

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ.
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ, ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ

Κυριακίδου Αμαλία

Διπλωματική εργασία υποβληθείσα στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος στον τομέα της
Τοξικολογίας

Λάρισα, Νοέμβριος, 2021

UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY &
BIOTECHNOLOGY



UNIVERSITY OF
THESSALY

POSTGRADUATE MASTERS STUDIES IN
TOXICOLOGY

IDENTIFICATION OF DRUGS IN HAIR.
DIFFICULTIES, CHALLENGES AND OTHER
FACTORS

Kyriakidou Amalia

Master's thesis required as part of my studies in Thessaly University for the diploma acquisition in
Postgraduate Masters Studies in Toxicology

Larisa, November, 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ, ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ

Κυριακίδου Αμαλία

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Συν-Επιβλέποντες Καθηγητές:

Κοβάτση Λήδα

Κουρέτας Δημήτριος

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών – Τοξικολογίας

Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και
Τοξικολογίας

Τσατσάκης Αριστείδης

Καθηγητής Τοξικολογίας

Λάρισα, Νοέμβριος, 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

IDENTIFICATION OF DRUGS IN HAIR. DIFFICULTIES, CHALLENGES AND OTHER FACTORS

Kyriakidou Amalia

Master's Thesis Supervision Committee

Supervisor:

Kovatsi Leda

Associate Professor of Forensic
Medicine and Toxicology

Co-Supervisors:

Dimitrios Kouretas

Professor at University of
Thessaly

Aristidis Tsatsakis

Director Dept Forensic
Sciences & Toxicology

Larisa, November, 2021

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ	14
1.1 Ιστορικό.....	14
1.2 Δομή & φυσιολογία της τρίχας	14
1.2.1. Ανατομία & μορφολογία της τρίχας.....	14
1.2.2 Τύποι τριχώματος.....	15
1.2.3 Ανάπτυξη & κύκλος της τρίχας.....	16
1.2.4 Σμηγματογόνοι αδένες και τροφοδοσία του αίματος.....	17
1.3 Πλεονεκτήματα χρήσης τριχών ως βιολογικό δείγμα.....	19
1.4 Ουσίες/ κατηγορίες ουσιών/ μεταβολίτες που ανιχνεύονται στις τρίχες.	21
1.5 Η δυσκολία στην ανίχνευση των NPS	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ.....	29
2.1. Δειγματοληψία.....	30
2.2. Προετοιμασία του δείγματος.....	34
2.3. Ποιοτικός προσδιορισμός ουσιών	38
2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών.....	39
2.4.1. Χρωματογραφικές τεχνικές	39
2.4.2. Ανοσολογικές τεχνικές.....	41
2.4.3. Άλλες τεχνικές.....	43
2.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων	44
2.6. Διασφάλιση ποιότητας.....	47
2.7. Ανίχνευση ουσιών σε ειδικές κατηγορίες.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΤΡΙΧΑ	50
3.1. Ενδογενείς παράγοντες.....	51
3.1.1. Φύλο, ηλικία και γενετική.....	52
3.1.2. Διατροφή.....	55
3.2. Εξωγενείς παράγοντες.....	57
3.2.1. Περιβαλλοντικοί ρύποι.....	58
3.2.3. Καλλυντικές θεραπείες.....	60
3.3. Εξωτερική επιμόλυνση και ψευδή αποτελέσματα.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ & ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	66
4.1. Εφαρμογές της ανάλυσης τριχών στην εγκληματολογία.....	66

4.1.1. Εγκλήματα σχετιζόμενα με τη χρήση ουσιών	66
4.1.2. Θάνατοι σχετιζόμενοι με τη χρήση ουσιών	67
4.1.3. Κατάχρηση αλκοόλ.....	68
4.2. Εξέταση για χρήση ουσιών στον χώρο εργασίας.....	69
4.3. Υποθέσεις επιμέλειας & προστασίας των παιδιών	73
4.4. Εφαρμογή της εξέτασης των τριχών για έλεγχο doping.....	74
4.5. Νομοθεσία	76
ΕΠΙΛΟΓΟΣ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάλυση των τριχών έχει λάβει αυξημένη προσοχή εδώ και χρόνια και επί του παρόντος, έχει γίνει η τρίτη πιο θεμελιώδης βιολογική μήτρα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φαρμάκων και μεταβολιτών τους στην ιατροδικαστική τοξικολογία, μετά το αίμα και τα ούρα. Η ενσωμάτωση των ουσιών στην τρίχα παρέχει τη δυνατότητα μελέτης μεμονωμένων ιστορικών χρήσης ουσιών μέσω της τμηματικής ανάλυσης. Για το λόγο αυτό, αρχικά πρέπει να κατανοήσουμε τις βασικές δομές της ανατομίας της τρίχας με ιδιαίτερη έμφαση στις οδούς ενσωμάτωσης φαρμάκων, λαμβάνοντας βέβαια υπόψη και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών και των μεταβλητών τους, που τους επιτρέπουν τη διείσδυση στην τρίχα. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να αναθεωρήσει, να συνοψίσει και να συζητήσει διάφορες εφαρμογές της ανάλυσης της τρίχας ως αυτούσιο πλεονεκτικό δείγμα έναντι των ούρων και του αίματος και άλλοτε ως συμπληρωματικό αυτών, στην ιατροδικαστική τοξικολογία, με βάση τη βιβλιογραφία έμπειρων τοξικολόγων και ερευνητών. Πρακτική εφαρμογή σε μεγαλύτερη κλίμακα αναφέρεται σε παραβιάσεις νόμων και κανονισμών στον χώρο εργασίας, σε περιπτώσεις προστασίας παιδιών, στις μεταθανάτιες έρευνες και σε εγκλήματα σχετιζόμενα με τη χρήση ουσιών. Ωστόσο, η ερμηνεία ενός αναλυτικού αποτελέσματος από δείγμα τρίχας μπορεί να περιπλέκεται από την παρουσία ενδογενών παραγόντων, σχετιζόμενων με γενετικά χαρακτηριστικά, είτε από εξωγενείς-περιβαλλοντικούς παράγοντες επιμόλυνσης όπως η ρύπανση και τα καλλυντικά, που επικάθονται στην τρίχα και είναι υπαίτιοι για ψευδή αποτελέσματα. Περιγράφονται τα πρωτόκολλα για την απομάκρυνση των παραγόντων αυτών και την γενικότερη προετοιμασία του δείγματος, τη συλλογή, το πλύσιμο, την πέψη και την κονιοποίηση με απώτερο στόχο την ανίχνευση των ουσιών. Οι κοινές στρατηγικές περιλαμβάνουν ανοσοπροσδιορισμούς που είναι γρήγορες, ευαίσθητες και οικονομικά αποδοτικές ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης με κύριες τις RIA & ELISA. Ωστόσο, οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται όλο και πιο συγκεκριμένα από ιατροδικαστικά εργαστήρια όπου το ποσοστό θετικότητας είναι πολύ υψηλότερο με επικρατέστερη την GC-MS αλλά και νεότερους συνδυασμούς που είναι δυνατόν να μας δώσουν ακριβέστερα αποτελέσματα μικροποσοτήτων στην τρίχα ή ακόμα και αποτελέσματα από μία μόνο δόση. Οι μετρήσεις αυτές συχνά αφορούν εγκληματικές ή ιατροδικαστικές υποθέσεις γι αυτό είναι σημαντική η διασφάλιση ποιότητας ελέγχου του εργαστηρίου και της μεθόδου. Ανακαλύπτονται διαρκώς νέες ουσίες, από τον χώρο του ντόπινγκ στον αθλητισμό, μέχρι τον κόσμο των ναρκωτικών με παράνομες ψυχοτρόπες ουσίες, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα νέων μεθόδων ανίχνευσης και τη βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχών τεχνικών.

ABSTRACT

Hair analysis has received increasing attention for years and is currently the third most fundamental biological matrix used to detect drugs and their metabolites in forensic toxicology, after blood and urine. The incorporation of substances into the hair provides the possibility of studying individual cases of use through partial analysis. That reason why, should we at first consider the basic structures of hair anatomy with special emphasis on drug incorporation routes, taking into account the physicochemical standards of substances and their variables, which allow them to penetrate the hair. The purpose of this paper is to review, summarize and discuss various applications of hair analysis as a true advantage over urine and blood and sometimes as a complement to them, in forensic toxicology, based on the bibliography of experienced toxicologists and researchers. It has greater applications on violations of the law and regulations in the workplace, on child protection cases, on post-mortem investigations and drug facilitated crimes. However, the interpretation of an analytical result from a hair sample can be complicated by the presence of endogenous factors, related to genetic characteristics, or by exogenous-environmental contaminants such as pollution and cosmetics, which settle on the hair and are responsible for false results. The protocols for the removal of these agents and the general preparation of the sample, its collection, washing, digestion and pulverization are described by the stage of extraction. Common strategies include immunoassays that are rapid, sensitive, and cost-effective immunological detection methods based primarily on RIA & ELISA. However, chromatographic techniques are increasingly used by forensic laboratories where the positivity rate is much higher, GC-MS is the most common technique, but also newer combinations can give us more accurate results, even results from a single dose. These measurements often relate to criminal or forensic cases, and it is important to ensure the quality control of the laboratory and the method too. The fact that new substances are constantly being discovered, from the field of doping in sports, to the world of drugs, put the science world in need for optimizing the existing techniques and for further research of new detection methods.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επιστήμη που ασχολείται με τις βλαβερές συνέπειες χημικών παραγόντων στα βιολογικά συστήματα ονομάζεται τοξικολογία, από την ελληνική λέξη τοξικόν.(1) Η τοξικολογία εφαρμόζεται από αρχαιοτάτων χρόνων μιας και τα δηλητήρια θεωρούνταν κατεξοχήν θανάσιμα όπλα. Η εκτίμηση γινόταν αρχικά μακροσκοπικά-συμπτωματικά. Με την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη της επιστήμης η ανίχνευση τέτοιων ουσιών γίνεται πλέον με βιολογικά δείγματα. Ένα τέτοιο σπουδαίο δείγμα είναι η τρίχα, η ανάλυση της οποίας για ουσίες και φάρμακα προκύπτει από τον συνδυασμό της σύγχρονης Αναλυτικής Χημείας και της Θεμελιώδους Τοξικολογίας και την εφαρμογή τους κυρίως στις ιατροδικαστικές πτυχές των επιβλαβών τους επιπτώσεων στους ανθρώπους. Το 1837, μελετήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο Brewster, για πρώτη φορά η ιδιαιτερότητα της επιφανειακής δομής των τριχών.(2) Για πολλά χρόνια η ανάλυση των τριχών ήταν περιορισμένη εξαιτίας των δυσκολιών κατανόησης του τρόπου με τον οποίο τα φάρμακα ενσωματώνονται στις τρίχες και της ευαισθησίας των αναλυτικών οργάνων. Η σημαντική πρόοδος στην αναλυτική μεθοδολογία εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του '40 με την εισαγωγή και εφαρμογή εκλεπτυσμένων τεχνικών όπως η φασματομετρία και η χρωματογραφία. (3) Το 1979, αποδεικνύεται πλέον με ραδιοανοσοπροσδιορισμό η παρουσία οπιοειδών στα ανθρώπινα μαλλιά. Το 1995 ιδρύθηκε, το Society of Hair Testing (SoHT) το οποίο υποστηρίζει ένα παγκόσμιο δίκτυο μελών που ασχολούνται με τις δοκιμές στις τρίχες έχοντας δημοσιεύσει αρκετά έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με την εξέταση φαρμάκων και ουσιών στις τρίχες. (4)

Η ανίχνευση ουσιών στις τρίχες έχει καθιερωθεί ως μια συμπληρωματική τεχνική με μια σειρά εφαρμογών τόσο στην κλινική όσο και στην ιατροδικαστική τοξικολογία. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια οι τρίχες έχουν εξελιχθεί σε ένα κύριο δείγμα που χρησιμοποιείται στην εγκληματολογική τοξικολογία για τον προσδιορισμό της χρήσης και της έκθεσης σε φάρμακα και παράνομες ουσίες. Το πλεονέκτημα της τρίχας είναι η ικανότητά της να παρέχει ένα ιστορικό προφίλ της έκθεσης ενός ατόμου σε φάρμακα μετά από χρόνια χρήση ή ακόμη και σε μια μεμονωμένη έκθεση. Είναι ένας ισχυρός, σταθερός ιστός που είναι σε θέση έναντι των παραδοσιακών μητρών (π.χ. αίμα ή ούρα), να επιβεβαιώσει τη μακροχρόνια έκθεση σε φάρμακα για μια περίοδο εβδομάδων έως μηνών ανάλογα με το μήκος των τριχών που συλλέγονται. Οι εναλλακτικές μήτρες κερδίζουν σταθερά αναγνώριση ως

βιολογικά δείγματα για τοξικολογικές αναλύσεις. Στις τρίχες όμως μπορεί κανείς να διακρίνει τη χρόνια και την οξεία ή πρόσφατη χρήση ουσιών με τμηματική ανάλυση. Άλλα πλεονεκτήματα της χρήσης δειγμάτων τριχών περιλαμβάνουν την ικανότητα αποθήκευσης τους σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλες περιόδους χάρη στη σημαντική σταθερότητα του μορίου, το γεγονός ότι τα δείγματα είναι δύσκολο να νοθευτούν και ότι η συλλογή δειγμάτων τρίχας κεφαλής είναι λιγότερο επεμβατική από τη συλλογή δειγμάτων αίματος ή ούρων. Κατά τη δειγματοληψία, θα πρέπει να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα τρίχας για επαναληπτική ανάλυση. Ακόμη και τότε, μπορεί να ληφθεί ένα δεύτερο αντιπροσωπευτικό δείγμα τρίχας με την προϋπόθεση ότι τα μαλλιά δεν έχουν κοπεί ή δεν έχουν υποστεί καλλυντική επεξεργασία. Επιπλέον πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα δειγματοληψίας εναλλακτικών σημείων του σώματος όπως η μασχάλη, η οποία μπορεί να επιβεβαιώσει τα ευρήματα των τριχών του κεφαλιού.

Ένας σημαντικός παράγοντας στην επεξεργασία του δείγματος είναι η κατανόηση των οδών ενσωμάτωσης. Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφονται οι βασικές δομές της ανατομίας που εμπλέκονται στο σχηματισμό του θύλακα της τρίχας και στην ενσωμάτωση φαρμάκων και δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις τρεις κύριες οδούς ενσωμάτωσης: από την κυκλοφορία του αίματος, τον ιδρώτα και το σμήγμα που λούζουν τα μαλλιά και μπορεί να συμβάλλουν στις συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Οι μηχανισμοί ενσωμάτωσης αντιμετωπίζονται επίσης εστιάζοντας στο ρόλο της μελανίνης και στο ζήτημα μιας σχέσης δόσης -απόκρισης.

Εντοπίζονται οι κατηγορίες που ανιχνεύονται συνηθέστερα στις τρίχες με ιδιαίτερη προσοχή στην ανίχνευση των μητρικών ουσιών και των μεταβολιτών τους και συζητείται η δυσκολία στην ανίχνευση διαρκώς καινούργιων ουσιών. Για πολλές δεκαετίες υπήρξαν λίγες προσθήκες στο φάσμα των ναρκωτικών που χρησιμοποιούνται. Σε παγκόσμια κλίμακα και ενώ οι γνωστές έως τώρα, απαγορευμένες ουσίες όπως το αλκοόλ, η κοκαΐνη, η ηρωίνη και η μεθαμφεταμίνη, εξακολουθούν να κυριαρχούν, τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε η εμφάνιση των λεγόμενων «νόμιμων υψηλών» ή νέων φαρμακευτικών ουσιών, NPS (New Psychoactive Substances), οι οποίες χωρίζονται εκ νέου σε διεγερτικά, συνθετικά κανναβινοειδή και ανάλογα της φεντανύλης και άλλων συνθετικών οπιοειδών όπως η καρφεντανίλη, και στις οποίες έχει σημειωθεί μια τεράστια έξαρση.(5)

Οι στόχοι του δεύτερου κεφαλαίου είναι να δώσουν στον αναγνώστη μια καλή εικόνα για τις πρακτικές προαναλυτικές πτυχές των δοκιμών τρίχας. Η αλυσίδα των γεγονότων που οδηγούν στην ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων ξεκινά ήδη από τον τόπο δειγματοληψίας. Οι σειρά που ακολουθεί ο τοξικολόγος χρήζει αυστηρότητας και τυπικότητας καθώς και καταγραφής όλων των βημάτων του για να διασφαλιστεί ένα έγκυρο αποτέλεσμα. Αυτά περιλαμβάνουν κατακερματισμό, ομογενοποίηση και εξαγωγή φαρμάκων από τη μήτρα των τριχών. Η σταθερότητα αποθήκευσης είναι επίσης ένα σημαντικό ζήτημα που πρέπει να εξεταστεί κατά τη διάρκεια της προαναλυτικής φάσης, καθώς η εξέτασή της θα διευκολύνει την εκτίμηση της ποιότητας του δείγματος και του αναλυτικού αποτελέσματος που λαμβάνεται από αυτό το δείγμα. Η γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς αποδόμησης και τις μεθόδους για την αύξηση της σταθερότητας αποθήκευσης μπορεί να επιτρέψει στον ιατροδικαστή να παρακάμψει πιθανές δυσκολίες.

Ωστόσο, η ερμηνεία ενός αναλυτικού αποτελέσματος τρίχας μπορεί να περιπλέκεται από την παρουσία εξωτερικής μόλυνσης από φάρμακα. Οι μέθοδοι απολύμανσης περιλαμβάνονται στις μεθόδους ανάλυσης τρίχας για την απομάκρυνση της εξωτερικής μόλυνσης, αλλά η ικανότητα αυτών των πλύσεων να απομακρύνουν πλήρως τη μόλυνση από όλες τις πιθανές ουσίες είναι αμφιλεγόμενη. Η αναλυόμενη ουσία, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών της, εμφανίζεται μέσα ή πάνω στην τρίχα και οι προσπάθειες αφαίρεσης της όποιας εξωτερικής επιμόλυνσης μπορεί να μετακινήσουν τις αναλυόμενες ουσίες από την επιφάνεια της τρίχας στον μυελό, δίνοντας την εντύπωση ότι ήταν παρούσες στο σώμα όταν σχηματίστηκε η τρίχα. Είναι προφανές ότι δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με την πιο αποτελεσματική διαδικασία απολύμανσης. Οργανισμοί όπως η Society of Hair Testing συνιστούν μια διαδικασία απολύμανσης των μαλλιών να περιλαμβάνει τόσο οργανικό όσο και υδατικό βήμα πλύσης, το οποίο είναι σύμφωνο με την αναθεωρημένη βιβλιογραφία. Μελέτες που περιελάμβαναν συστηματική αξιολόγηση διαφόρων διαλυτών έδειξαν ότι ο πιο αποτελεσματικός οργανικός διαλύτης ήταν η μεθανόλη και ο πιο αποτελεσματικός υδατικός διαλύτης περιείχε απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικού νατρίου. Εάν μελλοντικές συστηματικές μελέτες καταδείξουν παρόμοια ευρήματα, μπορεί να επιτευχθεί συναίνεση σχετικά με την πιο αποτελεσματική διαδικασία απολύμανσης για την ιατροδικαστική ανάλυση τριχών.(6)

Το 1986 περιγράφηκε από τους Sachs και Brunner για πρώτη φορά η διαδικασία για την ανίχνευση μορφίνης και κωδεΐνης σε δείγματα μαλλιών με GC-MS. Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος δεν ήταν σε θέση να διαφοροποιήσουν την κατανάλωσης μεταξύ ηρωΐνης/μορφίνης και της κωδεΐνης.(7) Όποια αναλυτική μέθοδος και αν χρησιμοποιηθεί, πρέπει να επικυρωθεί, να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό. Είναι σημαντικό όχι μόνο κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου αλλά και κατά την εφαρμογή της σε καθημερινή βάση. Το όριο ευαισθησίας μίας μεθόδου είναι ο όρος που χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει το όριο ακριβούς μέτρησης και ορίζεται καλύτερα ως το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ή και όριο ανίχνευσης. Όποια ορολογία και αν χρησιμοποιείται η αξιολόγηση της παρουσίας ή της απουσίας μιας ένωσης στο όριο της ευαισθησίας της ανάλυσης είναι πάντα δύσκολη και ιδανικά η αναφορά θετικού ευρήματος σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτεί επιβεβαίωση από άλλα στοιχεία. Η ανάλυση των τριχών, η οποία υποστηρίχθηκε από καιρό ως τρόπος αξιολόγησης της έκθεσης σε τοξικά μέταλλα, μπορεί επίσης να παρέχει μια ιστορία έκθεσης σε παράνομες ουσίες και άλλα οργανικά δηλητήρια, αλλά χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αναφέρονται λοιπόν στο τρίτο κεφάλαιο αναλυτικές τεχνικές για ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση φαρμάκων στην τρίχα, δίνοντας έμφαση στις δυνατότητες και τους περιορισμούς της ως εναλλακτική βιολογική μήτρα για τοξικολογικές αναλύσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα του υλικού αυτού και τις δυνατότητες που έχει ο τοξικολόγος με όλες τις παραπάνω μεθοδολογίες για την ανίχνευση ουσιών στις τρίχες, είναι επόμενο η μήτρα αυτή να χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα πλαισίων, συγκεκριμένα για την αξιολόγηση της έκθεσης σε παράνομες ουσίες στο χώρο εργασίας, για εγκλήματα ή επιθέσεις που διευκολύνονται από ψυχοδιεγερτικές ουσίες (DFC), για την έκθεση σε ουσίες με αντίκτυπο στα παιδιά, για έλεγχο αντιντόπινγκ, για φαρμακολογική παρακολούθηση και κατάχρηση αλκοόλ.

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί αύξηση των καταστάσεων που χρησιμοποιούνται κατασταλτικά φάρμακα στα παιδιά. Αλλά και παιδιά που ζουν σε περιβάλλον κατάχρησης ναρκωτικών είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της πιθανότητας εξωτερικής μόλυνσης των μαλλιών. Η ερμηνεία των ευρημάτων μπορεί να θέτει σοβαρό ζήτημα, καθώς η φαρμακολογία των ουσιών διαφέρει από τους ενήλικες.

Αναγνωρίζεται πλέον ότι η εξέταση για παράνομες ουσίες στο χώρο εργασίας είναι μια πολύπλοκη διεπιστημονική κατάσταση, όπου είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι κανένας εργαζόμενος δεν εργάζεται υπό την επήρεια ουσιών, αλλά ταυτόχρονα ότι διασφαλίζονται και τα ατομικά του δικαιώματα. Εκεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα ούρων ή υγρών από το στόμα, ενώ τα μαλλιά ως δείγμα για δοκιμές φαρμάκων επιτρέπουν ένα μακροπρόθεσμο ιστορικό της χρήσης του ατόμου. Αυτό το παράθυρο είναι εξαιρετικά χρήσιμο για αποφάσεις πρόσληψης, καθώς δίνει τη δυνατότητα σε χρήστες να αποκλείονται όταν η χρήση ναρκωτικών δεν είναι συμβατή με τις δραστηριότητές τους.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρακολούθηση της έκθεσης σε τοξικές ουσίες ατόμων στον εργασιακό τους χώρο ή της περιβαλλοντικής έκθεσης. Αυτά τα εργασιακά περιβάλλοντα πρέπει να τηρούν τις συνθήκες υγιεινής. Δεν είναι σπάνια τα φαινόμενα μιας κατά λάθος διαρροής χημικών στον εργασιακό χώρο ή στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στα δημόσια ύδατα. Η τοξικολογική ανάλυση μπορεί να είναι πολύτιμη όχι μόνο για την παροχή αποδεικτικών στοιχείων για τη φύση και το μέγεθος μιας έκθεσης, αλλά και για την απόδειξη ότι δεν έχει σημειωθεί σημαντική έκθεση, κατευνάζοντας έτσι την ανησυχία του κοινού. Για τους λόγους αυτούς, η έγκαιρη συλλογή του κατάλληλου βιολογικού δείγματος είναι απαραίτητη. Τα μεταλλικά ιόντα για παράδειγμα όπως ο μόλυβδος και ορισμένα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα όπως το χλωρδάνιο και η ντιελτρίνη, εμφανίζουν μεγάλο χρόνο ημιζωής στο σώμα και έτσι η συσσώρευση τους μπορεί να συμβεί ακόμα και με παρατεταμένη έκθεση σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε υψηλότερο κίνδυνο έκθεσης βρίσκονται οι κατασκευαστές στα εργαστήρια φαρμάκων και άλλων ουσιών όπου η έκθεση μπορεί να γίνει είτε κατά την εισπνοή είτε μέσω της διαδερμικής αναπνοής.(5)

Συνοψίζοντας, η ανάλυση των τριχών για φάρμακα και απαγορευμένες ουσίες θέτει θεμέλιες βάσεις ως υλικό σε έναν σημαντικό αριθμό καταστάσεων, όπως σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, σε πτωτικά ή ακόμα και μουμιοποιημένα πτώματα, όταν δεν υπάρχουν άλλα βιολογικά δείγματα, σε εγκλήματα που διευκολύνονται από τα ναρκωτικά (DFC) και σεξουαλικές επιθέσεις που διευκολύνουν τα ναρκωτικά (DFSA). Σε περιπτώσεις φροντίδας και επιμέλειας παιδιών και σε παρακολούθηση προγραμμάτων αποτοξίνωσης. Σε κάθε περίπτωση, ο τοξικολόγος θα πρέπει να είναι σε θέση να απαντήσει σε πολλές ερωτήσεις όπως: «Έχει δηλητηριαστεί αυτό το

άτομο;» και εφόσον το αποτέλεσμα είναι θετικό, «Ποια είναι η ταυτότητα του δηλητηριού;», «Πώς χορηγήθηκε;», «Ποια είναι τα αποτελέσματά του;» και «Ήταν επικίνδυνη ή θανατηφόρα ποσότητα;» Με άλλα λόγια, ο ιατροδικαστής πρέπει να κάνει ποιοτική και ποσοτική ανάλυση και να ερμηνεύσει το όποιο αποτέλεσμα. (8)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ

1.1 Ιστορικό

Η πρώτη ανάλυση της τρίχας για ύπαρξη φαρμάκων αναφέρθηκε το 1954 από δερματολόγους που μέτρησαν βαρβιτουρικά σε τρίχες και δέρμα, για να αποδείξουν δερματίτιδα προκληθείσα από φάρμακα. Ανάλυση για απαγορευμένες ουσίες (ναρκωτικά) επιχειρήθηκε μόλις την τελευταία δεκαετία (9), Ενώ η πρώτη δημοσίευση για χρήση τριχών στον εντοπισμό ουσιών ήταν το 1979 όπου ο Baumgartner και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας τη ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA, Radioimmunoassay), μπόρεσαν να εντοπίσουν μορφίνη στα μαλλιά χρηστών ηρωίνης.(10)

1.2 Δομή & φυσιολογία της τρίχας.

