από 5gr/ml για το αίμα και 10gr/ml για τα ούρα υποδηλώνουν κατανάλωση εξωγενούς GHB, ενώ η ίδια συγκέντρωση στα ούρα χρησιμοποιείται και για μεταθανάτια δείγματα.[62] Στην περίπτωση μίας καταγγελίας ενός εγκλήματος με χρήση GHB, επειδή συχνά οι καταγγελίες συμβαίνουν μετά το πέρας του χρόνου που τα αποτελέσματα από τα συγκεκριμένα βιολογικά δείγματα είναι ασφαλή, χρησιμοποιούνται και εναλλακτικά βιολογικά δείγματα, όπως οι τρίχες, που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την έκθεση σε εξωγενές GHB ακόμη και μετά από αρκετό καιρό.[26][62]

Σύμφωνα με μελέτη των Kietzerow et al., το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι χρήσιμο δείγμα για την εκτίμηση των μεταθανάτιων συγκεντρώσεων GHB με σκοπό τη διαφοροποίηση μεταξύ ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσής του. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με βάση την ανάλυση του ENY χαρακτηρίστηκαν από καλή σταθερότητα, ακόμη και κατά την παρατεταμένη αποθήκευση του δείγματος, και παρόλο που αυτό δεν επηρέασε τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών, αποδείχθηκε επιπλέον ότι το ENY είχε σχετικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε βακτήρια σε σύγκριση με άλλα σωματικά υγρά. Στο μεταθανάτιο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, έχει προταθεί η τιμή 30gr/ml για τη διάκριση μεταξύ ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης. [62] Λόγω των πλεονεκτημάτων του ENY ως εναλλακτικό βιολογικό υλικό ορισμένες μελέτες εστιάζουν στην ανάπτυξη μεθόδων

για τη χρήση του στον προσδιορισμό του GHB και των πρόδρομων μορίων και μεταβολιτών του σε εν ζωή άτομα και σε μεταθανάτια δείγματα.

Στη δημοσίευση των Busardò et al. περιγράφεται η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Πολύ Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με Φασματομετρία μάζας πολλαπλών μεταπτώσεων (UHPLC-MS/MS) για τον προσδιορισμό της οξείας και χρόνιας έκθεσης σε GHB και παράλληλα την ποσοτικοποίηση αυτών των ουσιών σε κατασχεμένα παράνομα σκευάσματα του εμπορίου. Η μέθοδος αφορά δείγματα πλάσματος, ούρων, τριχών και εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη του εγκεφαλονωτιαίου υγρού παρασκευάστηκαν προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες των πρότυπων διαλυμάτων των ουσιών σε τεχνητή μήτρα διαλύματος 0,9% χλωριούχου νατρίου, ως υποκατάστατο του ENY. Τα πρότυπα αυτά διαλύματα καθώς και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση παρασκευάστηκαν με προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών GHB, GHB-Gluc, GABA και GBL σε μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση. Η προκατεργασία των προς ανάλυση δειγμάτων ENY γίνεται με ανάμιξη 20μl ENY με 20μl εσωτερικού προτύπου και 70μl ακετονιτριλίου. Ακολουθούν 30 δευτερόλεπτα έντονης ανάδευσης(vortex), φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 3000g και ξήρανση σε ρεύμα αζώτου (5 λεπτά στους 40°C). Έπειτα από επαναδιαλυτοποίηση σε 100μl υδατικού διαλύματος φορμικού οξέος 0,1%, 10μl του τελικού δείγματος εγχύονται στη χρωματογραφική στήλη. Για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM). Η μέθοδος ήταν γραμμική μέχρι τα 500μg/ml με όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης LOD=0.2μg/ml και LOQ=0.5μg/ml για τα GHB και GABA και LOD=0,3μg/ml και LOQ=1μg/ml για τα GHB-Gluc και GBL, με καλή ακρίβεια άνω του 15% και ανάκτηση των αναλυόμενων ουσιών άνω του 75% σε όλες τις περιπτώσεις. Η επικυρωμένη μέθοδος στη συνέχεια εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού που συλλέχθηκαν από ναρκοληπτικούς ασθενείς υπό θεραπεία με Xyrem®.[26]