1.2.1. Ανατομία & μορφολογία της τρίχας

Η τρίχα αποτελείται από δύο μέρη: τη ρίζα που είναι το τμήμα που βρίσκεται μέσα στον οργανισμό και το στέλεχος που είναι το τμήμα της τρίχας που προεξέχει πάνω από την επιφάνεια του δέρματος (11). Το κάτω τμήμα της ρίζας παρουσιάζει μία διόγκωση η οποία ονομάζεται βολβός της τρίχας και βρίσκεται 3-4 mm κάτω από την επιφάνεια του δέρματος. Το χόριο μαζί με τα αγγεία μπαίνουν μέσα στην κοιλότητα του βολβού της τρίχας και σχηματίζουν το θύλακα. Εκεί τα αγγεία την τροφοδοτούν με αίμα, οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά.

Το ορατό κομμάτι-στέλεχος, αποτελείται από πλήρως κερατινοποιημένα κύτταρα και μαζί με την επιδερμίδα σχηματίζουν το εξωτερικό προστατευτικό στρώμα. Το στέλεχος αποτελείται από τρία μέρη.

- i. Το περιτρίχιο ή επιδερμίδα της τρίχας που την περιβάλλει και αποτελείται από ένα στρώμα επίπεδων κυττάρων, που περιέχουν την κερατίνη.
- ii. Το φλοιό της τρίχας εκεί που τα κύτταρα περιέχουν τη μελανίνη (χρωστική ουσία στην οποία οφείλεται το χρώμα του δέρματος και των τριχών).
- iii. Το μυελό της τρίχας (medulla) όπου αποτελεί την καρδιά του στελέχους. Συναντάται στις τρίχες μεγάλης διαμέτρου ενώ δεν υπάρχει στις πολύ λεπτές τρίχες και στις τρίχες της κεφαλής. (12)

Η κερατίνη που προαναφέραμε είναι το κύριο συστατικό των τριχών. Είναι πρωτεΐνη, δηλαδή μακριές αλυσίδες πολυμερών που αποτελούνται από αμινοξέα. Όταν αναφέρεται ότι ανοίγουν οι πόροι της τρίχας, στην πραγματικότητα αλλάζει η διάταξη των αλυσίδων της κερατίνης στο χώρο. Ο τύπος κερατίνης που υπάρχει στις τρίχες είναι η σκληρή κερατίνη, δεν διαλύεται στο νερό και είναι πολύ ανθεκτική χάρη στο αμινοξύ κυστεΐνη, που περιέχει θείο. Είναι το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών της κερατίνης και υπεύθυνο για τους πολύ δυνατούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Και για το λόγο αυτό οι τρίχες είναι ανθεκτικές στις επιδράσεις του περιβάλλοντος (13).

1.2.2 Τύποι τριχώματος

Η διάμετρος μιας τρίχας ποικίλλει, από λεπτές σχεδόν άχρωμες στην επιφάνεια του σώματος, σε παχύτερες και μακρύτερες στην κεφαλή. Οι τύποι τριχώματος διαχωρίζονται σε αυτούς που εξαρτώνται από τις ορμόνες και στους ανεξάρτητους. Οι τρεις βασικοί τύποι τρίχας στο ανθρώπινο σώμα είναι οι vellus: λεπτές, κοντές τρίχες (κρόταφοι, βλέφαρα, φρύδια) που είναι ανεπηρέαστες από ορμόνες, οι ενδιάμεσες και οι τελικές. Σε αντίθεση με τις πρώτες, οι ενδιάμεσες και τελικές τρίχες(μαλλιά, γένια, ηβικές), επηρεάζονται από ορμόνες και από τις αλλαγές κατά την εφηβεία. Είναι χονδρές, μακριές και χρωματισμένες. Οι ενδιάμεσες είναι αυτές που βρίσκονται στα χέρια και τα πόδια των ενηλίκων. (14)

Μία διαφορετική ταξινόμηση γίνεται με βάση το αν η τρίχα είναι ίσια ή σγουρή και φυσικά βάσει χρώματος. Οι διαφορές στο χρώμα των μαλλιών είναι συνέπεια της ποικιλομορφίας του τύπου και του ποσοστού της υπάρχουσας μελανίνης. Ο σχηματισμός της χρωστικής ουσίας της μελανίνης λαμβάνει χώρα αποκλειστικά μέσα

στο θυλάκιο των τριχών, μέσα στα μελανοσώματα και ρυθμίζεται από ένζυμα, υποδοχείς, και πρωτεΐνες κατά τη φάση της αναγέννησης. Τρεις τύποι μελανίνης πιστεύεται ότι καθορίζουν το χρώμα των μαλλιών, η ευμελανίνη για τα πιο σκούρα, η φαιομελανίνη και τα οξειδωτικά προϊόντα τους για κόκκινες αποχρώσεις, και η νευρομελανίνη στις ανοιχτές. (10)

1.2.3 Ανάπτυξη & κύκλος της τρίχας

Η ανάπτυξη των τριχών είναι μια κυκλική διαδικασία που καθοδηγείται από τις αλλαγές στη δραστηριότητα των κυτοκινών (ορμόνες). (15) Κάθε τρίχα αναπτύσσεται από τον θύλακά της και κάθε θύλακας έχει τον δικό του κύκλο ζωής. Αυτό σημαίνει ότι κάθε τρίχα αναπτύσσεται ξεχωριστά από τις άλλες γύρω της. Αν όλοι οι θύλακες ήταν συγχρονισμένοι, τα μαλλιά θα αναπτύσσονταν όλα ταυτοχρόνως, γεγονός που θα σήμαινε ότι θα υπήρχαν περίοδοι όπου θα ήμασταν όλοι φαλακροί και άλλες που θα είχαμε κεφάλια γεμάτα μαλλιά!

Τα τρία στάδια ανάπτυξης είναι α) η αναγέννηση, β) η καταγέννηση και γ) η τελογέννηση. Η αναγέννηση ή ανάπτυξη μπορεί να διαρκέσει 1 έως 4 χρόνια και χαρακτηρίζεται από τη διαμόρφωση του στελέχους της τρίχας. Εκτιμάται ότι το 85% του τριχωτού της κεφαλής είναι στη φάση αυτή και μεγαλώνουν κατά μέσο όρο 1 εκατοστό τον μήνα. Στην καταγέννηση ή μεταβατική φάση η κυτταρική διαίρεση σταματά, ο άξονας της τρίχας γίνεται πλήρως κερατινοποιημένος και ο θύλακας αρχίζει να εκφυλίζεται. Η τρίχα δηλαδή παύει να αναπτύσσεται πράγμα που διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Η τελογέννηση ή φάση ανάπαυσης είναι μια περίοδος όπου δεν υπάρχει τριχοφυΐα. Εκτιμάται ότι το 10-15% όλων των τριχών είναι στην τελογεννή φάση ανά πάσα στιγμή. (16) Έτσι, τα μαλλιά μας δεν αναπτύσσονται συνεχώς, αλλά σε διαδοχικούς κύκλους. Το 90% περίπου των τριχών της κεφαλής βρίσκεται σε αναγενή φάση, το 10% σε τελογενή και μόλις το 1% σε καταγενή. Καθημερινά, χάνουμε φυσιολογικά 50 ως 80 τρίχες, μετά από έναν κύκλο ζωής 2 έως 7 ετών. Στη συνέχεια, οι τρίχες αυτές αντικαθίστανται από νέες. Κάθε θύλακας παράγει μια νέα τρίχα σε φάση ανάπτυξης, με σύνολο 25 ως 30 κύκλων σε όλη τη διάρκεια της ζωής μας. Ωστόσο, ορισμένες φορές οι κύκλοι ανάπτυξης της τρίχας μπορεί να διακοπούν λόγω της επιρροής των ορμονών. (14)

Το τριχωτό της κεφαλής έχει τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης με το υψηλότερο ποσοστό θυλακίων στην φάση αναγέννησης, η ηβική περιοχή έχει βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης με μεγαλύτερη διάρκεια φάσης ανάπαυσης, ενώ η γενειάδα έχει τις παχύτερες τρίχες και τον βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Η διακύμανση των ρυθμών ανάπτυξης των διαφόρων τριχών μας οδηγούν στην ενασχόληση κυρίως με τις τρίχες της κεφαλής.

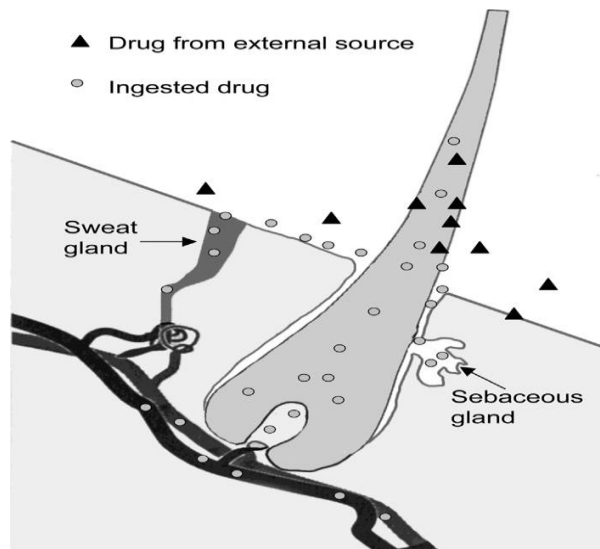
Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης μόνο για τους ενήλικες είναι 1 cm / μήνα. Υπάρχει σημαντική έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τους ρυθμούς ανάπτυξης για τα μικρότερα παιδιά ή τους εφήβους. Έτσι θα πρέπει να λαμβάνουμε πάντα υπόψη και την ηλικία του ατόμου σε σχέση με το μήκος της τρίχας που εξετάζουμε. Επιπλέον, δεδομένου ότι η τρίχα χρειάζεται 7 -10 ημέρες για να φτάσει στην επιφάνεια της κεφαλής, καταλαβαίνουμε ότι τα μαλλιά που έχουμε κόψει από το κρανίο δεν αντιπροσωπεύουν την πιο πρόσφατη περίοδο ανάπτυξής τους. (15)

1.2.4 Σμηγματογόνοι αδένες και τροφοδοσία του αίματος

Όπως προείπαμε, τα αγγεία μπαίνουν στον βολβό της τρίχας, σχηματίζοντας το θύλακα και τροφοδοτώντας τον με αίμα, οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, ταυτόχρονα υποστηρίζουν την αποβολή των αποβλήτων και την ανάπτυξη. Η παροχή αίματος είναι ένα βασικό συστατικό της επιτυχούς ανάπτυξης, ωρίμανσης και συντήρησης των θυλακίων των μαλλιών και η απώλειά της σχετίζεται με ορισμένες μορφές τριχόπτωσης. (17)

Στο θύλακα καταλήγει ο πόρος του σμηγματογόνου αδένου και οι ορθωτήρες μύες των τριχών. Οι μύες αυτοί όταν συσπώνται, προκαλούν την ανόρθωση των τριχών και την έξοδο του σμήγματος από τους σμηγματογόνους αδένες (11). Έτσι έχουμε παθητική διάχυση ουσιών απευθείας από το αίμα που τροφοδοτεί τους θύλακες, από το σμήγμα και τον ιδρώτα.

Το σχήμα 1.2 απεικονίζει τις τρεις αναγνωρισμένες οδούς ενσωμάτωσης των ουσιών στις τρίχες.



Εικόνα 1. Οδοί ενσωμάτωσης ουσιών στην τρίχα (Πηγή:(1))

Θεωρούμε ότι τα φάρμακα και τα ιχνοστοιχεία που περνούν στο σώμα μέσω της κυκλοφορίας, ενσωματώνονται σε τρίχες κατά τη διάρκεια περιόδων αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας και κατά την κυτταρική διαίρεση στην φάση της αναγέννησης.

Γενικά έχουν ανιχνευθεί φάρμακα τόσο στον ιδρώτα όσο και στο σμήγμα και καθώς και οι δύο αυτές εκκρίσεις πλένουν το θυλάκιο και τον άξονα της τρίχας καθώς αυτή μεγαλώνει, είναι αντιληπτό πως θα μεταδώσουν συγκέντρωση από τις ουσίες αυτές στις τρίχες. Απόδειξη για το παραπάνω είναι η ενσωμάτωση του αιθυλικού γλυκουρονιδίου (EtG) από τον ιδρώτα σε τρίχες γενειάδας, αφότου έγινε ανίχνευση της EtG στο μούσι μόλις 9 ώρες μετά από μία μόνο δόση αλκοόλης (αιθανόλη). Ωστόσο η κυρίαρχη οδός ενσωμάτωσης ήταν από την κυκλοφορία του αίματος κατευθείαν μέσα στη ρίζα. Οι συγκεντρώσεις της EtG αυξήθηκαν σε μέγιστο 72-242 pg/mg μέσα σε 2-4 ημέρες μετά τη χορήγηση και έπειτα μειώθηκαν σταδιακά κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης την 8η-10η ημέρα καθώς ο βολβός της ρίζας αναπτύχθηκε και αναδύθηκε στην επιφάνεια του δέρματος. (10)

Η λιποδιαλυτότητα ενός φαρμάκου είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για να προσδιορίσουμε το ρυθμό μεταφοράς του, καθώς μεταφέρεται παθητικά στα μητρικά, αναγεννώμενα κύτταρα, από τη ροή του αίματος διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης μέσα στο βολβό της αναπτυσσόμενης ρίζας. (15) Έτσι όταν τα κύτταρα αυτά επιμηκύνονται, μετακινούνται έξω από το θύλακα και κερατινοποιούνται και έτσι η

ουσία μας παγιδεύεται. Τα κύτταρα κατόπιν πεθαίνουν, αφυδατώνονται και σχηματίζουν μία ινώδη μάζα, χημικά ανενεργή. Παγιδευμένη η ουσία μέσα στη μάζα αυτή, παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ζωής της τρίχας. (14)

1.3 Πλεονεκτήματα χρήσης τριχών ως βιολογικό δείγμα

Οι τρίχες είναι το πλέον κατάλληλο υλικό για ανάλυση, επαλήθευση και παρακολούθηση της πρόσληψης φαρμακευτικών ουσιών και ουσιών κατάχρησης (DOA) καθώς και για έλεγχο αποχής (18). Κατάλληλες τις καθιστά και ο τρόπος συλλογής τους υπό επίβλεψη χωρίς ενόχληση του ατόμου. Δεν υπόκεινται σε εσκεμμένες επεμβάσεις του εξεταζόμενου ατόμου, (στην προσπάθεια του να παρέμβει στο αποτέλεσμα) όπως η εξέταση των ούρων, που μπορεί να επηρεασθεί από μία προσωρινή αποχή λίγες μέρες πριν τον έλεγχο ή από την υπερβολική κατάποση υγρών (επηρεάζοντας την συγκέντρωση της ουσίας) ή ακόμα και αντικατάσταση του δείγματος, στην προσπάθεια του ατόμου να διαφύγει τον έλεγχο.

Η ανάλυση της τρίχας μπορεί να φέρει καθυστερημένη έναρξη της ανίχνευσης (μερικές ημέρες) αλλά παρουσιάζει ένα ευρύτερο χρονικό φάσμα (μήνες ως χρόνια). Ακόμα ένα πλεονέκτημα είναι η χημική σταθερότητα του δείγματος. Στις έρευνες για εγκλήματα που σχετίζονται με ψυχοδραστικές ουσίες, οι τρίχες είναι ένα σημαντικό εναλλακτικό δείγμα από τα ούρα και το αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι ορισμένα καταπιώμενα φάρμακα μπορούν να διατηρηθούν σταθερά στα μαλλιά για αρκετούς μήνες ή περισσότερο. Η μαζική ανάλυση, στην οποία λαμβάνεται ένα δείγμα με ομογενοποίηση πολλαπλών κλώνων τριχών που συλλέγονται από ένα άτομο, χρησιμοποιείται γενικά για να αποδείξει συστηματική χρήση ουσιών. Αντίθετα, η τμηματική ανάλυση, η οποία βασίζεται στην αρχή ότι τα φάρμακα ενσωματώνονται στα μήτρα των τριχών μέσω της κυκλοφορίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του χρόνου λήψης φαρμάκου. Ενώ η ακριβής ημέρα χορήγησης μπορεί να προσδιοριστεί, η μεταβλητότητα στον ρυθμό ανάπτυξης της τρίχας και η φάση του κύκλου που θα την πετύχουμε είναι οι παράγοντες που κάνουν τις μετρήσεις αυτές ανακριβείς και αντικείμενο συνεχών ερευνών. (19) Θετικό είναι επίσης πως η ανάλυση των τριχών δεν υπόκειται σε προβλήματα μόλυνσης αφού οι τρίχες καθαρίζονται πριν την ανάλυση ή είναι δυνατό να επαναληφθεί η μέτρηση με καινούργιο δείγμα αν προκύψουν υπόνοιες επιμόλυνσης του αρχικού δείγματος. Στην περίπτωση της ανάλυσης ούρων τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι κυρίως από

παθητική εισπνοή καπνού μαριχουάνας ή κατάποση μολυσμένων τροφών. Αυτό συμβαίνει διότι οι πνεύμονες και το γαστρεντερικό σύστημα δεν αποτελούν φραγμό για τις ουσίες.

Οι Baumgartner και V. Hill (1990) ασχολήθηκαν με την παθητική έκθεση σε ναρκωτικές ουσίες, για να καταδείξουν τελικά πως η ανάλυση τριχών μας προσφέρει την ευκολία στη δημιουργία διαφόρων τύπων πειραμάτων πάνω στην παθητική έκθεση (επιμόλυνση), την εκτίμηση πολλαπλών μεθόδων καθαρισμού και ανάλυσης των αποτελεσμάτων αυτών και την εκτίμηση της φυσικής κατάστασης της τρίχας με χρωματικές μεθόδους. Αυτές οι πειραματικές προσεγγίσεις στο πρόβλημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από παθητική έκθεση δεν είναι εφαρμόσιμες στην ανάλυση ούρων, μπορούν όμως να λύσουν το πρόβλημα στην ανάλυση τριχών. (18)

Έχουν παρατηρηθεί διαφορετικά μεταβολικά επίπεδα στα μαλλιά και στο αίμα. Στο αίμα, εντοπίζουμε κυρίως τους πρωτογενείς μεταβολίτες των ουσιών, ενώ στα μαλλιά το αντίθετο. Για παράδειγμα, στις τρίχες εντοπίζουμε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση την κοκαΐνη και την δμονοακετυλομορφίνη(6-MAM), (κύριο μεταβολίτη της ηρωΐνης), από ότι τους μεταβολίτες τους, βενζοϋλεγκονΐνη και μορφΐνη αντίστοιχα, που εντοπίζονται στο αίμα. Έρευνες μάλιστα μας έχουν δείξει πως είναι εφικτή η ανΐχνευση δευτεριωμένης κοκαΐνης μετά από μία μόνο δόση. (19)

Σε έρευνα που διεξήχθη το 2014-2017, εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν δείγματα ούρων 532 ανθρώπων και δείγματα μαλλιών των περισσοτέρων από αυτούς για την ανΐχνευση αμφεταμινών και μεθαμφεταμινών, βαρβιτουρικών και βενζοδιαζεπΐνων, κοκαΐνης, μαριχουάνας και των οπιοειδών : μεθαδόνη, οξυκαδόνη και προποξυφαΐνη για χρήση τον τελευταίο μήνα. Τα δείγματα των ούρων ελέγχθηκαν για ποιοτική ανΐχνευση με τεχνική ανοσοδοκιμής βασιζόμενη στην παρουσία ή την απουσία μιας γραμμής δείκτη για κάθε φάρμακο, καθώς και μια γραμμή ελέγχου για κάθε φάρμακο για να εξασφαλιστεί η σωστή λειτουργία του τεστ. Ο έλεγχος αυτός των ούρων μπορεί να ανιχνεύσει τη χρήση τις τελευταίες 1-7 ημέρες. Τέλος ο συνδυασμός ανΐχνευσης ούρων και μαλλιών για οπιούχα / ηρωΐνη οδήγησε σε σχεδόν τέλεια ευαισθησία. Σε σύγκριση με την ανΐχνευση στις τρίχες, η εξέταση ούρων μπόρεσε να επιβεβαιώσει υψηλότερα ποσοστά αυτοαναφερόμενης χρήσης ηρωΐνης οπιοειδών, μαριχουάνας, βενζοδιαζεπΐνων και μεθαδόνης. Για την κοκαΐνη ωστόσο και την οξυκαδόνη συνέβη το αντίθετο. Ενώ ο συνδυασμός των μεθόδων ανΐχνευσης έδωσε

καλύτερα αποτελέσματα για τις μεθαμφεταμίνες και τέλεια ευεσθησία στην ανίχνευση οπιούχων. (20)

Ενώ η δοκιμή μαλλιών είναι αποτελεσματική στην ανίχνευση της χρήσης ναρκωτικών σε περιόδους μεγάλου παραθύρου (π.χ. χρήση του προηγούμενου έτους), είναι λιγότερο αποτελεσματική από τη δοκιμή ούρων κατά τη δοκιμή χρήσης επιλεγμένων φαρμάκων τον τελευταίο μήνα μεταξύ των χρηστών οπιούχων/οπιοειδών. Ωστόσο, η εξέταση μαλλιών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανίχνευση μη αναφερόμενης χρήσης κοκαΐνης και / ή οξυκωδόνης.

1.4 Ουσίες/ κατηγορίες ουσιών/ μεταβολίτες που ανιχνεύονται στις τρίχες.

Για να έχουμε μία γενική εικόνα για τις ουσίες που αποθηκεύονται στις τρίχες πρέπει να κατανοήσουμε τις οδούς ενσωμάτωσης οι οποίες είναι τέσσερις.

- i. Φαρμακευτικές ουσίες, οι οποίες υπάρχουν στη συστηματική κυκλοφορία λόγω σκόπιμης κατανάλωσης φαρμάκων αντιπροσωπεύουν την ενδογενή οδό.
- ii. Τα μόρια του φαρμάκου που απορροφήθηκαν ή μεταφέρθηκαν στα κερατινοποιημένα μαλλιά με διαδερμική απέκκριση του ιδρώτα και του σμήγματος αντιπροσωπεύουν την ενδογενή-εξωγενή οδό. Ο Henderson είχε παρατηρήσει πως μόρια κοκαΐνης πρόσφατης χορήγησης, σε δείγματα μαλλιών δεν μπορεί να προκύψουν από την ενδογενή ενσωμάτωση φαρμάκων στα μαλλιά μέσω του βολβού, λόγω της καθυστέρησης που οφείλεται στην ενδοδερμική ανάπτυξη των μαλλιών. Συνεπώς είναι εναπόθεση από τον ιδρώτα. Οι Raul et al. πρότειναν ότι η κορτιζόλη και η κορτιζόνη ενσωματώνονται στα μαλλιά όχι μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αλλά κυρίως μέσω της διάχυσης από τον ιδρώτα. (21)
- iii. Μόρια που εναποτίθενται από το εξωτερικό περιβάλλον (π.χ. ρύπανση, περιποιήσεις μαλλιών) μπορούν να εισέλθουν στα κερατινοποιημένα μαλλιά με απορρόφηση, η οποία αντιπροσωπεύει την εξωγενή οδό. Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει ότι τα μαλλιά που είναι εμποτισμένα σε διαλύματα ναρκωτικών ή εκτεθειμένα στον ατμό δεν απολυμαίνονται πλήρως με κοινές διαδικασίες πλύσης.

- iv. Τέλος οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να αποκτήσουν ακούσια πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία μέσω αναπνοής ή μέσω της δερματικής απορρόφησης και ενσωματώνονται ενδογενώς κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ινών μαλλιών και αποτελούν την εξωγενή-ενδογενή παράκαμψη.

Ο μηχανισμός που προτείνεται γενικά για την ενδογενή ενσωμάτωση μορίων φαρμάκου σε αναπτυσσόμενα μαλλιά είναι η παθητική διάχυση από την παροχή αίματος στη βάση του θυλακίου των μαλλιών. Ενώ αυτή η υπόθεση χρησιμοποιείται συχνά για να υποστηρίξει τη σημασία της ανάλυσης μαλλιών, αποτυγχάνει να εξηγήσει τα τακτικά ευρήματα των υψηλών αναλογιών φαρμάκων προς μεταβολίτη στις κερατινοποιημένες ίνες μαλλιών. Φαίνεται περίεργο ότι εξαιρετικά μεταβολικά ευκίνητα φάρμακα όπως η ηρωίνη ή ουσίες με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα όπως η κοκαΐνη υπάρχουν σε κερατινοποιημένες ίνες μαλλιών και ότι οι συγκεντρώσεις τους υπερβαίνουν πάντα αυτές των μεταβολιτών, τα οποία είναι υψηλότερα κατά τάξη μεγέθους στο πλάσμα. Η "βιοχημική έννοια" προτάθηκε για να εξηγήσει την ενδογενή ενσωμάτωση μορίων φαρμάκου σε αναπτυσσόμενες τρίχες. Αυτή η ιδέα εξηγεί ότι η ενσωμάτωση του φαρμάκου στην τρίχα εξαρτάται από:

- ο την αναλογία που έχει η αρχική μορφή του φαρμάκου προς τον μεταβολίτη του,
- ο τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου,
- ο τη φυσική χρωστική της τρίχας (22)

Για να εισχωρήσει μία ουσία στο κύτταρο, πρέπει να διασχίσει τη μεμβράνη του πλάσματος. Επομένως, πέρα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων των φαρμάκων (μέγεθος, σχήμα) έχει καθοριστικό ρόλο και η σύνδεσή του με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Για παράδειγμα μόρια με πιο ραβδοειδές σχήμα, βρέθηκαν να διασχίζουν τη μεμβράνη του πλάσματος πιο γρήγορα.

Μόνο μη δεσμευμένα μόρια φαρμάκου μπορούν να διασχίσουν το φράγμα της μεμβράνης. Τα ιονισμένα μόρια σπάνια είναι ικανά να διεισδύσουν στη μεμβράνη των λιπιδικών κυττάρων.

Οι μεταβλητές που καθορίζουν τη μεταφορά μορίων φαρμάκου στα κύτταρα της μήτρας και στα μελανοκύτταρα του θυλακίου των τριχών είναι (23):

- ο Η φύση της βιομεμβράνης.

- Η ροή του αίματος.
- Η σύνδεση πρωτεΐνης πλάσματος του μορίου φαρμάκου.
- Η διαλυτότητα στα λιπίδια του φαρμάκου (log PO).
- Η αναλογία ιονισμένων προς μη ιονισμένων μορίων φαρμάκου (pK εξίσωση Henderson-Hasselbalch)
- Το μοριακό μέγεθος και γεωμετρία του μορίου του φαρμάκου.
- Το μικρο-κλίμα.
- Η βαθμίδα συγκέντρωσης .
- Το pH

Ο ρυθμός διάδοσης των φαρμάκων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζεται από τη διαβάθμιση pH μεταξύ πλάσματος και κυττάρου. Το pH του πλάσματος είναι 7,3 ενώ το pH των κερατινοκυττάρων και των μελανοκυττάρων είναι χαμηλότερο, κυμαινόμενο μεταξύ 3 και 6. Η αλληλεπίδραση της μελανίνης με τις βασικές ενώσεις είναι επομένως απαραίτητη για την ενσωμάτωση. Μόνο μόρια φαρμάκου που δεν συνδέονται με πρωτεΐνες μπορούν να συμμετέχουν σε αυτήν τη διάχυση. Τα βασικά φάρμακα, σε αντίθεση με τα όξινα φάρμακα, μπορούν να συσσωρευτούν στα κερατινοκύτταρα και τα μελανοκύτταρα καθώς η διάχυση στο κύτταρο ευνοείται από τη βαθμίδα του pH. Η δέσμευση φαρμάκων στις κυτταρικές πρωτεΐνες μπορεί επίσης να ενισχύσει αυτό το αποτέλεσμα, καθώς η συγκέντρωση του φαρμάκου στο κυτοσόλιο μειώνεται όταν τα μόρια συνδέονται με δομές εντός του κυττάρου (20). Είναι γνωστό ότι οι όξινες ενώσεις γενικά δεν αποθηκεύονται τόσο εύκολα στις τρίχες όσο οι βασικές ενώσεις, οι οποίες έχουν υψηλή συγγένεια για τη μελανίνη. Επιπλέον οι Kuwayama et al. κατέδειξαν σε έρευνά τους, ότι όξινες και ουδέτερες ενώσεις, όπως η ακεταμινοφαίνη, και η ιβουπροφαίνη σπάνια εντοπίζονται στις τρίχες (19). Η διαβάθμιση που παρατηρείται από το pH του πλάσματος (pH =7,3), στις πιο όξινες συνθήκες που επικρατούν εντός των μελανοκυττάρων / κερατινοκυττάρων (pH=3,6) παρέχει πλεονεκτικές συνθήκες στην ενσωμάτωση βασικών φαρμάκων από ότι σε πιο όξινα φάρμακα (15).

Ένας άλλος παράγοντας ενσωμάτωσης είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας με κύρια βάση στην λιποφιλικότητα όπου σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα σε μελανίνη δίνει και την αντίστοιχη διαπερατότητα της μεμβράνης στο ρυθμό ενσωμάτωσης στις τρίχες. Κατά προτίμηση τα ελεύθερα, μη ιονισμένα μόρια, τα οποία είναι επαρκώς διαλυτά στα λιπίδια, διαχέονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής κατανομής λιπιδίων /

νερού του συγκεκριμένου φαρμάκου, τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στη μεμβράνη και τόσο πιο γρήγορη είναι η διάδοσή του (22). Η πιο κρίσιμη αβεβαιότητα στην εξέταση εντοπίζεται στις λιπόφιλες ουσίες όπου κατά τον μεταβολισμό τους στον οργανισμό αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό με σταδιακή απελευθέρωση από τις αποθήκες (κατά την σωματική άσκηση για παράδειγμα). Αυτό συχνά οδηγεί σε πιθανή μακροπρόθεσμη ανίχνευση των ουσιών αυτών οι οποίες δεν σχετίζονται με την τρέχουσα βιολογική κατάσταση. Τέτοιες ουσίες είναι τα κανναβινοειδή THC. Η εξέταση των ούρων βασίζεται στην αναγνώριση του τερματικού μεταβολίτη THCCOOH γλυκουρονίδη. Ενώ στο αίμα ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται οι μη συζευγμένες ουσίες :THC, THC-OH και THCCOOH των οποίων οι απόλυτες συγκεντρώσεις στον ορό διέπονται από την ταχεία διάχυση στα λιπώδη διαμερίσματα, από το χρόνο ημιζωής και από τις επακόλουθες διαδικασίες ανακατανομής. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι συγκεντρώσεις των κύριων ψυχοδραστικών συστατικών THC και THC-OH στο πλάσμα δεν είναι ο κατάλληλος δείκτης για τον καθορισμό των επιτρεπτών ορίων. Ο λόγος της συγκέντρωσης THC προς THCCOOH όμως πιστεύεται ότι είναι ισχυρότερο αποδεικτικό χρόνιας κατάχρησης κανναβινοειδών (μακροχρόνια συσσώρευση THCCOOH) ή οξείας κατανάλωσης (υψηλός λόγος THC / THCCOOH). Το δείγμα σιέλου αντιπροσωπεύει το δεσμευμένο με πρωτεΐνη τμήμα βασικών και ουδέτερων φαρμάκων που κυκλοφορούν στο αίμα και ως εκ τούτου είναι κατάλληλο ως συμπληρωματικό με την εξέταση αίματος. Γι αυτό το λόγο προτιμάται το δείγμα τριχών όπου παρέχει μία μακροπρόθεσμη αναδρομή έως και αρκετούς μήνες και μπορεί επίσης να μετρήσουν την ποσότητα χρήσης κάνναβης (23).

Η ανάλυση των μαλλιών μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την έκθεση εβδομάδες ή και μήνες πριν από τη συλλογή, ιδίως όσον αφορά τα βασικά φάρμακα όπως τα οπιοειδή, οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη (24).

Είναι σαφές ότι οι τρίχες έχουν μοναδικούς μηχανισμούς δέσμευσης για κάθε φάρμακο. Οι βασικές ουσίες όπως οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη, ενσωματώνονται από τις τρίχες σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα ουδέτερα ή όξινα φάρμακα και συνεπώς παρουσιάζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα μαλλιά σε σύγκριση με βενζοδιαζεπίνες και κανναβινοειδή για παράδειγμα (15).

Για να αποφύγουμε το ενδεχόμενο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και να ελαχιστοποιήσουμε την παρερμηνεία αυτή, εντάσσουμε τις τιμές αναφοράς (25). Για

την κοκαΐνη, για παράδειγμα, έχουμε όριο τιμής τα 0,5 ng / mg. Στην εξέταση για οπιοειδή με ανοσοχημική μέθοδο, έχουμε θετικό αποτέλεσμα όταν η μορφίνη ή η 6-ακετυλομορφίνης είναι 0,2 ng / mg. Ενώ σε μία χρωματογραφική δοκιμή το συνιστώμενο όριο ποσοτικού προσδιορισμού είναι (LOQ): $\leq 0,2$ ng / mg για κάθε ένωση. Εδώ η κατανάλωση ηρωΐνης πρέπει να διαφοροποιείται από τη χρήση κωδεΐνης ή μορφίνης με την παρουσία 6-ακετυλομορφίνης.

Η ανοσοχημική μέθοδος για την ανίχνευση κοκαΐνης μας δίνει θετικό αποτέλεσμα στο 0,5 ng / mg και η χρωματογραφία ανιχνεύει την κοκαΐνη για $\leq 0,5$ ng / mg και $\leq 0,05$ ng / mg για άλλες ενώσεις. Η χρωματογραφική ανάλυση θα πρέπει να περιλαμβάνει κοκαΐνη, και τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα: βενζοϋλεγκονίνη, κοκαΐθυλένιο, νορκοκαΐνη ή μεθυλεστέρα της εκγονίνης.

Όσον αφορά τις αμφεταμίνες πρέπει να έχουμε θετική συγκέντρωση 0,2 ng/mg για κάθε συστατικό ξεχωριστά: MDMA, μεθαμφεταμίνη, αμφεταμίνη, MDEA ή MDA. Στην χρωματογραφική μέθοδο το συνιστώμενο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ): $\leq 20,2$ ng / mg για κάθε ένωση. Σημείωση: Τα εργαστήρια πρέπει να γνωρίζουν την πιθανή κατάποση νόμιμων φαρμάκων που παράγουν θετικά αποτελέσματα για τη μεθαμφεταμίνη και την αμφεταμίνη.

Στα κανναβινοειδή η ανοσοχημική δοκιμή δίνει θετικό αποτέλεσμα σε συγκέντρωση THC=0,1 ng / mg και η χρωματογραφική δοκιμή έχει συνιστώμενο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ): THC: $\leq 0,1$ ng / mg & THC-COOH: $\leq 0,2$ pg / mg ενώ απαιτείται επιβεβαίωση του THC-COOH για να αποδειχθεί οριστικά η χρήση κανναβινοειδών (26).

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί πως με την εξέλιξη των εργαστηρίων είμαστε πλέον σε θέση να συσχετίσουμε την οδό χορήγησης και να προσδιορίσουμε την ημέρα της λήψης πολλών ουσιών, μέσω της αναλυτικής μεθόδου και κόβοντας ένα σκέλος τριχών σε τμήματα των 0,4 mm που αντιστοιχεί στην καθημερινή ανάπτυξη των μαλλιών. Η μικρο-τμηματική ανάλυση μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της ημέρας λήψης φαρμάκου και να διευκρινίσει τους μηχανισμούς πρόσληψης φαρμάκων στα μαλλιά (19)

1.5 Η δυσκολία στην ανίχνευση των NPS

Τα NPS (new psychoactive substances) είναι νέες ψυχοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για προσμίξεις στις ήδη υπάρχουσες. Ορίζονται από την απόφαση 2005/387 / ΔΕΥ του Συμβουλίου της ΕΕ ως ψυχοτρόπα φάρμακα σε καθαρή μορφή ή σαν ένα παρασκεύασμα που δεν πληρεί τη συμφωνία με την Ενιαία Σύμβαση των Ηνωμένων Εθνών του 1971 για τις ψυχοδραστικές ουσίες και μπορεί να αποτελέσει απειλή για την υγεία. Μπορούν να είναι νέες συνθετικές σχεδιασμένες ενώσεις, αλλά μπορούν επίσης να είναι και ερευνητικές χημικές ουσίες, θρεπτικές ουσίες ή (αποτυχημένα) φάρμακα που διατίθενται στο εμπόριο με τη μορφή αλάτων μπάνιου, φυτικής τροφής ή θυμιάματος. Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν συνθετικά κανναβινοειδή, καθιόνες, τρυπταμίνες, διεγερτικά και φάρμακα (οπιοειδή, βενζοδιαζεπίνες κ.λπ.) (10) Η επικρατούσα ομάδα με διεγερτική ή ψυχεδελική δραστηριότητα αντιπροσωπεύεται από συνθετικές καθιόνες, δηλαδή υποκατεστημένες ενώσεις φαινιθλαμίνης (27). Τέτοιες είναι η μεθοξαταμίνη (MXE), η μεφεδρόνη κ.α . Η συνηθέστερη πρόσμιξη απαντάται στο MDMA ή “Molly”-συντομογραφία για το «molecular-μοριακό» και δηλώνει την καθαρή ουσία. Η πρόσμιξη των NPS καθιστά την ουσία ακόμα πιο επικίνδυνη (20). Η ανίχνευση μεταβολιτών που υπάρχουν στα μαλλιά είναι, ωστόσο, ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό δεδομένου ότι μπορεί να διευκολύνει τη διαφοροποίηση μεταξύ παθητικής μόλυνσης και πραγματική χρήση ναρκωτικών (16). Η χημική ποικιλομορφία του συνθετικού NPS αντικατοπτρίζει επιχειρηματικούς μηχανισμούς και προσπάθειες παράκαμψης του νομοθετικού ελέγχου. Τα συνθετικά παράγωγα καθιόνης με υποκατάσταση δακτυλίου και τα συνθετικά κανναβινοειδή είναι από τα είδη που απαντώνται συχνότερα.

Σε μελέτη που διεξήχθη στην Ισπανία το 2013 από τους Caudevilla-Gálligo et al βρέθηκαν συνθετικές καθιόνες (γνωστές και ως «άλατα μπάνιου») σε πολλά δείγματα που υποβλήθηκαν σε έλεγχο (29).

Οι περισσότερες μέθοδοι περιλαμβάνουν αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC/ MS) ή εξαιρετικά υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UHPLC MS / MS) ως τεχνικές ανίχνευσης και περιορίζονται σε έναν μόνο αναλύτη ή σε ομάδες σχετικών ουσιών (δηλαδή συνθετικών κανναβινοειδών ή καθιόνων μαζί με φαινυλαμίνη ή πιπεραζίνες). Οι Strano Rossi et al. περιέγραψαν την ανάλυση 50+ φαρμάκων, αν και η διαδικασία τους χωρίστηκε σε

δύο ξεχωριστές εκχυλίσεις και περιελάμβανε ανεξάρτητες αναλυτικές μεθόδους για συνθετικά κανναβινοειδή και καθιόνες. (10) Λίγοι ήταν οι συγγραφείς που ανέφεραν HPLC σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) για διαλογή των NPS. Σε αυτήν τη μελέτη απέδειξαν ότι η εκχύλιση υπό πίεση (PLE) ή η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (ASE), μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για μια εξαγωγή NPS πολλαπλών κατηγοριών από κερατινοποιημένους ιστούς. Η επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης (π.χ. μείγμα νερού και μεθανόλης) και η εφαρμογή του PLE ακολουθούμενη από καθαρισμό με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) παρείχε υψηλές ανακτήσεις με αμελητέα αποτελέσματα μήτρας για όλα τα δοκιμασμένα φάρμακα. Το PLE χρησιμοποιεί διαλύτες σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις για την εξαγωγή αναλυτών από στερεά ή ημι-στερεά δείγματα και έχει δείξει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις ανταγωνιστικές τεχνικές (εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών) όπως εξοικονόμηση χρόνου, μειωμένη χρήση οργανικών διαλυτών, αυτοματοποίηση και απόδοση. Η χρήση του HRMS ως τεχνική ανίχνευσης από την άλλη, επιτρέπει την εύκολη συμπερίληψη νέων αναλυτών στη μέθοδο. Επιπλέον, είναι δυνατόν να επανεξεταστούν αναδρομικά τα ήδη ληφθέντα δεδομένα HRMS για την αναζήτηση άγνωστων ενώσεων. Η ικανότητα αναγνώρισης της ακριβούς μάζας των μητρικών ιόντων και των ιόντων προϊόντων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό των NPS (30).

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι ερευνητές Rust et al. το 2012, ανάλυση των δειγμάτων τριχών που προηγουμένως είχαν ανιχνευτεί θετικά για MDMA ή αμφεταμίνες περιείχαν επίσης πιπεραζίνες ή και μεφεδρόνη (μια συνθετική καθιόνη). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν τα άτομα χρησιμοποίησαν αυτά τα NPS χωρίς να το γνωρίζουν, θεωρώντας ότι ήταν έκσταση. Ενώ οι επιδράσεις ορισμένων συνθετικών καθιόνων είναι παρόμοιες με τις επιδράσεις της έκστασης ή άλλων διεγερτικών, η χρήση έχει συσχετιστεί με πολλά αρνητικά αποτελέσματα για την υγεία. Σε έρευνα που έκαναν το 2016 οι Palamar JJ et al. εξέτασαν δείγματα νέων από κλαμπς της Νέας Υόρκης που χρησιμοποιούσαν MDMA. Στο 41% αυτών που δήλωσαν μηδενική χρήση NPS, ανιχνεύθηκε η ουσία και συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε και η βουτυλόνη, ενώ σε μερικά και η μεθυλόνη (28).

Τα NPS αναπτύχθηκαν με τάχιστο ρυθμό τα τελευταία χρόνια, χαρακτηριζόμενα από ευρεία μεταβλητότητα της δομής τους και απουσία προτύπων αναφοράς τόσο των μητρικών ουσιών όσο και των μεταβολιτών τους εμποδίζοντας τα ιατροδικαστικά

και κλινικά εργαστήρια να επιτύχουν τη σωστή αναγνώριση και ποσοτικοποίηση του NPS. Η ανίχνευσή τους στα ούρα παρουσιάζει πολλές δυσκολίες, έτσι για την ταυτοποίησή τους προτιμάται η εξέταση της τρίχας, όπου το μητρικό φάρμακο αντιπροσωπεύει συνήθως τον αναλυτή στόχο, σε αντίθεση με τα ούρα, επειδή τα μόρια ενσωματώνονται ως επί το πλείστον εντός της μήτρας-κερατίνης από τον ιδρώτα, την κυκλοφορία του αίματος και / ή το σμήγμα, πριν μεταβολιστούν. Έρευνα που έγινε το 2016 στην περιοχή της Ιταλίας έδειξε πως μεταξύ των θετικών δειγμάτων για NPS, τα μετρούμενα επίπεδα για τα περισσότερα από τα φάρμακα ήταν σε εύρος πικογραμμάρια ανά χιλιόγραμμο τρίχας, υποδηλώνοντας είτε σποραδική έκθεση σε αυτές τις ουσίες, είτε χαμηλό ρυθμό ενσωμάτωσης στην μήτρα της κερατίνης. Κατέληξαν επίσης πως η μέθοδος UHPLC – MS / MS είχε μεγάλη ακρίβεια και μείωσε δραστικά τον χρόνο ανάλυσης που απαιτείται για τη διεξοδική τοξικολογική εξέταση, επιτυγχάνοντας έτσι δραστική αύξηση στην παραγωγικότητα του εργαστηρίου χωρίς να θυσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση. Είναι ακόμα χρήσιμες και για ευρύ φάσμα ανάλυσης στόχων και ανταγωνίζονται όλο και περισσότερο τις ανοσομετρικές μεθόδους όσον αφορά την οικονομική διάθεση και την ικανότητα υψηλής απόδοσης (27).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ

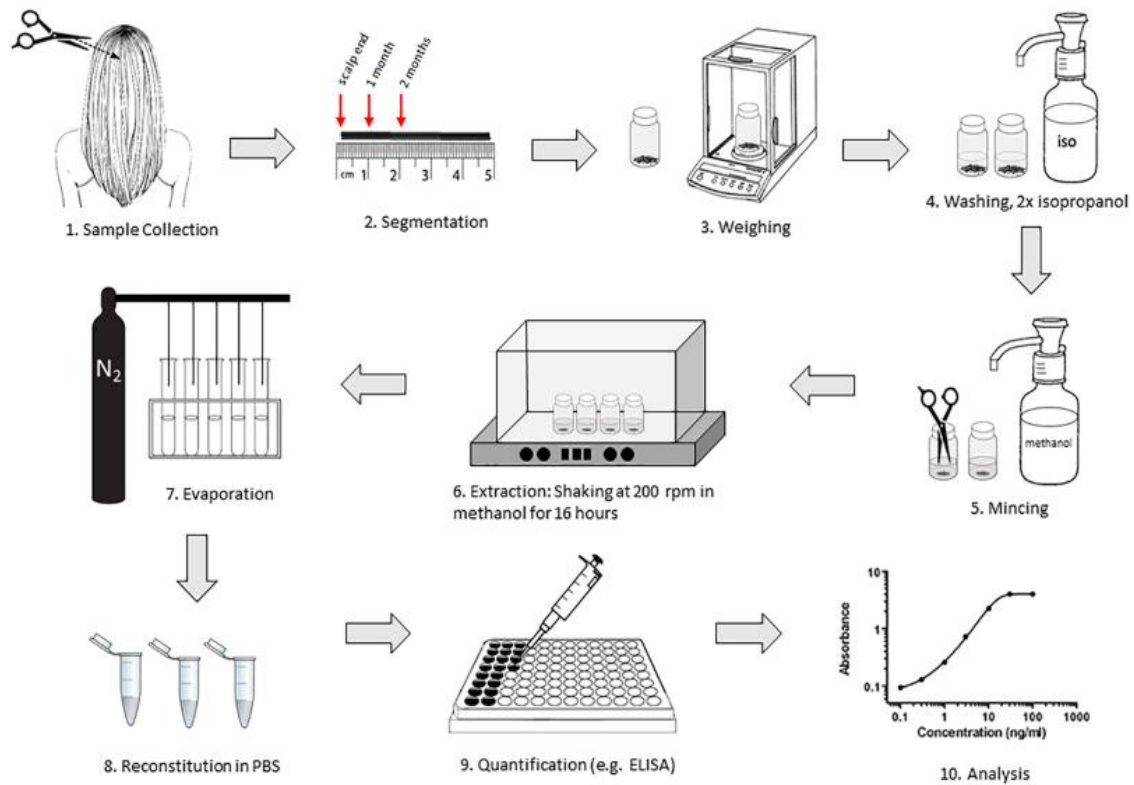
Η χρήση των τριχών ως μέσου για την ανάλυση της έκθεσης σε ουσίες έχει λάβει αυξημένη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω των λιγότερο ενοχλητικών συνθηκών συλλογής, του μεγάλου παραθύρου ανίχνευσης ξένων ουσιών και επειδή δεν αποσυντίθενται όπως άλλοι ιστοί του σώματος μετά το θάνατο. Το πιο κρίσιμο ζήτημα που αντιμετωπίζει η ανάλυση τριχών είναι η αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που προκαλούνται από την παθητική έκθεση στο φάρμακο, τα οποία βέβαια στα περισσότερα εργαστήρια αποφεύγονται με πλύσιμο. Επιπρόσθετα, για την αποφυγή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων καθιερώθηκαν για κάποιες ουσίες, κατώτατα όρια τα οποία δεν εφαρμόζονται σε ιατροδικαστικές υποθέσεις. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε περιπτώσεις κακοποίησης παιδιών, εγκλημάτων που διευκολύνουν τα ναρκωτικά ή αδικήματα ντόπινγκ (10).

Η προετοιμασία δείγματος, σε οποιαδήποτε αναλυτική διαδικασία, είναι ένα βασικό βήμα για ακριβή και συνεπή αποτελέσματα. Η προετοιμασία δείγματος μαλλιών, για την ανίχνευση ουσιών, επιτυγχάνεται σε πέντε βασικά βήματα:

- i. συλλογή δείγματος τριχών
- ii. απολύμανση/πλύσιμο
- iii. πέψη
- iv. κονιοποίηση
- v. πρωτογενής εξαγωγή και
- vi. δευτερογενής εξαγωγή.

Τα δύο τελευταία βήματα περιλαμβάνουν καθαρισμό δείγματος προκειμένου να αφαιρεθούν ανεπιθύμητες προσμίξεις και να συμπυκνωθεί η προς ανάλυση ουσία σε μικρό όγκο.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2) παρουσιάζονται συνοπτικά τα στάδια που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση δείγματος τριχών. Φαίνεται πως απαιτεί χρονοβόρες διεργασίες λόγω της πολύπλοκης σύνθεσης της μήτρας. Το θεμελιώδες μέρος της ανάλυσης, το οποίο επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των δεδομένων, είναι η προετοιμασία του δείγματος.



Εικόνα 2. Στάδια ανάλυσης δείγματος τριχών.

Παρακάτω θα αναλυθούν τα βασικά στάδια από τη λήψη του δείγματος μέχρι την ανάλυση του.

2.1. Δειγματοληψία

Προς το παρόν δεν υπάρχει τυπική μέθοδος για τη συλλογή δείγματος τρίχας από εξαρτημένους ασθενείς ή από θύματα για ιατροδικαστική ανάλυση. Τα δείγματα τρίχας συλλέγονται τυχαία από διαφορετικά μέρη του σώματος. Παρόλα αυτά προτιμάται το πίσω μέρος του κεφαλιού λόγω των ακόλουθων (32):

- i. οι περισσότερες τρίχες βρίσκονται στην ίδια φάση ανάπτυξης
- ii. ο ρυθμός ανάπτυξης των περισσότερων τριχών είναι επίσης ο ίδιος σε αυτήν την περιοχή
- iii. η περιοχή επηρεάζεται λιγότερο από το φύλο και την ηλικία.

Είναι επιθυμητό τα δείγματα να συλλέγονται περίπου ένα μήνα μετά από την έκθεση στην ουσία και τα νομικά, ηθικά και ανθρώπινα δικαιώματα του υποκειμένου πρέπει να γίνονται σεβαστά. Το δείγμα πρέπει να συλλέγεται από εκπαιδευμένο

άτομο, όχι απαραίτητα γιατρό και το περιβάλλον πρέπει να είναι απαλλαγμένο από εξωγενής πηγές μόλυνσης (15).

Οι τρίχες κόβονται κοντά στην επιφάνεια του τριχωτού της κεφαλής και σημειώνεται επίσης η θέση των μαλλιών. Οι τρίχες αποθηκεύονται σε φάκελο, αλουμινόχαρτο ή πλαστική σακούλα με φερμουάρ και διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ποσότητα του δείγματος τρίχας που λαμβάνεται εξαρτάται από το φάρμακο που πρόκειται να ελεγχθεί. Επίσης, εξαρτάται από το εργαστήριο στο οποίο πρόκειται να διεξαχθούν δοκιμές φαρμάκων επειδή διαφορετικά εργαστήρια έχουν διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής και ανάλυσης. Το μέγεθος του δείγματος που αναφέρεται στην περισσότερη ερευνητική βιβλιογραφία κυμαίνεται στα 200 mg, αλλά οι τρίχες πρέπει να κοπούν όσο το δυνατόν πιο κοντά στο τριχωτό της κεφαλής. Λαμβάνεται άξονας τρίχας μήκους περίπου 3 cm, όταν πρόκειται να πραγματοποιηθεί τμηματική ανάλυση των τριχών γνωρίζοντας ότι το μήκος του 1 cm αντιστοιχεί σε ανάπτυξη 1 μήνα (26).