Ταυτόχρονα με τα βιολογικά δείγματα που αναλύθηκαν, η ίδια μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε και για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων ουσιών σε παράνομα σκευάσματα του εμπορίου. Η μέθοδος αυτή είναι η πρώτη που επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των GHB, GHB-Gluc, GBL και GABA σε τέσσερις διαφορετικές βιολογικές μήτρες (πλάσμα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τρίχα) μετά από ελάχιστη προεπεξεργασία δείγματος. [26]

5. Επίλογος

Συμπερασματικά, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί ένα σημαντικό βιολογικό δείγμα στη δικανική τοξικολογία, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τοξικών ουσιών στον οργανισμό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως εναλλακτικό δείγμα, όταν υπάρχει αδυναμία εξασφάλισης των συμβατικών δειγμάτων, είτε συμπληρωματικά για την φαρμακοκινητική/τοξικοκινητική ανάλυση των ξενοβιοτικών ουσιών και την ερμηνεία άλλων ιατροδικαστικών ευρημάτων. Η ανάλυσή του επιτρέπει τη διάγνωση δηλητηριάσεων και την αξιολόγηση της έκθεσης σε τοξικές ουσίες και συμβάλλει σημαντικά στην αναγνώριση αιτίων θανάτου ή νόσων που συνδέονται με την τοξικότητα, ειδικότερα στην περιοχή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Παρά τις προκλήσεις που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη συλλογή και ανάλυση του ENY, η εξέλιξη των τεχνικών ανάλυσης και η συνεχής πρόοδος στη δικανική τοξικολογία ενδυναμώνουν τις δυνατότητες αξιοποίησής του στην επιστημονική και νομική έρευνα. Ήδη στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για τη συμβολή του ENY στον προσδιορισμό των επιπέδων αιθανόλης, θεραπευτικών φαρμάκων και ψυχοδραστικών ουσιών (νόμιμων και παράνομων) και τη συσχέτισή τους με τα αντίστοιχα στο αίμα. Συνεχείς μελέτες μπορούν να συμβάλουν στην περεταίρω αξιοποίησή του για την πρόβλεψη των επιπέδων των ξενοβιοτικών ουσιών στο αίμα όταν αυτό δεν είναι διαθέσιμο και την εκτίμηση της τοξικολογικής κατάστασης του οργανισμού κατά τη στιγμή του θανάτου.

6. Βιβλιογραφία

1. Wachholz, P., Skowronek, R., & Pawlas, N. (2021). Cerebrospinal fluid in forensic toxicology: Current status and future perspectives. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 82, 102231. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102231>
2. Telano, L. N., & Baker, S. (2023, July 4). Physiology, cerebral spinal fluid. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/>
3. Damkier, H. H., Brown, P. D., & Praetorius, J. (2010). Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology*, 25(4), 239–249. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2010>
4. Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
5. Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2010). *Ανασκόπηση ιατρικής φυσιολογίας* (Guyton & Hall). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Παρισιάνου.
6. Garland, J., Philcox, W., Kesha, K., Morrow, P., Lam, L., Spark, A., Palmiere, C., Elstube, H., Cala, A. D., Stables, S., & Tse, R. (2018). Differences in sampling site on postmortem cerebrospinal fluid biochemistry: A preliminary study. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 39(4), 304–308. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000420>
7. Ιωάννου, Π. Ι. (2008). *Φαρμακοκινητική μελέτη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) μετά από ενδοκοιλιακή έγχυση θανκομυκίνης, τεϊκοπλανίνης και νετιλμικίνης* [Διδακτορική διατριβή]. Πανεπιστήμιο Πατρών.
8. Wachholz, P., Skowronek, R., & Pawlas, N. (2022). Assessing the applicability of cerebrospinal fluid collected from the spinal cord for the determination of ethyl alcohol in post-mortem toxicology. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 18(1), 53–59. <https://doi.org/10.1007/s12024-022-00560-8>
9. Πουλιόπουλος, Α. (2018). *Μελέτη των συνθηκών απομόνωσης και προσδιορισμού συγκεντρώσεων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων* [Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης].
10. Khasawneh, A. H., Garling, R. J., & Harris, C. A. (2018). Cerebrospinal fluid circulation: What do we know and how do we know it? *Brain Circulation*, 4(1), 14–18. https://doi.org/10.4103/bc.bc_3_18
11. Gallardo, E., & Queiroz, J. A. (2008). The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*, 22(8), 795–821. <https://doi.org/10.1002/bmc.1009>
12. Swain, R., Krishna, K., Singh, S. R., & Behera, C. (2012). Post mortem biochemistry—Sampling and preservation. *Journal of Punjab Academy of Forensic Medicine and Toxicology*, 12, 121–124.
13. Forrest, A. R. (1993). Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and

biochemical analyses. *Journal of Clinical Pathology*, 46(4), 292–296.
<https://doi.org/10.1136/jcp.46.4.292>