Υπάρχουν έτοιμα κιτ συλλογής όπου περιέχονται και οι οδηγίες δειγματοληψίας αλλά και τα αυτοσχέδια θα πρέπει να περιέχουν τα ακόλουθα:

- Έντυπα επιμέλειας
- Αλουμινόχαρτο και φάκελο συλλογής
- Σφραγίδες ασφαλείας
- Τσάντα αποδείξεων (προαιρετικό)
- Φάκελος μεταφοράς (προαιρετικό)
- Οδηγίες για τη συλλογή ενός δείγματος μαλλιών

Το κιτ συλλογής θα πρέπει να σφραγίζεται έτσι ώστε ο συλλέκτης να μπορεί να ελέγξει ότι οι σφραγίδες δεν έχουν παραποιηθεί. Τα ψαλίδια που χρησιμοποιούνται για να κόψουν το δείγμα τρίχας πρέπει να καθαρίζονται με ένα πανάκι χωρίς οινόπνευμα ή να αποστειρώνονται πριν από τη χρήση.

Αφού κόψουμε το δείγμα, το τοποθετούμε στο χαρτί κατά μήκος, αποφεύγοντας να το διπλώσουμε στη μέση για να μην σπάσουν οι τρίχες. (34)



Εικόνα 3. Μέθοδος συλλογής δείγματος τριχών από την κεφαλή (Πηγή: <https://humanstress.ca/>).

Εάν αυτή η διαδικασία δεν είναι εφικτή, τότε η πηγή και η διαδικασία της δειγματοληψίας πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς. Εάν οι τρίχες της κεφαλής δεν είναι διαθέσιμες θα πρέπει να εξεταστούν εναλλακτικές τοποθεσίες συλλογής, συμπεριλαμβανομένων της ηβικής περιοχής, της μασχάλης και της γενειάδας. Η συλλογή οικείων δειγμάτων απαιτεί προσοχή για το απόρρητο του δότη, διασφαλίζοντας ταυτόχρονα ότι η ακεραιότητα της διαδικασίας συλλογής δεν διακυβεύεται. Σε κάθε περίπτωση, είναι γνωστό ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης και τα χαρακτηριστικά αδράνειας των τριχών από αυτές τις εναλλακτικές θέσεις, διαφέρουν από τα μαλλιά της κεφαλής (26). Η λήψη τριχών από γενειάδα ενέχει επίσης τον κίνδυνο της επιμόλυνσης, αν και είναι λιγότερο πιθανό να μολυνθούν από σμηγματογόνες εκκρίσεις. Ο ρυθμός ανάπτυξης των τριχών της γενειάδας είναι 0,27 mm/ημέρα και θεωρείται ότι είναι η κατάλληλη εναλλακτική επιλογή. Μπορούν να συλλέγονται καθημερινά για τη διερεύνηση του ρυθμού εναπόθεσης ουσιών (35).

Η ίδια ποσότητα αποκοπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στις τρίχες του σώματος, με εξαίρεση τα μασχαλιαία περιοχή που δεν είναι κατάλληλες για μέτρηση μεταβολιτών της αιθανόλης.(34)

Οι τρίχες της ηβικής περιοχής είναι πάντα διαθέσιμες ιδίως εν απουσία άλλων τριχών και μπορεί να είναι λιγότερο μολυσμένες από περιβαλλοντική έκθεση ή χρήση καλλυντικών. Από την άλλη πλευρά, εκτίθενται σε σμήγμα, ιδρώτα και άλλες αποβολές καθιστώντας δύσκολη την τμηματική ανάλυση (36). Συχνά εκφράζονται

ανησυχίες σε σχέση με την παραμονή μιας φαλακρής περιοχής ειδικά σε μικρά παιδιά ή άτομα με φαλάκρα ή αραιώση μαλλιών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η συλλογή αρκετών μικρότερων δειγμάτων τρίχας από πολλαπλές περιοχές και κυρίως από το πίσω μέρος της κεφαλής είναι επιθυμητή (26).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για να διαπιστωθούν οι διαφορές στις συγκεντρώσεις ουσιών σε διάφορους τύπους τρίχας από το ίδιο άτομο. Σε μια μελέτη συγκρίθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης μορφίνης, μεθαδόνης, φαινοβαρβιτάλης και κοκαΐνης σε διαφορετικούς τύπους τριχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υψηλότερο επίπεδο ποσότητας ουσίας βρέθηκε στις μασχαλιαίες τρίχες και το χαμηλότερο στις τρίχες του τριχωτού της κεφαλής. Σε μια άλλη μελέτη, η συγκέντρωση μορφίνης προσδιορίστηκε σε διαφορετικούς τύπους τριχών: 0,4-24,2 ng/mg βρέθηκαν σε μασχαλιαίες τρίχες, 0,6-27,1 ng/mg στα μαλλιά του τριχωτού της κεφαλής και 0,8-1,34 ng/mg σε ηβική τρίχα. Οι αξιοσημείωτες διαφορές στη συγκέντρωση της ουσίας οφείλονται στην παροχή αίματος, τη διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης και τον διαφορετικό αριθμό αποκρινών αδένων (35).

Σχετικά με τη λήψη δείγματος από παιδιά ή τη μεταθανάτια λήψη, η διαδικασία δεν αλλάζει αλλά συνήθως διαφέρει η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται. Σε εγκληματολογικές περιπτώσεις η λήψη δείγματος τριχών γίνεται διαφορετικά, διαχωρίζονται ανάλογα με τον τύπο και αποθηκεύονται σε διαφορετικές σακούλες. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να είναι χρήσιμη και η ανάλυση των ριζών των τριχών παρέχοντας πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση ουσιών του θανούτος πριν από το θάνατο ή το έγκλημα. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται στην αρχή της αυτοψίας και αν απαιτούνται πληροφορίες σχετικά με πρόσφατη χρήση, συνιστάται η συλλογή ενός τραβηγμένου δείγματος τρίχας με ρίζα, επιπλέον της συλλογής ενός κομμένου δείγματος μαλλιών. Αν υπάρχει υποψία ότι ο φόνος υποβοηθήθηκε από τη χρήση ουσιών τότε πρέπει η λήψη του δείγματος να γίνει μεταξύ 4-6 εβδομάδων και να μην υπάρχουν χημικά προϊόντα πάνω στα μαλλιά (26).

Προκειμένου να αποφευχθεί η αποικοδόμηση, η απώλεια του αναλυτή ή η μόλυνση από άλλες πηγές, το δείγμα και τυχόν εκχυλίσματα πρέπει να χειρίζονται και να αποθηκεύονται με ορισμένες προφυλάξεις. Τα ξηραμένα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (37). Δεν πρέπει να φυλάσσονται στο ψυγείο ή στον καταψύκτη, καθώς το πάγωμα μπορεί να διογκώσει

το δείγμα και να προκληθεί διάχυση του φαρμάκου. Τα δείγματα που είναι υγρά κατά τη συλλογή πρέπει να στεγνώνουν πριν την αποθήκευση και την ανάλυση (33).

2.2. Προετοιμασία του δείγματος

Το πλύσιμο αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο της ανάλυσης καθώς πρέπει να εξασφαλίσει την απομάκρυνση των εξωγενών ρύπων. Η ενδογενής μόλυνση προκύπτει από τη μακροχρόνια έκθεση σε ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό και ενσωματώνονται στη δομή της τρίχας κατά την ανάπτυξή της, ενώ η εξωγενής μόλυνση οφείλεται στην επαφή των μαλλιών με καπνό, καλλυντικά, ιδρώτα (32).

Τα υπάρχοντα ιχνοστοιχεία παρασύρονται από το νερό και μπορούν να προσκολληθούν στην κερατίνη στα μαλλιά, ενώ τα σωματίδια σκόνης που περιέχουν σημαντικές ποσότητες ιχνοστοιχείων μπορούν να συγκρατηθούν μεταξύ των διαφόρων στρωμάτων της επιδερμίδας μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι διαφορετικές μορφές προσάρτησης και αλληλεπίδρασης (ισχυρές ή αδύναμες) μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικές απώλειες κατά το πλύσιμο. Ως εκ τούτου, η εύρεση μιας διαδικασίας πλύσης για τον προσδιορισμό πολλών στοιχείων ευρείας εμβέλειας είναι ανέφικτη. Υπό αυτή την έννοια, τα διαφορετικά αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για το πλύσιμο των τριχών πρέπει επίσης να αναλυθούν παράλληλα με το δείγμα (38).

Για την απομάκρυνση των εξωτερικά προερχόμενων ρύπων, χρησιμοποιείται το βήμα πλύσης πριν από την εκχύλιση, ωστόσο δεν υπάρχει ομοιόμορφη/τυπική διαδικασία απολύμανσης. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα χημικά για το πλύσιμο είναι τα απορρυπαντικά, όπως για παράδειγμα σαμπουάν και χειρουργικά διαλύματα καθαρισμού, τασιενεργά (0,1% δωδεκυλοθειικό νάτριο), φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και οργανικοί διαλύτες, όπως η ακετόνη, ο διαιθυλαιθέρας, η μεθανόλη, η αιθανόλη, το διχλωρομεθάνιο και το εξάνιο (39). Ωστόσο, η χρήση των τελευταίων θα πρέπει να ελαχιστοποιηθεί ή να αποφεύγεται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα καθώς μπορεί να εξαγάγει αναλυτές και έτσι να προκαλέσει απώλεια της ουσίας που μας ενδιαφέρει.

Γενικά ο αριθμός των πλύσεων εξαρτάται από την έκταση της μόλυνσης. Η Εταιρεία Δοκιμών Μαλλιών συνιστά η διαδικασία απολύμανσης των μαλλιών να περιλαμβάνει τόσο οργανικό όσο και υδατικό βήμα πλύσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι

ο πιο αποτελεσματικός οργανικός διαλύτης είναι η μεθανόλη και ο πιο αποτελεσματικός υδατικός διαλύτης περιέχεται σε απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικού νατρίου (35).

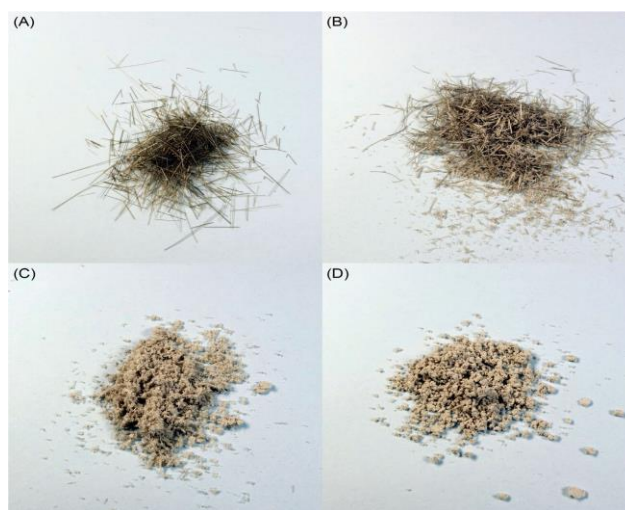
Μετά το πλύσιμο, το τμήμα των τριχών στεγνώνει και στη συνέχεια κονιοποιείται ή κόβεται σε μικρά κομμάτια. Ανάλογα με τον τύπο της περίπτωσης, ενδέχεται να ισχύουν διαφορετικές στρατηγικές κατάτμησης. Οι τρίχες της κεφαλής κόβονται σε μετρημένα τμήματα μεταξύ 10 και 30 mm, έτσι μπορούν να παρέχουν ένα πιο λεπτομερές ιστορικό προφίλ της έκθεσης ενός ατόμου σε ουσίες. Σε περιπτώσεις υποτιθέμενου θανάτου υποβοηθούμενου από ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της σεξουαλικής επίθεσης, η ανάλυση ακόμη μικρότερων τμημάτων μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της θετικής εξέτασης τρίχας σε μικρότερο χρονικό πλαίσιο. Η ακρίβεια της τμηματικής ανάλυσης εξαρτάται τόσο από τη δειγματοληψία όσο και από τη διαδικασία κατάτμησης στο εργαστήριο (26).

Επειδή, οι συγκεντρώσεις ουσιών στις τρίχες μπορεί να μειωθούν από τη ρίζα έως το άκρο της τρίχας, μέσω της φυσικής «έκπλυσης», μόνο οι τρίχες που έχουν κοπεί από το τριχωτό της κεφαλής και ευθυγραμμίζονται με το άκρο της ρίζας θα πρέπει να υποβάλλονται σε τμηματική ανάλυση (26).

Τα εκπλύματα που προκύπτουν από τη διεργασία πρέπει να φυλάσσονται στους 4 °C για μεταγενέστερη ανάλυση ώστε να εκτιμηθεί το ενδεχόμενο περιβαλλοντικής έκθεσης. Έχει προταθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αναλογία πλύσης/εκχυλίσματος τριχών για να αποδειχθεί αν η ανίχνευση οφείλεται σε κατάχρηση ουσιών ή σε περιβαλλοντική επιμόλυνση. Σε περίπτωση που αυτή η αναλογία είναι μικρότερη από 0,1 υποδηλώνει κατάσταση κατάχρησης ουσιών, ενώ υψηλότερη αναλογία από 0,1 και μικρότερη από 0,5, προτείνει πιθανή κατάχρηση ουσιών και όταν είναι υψηλότερη από 0,5, τότε η εξωτερική μόλυνση είναι η κύρια πηγή (37).

Σε αντίθεση με τα σωματικά υγρά, τα οποία κατανέμονται εύκολα πριν από την ανάλυση, τα μαλλιά είναι μια στερεή μήτρα που χρειάζεται κάποιου είδους ομογενοποίηση πριν από την ανάλυση. Το SoHT συνιστά τα δείγματα τριχών να κοπούν σε μικρότερα κομμάτια και να αναμειχθούν ή να αλεσθούν σε σκόνη ώστε να υπάρχει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα για ανάλυση (40).

Προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης, το δείγμα ξηραίνεται με τη χρήση SpeedVac. Το άλεσμα γίνεται πιο εύκολο με την προσθήκη αποστειρωμένων χαλύβδινων χαντρών στα σωληνάρια. (41). Έχει παρατηρηθεί πως ένας μικρός χρόνος άλεσης του δείγματος μας δίνει μεγάλη διακύμανση στο αποτέλεσμα εξαιτίας της μικρής ενεργής επιφάνειας που παίρνουμε. Για να διασφαλιστεί ένα αντιπροσωπευτικό και ομοιογενές δείγμα, η αρχική ποσότητα θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη και ο χρόνος κονιοποίησης επίσης ώστε για να ληφθεί μια λεπτή σκόνη όπως απεικονίζεται στην εικόνα.(1)



Εικόνα 3 : Εικόνες του δείγματος τριχών που αλέθονται σε σκόνη σε διαφορετικούς χρόνους. Στην εικόνα (A) & φαίνεται η τμηματοποίηση των τριχών στα & στις επόμενες φαίνεται η άλεσή τους στα 6, 15 & 25 λεπτά αντίστοιχα. Πηγή: (1)

Το μίγμα αυτό καθώς και η ποσότητα των τριχών ζυγίζονται με ακρίβεια για να διασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα. Στο δείγμα σκόνης προστίθεται ένα χιλιοστόλιτρο μεθανόλης το υποβάλουμε σε υπερήχους σε λουτρό πάγου. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται και το διαυγές υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρου μέχρι να ξεραθεί. Τέλος, το αποξηραμένο δείγμα μετά από κάποια ανασύσταση μεταφέρεται για ανάλυση LC-MS. Για την ανάλυση συνιστάται ένα κλάσμα των 10-50 mg. Στην πραγματικότητα αυτό αντιστοιχεί σε 50-100 τρίχες. (10)

Η διαδικασία της διαλυτοποίησης πρέπει να ρυθμιστεί με τέτοιο τρόπο ώστε η ουσία και οι μεταβολίτες της να παραμένουν άθικτα. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί σε ουσίες χημικά ασταθείς που χάνονται στη διαδικασία εξαγωγής. Για παράδειγμα, η 6-ακετυλομορφίνη μετατρέπεται σε μορφίνη και η κοκαΐνη

μετατρέπεται σε βενζοϋλεκγονίνη. Για τη διάλυση, υπάρχουν διαφορετικές τεχνικές προετοιμασίας με κάθε μια να έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της. Μπορεί να πραγματοποιηθεί επώαση σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και ανάλυση χρησιμοποιώντας ανοσολογικές τεχνικές, κυρίως ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA, Radioimmunoassay). Επίσης, η επώαση μπορεί να γίνει σε όξινο ή βασικό διάλυμα και να ακολουθήσει εκχύλιση υγρού-υγρού ή εκχύλιση στερεάς φάσης και ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές. Η επώαση σε αλκαλικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου καταστρέφει το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες και για αυτό παράμετροι όπως η θερμοκρασία επώασης, ο χρόνος επώασης και η συγκέντρωση του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου πρέπει να καθοριστούν προσεκτικά. Ουσίες όπως τα στεροειδή αναβολικά (εστέρες), οι βενζοδιαζεπίνες, η κοκαΐνη και αυτά που είναι χημικά ασταθή δεν μπορούν να εξαχθούν με αλκαλική υδρόλυση (39).

Αν η επώαση γίνει σε οργανικό διαλύτη (γενικά μεθανόλη με ή χωρίς υδροχλωρικό οξύ) ακολουθεί εκχύλιση υγρού-υγρού ή εκχύλιση στερεάς φάσης και ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές. Στην περίπτωση αυτή, οι τρίχες πέπτωνται σε λουτρό υπερήχων για αρκετές ώρες στους 45 °C χρησιμοποιώντας αιθανόλη ή μεθανόλη ως διαλύτη. Μετά την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, το δείγμα μπορεί να αναλυθεί απευθείας με GC-MS (37). Τέλος, αν πραγματοποιηθεί πέψη με ενζυμικό διάλυμα β-γλυκορονιδάσης/ αρυλοσουλφατάσης, ακολουθεί εκχύλιση υγρού-υγρού ή εκχύλιση στερεάς φάσης και ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές. Αυτά τα ένζυμα πέπτουν τις τρίχες ενεργώντας στην κερατίνη τους χωρίς να μεταβάλλουν ή να καταστρέφουν τη συγκέντρωση του φαρμάκου και των μεταβολιτών του (42).

Μερικές από τις πρόσφατα αναπτυγμένες τεχνικές όπως η υποβοήθηση εξαγωγής με υπερήχους και μικροκύματα επιταχύνουν και βελτιώνουν την αποδοτικότητα της ανάλυσης τριχών. Μικροτεχνικές όπως για παράδειγμα η μικροαφαίρεση στερεάς φάσης, η μικροεκχύλιση υγρής φάσης κοίλης ίνας και η μικροεκχύλιση από συσκευασμένα ροφητικά μειώνουν δραματικά την ποσότητα των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται και των τοξικών καταλοίπων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια των διαδικασιών καθαρισμού (43).

2.3. Ποιοτικός προσδιορισμός ουσιών

Από τη στιγμή που τα δείγματα έχουν συλλεχθεί και διατηρηθεί, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει μικροσκοπική ανάλυση χαμηλής μεγέθυνσης, χρησιμοποιώντας ένα στερεομικροσκόπιο. Η μορφολογική εξέταση της τρίχας είναι το πρώτο βήμα στις συγκρίσεις ιατροδικαστικών δειγμάτων. Οι κύριες ιατρικές-νομικές ανησυχίες σχετικά με την εξέταση τριχών περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό του είδους προέλευσης, τον προσδιορισμό της προέλευσης της τρίχας από το σώμα και τέλος, τη σύγκριση του δείγματος τρίχας ελέγχου από το θύμα με το δείγμα τριχών από τον τόπο του εγκλήματος. Παρόλο που δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί οριστικά ένα δείγμα τρίχας που προέρχεται από το κεφάλι ενός συγκεκριμένου ατόμου, ο κατηγορηματικός προσδιορισμός της ανθρώπινης προέλευσης μπορεί να καθοριστεί με βάση τη μικροσκοπική εξέταση της υφής της τρίχας, του φλοιού, του μυελού και των χρωστικών κόκκων (44).

Με το μικροσκόπιο οι τρίχες τοποθετούνται σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου εξετάζονται και αφαιρούνται τα άχρηστα υπολείμματα. Αυτό επιτρέπει την εξέταση των τριχών χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο υψηλής μεγέθυνσης. Ανάλογα με τον αριθμό των τριχών που συναντώνται στο δείγμα, όλες οι τρίχες μπορούν να τοποθετηθούν σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου ή να τοποθετηθεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των τριχών σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Στην πρώτη μέθοδο, μπορεί να τοποθετηθεί ένα δείγμα καθενός από τους ξεχωριστούς τύπους τριχών που παρατηρούνται με το στερεομικροσκόπιο, δηλαδή μερικές από κάθε χρώμα, μήκος, διάμετρο και υφή. Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση στοχευμένης αναζήτησης. Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου υποβάλλονται γνωστά δείγματα τριχών μαζί με τα αποδεικτικά στοιχεία. Τα γνωστά δείγματα μπορούν να εξεταστούν και να τοποθετηθούν πρώτα. Μόλις ληφθούν οι κατάλληλες προφυλάξεις για την αποφυγή μόλυνσης (καθαρισμός του χώρου εργασίας, καθαρισμός των εργαλείων, αλλαγή γαντιών), στη συνέχεια εξετάζονται τα δείγματα από τα αποδεικτικά στοιχεία. Τρίχες μακροσκοπικά παρόμοιες με εκείνες στα προηγούμενα τοποθετημένα γνωστά δείγματα μπορούν να αναγνωριστούν και να διατηρηθούν σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου (45).

Αφού οι τρίχες διατηρηθούν σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου, μπορούν στη συνέχεια να εξεταστούν με σύνθετο μικροσκόπιο υψηλής μεγέθυνσης. Χρησιμοποιώντας εύρος μεγέθυνσης από 50x έως 400x, μπορούν να παρατηρηθούν τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά. Με βάση την ανάλυση αυτών των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών, μπορούν να γίνουν ορισμένοι πιθανοί προσδιορισμοί και να ακολουθήσει η ανάλυση.

2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών

Οι διαδικασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ουσιών σε δείγμα τριχών είναι είτε ίδιες είτε ελαφρώς τροποποιημένες από τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ουσιών σε ούρα, αίμα ή άλλο δείγμα βιολογικού υγρού. Οι μέθοδοι ανάλυσης της τρίχας διακρίνονται κατά βάση σε ανοσολογικές και σε χρωματογραφικές. Η ανάλυση ουσιών στις τρίχες έχει ελάχιστες απαιτήσεις, οι οποίες είναι (36):

- i. ευαισθησία στο εύρος των πικογραμμάτων ανά χιλιοστόγραμμα τρίχας,
- ii. ειδικότητα για μητρικές ουσίες και λιπόφιλους μεταβολίτες και
- iii. απουσία φαινομένων μήτρας με πέψη τριχών.

Γενικά, το μείγμα που προκύπτει από την επώαση των τριχών με το διάλυμα πέψης ή εξαγωγής δεν είναι κατάλληλο για άμεση ανάλυση και πρέπει να καθαριστεί περαιτέρω και να συμπυκνωθούν οι προς ανάλυση ουσίες. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τεχνικές εκχύλισης όπως η υγρή-υγρή εκχύλιση, και η εκχύλισης στερεάς φάσης.

2.4.1. Χρωματογραφικές τεχνικές

Η αέρια χρωματογραφία (GC, Gas Chromatography) διαχωρίζει ένα μείγμα πτητικών ενώσεων σε μεμονωμένα συστατικά και ο ανιχνευτής σε συνδυασμό με τη GC προσδιορίζει κάθε συστατικό. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι ανιχνευτών που μπορούν να συζευχθούν με GC, όπως ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας και το φασματόμετρο μάζας (MS, Mass Spectrometry). Στην ανάλυση ουσιών σε δείγματα τριχών χρησιμοποιείται κυρίως η GC-MS. Με τη χρήση του GC-MS, μπορεί να ανιχνευθεί ένας αριθμός φαρμάκων, π.χ. αμφεταμίνες, βενζοϋλεκονίνη,

κανναβινοειδή, κοκαΐνη, κωδεΐνη, μεθαδόνη, και άλλα οπιούχα. Επίσης, υψηλά πολικές ενώσεις, όπως μορφίνη, βενζοϋλεκονίνη και μερικές βενζοδιαζεπίνες, μπορούν να γίνουν επιδεκτικές σε GC με κατάλληλη παραγωγοποίηση (47).

Η ανάλυση με χρήση GC-MS περιλαμβάνει ορισμένα πολύπλοκα βήματα εξαγωγής και παραγωγοποίησης δείγματος. Ωστόσο, είναι μια σημαντική τεχνική για την ποιοτική ανάλυση των ναρκωτικών στην ιατροδικαστική επιστήμη. Η σιλυλίωση είναι μια κοινή διαδικασία παραγωγοποίησης για την αύξηση της ικανότητας ανάλυσης από το GC-MS (47).

Η υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι πλέον μεταξύ των ευρέως χρησιμοποιούμενων τεχνικών για την ανάλυση τριχών. Από μια πειραματική τεχνική το 1990, εξελίχθηκε αρχικά ως συμπληρωματική μεθοδολογία στην κλασσική τεχνική GC -MS. Χρησιμοποιούμενη αρχικά για στοχευμένη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση περιορισμένου αριθμού αναλυτών, πιο πρόσφατα οι τρόποι μέτρησης των σύγχρονων LC-MS (/MS) άνοιξαν νέες δυνατότητες για την εφαρμογή του στη λεγόμενη γενική άγνωστη διαλογή που πραγματοποιείται ως μέρος συστηματικής τοξικολογικής ανάλυσης ιδιαίτερα στην κλινική και ιατροδικαστική τοξικολογία (48).

Ως τεχνική είναι πλεονεκτική καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και μια μικρή ποσότητα φαρμάκου στο δείγμα τρίχας χωρίς παραγωγοποίηση. Λόγω των δραματικών βελτιώσεων, τα όργανα που βασίζονται σε LC-MS/MS καθιστούν δυνατή την ανίχνευση μικρής ποσότητας σχεδόν κάθε πιθανής ουσίας στις τρίχες και παραμένει δυνατή ακόμη και μετά από χορήγηση μίας μόνο δόσης (49).