14. Staeheli, S. N., Poetzsch, M., Kraemer, T., & Steuer, A. E. (2015). Development and validation of a dynamic range-extended LC-MS/MS multi-analyte method for 11 different postmortem matrices for redistribution studies applying solvent calibration and additional ¹³C isotope monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6525–6537. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9023-5>
15. Jaklińska, A. (1968). Studies on the value of simultaneously determining alcohol with Widmark's method in blood and in cerebrospinal fluid after death. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 18, 67–72.
16. Tominaga, M., Michiue, T., Ishikawa, T., Inamori-Kawamoto, O., Oritani, S., & Maeda, H. (2015). Evaluation of postmortem drug concentrations in cerebrospinal fluid compared with blood and pericardial fluid. *Forensic Science International*, 254, 118–125.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.005>
17. Strehmel, N., Dümpelmann, D., Vejmelka, E., et al. (2018). Another fatal case related to the recreational abuse of U-47700. *Forensic Science, Medicine and Pathology*.
<https://doi.org/10.1007/s12024-018-0018-3>
18. Libiseller, K., Pavlic, M., Grubwieser, P., & Rabl, W. (2007). An announced suicide with ecstasy. *International Journal of Legal Medicine*, 121(1), 40–43. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0039-9>
19. Freni, F., Pezzella, S., Vignali, C., Moretti, M., Cisini, S., Rossetti, C., Ravizza, R., Motta, M., Groppi, A., & Morini, L. (2019). A case report on potential postmortem redistribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP. *Forensic Science International*, 304, 109915.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109915>
20. Wyman, J. F., Lavins, E. S., Engelhart, D., Armstrong, E. J., Snell, K. D., Boggs, P. D., Taylor, S. M., Norris, R. N., & Miller, F. P. (2013). Postmortem tissue distribution of MDPV following lethal intoxication by “bath salts.” *Journal of Analytical Toxicology*, 37(3), 182–185.
<https://doi.org/10.1093/jat/bkt001>
21. Dimitrova, A., Croce, E. B., Iaquinta, G., Ferri, E., Faccioli, S., Chiavacci, G., Gualco, B., Focardi, M., Grassi, S., & Vaiano, F. (2024). Exploring cerebrospinal fluid: Validation of a new method for quantification of 39 drugs of abuse by LC-MS/MS. *Forensic Science*, 4(4), 546–554.
<https://doi.org/10.3390/forensicsci4040036>
22. Simic, M., Ajdukovic, N., Veselinovic, I., Mitrovic, M., & Djurendic-Brenesel, M. (2012). Endogenous ethanol production in patients with diabetes mellitus as a medicolegal problem. *Forensic Science International*, 216(1–3), 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.09.003>
23. Thelander, G., Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2020). High correlation between ethanol concentrations in postmortem femoral blood and in alternative biological specimens but large uncertainty when the linear regression model was used for prediction in individual cases. *Journal*

of *Analytical Toxicology*, 44(5), 415–421. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa018>