Για την εφαρμογή αυτή της τεχνικής μετά το πλύσιμο και την πέψη, οι ουσίες εκχυλίζονται με κάποιο κατάλληλο διαλύτη με εκχύλιση υγρού -υγρού και στη συνέχεια με εκχύλιση στερεάς φάσης. Η εκχυλισμένη ουσία εγχέεται απευθείας σε LC-MS για ανάλυση. Οι Shah et al., (2014) ανέπτυξαν μια δοκιμή ανίχνευσης πολλαπλών ουσιών/μεταβολιτών με βάση τις τρίχες χρησιμοποιώντας LC-MS/MS με δυναμική μέθοδο παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (DYN-MRM, Dynamic Multiple Reaction Monitoring) και χρησιμοποιώντας ιδιόκτητο λογισμικό, τόσο για έλεγχο όσο και για επικυρωμένες επιβεβαιωτικές αναλύσεις. Για την εκχύλιση τα δείγματα τρίχας απολυμάνθηκαν χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο, αλέστηκαν και κατεργάστηκαν με υδροξείδιο του νατρίου 1 M και εξουδετερώθηκαν με ρυθμιστικό

διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και φωσφορικού άλατος και το ομογενοποίημα εκχυλίστηκε αργότερα με εξάνιο χρησιμοποιώντας υγρή-υγρή εκχύλιση (50).

Μετά την εξαγωγή των ουσιών από το δείγμα τριχών, ο έλεγχος αυτών πραγματοποιήθηκε με LC-MS/MS δυναμική μέθοδο παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (DYN-MRM). Η μέθοδος διαλογής (για > 200 φάρμακα/μεταβολίτες) βαθμονομήθηκε με ένα προσαρμοσμένο μείγμα ουσιών και επικυρώθηκε για 20 επιλεγμένα φάρμακα σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA. Το LOD των ενώσεων κυμαινόταν μεταξύ 0,05-0,5 pg/mg τρίχας. 233 δείγματα ανθρώπινων μαλλιών ελέγχθηκαν με τη νέα αυτή μέθοδο και τα δείγματα επιβεβαιώθηκαν θετικά για 20 διαφορετικές ουσίες, κυρίως στεροειδή και ουσίες κατάχρησης (50).

Πρόσφατα, η φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού (ES -MS) σε συνδυασμό με HPLC έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή στην ανάλυση φαρμάκων. Δεδομένου ότι ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια "μαλακή" τεχνική ιοντισμού που παράγει ιόντα αναλυόμενης αέριας φάσης απευθείας από το δείγμα, η HPLC -ES -MS παρέχει την ευκαιρία για ανάλυση μοριακών ειδών. Ο προσδιορισμός τεμοζολομίδης και μεταβολιτών υδροξυλίου σε τρίχες αουραίων με HPLC σε συνδυασμό με ES -MS που περιγράφεται από τους Toyooka et al. (2003) έδειξε ότι η προτεινόμενη μέθοδος παρέχει ανίχνευση ιχνών μητρικών ουσιών και διαφόρων ειδών μεταβολιτών χωρίς περίπλοκη προκατεργασία. Η HPLC παρουσιάζει τις προϋποθέσεις που είναι κατάλληλες για τον διαχωρισμό κορτικοστεροειδών και τη χρήση φασματομετρίας μάζας (HPLC -MS) για ανίχνευση και παρέχει καλή εξειδίκευση και ευαισθησία (51).

Ο Gottardo χρησιμοποίησε φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης και ιονισμού τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης-ηλεκτροψεκασμού, για πρώτη φορά για τον εντοπισμό φαρμάκων κατάχρησης (κοκαΐνη, κωδεΐνη, εφεδρίνη, μορφίνη, MDMA, μεθαμφεταμίνη, MDA, αμφεταμίνη) από δείγμα μαλλιών. Προσδιορίστηκε η ποσότητα του φαρμάκου και τα αποτελέσματα έδειξαν μέτρια ακρίβεια, αλλά η μέθοδος εξακολουθεί να είναι χρήσιμη για την ανάλυση της κατάχρησης ουσιών σε τρίχες (52).

2.4.2. Ανοσολογικές τεχνικές

Οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ως εξέταση διαλογής για τον έλεγχο της παρουσίας κάποιας ουσίας και συνήθως όχι για την ποσοτικοποίηση. Επίσης τα

ανοσολογικά κιτ δεν έχουν σχεδιαστεί για μία συγκεκριμένη ουσία, αλλά για την ανάλυση μιας ομάδας ουσιών και των μεταβολιτών τους. Τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν ανοσολογικές μεθόδους θα πρέπει να διασφαλίζουν ότι οι δοκιμές προσυμπτωματικού ελέγχου έχουν επαρκή ευαισθησία για τον εντοπισμό των συγκεντρώσεων των ουσιών που υπάρχουν στο υγρό που λαμβάνεται από την εκχύλιση/πέψη των τριχών και οι δοκιμές διαλογής να έχουν επαρκή εξειδίκευση και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την αντιμετώπιση ποικίλων αναλογιών ουσιών/μεταβολιτών που ανευρίσκονται στο δείγμα. Τέλος, όλα τα υποθετικά «θετικά» δείγματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με βάση το χρωματογραφικό διαχωρισμό και τη φασματομετρία μάζας (53).

Σε αυτές τις μεθόδους η διαδικασία εξαγωγής πρέπει να είναι συμβατή με την προκαταρκτική δοκιμή διαλογής, έτσι ώστε τα απορρυπαντικά που χρησιμοποιούνται για το πλύσιμο και τα χημικά που χρησιμοποιούνται για την πέψη να μην αλληλεπιδρούν με τον προσδιορισμό. Εάν χρησιμοποιείται χημική διαδικασία υδρόλυσης, τότε η εξουδετέρωση πρέπει να γίνει μετά την εξαγωγή (37). Επιπλέον, σε αυτές τις μεθόδους πριν από την έναρξη του ανοσοπροσδιορισμού, η μήτρα μαλλιών πρέπει να καταστραφεί. Η καταστροφή της πρωτεΐνης της τρίχας πρέπει να γίνει προσεκτικά, έτσι ώστε να μην καταστρέψει την εναποτιθέμενη ουσία και τους μεταβολίτες της (54).

Άλλη μια κύρια απαίτηση για ανοσολογική ανάλυση τρίχας είναι ότι τα μίγματα πέψης που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να μετουσιώνουν τα αντισώματα που υπάρχουν στο μίγμα αντιδραστηρίου. Η χημική πέψη πρέπει να φτάσει σε ουδέτερο pH και η ιοντική ισχύς του τελικού διαλύματος δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλή. Οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει επίσης να αποτελούνται από τρίχες που περιέχουν ή όχι την ουσία και να αφομοιώνονται με τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα. Η ευαισθησία της ανοσολογικής δοκιμής κυμαίνεται στην περιοχή 10 pg/mg -10 ng/mg τρίχας, η οποία είναι η συνήθης αναφερόμενη σειρά ουσιών κατάχρησης που βρίσκονται στις τρίχες (36).

Η ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) υιοθετήθηκε πρώτη φορά στην εξέταση ανθρώπινων τριχών για οπιούχα το 1980. Η RIA είναι μια κοινή, ευαίσθητη και αξιόπιστη ανοσολογική τεχνική αλλά η χρήση ραδιενεργώς επισημασμένου υλικού εμποδίζει την χρήση της εκτός ασφαλών περιοχών (55). Κατά συνέπεια, συχνά προτιμώνται μη ραδιενεργές μεθοδολογίες. Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική

δοκιμασία (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay) είναι μια καλή εναλλακτική λύση, απλή, φθηνή και πολύ ευαίσθητη, ακόμη και αν σπάνια χρησιμοποιείται για την ανάλυση τριχών. Τα φάρμακα -στόχοι που ορίστηκαν από τον κατασκευαστή για τις δοκιμές ELISA είναι μορφίνη, ΒΕ και τεμαζεπάμη.

2.4.3. Άλλες τεχνικές

Εκτός από της προαναφερθείσες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί και άλλες τεχνικές. Η ηλεκτροφόρηση της τριχοειδούς ζώνης (CZE, Capillary zone electrophoresis) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ποσότητας μορφίνης και κοκαΐνης στα μαλλιά των εξαρτημένων.

Η χρήση μικροσκοπικής υπέρυθρης ακτινοβολίας έχει επίσης αναφερθεί στην ανίχνευση ουσιών κατάχρησης. Οι μη εκχυλισμένες τρίχες μπορούν να εξεταστούν με υπέρυθρη μικροσκόπηση. Τα υπέρυθρα φάσματα επιδερμίδας, φλοιού και μυελού μιας μεμονωμένης τρίχας μπορούν να δείξουν την έκθεση στο φάρμακο. Η μικροσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την GC-MS και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική γρήγορη λύσης. Επίσης, η παρουσία οργανικών ενώσεων μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπία φθορισμού, η οποία είναι μια καλή εναλλακτική λύση στις χρωματογραφικές διαδικασίες (37).

Για αρκετά χρόνια, οι ιατροδικαστές μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν ισότοπα που βρέθηκαν στα μαλλιά του ανθρώπου ως δείκτες που μπορούν να υποδείξουν μια περιοχή της χώρας όπου ζούσε ένα άτομο επειδή πολλά αποθέματα νερού έχουν μοναδικές ισοτοπικές υπογραφές που αποτυπώνονται στα μαλλιά. Ένα άτομο πίνει το τοπικό νερό και μια ισοτοπική καταγραφή αυτού του νερού καταγράφεται στα μαλλιά του ατόμου. Τέτοιες ισοτοπικές πληροφορίες με βάση το νερό βοήθησαν τους ερευνητές να εντοπίσουν την «περιοχή προέλευσης» αρκετών σκελετικών υπολειμμάτων, οδηγώντας στην τελική ταυτοποίηση των ατόμων (56).

Τα ισότοπα είναι διαφορετικές μορφές του ίδιου χημικού στοιχείου που μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και να συγκριθούν. Για ιατροδικαστικούς σκοπούς, οι αναλογίες ισοτόπων διαφόρων στοιχείων όπως άνθρακας, άζωτο, οξυγόνο και υδρογόνο διαφέρουν ανάλογα με την έκθεση του ατόμου σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το πόσιμο νερό και τα θρεπτικά συστατικά στα τρόφιμα. Επομένως, οι αναλογίες ισοτόπων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακή υπογραφή για να

αντικατοπτρίζουν τις συνήθειες και την καθημερινή έκθεση ενός ατόμου στο περιβάλλον και σε φάρμακα. Προς το παρόν όμως δεν είναι ευρεία η χρήση τους για εγκληματολογικούς σκοπούς και δεν έχουν αξιολογηθεί όλα τα αποτελέσματα (56).

2.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης τρίχας στοχεύει γενικά στην διαπίστωση εάν το άτομο χρησιμοποίησε ή ήταν εκτεθειμένο σε κάποια ουσία, στον προσδιορισμό της ουσίας αυτής, στη διάκριση μεταξύ μιας περιστασιακής, επαναλαμβανόμενης ή χρόνιας χρήσης και στον προσδιορισμό του χρόνου λήψης της ουσίας. Μια κριτική εξέταση του ιστορικού της περίπτωσης λαμβάνοντας υπόψη την υπόθεση της εξωτερικής μόλυνσης, του τόπου συλλογής τρίχας, της μεταβλητότητας της τριχοφυΐας, της φαρμακολογίας των ουσιών και μια ενδελεχής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας πρέπει να συνοδεύει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. (53)

Όσον αφορά τη χρήση επιπέδων ερμηνείας/αποτελεσμάτων ουσιών στις τρίχες, προτείνονται οι ακόλουθες συγκεντρώσεις για τον εντοπισμό «χρόνιας χρήσης ψυχοδιεγερτικών ουσιών». Η ευαισθησία μιας μεθόδου θα αποφασίσει εάν είναι κατάλληλη για συγκεκριμένο τύπο περιπτώσεων και αν είναι κατάλληλη για να δώσει μια απάντηση στην συγκεκριμένη περίπτωση. Όταν χρησιμοποιείται ανάλυση τριχών σε φόνους υποβοηθούμενους από ουσίες (DFC, Drug Facilitated Crimes) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χαμηλότερα όρια. Σε γενικές γραμμές, οι συγκεντρώσεις σε πικογραμμάρια ανά χιλιόγραμμο εμβέλειας ανιχνεύονται μετά από μία εφάπαξ λήψη μιας ουσίας, δημιουργώντας μια πρόκληση για αναλυτικές διαδικασίες καθώς και ερμηνεία. Στο παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα χαμηλότερα όρια. Αυτές οι τιμές δεν είναι όρια ποσοτικοποίησης ή ανίχνευσης, αλλά τιμές «απόφασης» και πρέπει να χρησιμοποιούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις εγκλημάτων οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι πολύ χαμηλότερες από τις παρακάτω λόγω της μεμονωμένης έκθεσης στο φάρμακο (53).

Screening			Confirmation
Group	Cut-off (ng/mg)	Target analyte	Cut-off (ng/mg)
Amphetamines	0.2	Amphetamine	0.2
		Methamphetamine	0.2
		MDA	0.2
		MDMA	0.2
Cannabinoids	0.1	THC	0.05
		THC-COOH	0.0002
Cocaine	0.5	Cocaine	0.5
		BZE, EME, CE, NC	0.05
Opiates	0.2	Morphine	0.2
		Codeine	0.2
		6-Acetylmorphine	0.2
Methadone	0.2	Methadone	0.2
		EDDP	0.05
Buprenorphine	0.01	Buprenorphine	0.01
		Norbuprenorphine	0.01

Πίνακας 1. Συνιστώμενα όρια ανίχνευσης φαρμάκων σε δείγματα τριχών (Πηγή: <https://www.unodc.org/>).

Η δυνατότητα καθιέρωσης σχέσης μεταξύ της ποσότητας της πρόσληψης και των συγκεντρώσεων των ουσιών/μεταβολιτών στις τρίχες παραμένουν εξαιρετικά αμφιλεγόμενες. Υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετικά με τη σχέση μεταξύ της ποσότητας πρόσληψης της ουσίας και των συγκεντρώσεων της και αφορούν κυρίως ηρωίνη, μεθαδόνη και THC. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Kintz et al. παρατήρησαν την αδυναμία να συναχθεί το ποσό ουσίας που χορηγήθηκε με βάση τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στην ανάλυση τριχών (57).

Ωστόσο, σε αντίθεση, ο Musshoff *et al.* ανέφεραν πραγματική συσχέτιση μεταξύ της δόσης και της συνολικής συγκέντρωσης οπιούχων στις τρίχες. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την ατομική ποσότητα ηρωίνης και τους μεταβολίτες της, 6-ακετυλομορφίνη και μορφίνη, σημειώθηκε ότι ο συντελεστής συσχέτισης αυξήθηκε σε αντιστοιχία με τον αντίστοιχο χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα. Επίσης οι ίδιοι

ερευνητές μελέτησαν τη συγκέντρωση της μεθαδόνης και του μεταβολίτη της 2-αιθυλιδενίου 1,5-διμεθυλο-3,3-διφαινυλοπυρρολιδίνης σε τρίχες σε πληθυσμό εξαρτώμενων εγκύων γυναικών και διαπίστωσαν ότι η ποσοτικοποίηση τους στις τρίχες δεν αντιστοιχεί με τη συνολική δόση μεθαδόνης που χορηγήθηκε (58).

Σχετικά με τον προσδιορισμό του χρόνου λήψης της ουσίας απαιτεί ανάλυση που πρέπει να συμπεριλάβει το ιστορικό φαρμάκων του ατόμου και τον ρυθμό ανάπτυξης των δειγμάτων τρίχας. Το σκεπτικό του υπολογισμού βασίζεται στην παραδοχή ότι, υπό ιδανικές συνθήκες, η ενσωμάτωση συμβαίνει μόνο στη ρίζα των τριχών και η θέση των μορίων της ουσίας στον άξονα της τρίχας δεν αλλάζει με τον χρόνο. Σύμφωνα με τους Pragst et al. γνωρίζοντας τον ρυθμό ανάπτυξης των τριχών, ο υπολογισμός της ημερομηνίας λήψης της ουσίας είναι συνάρτηση της απόστασης του μορίου από τη ρίζα και του ρυθμού ανάπτυξης των τριχών. Αυτό μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη εξίσωση (59, 60)

$$T_i = T_s - L_i/V_h - L_r/V_h - T_o$$

T_i = Χρόνος λήψης του φαρμάκου,

T_s = Χρόνος δειγματοληψίας τρίχας

T_o = Χρόνος μεταξύ της ενσωμάτωσης της ουσίας στη ρίζα της τρίχας και της εμφάνισής της στην επιφάνεια του δέρματος

L_i = Απόσταση της θέσης της ουσίας στα μαλλιά από το εγγύς άκρο της τρίχας

L_r = Μήκος του υπολειπόμενου άξονα τρίχας από την επιφάνεια του δέρματος μετά τη δειγματοληψία

V_h = Ρυθμός ανάπτυξης τρίχας

Καθώς η ενσωμάτωση συμβαίνει μεταξύ των κυττάρων της μήτρας και του τέλους της ζώνης κερατινοποίησης, καλύπτοντας απόσταση 1,2-1,5 mm, η χρονική ανάλυση είναι περίπου 3-4 ημέρες, αλλά μπορεί να αυξηθεί για ουσίες με μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής στο αίμα. Αρκετά παραδείγματα φαίνεται να επιβεβαιώνουν μια συσχέτιση μεταξύ του ιστορικού μίας ουσίας και των συγκεντρώσεων αυτής σε τμήματα των τριχών. Ωστόσο, άλλες αναφορές, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη τη μεταβλητότητα της τριχοφυΐας και τους μηχανισμούς ενσωμάτωσης φαρμάκων, θέτουν όρια στο μοντέλο (60).

2.6. Διασφάλιση ποιότητας

Η εφαρμογή της διασφάλισης ποιότητας αναγνωρίζεται ως θεμελιώδης αρχή για όλα τα εργαστήρια δοκιμών και η πιστοποίηση του διεθνούς προτύπου ISO/IEC 17025 αποτελεί απαίτηση του κλάδου. Ένας αριθμός εγγράφων ISO είναι διαθέσιμος για την παροχή καθοδήγησης με απαιτήσεις επικύρωσης επιπλέον των δημοσιεύσεων που προορίζονται ειδικά για επικύρωση μεθόδων ιατροδικαστικής και κλινικής τοξικολογίας (61).

Οι τυπικές παράμετροι επικύρωσης περιλαμβάνουν γραμμικότητα, ακρίβεια, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Τα εργαστήρια που επιθυμούν να λάβουν πιστοποίηση ISO/IEC 17025 πρέπει επίσης να διερευνήσουν την εγκυρότητα της μεθόδου δοκιμής, να διερευνήσουν τη σταθερότητα του αναλύτη και να εκτιμήσουν την αβεβαιότητα στη μέτρηση. Οι μέθοδοι διαπίστευσης για την ανάλυση ουσιών στις τρίχες αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πρόκληση για τον αναλυτή όσον αφορά την περιορισμένη διαθεσιμότητα πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που διατίθενται για χρήση ως εξωτερικοί ποιοτικοί έλεγχοι. Η συμμετοχή σε προγράμματα εξέτασης εξωτερικών προτύπων συνιστάται σε όλα τα εργαστήρια που προσφέρουν Υπηρεσίες ανάλυσης τριχών και είναι ιδιαίτερα σημαντική ως μέσο αξιολόγησης της απόδοσης των εσωτερικών μεθόδων. Υπάρχουν επί του παρόντος τρεις ευρωπαϊκές εταιρίες δοκιμής επάρκειας της ανάλυσης για τις τρίχες, το Society of Hair Testing (SoHT), το HAIRVEQ και η Γερμανική Εταιρία Τοξικολογικής και Ιατροδικαστικής Χημείας (GTFCh). Το όφελος αυτών είναι ότι τα δείγματα τους παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας τρίχες από γνωστούς χρήστες ουσιών και μπορούν να αποτελέσουν πρότυπα (62).

2.7. Ανίχνευση ουσιών σε ειδικές κατηγορίες

Η ανίχνευση ουσιών στις τρίχες ενός παιδιού καταδεικνύει απερίφραστα τη χρήση των ουσιών αυτών στο περιβάλλον του παιδιού, ωστόσο αντιμετωπίζει προκλήσεις καθώς είναι πολύπλοκη η διάκριση μεταξύ της συστηματικής ενσωμάτωσης της ουσίας στην τρίχα μετά από εισπνοή ή κατάποση και της εξωτερικής εναπόθεση στα μαλλιά από σκόνη, μολυσμένες επιφάνειες ή καπνό (10). Παρ' όλα αυτά, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τη συστηματική ή μόνο εξωτερική έκθεση είναι σημαντική για τα παιδιά για μια ρεαλιστική αξιολόγηση του κινδύνου της

τοξικότητας για την υγεία τους. Επιπλέον, όταν ένα παιδί ή ένα άτομο υπό κηδεμονία εκτίθεται σε παράνομη κατάχρηση ουσιών, συχνά αντιμετωπίζει επίσης άλλα συνυπάρχοντα εμπόδια σε μια φυσιολογική ζωή όπως για παράδειγμα κατάχρηση, παραμέληση, βία και άλλες ευπάθειες (63).

Βασική διαφορά με την ανάλυση τριχών σε ενήλικες είναι η μικρότερη ποσότητα βιολογικού υλικού. Η ποσότητα των τριχών που είναι διαθέσιμη για ανάλυση, μπορεί να είναι μικρή και να καθίσταται δύσκολη ειδικά όταν υπάρχει πληθώρα ουσιών που πρέπει να αναλυθούν. Αυτό μπορεί να επηρεάσει το όριο της ποσοτικοποίησης και της ταυτοποίησης του μεταβολίτη, ο οποίος κατά γενικό κανόνα είναι σε χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης σε σύγκριση με τη μητρική ουσία. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι οι τρίχες των παιδιών είναι πιο λεπτές και πιο πορώδεις σε σύγκριση με των ενηλίκων και επίσης υπάρχει υψηλότερος κίνδυνος μόλυνσης από ιδρώτα (64).

Εκτός από τη μικρότερη ποσότητα βιολογικού υλικού στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες, δεν υπάρχει κανένα ιδιότυπο αναλυτικό πρόβλημα κατά την επεξεργασία δειγμάτων και ως αποτέλεσμα δύναται να εφαρμοστούν οι ίδιες τεχνικές. Το μεγαλύτερο πρόβλημα αντιμετωπίζεται στην ερμηνεία των ευρημάτων, που αφορούν τα διάφορα φαρμακολογικά μέτρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα παιδιά που αναπτύσσονται, οι λειτουργίες του σώματος και των οργάνων είναι διαφορετικές σε σχέση με τους ενήλικες. Οπότε και η φαρμακοκινητική και η τοξικότητα από τις περισσότερες ουσίες διαφέρουν αξιοσημείωτα κατά τη διάρκεια του παιδιατρικού εύρους ηλικιών και μπορεί να είναι πολύ διαφορετική από τα ευρήματα στους ενήλικες. (10).

Εκτός από τις τυπικές μεθόδους ανάλυσης τριχών στα παιδιά που αναφέρουν θετικό αποτέλεσμα έκθεσης μόνο αν ανιχνευθούν μεταβολίτες, έχει προταθεί και η δοκιμή περιβαλλοντικής έκθεσης. Η τελευταία αναφέρει θετικό αποτέλεσμα είτε ανιχνευθούν φυσικά φάρμακα είτε μεταβολίτες. Αυτή η δοκιμή περιβαλλοντικής έκθεσης έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση παθητικής έκθεσης των παιδιών σε ουσίες.

Μια δοκιμή ανίχνευσης ουσιών στις τρίχες ενός παιδιού μπορεί να παρέχει στοιχεία για το περιβάλλον τους κατά τους τελευταίους 3 μήνες. Ένα θετικό αποτέλεσμα δοκιμής υποδηλώνει ότι το παιδί έχει βιώσει ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα:

- i. παθητική εισπνοή καπνού ναρκωτικών,

- ii. επαφή με καπνό ουσιών,
- iii. επαφή με ιδρώτα ή σμήγμα (λάδι δέρματος) ενός χρήστη,
- iv. άμεση επαφή με την ουσία,
- v. τυχαία ή σκόπιμη κατάποση παράνομων ουσιών.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σχέση μεταξύ προγεννητικής έκθεσης σε ουσίες και κινδύνου αυθόρμητης άμβλωσης καθώς και μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών στα εκτεθειμένα νεογέννητα. Ο εντοπισμός ουσιών κατάχρησης όσο το δυνατόν συντομότερα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της μελλοντικής χρήσης από τη μητέρα, των αναπηριών στο παιδί και να εξασφαλιστεί επαρκής υγειονομική και κοινωνική φροντίδα και για τους δύο (65).

Σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, η ανίχνευση ουσιών στο αίμα είναι πιο σημαντική όσον αφορά τον προσδιορισμό της αιτίας του θανάτου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, είναι επίσης γενικά σημαντικό να αποκτηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση του εκλιπόντος την περίοδο πριν από το θάνατο. Η ανάλυση της τρίχας θα δώσει κατ' αρχήν πρόσθετες πληροφορίες σε ό,τι λαμβάνεται από τη μετά θάνατο ανάλυση αίματος, καθώς οι χρόνοι ανίχνευσης είναι γενικά μεγαλύτεροι στα μαλλιά. Μπορεί επομένως να επαληθεύσει τη χρήση ουσιών εβδομάδες ή μήνες νωρίτερα, ακόμη και αν ο εκλιπών δεν ήταν υπό την επίδραση ουσιών τη στιγμή του θανάτου. Αυτό θα μπορούσε, για παράδειγμα, να παρέχει στον παθολόγο πληροφορίες σχετικά με άγνωστες προηγούμενες διαγνώσεις του εκλιπόντος ή παράνομη χρήση ουσιών (66).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΤΡΙΧΑ

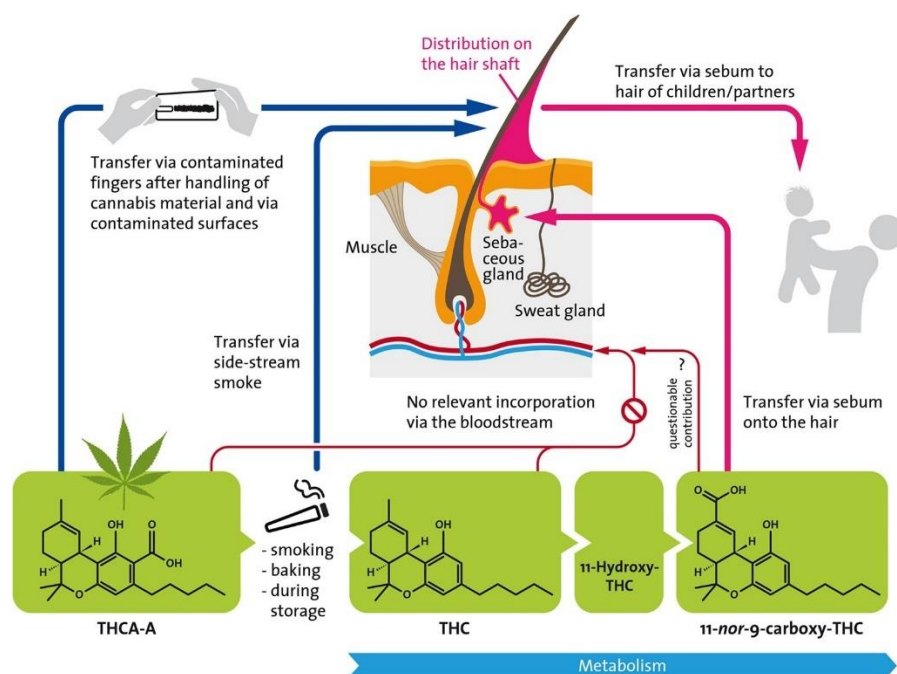
Η ανάλυση των τριχών για την παρουσία συγκεκριμένων ουσιών είναι ιδιαίτερα σημαντική και για αυτό είναι απαραίτητο σε κάθε περίπτωση να λαμβάνονται υπόψη οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τις μετρήσεις. Αυτοί μπορεί να είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Ωστόσο, πριν αναλυθούν με λεπτομέρεια θα αναφερθούν κάποια βασικά στοιχεία για τον μηχανισμό ενσωμάτωσης των φαρμάκων στις τρίχες, μιας και πολλές φορές για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι καλό να είναι γνωστές κάποιες πληροφορίες.

Οι μηχανισμοί ενσωμάτωσης της ουσίας στα μαλλιά έχουν αποτελέσει αντικείμενο σημαντικής συζήτησης και ακόμη δεν υπάρχει σαφής εξήγηση. Οι περισσότεροι συμφωνούν ότι τα ξενοβιοτικά φτάνουν στις τρίχες μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, μέσω της παροχής αίματος στον βολβό της τρίχας ή μέσω της παθητικής διάχυσης του εξωκυττάριου υγρού στη μήτρα των μαλλιών. Καθώς οι τρίχες συνεχίζουν να μεγαλώνουν και να κερατινοποιούνται, διάφορες ουσίες εισέρχονται στον άξονα των τριχών, όπου παραμένουν επ'αόριστον. Ο άξονας της τρίχας παρέχει ένα σταθερό περιβάλλον, το οποίο προστατεύει τα ενσωματωμένα φάρμακα από την αποδόμηση και ως αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους στις τρίχες να αντανακλά τη σωρευτική έκθεση ενός ατόμου με την πάροδο του χρόνου (67).

Οι σχέσεις δόσης -απόκρισης έχουν τεκμηριωθεί τόσο σε μελέτες σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Μερικοί ερευνητές έχουν διαπιστώσει ακόμη ότι οι συγκεντρώσεις στις τρίχες αντανακλούν την περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης πλάσματος έναντι της καμπύλης χρόνου. Αυτό υποδηλώνει ότι η ανάλυση των τριχών αντανακλά σε μεγάλο βαθμό τη συστηματική έκθεση και ότι οι ουσίες που ενσωματώνονται στις τρίχες προέρχονται κυρίως από την κυκλοφορία του αίματος (68).

Άλλοι μηχανισμοί ενσωμάτωσης ουσιών στις τρίχες περιλαμβάνουν την έκκριση των ουσιών από τον ιδρώτα, το σμήγμα ή τους βλεννογόνους αδένες και την επικείμενη ενσωμάτωση στην τρίχα. Χημικές ουσίες που καπνίζονται όπως η κοκαΐνη, η κάνναβη και η νικοτίνη μπορεί να υπόκεινται σε παθητική συσσώρευση, ωστόσο είναι πιθανώς ένας δευτερεύων μηχανισμός ενσωμάτωσης στην κύρια οδό της συστηματικής κυκλοφορίας (67).

Στην παρακάτω εικόνα δίνονται ενδεικτικά οι μηχανισμοί μεταφοράς της κάνναβης και των μεταβολιτών της. Η μεταφορά μπορεί να γίνει μέσω της κατανάλωσης και της αιματικής κυκλοφορίας είτε εξωγενώς μέσω του περιβάλλοντος από τη μητέρα στο παιδί ή από μολυσμένα χέρια ή και ακόμη από τον καπνό που υπάρχει σε ένα χώρο



Εικόνα. Μεταφορά κάνναβης στις τρίχες μέσω διαφορετικών μηχανισμών (Πηγή: Moosmann, B., Roth, N. & Auwärter, V. 2015).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα ανάλογα με το είδος του παράγοντα μπορεί να μεταφερθεί είτε ενδογενώς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος είτε εξωγενώς κυρίως μέσω απορρόφησης από το περιβάλλον.

3.1. Ενδογενείς παράγοντες

Υπάρχουν ποικίλοι ενδογενείς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση της τρίχας και κατ' επέκταση την ανίχνευση χημικών ουσιών κατά την ανάλυση.

3.1.1. Φύλο, ηλικία και γενετική

Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν εντοπίσει διαφορές σε στοιχειώδεις συγκεντρώσεις στα μαλλιά με βάση το φύλο. Για παράδειγμα, τα στοιχεία Ca και το Mg ήταν υψηλότερα στις γυναίκες ωστόσο, τα στοιχεία Cu και το Mg ήταν χαμηλότερα στα κορίτσια που πάσχουν από αυτισμό σε αντίθεση με τα αγόρια. Σε άλλες μελέτες, τα στοιχεία Zn, Na και Pb ήταν υψηλότερα στα αγόρια, ενώ τα στοιχεία Fe και Bi ήταν υψηλότερα στα κορίτσια. Αυτές οι διαφορές που παρατηρούνται στα στοιχεία επηρεάζουν και τις συγκεντρώσεις άλλων χημικών ουσιών κατά την ενσωμάτωση στις τρίχες.

Ο Beauchemin και η ομάδα του διαπίστωσαν ότι χρησιμοποιώντας τις τρίχες θα μπορούσαν να κάνουν διακρίσεις φύλου χρησιμοποιώντας τα στοιχεία μαγνήσιο, θείο, στρόντιο και ψευδάργυρο. Στην μελέτη τους τα στοιχεία λίθιο, μολυβδαίνιο, θείο, στρόντιο, χρώμιο, κάλιο, νικέλιο, ψευδάργυρος και μόλυβδος χρησιμοποιήθηκαν για να ξεχωρίσουν τους ανθρώπους της εθνικότητας της Ανατολικής Ασίας, του Καυκάσου και της Νοτίου Ασίας (69).

Εκτός από το φύλο και η ηλικία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λήψη και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Με την ηλικία διάφορες αλλαγές στα ορμονικά επίπεδα και στα επίπεδα των στεροειδών αλλάζουν, όπως και πολλές άλλες πρωτεΐνες και φυσιολογικές διαδικασίες. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις στο αίμα και συνεπώς τις συγκεντρώσεις ουσιών στις τρίχες. Επιπλέον, οι αλλαγές στη δερματική θηλή μπορούν επίσης να προκαλέσουν διαφοροποίηση στη σύνθεση των τριχών. Το οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με την ηλικία επηρεάζει την παραγωγή της μελανίνης και δεσμεύονται σε αυτή διαφορετικές ενώσεις όπως μέταλλα, μεταλλοειδή, φάρμακα και οργανικοί ρύπους

Έχουν χρησιμοποιηθεί μελέτες σε ζώα για την παρακολούθηση των αλλαγών στους βιοδείκτες με την ηλικία. Για παιδιά κάτω των 4 ετών, οι συγκεντρώσεις του Zn ήταν σημαντικά χαμηλότερες ενώ άλλοι συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι οι συγκεντρώσεις του Ca, Mg και Fe μειώνονται με την ηλικία. Μια μελέτη από τους Skalny et al., (2018) έδειξε ότι τόσο η ηλικία όσο και το φύλο σχετίζονται με τα επίπεδα τοξικών μετάλλων στις τρίχες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας δείγμα τριχών από παιδιά που κατοικούσαν σε βιομηχανικές περιοχές απέδειξαν ότι το επίπεδο των τοξικών μετάλλων Al, As, Cd, Pb και Sn μειώνεται σημαντικά με την

ηλικία τόσο για τις τοποθεσίες όσο και για το φύλο. Ειδικότερα, το επίπεδο Pb διαπιστώθηκε ότι ήταν υψηλότερο σε παιδιά ηλικίας 6-10 ετών, ενώ το περιεχόμενο σε Ni αυξήθηκε στις μικρότερες και μεγαλύτερες ομάδες παιδιών (70).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για να διαπιστωθούν οι διαφορές στις συγκεντρώσεις ουσιών σε διάφορους τύπους τρίχας από το ίδιο άτομο. Σε μια μελέτη συγκρίθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης μορφίνης, μεθαδόνης, φαινοβαρβιτάλης και κοκαΐνης σε διαφορετικούς τύπους τριχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υψηλότερο επίπεδο ποσότητας ουσίας βρέθηκε στις μασχαλιαίες τρίχες και το χαμηλότερο στα μαλλιά του τριχωτού της κεφαλής. Σε μια άλλη μελέτη, η συγκέντρωση μορφίνης προσδιορίστηκε σε διαφορετικούς τύπους τριχών: 0,4-24,2 ng/mg βρέθηκε σε μασχαλιαίες τρίχες, 0,6-27,1 ng/mg στα μαλλιά του τριχωτού της κεφαλής και 0,8-1,34 ng/mg σε ηβική τρίχα. Οι αξιοσημείωτες διαφορές στη συγκέντρωση των ουσιών οφείλονται στη βελτιωμένη παροχή αίματος, τη διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης και τον διαφορετικό αριθμό αποκρινών αδένων (37).

Ο μηχανισμός σύνδεσης ενός φαρμάκου με χρωστικές μελανίνης και φαιομελανίνης έχει επίσης διεκρινιστεί από πολλές μελέτες. Τα πιο σκούρα μαλλιά έχουν περισσότερη μελανίνη η οποία οδηγεί σε μεγαλύτερη συσσώρευση φαρμάκων σε σύγκριση με τα ανοιχτόχρωμα μαλλιά. Ωστόσο, εξακολουθούν να διεξάγονται μελέτες για τον μηχανισμό σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών ειδών ουσιών (οξέα και βάσεις) με τη μελανίνη (39).

Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη οι έρευνες που διεξήχθησαν έδειξαν ότι η στοιχειώδης σύνθεση των γυναικείων τριχών είναι διαφορετική από αυτή των ανδρών. Η παρουσία σεξουαλικού διμορφισμού αποδεικνύει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το μεταβολισμό αυτών των στοιχείων που εξαρτώνται από το φύλο. Έτσι, δείγματα τριχών που λαμβάνονταν από γυναίκες στο κεντρικό Καζακστάν παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις Ca και Mg από τα ανδρικά δείγματα, ανεξάρτητα από τα περιφερειακά χαρακτηριστικά (71).

Μια τάση για αυξημένα επίπεδα μικροστοιχείων σε δείγματα τριχών σχετικά με την ηλικία βρέθηκε για όλους τους κατοίκους του κεντρικού Καζακστάν, ανεξάρτητα από το φύλο. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης των χημικών στοιχείων μπορεί να σχετίζεται με συνεχή, μακροπρόθεσμη έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και διαδικασίες εναπόθεσης. Αξιοπρόσεκτο ήταν και το γεγονός ότι τα περισσότερα από

τα στοιχεία που ερευνήθηκαν σε δείγματα τριχών αυξήθηκαν σημαντικά στις ηλικιακές ομάδες από 21 έως 60 ετών (71).

Οι ερευνητές δεν απέκλεισαν το ενδεχόμενο η κληρονομικότητα να παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση μελανίνης που επηρεάζει την ενσωμάτωση χημικών στα μαλλιά. Οι γενετικοί παράγοντες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της υφής των τριχών - ίσια, κυματιστά ή σγουρά - και το πάχος των μεμονωμένων κλώνων τρίχας. Μελέτες υποδεικνύουν ότι διαφορετικά γονίδια επηρεάζουν την υφή και το πάχος των τριχών σε άτομα διαφορετικής εθνικής καταγωγής. Για παράδειγμα, φυσιολογικές παραλλαγές (πολυμορφισμοί) σε δύο γονίδια, το *EDAR* και το *FGFR2*, έχουν συσχετιστεί με διαφορές στο πάχος των τριχών στους ασιατικούς πληθυσμούς. Ένας πολυμορφισμός σε ένα άλλο γονίδιο, το *TCHH*, φαίνεται να σχετίζεται με τις διαφορές στην υφή των μαλλιών σε ανθρώπους της βόρειας ευρωπαϊκής καταγωγής. Είναι πιθανό ότι πολλά επιπλέον γονίδια συμβάλλουν στην υφή και το πάχος των τριχών σε διάφορους πληθυσμούς (72).

Το χρώμα των μαλλιών και γενικότερα το ποσοστό μελανίνης φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση ουσιών. Οι Rothe et al. (1997), ερευνώντας αρκετές ουσίες σε γκρίζες τρίχες από ασθενείς και μεταθανάτια περιστατικά, παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν γενικά χαμηλότερη στις λευκές τρίχες και επίσης μεταξύ των υποκειμένων για την ίδια ένωση. Σε δύο άλλες δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εθελοντές με ελεγχόμενη χορήγηση κωδεΐνης και σελεγενίνης αντίστοιχα, αποδείχθηκε ισχυρή εκθετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στις τρίχες και την περιεκτικότητα σε μελανίνη (73).

Το χρώμα μπορεί να επηρεάσει την πρόσληψη νικοτίνης. Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι τα λευκά ή ανοιχτά μαλλιά έχουν χαμηλότερα επίπεδα νικοτίνης από τα μαύρα μαλλιά για παρόμοιο επίπεδο έκθεσης. Αρκετοί συμμετέχοντες με γκρίζα μαλλιά παρείχαν ταυτόχρονα μαύρα και γκρίζα μαλλιά και έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα στα γκρίζα μαλλιά τους. φλοιός των μαλλιών. (Αυτή η υψηλότερη συγγένεια με τη μελανίνη υποδηλώνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της νικοτίνης στα μαλλιά ενσωματώνεται μέσω συστηματικής κυκλοφορίας περνώντας από το βολβό της τρίχας και προσκολλώντας στους κόκκους των μελανοκυττάρων, που υπάρχουν μόνο στον φλοιό του άξονα της τρίχας) (74).

Οι Gerstenberg et al., αναγνώρισαν ότι οι μη χρωματισμένες τρίχες αρουραίου είχαν συγκεντρώσεις νικοτίνης 20 φορές χαμηλότερη από τις χρωματισμένες τρίχες αρουραίου όταν ελήφθησαν μέσω της συστηματικής οδού. Η χρώση των τριχών σχετίζεται επίσης με τα επίπεδα νικοτίνης που απορροφούνται από κομμένα δείγματα τρίχας αρουραίου απευθείας από το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά με πολύ χαμηλότερη αναλογία 1,5: 1 (χρωματισμένη προς μη χρωματισμένη) (75).

3.1.2. Διατροφή

Η εμφάνιση των τριχών ενός ατόμου αντικατοπτρίζει τη διατροφική του κατάσταση, και με την έλευση εξελιγμένων επιστημονικών αναλύσεων, έχουμε συνειδητοποιήσει πλέον ότι η διατροφή και οι διατροφικές πληροφορίες μπορούν επίσης να αντληθούν από τις χημικές ουσίες και τη στοιχειακή σύνθεση των τριχών Άτομα και μόρια που καταναλώνονται ως τρόφιμα ενσωματώνονται στους ιστούς του καταναλωτή και ως αποτέλεσμα οι τρίχες μπορούν να δώσουν διατροφικές πληροφορίες σε διάφορα επίπεδα.

Διαιτητικά και περιβαλλοντικά σήματα που μπορούν να μετρηθούν εντός των συστατικών πρωτεϊνών είναι κυρίως οι σταθερές ισοτοπικές αναλογίες των στοιχείων άνθρακα, άζωτο, θείο, υδρογόνο και οξυγόνο. Παραλλαγές στην κατανομή των σταθερών ισοτόπων άνθρακα, αζώτου και θείου καθιστά δυνατή τη χρήση αυτών των στοιχείων ως φυσικών διαιτητικών ιχνηλατών.

Ακόμη και η διατροφή μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα και να δώσει ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά. Για παράδειγμα, μερικά τρόφιμα είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα αποτελέσματα των δοκιμών φαρμάκων, με τα πιο διάσημα να είναι οι σπόροι παπαρούνας που χρησιμοποιούνται σε κουλούρια και γλυκά. Επειδή πολλά οπιούχα προέρχονται από τους σπόρους παπαρούνας συμπεριλαμβανομένης της μορφίνης και της κωδεΐνης, η συχνή και υψηλή σε ποσότητα κατανάλωση μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Να αναφερθεί βέβαια ότι οι σπόροι παπαρούνας που χρησιμοποιούνται σε ψημένα προϊόντα είναι συνήθως αρκετά επεξεργασμένοι ώστε να αποτρέψουν οποιοδήποτε ψευδές αποτέλεσμα και οι ωμοί σπόροι είναι γενικά μη βρώσιμοι για τους περισσότερους ανθρώπους, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα. Ένα άλλο παράδειγμα έχει να κάνει με την κινίνη που χρησιμοποιείται σε τονωτικό ρόφημα. Μπορεί να

δημιουργήσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Αν και είναι αρκετά χαμηλή ώστε να είναι ασφαλής για κατανάλωση σε μικρές ποσότητες, μια δοκιμή ουσιών που ανιχνεύει υψηλά επίπεδα μπορεί να οδηγήσει σε υποψία κατάχρησης οπιοειδών επειδή η κινίνη χρησιμοποιείται συχνά για τη μείωση της ηρωίνης (76).

Υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες αναφορές που περιλαμβάνουν ανάλυση τριχών μετά την κατάποση νοθευμένων προϊόντων. Μια περίπτωση ανέφερε τη νοθεία της κινεζικής βοτανοθεραπείας με N-νιτροσοφενφλουραμίνη, που είναι κατασταλτικό της όρεξης. Σε αυτή τη μελέτη, οι μεταβολίτες φαινφλουραμίνη (43-1389 pg/mg) και νορφενφλουραμίνη (18-680 pg/mg) εντοπίστηκαν στα τρίχες των εκτεθειμένων ασθενών που νοσηλεύονταν με ηπατική δυσλειτουργία. Βασισμένοι στα ψευδώς θετικά αυτά τα ευρήματα οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτοί οι ασθενείς κατανάλωναν N-νιτροσοφενφλουραμίνη για περίοδο περίπου 5 μηνών (77).

Στο πλαίσιο της διατροφής θα μπορούσε να ενταχθεί και η λήψη άλλων φαρμάκων για τη θεραπεία ασθενειών. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να εξαχθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα τα οποία μπορούν να αμφισβητηθούν. Ο καλύτερος τρόπος είναι ο εξεταζόμενος να επικοινωνήσει με τον γιατρό ή τον φαρμακοποιό του και να ρωτήσει εάν συνταγογραφούμενα φάρμακα και φάρμακα εξωτερικής θεραπείας που λαμβάνει σε τακτική βάση μπορούν να προκαλέσουν θετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση παράνομων ουσιών.

Ακόμη και το κάπνισμα μπορεί να επηρεάσει τη σύσταση των τριχών και την ενσωμάτωση των ουσιών. Η νικοτίνη και ο κύριος μεταβολίτης της η κοτινίνη, εναποτίθενται καλά στα μαλλιά. Ίχνη νικοτίνης μπορούν γενικά να βρεθούν στους θύλακες των τριχών έως και τρεις μήνες μετά την τελευταία έκθεση. Ανάλογα με το τεστ που χρησιμοποιείται, η νικοτίνη μπορεί να ανιχνευθεί έως και ένα χρόνο μετά την τελευταία έκθεση. Παρόλο που είναι δυνατή η εξέταση τρίχας, δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά όσο οι εξετάσεις ούρων, σάλιου ή αίματος (78).

Οι ενεργοί καπνιστές έχουν ουσιαστικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νικοτίνης (0,9–33,9 ng/mg) και κοτινίνης (0,09–4,99 ng/mg) στις τρίχες έναντι των παθητικών καπνιστών- 0,54–1,82 και 0,01–0,13 ng/mg, αντίστοιχα. Βέβαια, στους παθητικούς καπνιστές η κοτινίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση της παθητικής χρήσης καπνού μεταξύ τους. Υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των δεικτών βρέθηκαν επίσης στα μαλλιά παιδιών που ζούσαν σε σπίτι καπνιστών. *In vitro* πειράματα έχουν

δείξει ότι η νικοτίνη ενσωματώνεται στον καπνό παράπλευρου ρεύματος και οδηγεί σε κλίση συγκέντρωσης (εγγύς προς το περιφερικό) στα μαλλιά (74).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες μια άλλη κοινή επίδραση της νικοτίνης είναι το κιτρίνισμα των μαλλιών και των νυχιών, το οποίο είναι επίσης γνωστό ως χρώση. Αυτό δεν συμβαίνει μόνο στα μαλλιά του τριχωτού της κεφαλής, αλλά στους άνδρες λεκιάζει επίσης αυτά τις τρίχες στο μουστάκι, καθώς είναι κοντά στο εκπνεόμενο καπνό. Ένα άτομο δεν χρειάζεται να είναι καπνιστής για να συμβεί αυτό. Άτομα που εργάζονται σε βιομηχανίες καπνού ή εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα είναι επίσης πολύ πιθανό να υποστούν χρώση νικοτίνης (79).

3.2. Εξωγενείς παράγοντες

Πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την έκταση, τη συχνότητα ή τις συνθήκες που απαιτούνται για να συμβεί περιβαλλοντική μόλυνση των τριχών. Πολλοί παράγοντες είναι πιθανό να επηρεάσουν τον βαθμό διείδυσης των χημικών που προέρχονται από το περιβάλλον στις τρίχες. Μεταξύ αυτών των παραγόντων είναι η κατάσταση της επιδερμίδας των τριχών, η ποσότητα και ο χρόνος έκθεσης, οι επιδράσεις του pH, η ενυδάτωση, η κατάσταση της μήτρας των τριχών και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε ουσίας.

Για την αξιολόγηση ορισμένων παραγόντων πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων για να προσδιοριστεί εάν η περιβαλλοντική μόλυνση των τριχών από συγκεκριμένες ουσίες θα οδηγούσε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα δοκιμών. Η κοκαΐνη επιλέχθηκε ως πρότυπη ένωση λόγω της εκτεταμένης παράνομης χρήσης και της διαθεσιμότητάς της σε δύο διαφορετικές χημικές μορφές (υδροχλωρικό άλας και ελεύθερη βάση). Σε αυτήν την έκθεση, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα ζητήματα περιβαλλοντικής μόλυνσης (64):

- i. η ικανότητα των μαλλιών να απορροφήσουν βασική κοκαΐνη (ατμός) και υδροχλωρική κοκαΐνη (υδατικό διάλυμα)
- ii. ο ρυθμός με τον οποίο εμφανίζεται κοκαΐνη στις τρίχες από περιβαλλοντική μόλυνση από ατμούς
- iii. οι επιδράσεις των κύκλων πλύσης με σαμπουάν για την απομάκρυνση της μόλυνσης από κοκαΐνη

- iv. σύγκριση κοκαΐνης και μόλυνσης «ζωντανών» τριχών ατόμων έναντι των «κομμένων» μαλλιών
- v. αξιολόγηση της σταθερότητας της κοκαΐνης σε μολυσμένα μαλλιά όταν υποβάλλονται σε συνθήκες αλκαλικού pH.

Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η έκθεση των «κομμένων» μαλλιών σε ατμούς κοκαΐνης και σε υδατικά διαλύματα υδροχλωρικής κοκαΐνης οδήγησαν σε σημαντική μόλυνση των δειγμάτων τρίχας. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν με δύο άτομα που εκτέθηκαν σε ατμούς κοκαΐνης σε ένα μη αεριζόμενο δωμάτιο. Οι κύκλοι θεραπείας με σαμπουάν (ενυδάτωση κατά τη διάρκεια της νύχτας) απομάκρυναν σταδιακά αυξανόμενες ποσότητες κοκαΐνης από τα μολυσμένα μαλλιά, αλλά παρέμειναν υπολείμματα μετά από 10 κύκλους πλύσης. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η βενζοϋλεκονίνη μπορεί να απορροφηθεί από την παράνομη κοκαΐνη και να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης στις αναλύσεις (64).

3.2.1. Περιβαλλοντικοί ρύποι

Παρόλο που οι τρόποι έκθεσης του ανθρώπου σε ρύπους μπορεί να είναι διάφοροι, πολλές μελέτες έδειξαν κυρίως τη διατροφή, τη μόλυνση του χώρου διαβίωσης (εγγύτητα βιομηχανιών ή καλλιεργείων) και την παρουσία μολυσματικών ουσιών στα σπίτια (βιοκτόνα, επιβραδυντικά φλόγας) ως βασικές πηγές έκθεσης σε οργανικούς ρύπους.