24. Kovatsi, L., Redifis, K., Mihailidou, K., Pavlidis, P., & Samanidou, V. (2012). A validated UHPLC-diode array detector method for the bioanalysis of atypical antipsychotics in whole blood, urine and cerebrospinal fluid following SPE. *Bioanalysis*, 4(24), 2929–2938. <https://doi.org/10.4155/bio.12.276>
25. Samanidou, V., Pantazidou, K., Kovatsi, L., Njau, S., & Livanos, A. (2012). A simple HPLC method for the simultaneous determination of two selective serotonin reuptake inhibitors and two serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors in hair, nail clippings, and cerebrospinal fluid. *Journal of Separation Science*, 35(7), 839–845. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100849>
26. Busardò, F. P., Kyriakou, C., Marchei, E., Pacifici, R., Pedersen, D. S., & Pichini, S. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.022>
27. Lemos, N. P. (2014). Ethanol analysis in postmortem and human performance forensic toxicology cases. *Journal of Forensic Sciences*, 59(5), 1232–1240. <https://doi.org/10.23907/2014.023>
28. Brust, J. C. M. (2010). Ethanol and cognition: Indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1540–1557. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041540>
29. Alpert, H. R., Slater, M. E., Yoon, Y. H., Chen, C. M., Winstanley, N., & Esser, M. B. (2022). Alcohol consumption and 15 causes of fatal injuries: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Preventive Medicine*, 63(2), 286–300. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2022.03.025>
30. Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2007). Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International*, 165(1), 10–29. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.004>
31. Ελλάδα. (1999). *Κώδικας Οδικής Κυκλοφορίας* (Ν. 2696/1999, ΦΕΚ Α' 57/23.03.1999). Εφημερίδα της Κυβερνήσεως.
32. Boumba, V., Kourkoumelis, N., Ziavrou, K., & Vougiouklakis, T. (2019). Estimating a reliable cutoff point of 1-propanol in postmortem blood as marker of microbial ethanol production. *Journal of Forensic Science and Medicine*, 5(3), 141–146. https://doi.org/10.4103/jfsm.jfsm_8_19
33. Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, 142(2–3), 75–100. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.012>
34. Bogusz, M., Gumińska, M., & Markiewicz, J. (1970). Studies on the formation of endogenous ethanol in blood putrefying in vitro. *Journal of Forensic Medicine*, 17(4), 156–168. PMID: 5495839.
35. Kala, M., & Chudzikiewicz, E. (2003). The influence of post-mortem changes in biological material on interpretation of toxicological analysis results. *Problems of Forensic Sciences*, 54, 32–59.

36. Tomsia, M., Nowicka, J., Skowronek, R., Woś, M., Wójcik, J., Drożdżiok, K., Zorychta, M., Javan, G. T., & Chelmecka, E. (2020). A comparative study of ethanol concentration in costal cartilage in relation to blood and urine. *Processes*, 8(12), 1637. <https://doi.org/10.3390/pr8121637>
37. Gettler, A. O., & Freireich, A. W. (1931). Determination of alcohol intoxication during life by spinal fluid analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 92, 199–209.
38. Ζιαβρού, Κ. (2005). *Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταθανάτια συγκέντρωση της αιθανόλης σε βιολογικά υλικά* [Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων].
39. Engelhart, D. A., & Jenkins, A. J. (2007). Comparison of drug concentrations in postmortem cerebrospinal fluid and blood specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(9), 581–586. <https://doi.org/10.1093/jat/31.9.581>
40. Johanson, C. E., Duncan, J. A., Stopa, E. G., & Baird, A. (2005). Enhanced prospects for drug delivery and brain targeting by the choroid plexus–CSF route. *Pharmaceutical Research*, 22(7), 1011–1037. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-6039-0>
41. Moriya, F., & Hashimoto, Y. (1999). Pericardial fluid as an alternative specimen to blood for postmortem toxicological analyses. *Legal Medicine*, 1(2), 86–94. [https://doi.org/10.1016/s1344-6223\(99\)80018-2](https://doi.org/10.1016/s1344-6223(99)80018-2)
42. Moriya, F., & Hashimoto, Y. (2000). Criteria for judging whether postmortem blood drug concentrations can be used for toxicologic evaluation. *Legal Medicine*, 2(3), 143–151. [https://doi.org/10.1016/s1344-6223\(00\)80014-0](https://doi.org/10.1016/s1344-6223(00)80014-0)
43. Caldwell, J., Dring, L. G., & Williams, R. T. (1972). Norephedrine as metabolites of [14C] amphetamine in urine in man. *Biochemical Journal*, 129(1), 23–24. <https://doi.org/10.1042/bj1290023>
44. Dring, L. G., Swith, R. L., & Williams, R. T. (1970). The metabolic fate of amphetamine in man and other species. *Biochemical Journal*, 116(3), 425–435. <https://doi.org/10.1042/bj1160425>
45. Banerjee, P., Ali, Z., Levine, B., & Fowler, D. R. (2014). Fatal caffeine intoxication: A series of eight cases from 1999 to 2009. *Forensic Science International*, 59(3), 865–868. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12387>
46. Benowitz, N. L. (1990). Clinical pharmacology of caffeine. *Annual Review of Medicine*, 41, 277–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.41.020190.001425>
47. Kerrigan, S., & Lindsey, T. (2005). Fatal caffeine overdose: Two case reports. *Forensic Science International*, 153, 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.016>
48. Van der Marel, C. F., Anderson, B. J., Pluim, M. A. L., de Jong, T. H. R., & Gonzalez, D. T. (2003). Acetaminophen in cerebrospinal fluid in children. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59, 297–302. <https://doi.org/10.1007/s00228-003-0622-2>
49. Bannwarth, B., Netter, P., Lopicque, F., Gillet, P., Pere, P., Boccard, E., Royer, R. J., & Gaucher, A. (1992). Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous

dose of propacetamol. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 34(1), 79–81.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1992.tb04112.x>

50. McNamara, J. O. (2001). Antiseizure barbiturates. In J. G. Hardman & L. E. Limbird (Eds.), *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (10th ed., pp. 532–533). McGraw-Hill.
51. Hansson, E., & Schmitterlow, C. G. (1961). A comparison of the distribution, excretion and metabolism of a tertiary (promethazine) and a quaternary (aprobit) phenothiazine compound labelled with S35. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 131, 309–324.
52. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2019). *European Drug Report 2018: Trends and Developments* [PDF].
http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001ENN_PDF.pdf
53. Alvear, E., von Baer, B., Mardones, C., & Hitschfeld, A. (2014). Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. *Journal of Forensic and Legal Medicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2014.01.003>
54. Tokarczyk, B., Jurczyk, A., Krupińska, J., & Adamowicz, P. (2022). Fatal intoxication with new synthetic cannabinoids 5F-MDMB-PICA and 4F-MDMB-BINACA—Parent compounds and metabolite identification in blood, urine and cerebrospinal fluid. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 18(4), 393–402. <https://doi.org/10.1007/s12024-022-00492-3>
55. Fischer, V., Kamphausen, T., Büttner, A., & Andresen-Streichert, H. (2023). Fatal intoxication with 1,4-butanediol: Case report and comprehensive review of the literature. *Journal of Forensic Sciences*, 68(4), 1410–1418. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15294>
56. Bessman, S. P., & Fishbein, W. N. (1963). Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite. *Nature*, 200(4907), 1207–1208. <https://doi.org/10.1038/2001207a0>
57. Anderson, R. A., Ritzmann, R. F., & Tabakoff, B. (1977). Formation of gamma-hydroxybutyrate in brain. *Journal of Neurochemistry*, 28(5), 957–966. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10435.x>
58. Chin, R. L., Sporer, K. A., Cullison, B., Dyer, J. E., & Wu, T. U. (1998). Clinical course of gammahydroxybutyrate overdose. *Annals of Emergency Medicine*, 31, 716–722.
59. Elsohly, M. A., & Salamone, S. J. (1999). Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault. *Journal of Analytical Toxicology*, 23(3), 141–146. <https://doi.org/10.1093/jat/23.3.141>
60. Nicholson, K. L., & Balster, R. L. (2001). GHB: A new and novel drug of abuse. *Drug and Alcohol Dependence*, 63(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/s0376-8716\(00\)00191-5](https://doi.org/10.1016/s0376-8716(00)00191-5)
61. Δουινούδη, Ε. (2023). *Η ανάλυση του GHB στις τρίχες ως δείκτης χορήγησης στα πλαίσια βιασμού: Ο ρόλος του γλυκουρονιδίου του GHB* [Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας].

62. Kietzerow, J., Otto, B., Wilke, N., Rohde, H., Iwersen-Bergmann, S., & Andresen-Streichert, H. (2020). The challenge of post-mortem GHB analysis: Storage conditions and specimen types are both important. *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02150-w>
63. Tomsia, M., Głaz, M., Nowicka, J., Cieśla, J., Sosnowski, M., & Chelmecka, E. (2022). Fatal methanol poisoning caused by drinking industrial alcohol: Silesia region, Poland, April–June 2022. *Toxics*, 10(12), 800. <https://doi.org/10.3390/toxics10120800>
64. Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *British Medical Bulletin*, 114(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
65. Stahl, S. M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors: Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *Journal of Affective Disorders*, 51(3), 215–235. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(98\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(98)00221-3)