Εκτός από τον καπνό και οι οργανικοί ρύποι που υπάρχουν στο περιβάλλον μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση των μαλλιών. Οι διοξίνες, και πιο συγκεκριμένα οι πολυχλωριωμένες διβενζο-π-διοξίνες (PCDD) και τα διβενζοφουράνια (PCDF), τα οποία είναι υποπροϊόντα διεργασιών καύσης ήταν οι πρώτοι οργανικοί ρύποι που εντοπίστηκαν στα ανθρώπινα μαλλιά. Το ποσοστό θετικής ανίχνευσης είναι γενικά υψηλό, αλλά μπορεί να μειωθεί κάτω από το 10% για μερικές ενώσεις. Τα επίπεδα συγκέντρωσης που περιγράφονται σε διαφορετικές μελέτες κάλυψαν αρκετές τάξεις μεγέθους αλλά οι μέσες τιμές ήταν γενικά κάτω από 10.000 pg/g. Ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις αναφέρθηκαν ωστόσο σε δείγματα μαλλιών που ελήφθησαν από παιδιά που ζούσαν στην αστική περιοχή του Πεκίνου και σε μαλλιά κατοίκων γύρω από χώρους αποσυναρμολόγησης ηλεκτρονικών αποβλήτων στην Κίνα,

αποδεικνύοντας ότι το περιβάλλον διαβίωσης μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα ανάλυσης. (80)

Η ανάλυση των τριχών για φυτοφάρμακα και άλλους ρύπους περιορίζεται σε οργανοχλωρικές ενώσεις όπως DDT, λιντάνιο και πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Η συγκέντρωση αυτών των ρύπων στις τρίχες κυμαίνονται μεταξύ 0,5–5 pg/mg στον φυσιολογικό πληθυσμό. Επειδή αυτές οι ουσίες είναι τυπικά εισπνεόμενες, η εξωτερική ενσωμάτωση θεωρείται πιο σημαντική από τη συστηματική ενσωμάτωση (59).

Σχετικά με τους οργανικούς ρύπους τα παιδιά αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο ευάλωτα μέρη του ανθρώπινου πληθυσμού λόγω του ανώριμου ανοσοποιητικού τους συστήματος, των υψηλών ρυθμών μεταβολισμού και των ειδικών δραστηριοτήτων και συμπεριφοράς τους που θα μπορούσαν να τα κάνουν πιο επιρρεπή στις επιπτώσεις μιας χρόνιας έκθεσης από τους ενήλικες. Σε μια μελέτη από τους Iglesias-González et al., (2020) αναλύθηκε μια ποικιλία οργανικών ρύπων στα μαλλιά παιδιών από τη Γαλλία. Ο αριθμός των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε δείγμα κυμαίνονταν από 9 έως 37 (21 κατά μέσο όρο), γεγονός που ανέδειξε σαφώς τη σωρευτική έκθεση των παιδιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ένα ευρύ φάσμα συγκέντρωσης των ρύπων στις τρίχες (συνήα περισσότερο από 100 φορές υψηλότερο στο πιο εκτεθειμένο παιδί σε σύγκριση με το λιγότερο εκτεθειμένο), υποδηλώνοντας σημαντικές ανισότητες στο επίπεδο έκθεσης, ακόμη και σε παιδιά που ζουν στην ίδια περιοχή (81).

Εκτός από την ανίχνευση χημικών που χρησιμοποιούνται σήμερα, η παρουσία επίμονων οργανικών ρύπων (POPs) στα παιδιά υποδηλώνει επίσης ότι ο γαλλικός πληθυσμός εξακολουθεί να εκτίθεται σε POPs στις μέρες μας. Οι οργανικές ενώσεις PCP, DEP, PNP, 3Me₄NP, trans-C₂CA, 3PBA, fipronil και fipronil sulfone, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη συγκέντρωση στα μαλλιά των αγοριών σε σύγκριση με τα κορίτσια. Τα PCP, PNP και 3Me₄NP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη συγκέντρωση σε μικρότερα παιδιά. Τέλος, αυτή η μελέτη υποδηλώνει επίσης ότι η τοπική περιβαλλοντική μόλυνση δεν ήταν η κύρια πηγή έκθεσης και ότι οι ατομικές ιδιαιτερότητες (συνήθειες, διατροφή) ήταν οι κύριοι συντελεστές στην έκθεση στους συγκεκριμένους ρύπους (81).

3.2.3. Καλλυντικές θεραπείες

Μια σημαντική ανησυχία τόσο για τη ανίχνευση φαρμάκων όσο και για την ανάλυση αλκοόλ στις τρίχες είναι οι καλλυντικές θεραπείες. Το ιστορικό της καλλυντικής θεραπείας των τριχών πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η χαμηλή συγκέντρωση φαρμάκων μπορεί να μην ανιχνεύεται σε τρίχες που έχουν υποστεί χημική επεξεργασία, ενώ άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι η χημική επεξεργασία βλάπτει τα μαλλιά, κάνοντάς τα πιο επιρρεπή σε πιθανή εξωτερική μόλυνση (82).

Οι καλλυντικές θεραπείες μπορούν να περιλαμβάνουν: περμανάντ, βαφή, λεύκανση, θερμική ευθυγράμμιση, ακόμη και χαλάρωση μαλλιών και άλλες θεραπείες. Ανάλογα με τον τύπο της θεραπείας που χρησιμοποιείται, το επίπεδο πρόσκρουσης μπορεί να διαφέρει. Οι καλλυντικές χημικές επεξεργασίες ανοίγουν το στρώμα της επιδερμίδας και εκθέτουν τον φλοιό, επομένως εκτίθεται πιο εύκολα σε περιβαλλοντική μόλυνση. Ταυτόχρονα, οι χημικές ουσίες συνδέονται με τη μελανίνη και επηρεάζουν τον ρυθμό ενσωμάτωσης ουσιών και δεικτών αλκοόλ στις τρίχες. Για παράδειγμα, κατά τη λεύκανση των μαλλιών, η διαδικασία χρήσης υπεροξειδίου του υδρογόνου, αφαιρεί το χρώμα των τριχών, προκαλώντας απώλεια κόκκων μελανίνης. Η μειωμένη περιεκτικότητα σε μελανίνη σε λευκασμένα μαλλιά μας δίνει συνεπώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις ουσιών που έχουν απορροφηθεί (37).

Είναι άγνωστο ακριβώς πόσο η χημική θεραπεία των μαλλιών θα επηρεάσει την ποσότητα φαρμάκου ή αλκοόλ που υπάρχει σε αυτά. Στην επιστημονική βιβλιογραφία καταλήγει στο συμπέρασμα ότι τα καλλυντικά προϊόντα για τα μαλλιά και οι χημικές θεραπείες, πιθανότατα θα προκαλέσουν μείωση του επιπέδου φαρμάκων και αναλυτικών ουσιών στις τρίχες μεταξύ 30 και 80% και μέχρι το επίπεδο μη ανίχνευσής τους. Βέβαια, αυτό το επίπεδο εξαρτάται από τον τύπο της χημικής επεξεργασίας των τριχών που χρησιμοποιείται, το πόσο ταλαιπωρημένα είναι τα μαλλιά, το χρώμα των αρχικών μαλλιών και της βαφής (59).

Επιπρόσθετα, οι ενυδατικές ουσίες που είναι παρούσες σε ορισμένα προϊόντα περιποίησης μαλλιών, εμβαπτίζουν αποτελεσματικά τις μολυσμένες τρίχες σε υδατικά διαλύματα διαφόρων ουσιών για όσο χρόνο το προϊόν είναι παρόν, το οποίο μπορεί να είναι εβδομάδες. Αυτά τα προϊόντα περιποίησης μαλλιών επειδή

συμπληρώνουν την υγρασία από τον ιδρώτα, μολύνουν πιο αποτελεσματικά τις τρίχες ακόμη και αν ο χρόνος έκθεσης είναι μικρός ή αν υπάρχουν μικρές ποσότητες ουσιών. Σε μια μελέτη από τους Kidwell et al., (2015) προϊόντα με υγραντικές ουσίες προκάλεσαν μεγαλύτερη πρόσληψη ουσιών σε σύγκριση με προϊόντα με βάση μόνο το λάδι που δεν έχουν την ικανότητα να ενυδατώνουν τα μαλλιά. Μάλιστα, η ενίσχυση ήταν μεγαλύτερη κατά τάξεις μεγέθους από τις επιπτώσεις της βλάβης των μαλλιών ή τους χρώματος. Σε αυτό το πλαίσιο το αφρικάνικο εθνικά προϊόντα περιποίησης μαλλιών που διαμορφώθηκαν με αυτά τα υλικά λόγω της ξηρότητας των αφρικανικών μαλλιών έδειξαν μεγαλύτερη πρόσληψη ουσιών η οποία δεν συσχετίστηκε με τη φυλή (83).

Οι Pichini et al χρησιμοποιήσαν βαφή μαλλιών, και 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτές οι χημικές ουσίες μειώνουν τα επίπεδα νικοτίνης και κοτινίνης στις τρίχες αλλά δεν τα αφαιρούν εντελώς. Ο Jurado et al χρησιμοποίησε λεύκανση και βαφή μαλλιών σε οκτώ δείγματα μαλλιών καπνιστών και διαπιστώθηκε ότι η επιδερμίδα των τριχών δεν είχε υποστεί ζημιά μετά τη λεύκανση και τα επίπεδα νικοτίνης μειώθηκαν κατά 30% (84). Βέβαια, οι Li και Chen διαπίστωσαν ότι το πλύσιμο δειγμάτων μαλλιών με σαμπουάν για έως και 20 λεπτά δεν επηρέασε το εσωτερικό περιεχόμενο των μαλλιών. Πρόσφατα σε μια μελέτη που περιλάμβανε μη-καπνιστές που εργάζονταν σε μπα και εστιατόρια, διαπιστώθηκε ότι η προσαρμογή στο ιστορικό της βαφής μαλλιών με χρήση μοντέλου πολλαπλής παλινδρόμησης δεν άλλαξε σημαντικά τα εκτιμώμενα επίπεδα νικοτίνης στις τρίχες(40).

Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει την ικανότητα να βλάπτει σοβαρά τη δομή και την ακεραιότητα των μαλλιών. Συμμετέχει στη βλάβη τόσο της δομής της κερατίνης όσο και στα μόρια της μελανίνης. Ορισμένα υπολείμματα αμινοξέων επιδεικνύουν φωτοευαισθησία και αυτό οδηγεί σε διασταυρούμενη σύνδεση θραυσμάτων πρωτεΐνης με άμορφες περιοχές των μαλλιών. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι τα μαλλιά υφίστανται αλλαγή χρώματος μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, λόγω αποικοδόμησης της τρυπτοφάνης. Τέτοιες αλλοιώσεις μεταβάλλουν σημαντικά τη στοιχειώδη σύνθεση των τριχών και θα μπορούσε να συμβάλει στη διαμήκη παραλλαγή που παρατηρείται για πολλές στοιχειώδεις συγκεντρώσεις (67).

3.3. Εξωτερική επιμόλυνση και ψευδή αποτελέσματα

Η εξωτερική μόλυνση των τριχών για ομάδες ουσιών που συνήθως καπνίζονται, όπως η κοκαΐνη ή η κάνναβη, είναι πιθανή να συμβεί σε ένα άτομο που υποβάλλεται σε έκθεση καπνού για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι, για οποιονδήποτε έλεγχο ουσιών κατά τον οποίον χρησιμοποιούνται δείγματα τριχών, η αφαίρεση τυχόν εξωτερικών εναποθέσεων είναι αναπόσπαστο μέρος της ανάλυσης καθώς μπορεί να οδηγηθούμε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Παραπάνω για κάθε κατηγορία παραγόντων αναφέρθηκαν και παραδείγματα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων.

Ποικιλία πρωτοκόλλων πλύσης ή διαδικασίες απολύμανσης έχουν δημοσιευτεί εδώ και πολλά χρόνια και η αποτελεσματικότητά τους και οι περιορισμοί έχουν αναθεωρηθεί πρόσφατα. Υπάρχουν δύο κοινές συμφωνίες σε αυτές τις αναθεωρήσεις: η πρώτη είναι ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν μεταξύ των πολλών διαδικασιών απολύμανσης που ερευνήθηκαν, και το δεύτερο είναι ότι είναι δύσκολο να αποδειχθεί ότι η εξωτερικά εναποτιθέμενη ουσία έχει εξαλειφθεί πλήρως (85).

Η απολύμανση και η απομάκρυνση των εξωτερικών ρύπων παραμένει ένα σημαντικό ζήτημα για την ανίχνευση ουσιών στις τρίχες. Οι κριτικές για μια σειρά δημοσιευμένων πρωτοκόλλων πλύσης συμφωνούν ότι δεν επιτυγχάνεται πλήρης αφαίρεση του εξωτερικά εναποτιθέμενου φαρμάκου είτε με οργανικούς διαλύτες σε συνδυασμό με ρυθμιστικό διάλυμα ούτε μεμονωμένα (85).

Το πλύσιμο των δειγμάτων τριχών πριν από την ανάλυση είναι αναμφίβολα η πιο κοινή μορφή μείωσης του αντίκτυπου της εξωτερικής μόλυνσης στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και είναι πιθανό ότι οποιοδήποτε πρωτόκολλο πλύσης που χρησιμοποιείται από εργαστήρια δοκιμών είναι σε θέση να αφαιρέσει τα περισσότερα μόρια επιμόλυνσης. Ωστόσο, τα εργαστήρια πρέπει να επικυρώσουν τα δικά τους πρωτόκολλα και να αξιολογούν τη δική τους αποτελεσματικότητα και ευρωστία. Ένα σημείο στη διαδικασία απολύμανσης που μπορεί να μεταβάλει τα αποτελέσματα είναι ότι κατά την πλύση ξεκινά αναπόφευκτα και η διαδικασία έκπλυσης ουσιών που πρέπει να αναλυθούν. Αν και δεν είναι δυνατό να μετρηθεί αυτό, μια μικρή ποσότητα της εξετάζουσας ουσίας υποτίθεται ότι διαρρέει από το στέλεχος της τρίχας και φεύγει στα εκπλύματα (85).

Οι Tsanaclis et al (2008) πρότειναν ένα επιπλέον βήμα που βοηθά σημαντικά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με στόχο την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων. Η

πρόταση τους περιλαμβάνει την ανάλυση του υπολείμματος πλύσης και τη σύγκρισή του με τα επίπεδα που ανιχνεύονται στις τρίχες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οριστική ερμηνεία σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, όταν ουσίες ανιχνεύονται στις τρίχες και όχι στο υπόλειμμα πλύσης, αυτό υποδεικνύει χρήση αυτών σε αντίθεση με τη μόλυνση του περιβάλλοντος. Όταν τα επίπεδα που ανιχνεύονται στο υπόλειμμα πλύσης είναι μεγαλύτερα από τα επίπεδα στις τρίχες, τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι πιθανό να υποδείξουν ότι η πηγή του μεγαλύτερου μέρους της υπό εξέταση ουσίας είναι από εξωτερική μόλυνση (86).

Η εξάλειψη της εξωτερικής μόλυνσης παραμένει μια πρόκληση. Για να μειωθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ο έλεγχος τρίχας πρέπει να αφορά (59):

- i. αφαίρεση εξωτερικής μόλυνσης με ουσίες,
- ii. απομάκρυνση της μόλυνσης που διεισδύει στα μαλλιά λόγω υγρασίας,
- iii. ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μοναδικών μεταβολιτών που διακρίνουν τη χρήση φαρμάκων από τη μόλυνση και
- iv. διαφορετική πρόσληψη ουσιών λόγω προκατάληψης από το χρώμα, την υφή των μαλλιών, τη βλάβη ή καλλυντική θεραπεία.

Όλες οι διαδικασίες απολύμανσης βασίζονται στην υπόθεση ότι οι ουσίες που εναποτίθενται στις τρίχες από το εξωτερικό περιβάλλον δεσμεύονται ασθενώς είτε στην επιφάνεια της τρίχας είτε στη μήτρα των μαλλιών, και επομένως αφαιρούνται με διαδικασίες απολύμανσης. Προς το παρόν, δεν υπάρχει συναίνεση για το ποια διαδικασία απολύμανσης είναι η βέλτιστη.

Εκτός από τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν στις παραπάνω κατηγορίες υπάρχουν και τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι το 15% όλων των τεστ επιστρέφει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, οπότε είναι και λογικό να αμφισβητούνται πολλές φορές τα αποτελέσματα. Για την τεκμηρίωση των αρνητικών ευρημάτων, η έννοια της ελάχιστης ανιχνεύσιμης δοσολογίας στις τρίχες είναι σημαντική, αλλά υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα προς το παρόν στην επιστημονική βιβλιογραφία. Αυτά τα δεδομένα περιλαμβάνουν τις ουσίες κοκαΐνη, κωδεΐνη, κεταμίνη, μερικές βενζοδιαζεπίνες και μερικές ασυνήθιστες ενώσεις.

Μια αρνητική αναλυτική απάντηση σε δείγμα τρίχας μετά από ελεγχόμενη χορήγηση κάποιας ουσίας μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικούς παράγοντες.

Πρώτον, η ουσία μπορεί να μην έχει ενσωματωθεί στις τρίχες. Δηλαδή, στην περίπτωση μεγάλων βιομορίων, όπως ορμόνες (π.χ. ερυθροποιητίνη, ινσουλίνη, αυξητική ορμόνη) υπάρχει αδυναμία μετακίνησης τους στα τριχοειδή του αίματος και δεν μπορούν να ενσωματωθούν κατά την ανάπτυξη της τρίχας. Γενικά, μπορούν να ενσωματωθούν μόνο ουσίες με μοριακό βάρος χαμηλότερο από 1000 daltons. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν σε αρνητικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν την πιθανότητα η χορηγούμενη μητρική ένωση να μην είναι η ένωση στόχος στις τρίχες, όπως για παράδειγμα η αιθανόλη και το αιθυλο γλυκουρονίδιο, ή να έχει γίνει μια κακή ενσωμάτωση της ουσίας, αφού ρυθμίζεται από παράγοντες όπως η συγγένεια μελανίνης, η λιποφιλικότητα και η διαπερατότητα μεμβρανών (10).

Σχετικά με τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, η υποκατάσταση ουσιών ή αντικατάσταση μιας κοινώς δοκιμασμένης ουσίας με μία άλλη που είναι λιγότερο πιθανό να ανιχνευθεί όπως τα NPS-είναι μια άλλη μέθοδος στρατηγικής αποφυγής που εντοπίστηκε ευρέως κατά τη διάρκεια πολλών μελετών. Τα NPS όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο έχουν θέσει σημαντικές προκλήσεις στους υπεύθυνους χάραξης πολιτικής λόγω του γρήγορου ρυθμού με τον οποίο οι χημικές δομές μεταβάλλονται ως απάντηση στη νομοθεσία για τον έλεγχο μεμονωμένων ουσιών, δημιουργώντας τεράστιο αριθμό νέων NPS.

Για την εκφυγή εντοπισμού ουσιών πολλές ιστοσελίδες στο διαδίκτυο προτείνουν τους χρήστες να ξυρίσουν τα μαλλιά τους σε πρώτη φάση. Η στενή περικοπή των μαλλιών (και το ξύρισμα της τρίχας του σώματος) εμποδίζει τη συλλογή επαρκούς δείγματος για δοκιμή τρίχας, η οποία μπορεί επομένως να αντικατασταθεί από μια δοκιμή μικρότερου παραθύρου ανίχνευσης, όπως αυτά που χρησιμοποιούν σάλιο, αίμα και ούρα. Κατά καιρούς έγινε αναφορά σε καθαριστικά ολόκληρου του σώματος («αναλώσιμα»), που λαμβάνονται από το στόμα, τα οποία αφαιρούν ίχνη και μεταβολίτες φαρμάκων από τις τρίχες, τα ούρα και το αίμα ή και σαμπουάν που παραλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος των συγκεντρώσεων από τα μαλλιά. Ένα παράδειγμα είναι το "Nutracleanse" που προσφέρεται ή το "Total Detoxification System", που προβλέπει μια καθορισμένη διαίτα για τους χρήστες που πρέπει να ακολουθούν σε συνδυασμό με τη θεραπεία. Προς το παρόν δεν εντοπίστηκαν εύλογες μαρτυρίες από χρήστες που πέτυχαν ένα σαφές αποτέλεσμα δοκιμής μόνο με τη χρήση αναλώσιμων (87).

Επίσης έχει βρεθεί ότι καλλυντικές θεραπείες που ακολουθούνται τακτικά και περιλαμβάνουν «σαμπουάν αποτοξίνωσης», χρωματισμό, ημιμόνιμη/μόνιμη βαφή μαλλιών ή ίσιωμα των μαλλιών, οι πιο αποτελεσματικές, οξειδωτικές θεραπείες μαλλιών με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) υπό αλκαλικές συνθήκες μειώνουν σημαντικά τις συγκεντρώσεις δείκτη DOA ή αλκοόλ και ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα δοκιμών τρίχας (88).

Μια σημαντική πρόκληση στη συνήθη ανάλυση τριχών είναι ο εντοπισμός τέτοιων προσπαθειών νοθείας. Μέχρι στιγμής, οι οπτικές επιθεωρήσεις δειγμάτων τριχών και χρωματισμένων εκχυλισμάτων μπορούν να προκαλέσουν υποψίες χρήσης καλλυντικών στα μαλλιά και να αποφευχθούν έτσι τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, οι αντικειμενικοί δείκτες θα βελτίωναν την εμπιστοσύνη στην επιβεβαίωση νοθείας, ιδιαίτερα στο δικαστήριο. Για το λόγο αυτό, πιο σύνθετες τεχνικές όπως η μικροσκοπία φθορισμού ή η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολία έχουν αναπτυχθεί με την πάροδο του χρόνου για την ανίχνευση ουσιών σε δείγματα τρίχας με κοσμητική επεξεργασία και αποτελούν μεθόδους αποφυγής της νοθείας (89).

Ωστόσο, η ανίχνευση αποπειρών νοθείας με τακτικά διαθέσιμες διαδικασίες όπως LC-MS/MS θα ήταν ιδανική. Σε μια πρώτη μελέτη, 1H-πυρρόλιο-2,3,5-τρίκαρβοξυλικό οξύ (PTCA) αναλύθηκε με LC-MS/MS και περιγράφηκε ως δείκτης για οξειδωτικές θεραπείες μαλλιών αλλά απαιτείται η εύρεση των κατώτερων τιμών. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το 1H-πυρρόλιο-2,3,4,5-τετρακαρβοξυλικό οξύ (PTeCA) σχηματίζεται αποκλειστικά μέσω οξειδωτικής θεραπείας τρίχας που θεωρητικά θα διευκόλυνε την ανίχνευση λευκασμένων δειγμάτων τριχών, καθώς οι κατώτερες τιμές δεν χρειάζεται να προσδιοριστούν. Προς το παρόν, η τρέχουσα έλλειψη εμπορικά διαθέσιμων προτύπων αναφοράς και η εξάρτησή της από τη μελανίνη εξακολουθεί να εμποδίζει τη συνηθισμένη εφαρμογή της (88).

Άλλη μια μέθοδος για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα είναι οι μεταβολικές αναλύσεις που στοχεύουν στη διεξοδική μελέτη μικρών ενδογενών μεταβολιτών ενός οργανισμού υπό διαφορετικές συνθήκες (π.χ. υγιείς έναντι ασθενειών) για να περιγράψουν φυσιολογικές διεργασίες και να εντοπίσουν βιοδείκτες. Αν και χρονοβόρες και κοστοβόρες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις που υπάρχει υποψία για νοθεία του αποτελέσματος (90).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ & ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

4.1. Εφαρμογές της ανάλυσης τριχών στην εγκληματολογία

Τα δείγματα τριχών είναι ένας από τους σημαντικότερους πόρους στην ιατροδικαστική ανάλυση σκηνών εγκλήματος και συχνά παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό ενός υπόπτου ή θύματος. Εκτός από τον εντοπισμό υπόπτων είναι χρήσιμα για την διαλεύκανση υποθέσεων που διεξήχθησαν υπό την επήρεια αλκοόλ ή απαγορευμένων ουσιών. Παρακάτω παρουσιάζονται εφαρμογές της ανάλυσης τριχών στην εγκληματολογία.

4.1.1. Εγκλήματα σχετιζόμενα με τη χρήση ουσιών

Τα εγκλήματα, όπως ληστείες, βιαιοπραγίες, σεξουαλική επίθεση, εκβιασμός χρημάτων ή κακομεταχείριση ανθρώπων, όταν διαπράττονται ενώ το θύμα βρίσκεται υπό την επήρεια ναρκωτικών, ορίζονται ως εγκλήματα που διευκολύνουν τα ναρκωτικά (DFC) (91). Συχνά, μόνο μία δόση ενός φαρμάκου χορηγείται πριν από την έναρξη του DFC. Κατά συνέπεια, τα στοιχεία μιας μεμονωμένης χορήγησης φαρμάκων, καθώς και επαναλαμβανόμενων εκθέσεων, είναι πολύτιμα σε περιπτώσεις DFC.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, το θύμα δεν μπορεί να ανακαλέσει το συμβάν που συνέβη ενώ ήταν υπό την επήρεια ουσιών λόγω αμνησίας ή νάρκωσης που προκαλείται από την ουσία. Επομένως, μπορεί να εμφανιστεί καθυστέρηση στη δειγματοληψία, η οποία μπορεί να αποφέρει αρνητικά αποτελέσματα στην ιατροδικαστική ανάλυση αίματος και ούρων θύματος. Μια μέθοδος που μπορεί να επιτρέψει έναν αναδρομικό προσδιορισμό της μακροχρόνιας χρήσης ναρκωτικών σε διάστημα εβδομάδων έως μηνών είναι η τμηματική ανάλυση μαλλιών (46).

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για εγκληματικούς σκοπούς περιλαμβάνουν βενζοδιαζεπίνες, υπνωτικά, ηρεμιστικά και αναισθητικά, ναρκωτικά κατάχρησης (όπως κάνναβη, έκσταση, LSD ή ηρωίνη), διάφορα ναρκωτικά (π.χ. σκοπολαμίνη) και, πιο συχνά, αιθανόλη. Επίσης, συχνά εντοπίζονται πιθανά «ναρκωτικά για τον βιασμό». Η ιδανική ουσία για τη διάπραξη εγκλήματος είναι άμεσα διαθέσιμη, εύκολη στη διαχείριση, ικανή να βλάψει γρήγορα τη συνείδηση και να προκαλέσει πρόωρη αμνησία. Πολλά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε σεξουαλικές

επιθέσεις που διευκολύνονται από τα ναρκωτικά είναι ταχείας δράσης και ισχυρά κατασταλτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν πολλαπλές φαρμακολογικές επιδράσεις όπως χαλάρωση, ευφορία, μειωμένο όριο αναστολής, αμνησία, μειωμένες αντιλήψεις, δυσκολία στη διατήρηση ισορροπίας, μειωμένη ομιλία, υπνηλία, απώλεια κίνησης, έμετος, ακράτεια, αναισθητο και περιστασιακά θάνατος (92).

Μεταξύ των ποικίλων ουσιών η ζολπιδέμη είναι μία από τις πιο συχνά συναντώμενες ουσίες σε εγκλήματα που διευκολύνουν τα ναρκωτικά, έτσι ώστε η ερμηνεία της παρουσίας της σε βιολογικά δείγματα, ειδικά στην ανάλυση μαλλιών, έχει γίνει μια τρέχουσα τοξικολογική πρόκληση. Η ανίχνευσή της σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε δείγματα μαλλιών μπορεί να αντιπροσωπεύει μία ή περιστασιακή έκθεση στο φάρμακο, ενώ υψηλότερα επίπεδα συνήθως υποδεικνύουν τακτική και θεραπευτική χορήγηση, αν και δεν υπάρχει δια-ατομική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας και δόση πρόσληψης φαρμάκου και της συγκέντρωσης στις τρίχες (92).

Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι όλα τα εργαστήρια αναφέρουν την παρουσία ουσιών που σχετίζονται με το DFC με ομοιόμορφο τρόπο, προτείνεται να καθιερωθεί έλεγχος ρουτίνας ανίχνευσης για μεθόδους δοκιμής. Προκειμένου να ξεπεραστεί το γεγονός ότι κάποια εργαστήρια μπορούν να προσδιορίσουν ευρύτερο φάσμα ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις ουσιών από άλλα εργαστήρια, πρέπει να τεθούν τα ελάχιστα απαιτούμενα επίπεδα απόδοσης. Πρόκειται για παραμέτρους τεχνικής απόδοσης με τις οποίες όλα τα εργαστήρια πρέπει συμμορφώνονται κατά τον έλεγχο για την παρουσία ουσίας που σχετίζεται με το DFC (53).

4.1.2. Θάνατοι σχετιζόμενοι με τη χρήση ουσιών

Η αναγνώριση ενός θανάτου ως προκαλούμενου από τη χρήση ουσιών εξαρτάται από την οργάνωση της νεκροψίας στο σημείο του θανάτου, η οποία διαφέρει από χώρα σε χώρα και μπορεί ανάλογα με την ικανότητα να επηρεάζεται σημαντικά από νομικούς κανονισμούς και αποφάσεις της αστυνομίας καθώς και από τη δικαιοσύνη ή τον τομέα της υγείας. Μια λεπτομερής διερεύνηση ενός θανάτου μπορεί να παράγει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τους τεχνικούς πόρους που χρησιμοποιούνται και σχετίζονται με τις μεθόδους και τις διαδικασίες για τη λήψη ευρημάτων από το πτώμα με αυτοψία ή, πιο πρόσφατα, τεχνικές απεικόνισης για λήψη πληροφοριών για

αντικείμενα ή δείγματα που συλλέχθηκαν στο σημείο του θανάτου αλλά και για συμπερίληψη άλλων πληροφοριών από το κοινωνικό περιβάλλον, τους συγγενείς ή τους θεράποντες ιατρούς (93). Σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, η ανίχνευση ουσιών στο αίμα είναι πιο σημαντική όσον αφορά τον προσδιορισμό της αιτίας του θανάτου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, είναι επίσης γενικά σημαντικό να αποκτηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση ουσιών πριν από το θάνατο. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ανάλυση τριχών θα δώσει πρόσθετες πληροφορίες και μπορεί να επαληθεύσει τη χρήση φαρμάκων εβδομάδες ή μήνες νωρίτερα, αν και ο εκλιπών δεν ήταν υπό την επίδραση του φαρμάκου τη στιγμή του θανάτου (94).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία για την ανάλυση ουσιών σε τρίχες ζώντων δεν υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία για μεταθανάτιες περιπτώσεις. Ερευνητές έχουν αναφέρει τη χρήση αναλύσεων τρίχας στην ερμηνεία θανάτων σχετιζόμενων με υπερβολική δόση οπιοειδών. Αναλύσεις τριχών ορισμένων άλλων φαρμάκων, όπως γ-υδροξυ βουτυρικό και βενζοδιαζεπίνες περιγράφονται επίσης σε περιπτώσεις μετά θάνατον. Εκτός από τα παράνομα ναρκωτικά, άλλες ιατρικές και ψυχοδραστικές ουσίες είναι επίσης πολύ σημαντικές σε θανάτους που σχετίζονται με υπερβολική δόση ναρκωτικών και έχουν εντοπιστεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις (95).

4.1.3. Κατάχρηση αλκοόλ

Αν και το αλκοόλ είναι η πιο συχνά ελεγχόμενη ουσία, έχει διαδραματίσει έναν δευτερεύοντα ρόλο στην ανάλυση τριχών επειδή είναι πτητική ουσία και δεν μπορεί να ενσωματωθεί αποτελεσματικά και να παραμείνει στην τρίχα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επειδή η κατανάλωση αλκοόλ είναι νόμιμη μια δοκιμή αλκοόλ στις τρίχες πρέπει να μπορεί να διαφοροποιήσει την κοινωνική κατανάλωση αλκοόλ από την κακοποίηση. Επιπλέον, άλλες μέθοδοι και σχετικά χαμηλού κόστους εργαστηριακοί βιοδείκτες για κατάχρηση αλκοόλ σε χρόνιες καταστάσεις έχουν καθιερωθεί, οπότε καθίσταται σπάνια και περιορισμένη η χρήση των τριχών για την ανάλυση του αλκοόλ. Στους τυπικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για την κατάχρηση αλκοόλ είναι η γάμμα-γλουταμυλτρανσφεράση, ο μέσος όγκος των ερυθροκυττάρων και η τρανσφερίνη με έλλειψη υδατανθράκων. Στις τρίχες οι αναλύσεις γενικά σχετίζονται με τον προσδιορισμό των δευτερευόντων μεταβολιτών του, συμπεριλαμβανομένων των αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων και του αιθυλο γλυκουρονιδίου (59).

Σε αντίθεση με το γεγονός ότι η συγκέντρωση ποικίλων ουσιών κατάχρησης επηρεάζεται από τη βαφή ή τις θεραπείες των μαλλιών, η συγκέντρωση του αιθυλο γλυκουρονιδίου στα μαλλιά δεν επηρεάζεται από αυτούς τους παράγοντες. Πολλές μελέτες έχουν επίσης εξετάσει το αιθυλο γλυκουρονιδίου στα μαλλιά και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να δείξει ποιοτικά οποιαδήποτε χρήση αλκοόλ τους τελευταίους 3 μήνες. Οι συγκεντρώσεις σε θετικές περιπτώσεις αλκοολισμού κυμαίνονται από 0,11-4,0 ng/mg τρίχας (59).

Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων ενσωματώνονται στα μαλλιά κυρίως από το σμήγμα. Για το λόγο αυτό, η χρήση της συγκέντρωσής τους ως δείκτης υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ περιπλέκεται από τις ατομικές διαφορές στη δραστηριότητα των σμηγματογόνων αδένων και την εξάλειψη προϊόντων περιποίησης μαλλιών και καλλυντικών (96). Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων θα μπορούσαν να είναι πιο αξιόπιστοι δείκτες μαλλιών για χρόνια κατάχρηση αλκοόλ σε σχέση με το αιθυλογλυκουρονίδιο. Μια πολύ ευαίσθητη και συγκεκριμένη μέθοδος για την ποσοτική ανάλυση μυριστικού αιθυλεστέρα, παλμιτικού αιθυλεστέρα, ελαϊκού αιθυλεστέρα και στεατικού αιθυλεστέρα από τα μαλλιά αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε σε δείγματα μαλλιών από ανθρώπινους θανάτους με επαληθευμένη υπερβολική κατάχρηση αλκοόλ, μέτριους κοινωνικούς πότες και μη-αλκοολικούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνολική συγκέντρωση των τεσσάρων εστέρων στα μαλλιά από τους αλκοολικούς (1–29 ng/mg) ήταν σαφώς υψηλότερη από ό,τι στα μαλλιά από τους κοινωνικούς πότες (<0,8 ng/mg). Σε μαλλιά ατόμων με αποχή σε παιδιά και ενήλικες, μετρήθηκαν αρνητικά αποτελέσματα ή μόνο ίχνη των εστέρων (59).

4.2. Εξέταση για χρήση ουσιών στον χώρο εργασίας

Ο έλεγχος των εργαζομένων για χρήση παράνομων ουσιών είναι κοινή πρακτική σε πολλές χώρες. (99) Ο έλεγχος αυτός αρχικά νομιμοποιήθηκε στις Η.Π.Α ,την δεκαετία του 80, μετά από μία σειρά εργασιακών ατυχημάτων και ενώ η κυβέρνηση δήλωνε αποφασιστική καταπολέμηση των ουσιών τύπου "κρακ". Αρχικά εξετάζονταν οι ομοσπονδιακές αρχές και υγειονομικοί φορείς, αργότερα συμπεριλήφθηκαν και γενικότεροι οργανισμοί και ιδιωτικές επιχειρήσεις. Στις υπόλοιπες ηπείρους ο έλεγχος ξεκίνησε να εδραιώνεται περί το 2000.(100)

Τα εργαστήρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν ιδιαίτερα προσεγμένα πρωτόκολλα για τη συλλογή, την ανάλυση και την έκβαση των αποτελεσμάτων. Να σημειώσουμε ότι υπάρχουν διαφορές τόσο στα κριτήρια όσο και στις τιμές θετικοποίησης των ουσιών παρόλο που αυτές μειώνονται με το χρόνο.(100)

Σε έρευνες που έχουν γίνει σε εργαζόμενους σε σύγκριση με χρήστες κατ'εξακολούθηση, τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα επίπεδα ουσιών όπως κοκαΐνη και MDMA στους πρώτους, καθώς πρόκειται για ουσίες περιστασιακής χρήσης που γίνεται συνήθως σε πάρτυ, τα σαββατοκύριακα.(101) Να τονιστεί σε αυτό το σημείο πως ο έλεγχος που γίνεται είναι συνήθως σε τυχαίο χρόνο και για αυτόν το λόγο συνηθίζεται να δίνεται δείγμα ούρων ή σιέλου στο οποίο καταδεικνύεται η πρόσφατη χρήση. Κατά αυτές τις συνθήκες ο έλεγχος των τριχών χρησιμεύει μόνο σε συνδυασμό με θετική εξέταση ούρων ή στοματικών υγρών. Τα μαλλιά ως δείγμα για ανίχνευση ουσιών έχουν το πλεονέκτημα γρήγορης και εύκολης συλλογής, μη επεμβατικής, αποστέλλεται εύκολα στο εργαστήριο και μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το μακροπρόθεσμο ιστορικό παράθυρο που δίνεται είναι εξαιρετικά χρήσιμο για την περίπτωση μίας πρόσληψης ή την περίπτωση αποχής από καταχρήσεις. Σε αυτές τις καταστάσεις λοιπόν, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σε δείγμα τριχών είναι κατά πολύ ισχυρότερος δείκτης από ένα αρνητικό αποτέλεσμα δείγματος ούρων.(85)

Από αναλυτικής απόψεως, οι αβεβαιότητες της τελικής μέτρησης των δειγμάτων τριχών μπορεί να είναι μεγαλύτερες από εκείνες στα ούρα και μεταβλητές μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Αυτό συμβαίνει επειδή η ανάλυση σε δείγματα τριχών μέσα από τις διαδικασίες απολύμανσης και αφομοίωσης πιθανώς να υπάρξουν και απώλειες αυξάνοντας τη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, κατά την ανάλυση της κοκαΐνης και της 6-ακετυλομορφίνης, η υδρόλυση που μπορεί να συμβεί σε ακραίες συνθήκες pH μπορεί να παραπλανήσει την ερμηνεία. Καθώς τα μαλλιά καλύπτουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, είναι λογικό ένα τέτοιο δείγμα να είναι θετικό και το τεστ ούρων αρνητικό. Το αντίστροφο είναι επίσης δυνατό, ένας μη συστηματικός χρήστης να είχε χρησιμοποιήσει κοκαΐνη μία ή δύο ημέρες πριν από τον έλεγχο δίνοντας αρνητική την εξέταση τριχών και θετική των ούρων. (85) Λαμβάνοντας πάντα υπόψη ότι το θετικό αποτέλεσμα μπορεί να δείχνει χρήση αλλά και έκθεση του ατόμου σε απαγορευμένες ουσίες, δίνουμε ένα αποτέλεσμα διασφαλίζοντας τα δικαιώματα του εργαζομένου. Στον πίνακα που ακολουθεί

εξηγούνται τα πιθανά σενάρια όπου ενδέχεται να υπάρξει ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων σε δείγμα ούρων και τριχών.

Η σημασία της ταυτόχρονης εξέτασης ούρων και τριχών		
	Τεστ πριν την πρόσληψη	Τυχαίος έλεγχος
Αρνητικό δείγμα ούρων & τριχών	Πολύ πιθανή εμφάνιση	Πολύ πιθανή εμφάνιση
	Η πλειονότητα των αιτούντων εργασίας	Οι περισσότεροι εργαζόμενοι δεν είναι χρήστες
Αρνητικό δείγμα ούρων & Θετικό τριχών	Στις τρίχες ανιχνεύεται 5 φορές παραπάνω	Στις τρίχες ανιχνεύεται 3 φορές παραπάνω
	Αναμενόμενο αποτέλεσμα λόγω της αναδρομικής ικανότητας των τριχών να εντοπίζουν τη χρήση ουσιών	Αναμενόμενο αποτέλεσμα λόγω της αναδρομικής ικανότητας των τριχών να εντοπίζουν τη χρήση ουσιών
Θετικό δείγμα ούρων & τριχών	Πιθανή εμφάνιση	Λιγότερο πιθανή εμφάνιση
	Πιθανότερο να είναι χρόνιος χρήστης	Πιθανότερο να είναι χρόνιος χρήστης
	Ένας μη χρήστης δεν θα πήγαινε στη συνέντευξη 3 μέρες μετά τη χρήση	Ένας μη χρήστης δεν θα πήγαινε στη συνέντευξη 3 μέρες μετά τη χρήση
Θετικό δείγμα ούρων και Αρνητικό τριχών	Σπάνια εμφάνιση	Σπάνια εμφάνιση
	Ενδέχεται να συμβεί όταν τα μαλλιά είναι κοντά και η χρήση της ουσίας έγινε μιας εβδομάδας πριν τη δειγματοληψία, χρόνος που απαιτείται για να βγει η ουσία στο τριχωτό της κεφαλής μετά την κατάποση	Πιθανότατα να είναι ένα κανναβινοειδές που απεκκρίνεται αργά και μπορεί να ανιχνευθεί στα ούρα έως και εβδομάδες μετά την τελευταία χρήση και πιο δύσκολο να εντοπιστεί στις τρίχες
	Πιθανότερο να είναι κανναβινοειδές από μία ταχέως απεκκριμένη ουσία όπως η κοκαΐνη	
Πηγή : από τους Tsanaclis L & Wicks J. (2)		

Στην περίπτωση των ούρων και του σάλιου χρησιμοποιούνται τιμές αναφοράς πολύ υψηλότερες με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ανίχνευσης ουσιών που λαμβάνονται ακούσια (παθητικά) και ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στις προηγούμενες περιόδους ενδιαφέροντος. Ωστόσο, στην ανάλυση τριχών, οι τιμές αναφοράς μας είναι χαμηλότερες και καθορίζονται στο όριο ποσοτικοποίησης των μεθόδων που χρησιμοποιούνται με πρωταρχικό στόχο την ελαχιστοποίηση της ανίχνευσης ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες περιόδους και την αύξηση της ανίχνευσης της τρέχουσας χρήσης. (85) Οι μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται είναι η ανοσοδοκιμή και η χρήση GC-MS ενώ τα αντιδραστήρια είναι συνήθως κάποια ένζυμα, μικροσωματίδια ή πόλωση φθορισμού.(100)

Το μεγαλύτερο πρόβλημα εδώ έγκειται στο νομικό πλαίσιο και στην ‘σύγκρουση’ μεταξύ της υγείας και ασφάλειας στη δουλειά με την προάσπιση των ανθρωπίνων δικαιωμάτων και των προσωπικών δεδομένων. Οι δύο πλευρές δίνουν έμφαση στο κομμάτι της υγείας και όχι τόσο της νομιμότητας καθώς όμως και στην υποχρέωση του εργοδότη να παρέχει στο σύνολο έναν ασφαλή εργασιακό χώρο. Σε πολλές χώρες για παράδειγμα, ο αρμόδιος που φέρει το αποτέλεσμα, ανακοινώνει στην εργοδοσία μόνο την καταλληλότητα ή μη του υποψηφίου και όχι την πλήρη έκθεση του αποτελέσματος.(100)

Διαφορετικές χώρες έχουν διαφορετικούς οργανισμούς διαπίστευσης και το δικό τους φορέα που ακολουθεί διεθνή πρότυπα πιστοποίησης εργαστηριακής ικανότητας όπως το ISO / IEC 17025 (the International Organization for Standardization) / (the International Electrotechnical Commission).(85)

Η ανίχνευση ουσιών στην τρίχα έχει επεκτείνει την παρακολούθηση από το χώρο εργασίας στο σπίτι και την κοινωνική ζωή του υπαλλήλου. Είναι αδύνατο να περιοριστεί ο έλεγχος έτσι ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία ουσιών μόνο κατά την εργασία. Στην ουσία είναι μια δοκιμή τρόπου ζωής. Ανάλογα με την ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν και τα όρια των τιμών αναφοράς που εφαρμόστηκαν, μια εξέταση τριχών μπορεί να ανιχνεύσει τη χρήση ναρκωτικών αρκετούς μήνες πριν από τη δοκιμή.

Τα δικαστήρια αναζητούν απόλυτη σαφήνεια στις μετρήσεις που χρησιμοποιούνται. Πρέπει να είναι ευθύνη της εργαστηριακής κοινότητας να

διασφαλίζει ότι κανένας χρήστης, είτε ένα άτομο είτε ένας μεγάλος οργανισμός, δεν μπορεί να παρεξηγήσει τι μπορεί να προσφέρει η τεχνική.(85)

4.3. Υποθέσεις επιμέλειας & προστασίας των παιδιών

Η ανάλυση των τριχών εφαρμόζεται εκτενώς σε περιπτώσεις προστασίας των παιδιών. Προτιμάται από τη δειγματοληψία ούρων ή αίματος καθώς γίνεται κατόπιν ραντεβού. Αποτελεί συχνό φαινόμενο η ανίχνευση ουσιών στα μαλλιά των παιδιών ως αποτέλεσμα παθητικής έκθεσης ή ως αποτέλεσμα χορήγησης ουσιών, κυρίως κατασταλτικών ως ηρεμιστικά ή με στόχο τη σεξουαλική κακοποίηση. Αυτό μας ανησυχεί όσον αφορά το υγιές περιβάλλον του σπιτιού ή ακόμα και στις περιπτώσεις φύλαξης των ανηλίκων. Στις περισσότερες περιπτώσεις εξετάζονται και δείγματα τριχών των εκάστοτε ενηλίκων.(102)

Έρευνα που έγινε από επιστημονικά ινστιτούτα το 2000-2008 στις ΗΠΑ για την έκθεση των παιδιών σε απαγορευμένες ουσίες, έδειξε ότι το 50% αυτών έχουν εκτεθεί τουλάχιστον σε μία από τις ουσίες αυτές, ότι ο μέσος όρος αυξάνεται χρόνο με το χρόνο, ότι περίπου το 9,7% αφορά έκθεση σε περισσότερες από μια ουσίες και τέλος ένα μικρό ποσοστό περί το 1,2% απεβίωσε εξαιτίας της έκθεσης κυρίως σε κατασταλτικούς παράγοντες όπως τα οπιοειδή.(103)

Η κάνναβη μεταξύ των παράνομων ουσιών είναι αυτή που παρουσιάζει τον μεγαλύτερο επιπολασμό παγκοσμίως, συνεπώς και αυτή που ανιχνεύεται συχνότερα στις τρίχες των παιδιών. Η κοινή εργαστηριακή πρακτική είναι η ανάλυση μόνο της THC (Δ 9-tetrahydrocannabinol) καθώς ο μεταβολίτης της THC-COOH (11-nor-9-carboxy-Δ 9-tetrahydrocannabinol), ο οποίος σχηματίζεται μόνο μέσα στο σώμα και θεωρείται για το λόγο αυτό απόδειξη πρόσληψης / κατανάλωσης, βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις απαιτώντας τη χρήση δαπανηρών οργάνων μέτρησης.(102)

Πολλά παιδιά εκτίθενται σε βαρέα μέταλλα όπως μόλυβδος, υδράργυρος, αλουμίνιο, αρσενικό, κάδμιο κυρίως σε βιομηχανικές περιοχές. Σε αντίθεση, στις αγροτικές περιοχές παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων, από την αλόγιστη χρήση τους στις καλλιέργειες, είτε από την τροφή ή το νερό. Εάν τα κύτταρα στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο ενός παιδιού καταστρέφονται από χημικές ουσίες όπως ο μόλυβδος, ο υδράργυρος ή οι διαλύτες τους ή εάν αποστέλλονται ψευδή σήματα στα αναπτυσσόμενα αναπαραγωγικά όργανα υπάρχει

μεγάλος κίνδυνος η προκύπτουσα δυσλειτουργία να είναι μόνιμη και μη αναστρέψιμη. Επειδή τα παιδιά έχουν γενικά περισσότερα χρόνια ζωής μπροστά από τους ενήλικες, έχουν περισσότερο χρόνο να αναπτύξουν χρόνιες ασθένειες που προκαλούνται από πρώιμες εκθέσεις.(104)

Λόγω των άμεσων και μακροπρόθεσμων προβλημάτων, τα νεογέννητα που γεννιούνται από γυναίκες που εκτίθενται σε ναρκωτικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης θα πρέπει να εξετάζονται αμέσως μετά τη γέννηση, ώστε να μπορεί να γίνει κατάλληλη παρέμβαση και παρακολούθηση. Εξετάζονται δείγματα της μητέρας, το αμνιακό υγρό και δείγμα από το μηκόνιο του μωρού.(105) Έχει βρεθεί ότι το μηκόνιο και τα μαλλιά του νεογνού είναι αποτελεσματικοί βιοδείκτες έκθεσης σε μητρικό φάρμακο. Σε αυτό το πλαίσιο, το μηκόνιο μπορεί να είναι πιο ευαίσθητο, αλλά είναι διαθέσιμο για ανάλυση μόνο για μερικές ημέρες μετά τη γέννηση ενώ τα μαλλιά είναι για 3 μήνες.(101)

Είναι πολύ σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η ανάλυση των μαλλιών των παιδιών δεν παρέχει πάντα πειστικά αποτελέσματα. Οι τρίχες των παιδιών διαφέρουν από εκείνες των ανηλίκων, στο πάχος, στην απορροφητικότητα, ακόμα και στο ρυθμό ανάπτυξης. (106) Επίσης η ενζυμική δραστηριότητα σε έναν παιδικό οργανισμό είναι πιο αργή επηρεάζοντας την κυκλοφορία της ουσίας στο αίμα συνεπώς και την εξασθένησή της. Σημειωτέο είναι ότι μια συγκέντρωση σε έναν υγιή ενήλικα, μπορεί να ερμηνευτεί ως θανατηφόρος για τα παιδιά. (105) Καταστροφικές συνέπειες στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να φέρουν και τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, για αυτό πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στην ευαισθησία και στην ειδικότητα των μεθόδων.(59)

4.4. Εφαρμογή της εξέτασης των τριχών για έλεγχο doping

Ο ορισμός του «ντόπινγκ» σχετίζεται κυρίως με τις πιθανές επιδόσεις και την ενίσχυση στον αθλητισμό. Η ερμηνεία του όσον αφορά την ανάλυση μαλλιών επηρεάζεται από ορισμένους διοικητικούς ορισμούς. Οι πιο πρόσφατες εκδόσεις του καταλόγου απαγορευμένων ουσιών ενημερώνονται ετησίως από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ ο οποίος διακρίνει τις ουσίες μεταξύ κατηγοριών ουσιών που απαγορεύονται ανά πάσα στιγμή, ουσιών που απαγορεύονται σε αγώνες ή ουσιών που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα (107).

Η διαφοροποίηση που προκύπτει οφείλεται βασικά στο γεγονός ότι ορισμένες ενώσεις πρέπει να είναι βιοδιαθέσιμες σε θεραπευτικά επίπεδα για να παρέχουν οξεία απόδοση και ενίσχυση (π.χ. διεγερτικά) ενώ οι έμμεσες βιολογικές επιδράσεις άλλων φάρμακα (αναβολικοί παράγοντες) επιμένουν μετά την είσοδο τους στο σώμα. Μέχρι τώρα ο έλεγχος doping διεξάγεται με τη χρήση ούρων ως δείγμα. Ωστόσο, η ολοένα αυξανόμενη χρήση των τριχών ως δείγμα στην κατάχρηση ουσιών αποτελεί ένα εργαλείο και για τον έλεγχο doping.

Οι πιθανές ειδικές εφαρμογές της ανάλυσης τριχών στα προγράμματα ανίχνευσης doping είναι ποικίλες. Η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθιερωθεί η χρήση εξωγενών ουσιών και να επιβεβαιωθεί η μακροπρόθεσμη έκθεση σε ουσίες. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της εφάπαξ έναντι της μακροχρόνιας χορήγησης επιτρεπόμενων φαρμακευτικών προϊόντων που χορηγούνται χωρίς ιατρική ένδειξη. Στους ελέγχους anti-doping, η ανάλυση των τριχών θα μπορούσε να παράσχει πρόσθετες πληροφορίες στην ανάλυση ούρων, επιτρέποντας σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως για τους β-2-αγωνιστές, τη θεωρητική δυνατότητα διάκρισης της οξείας χορήγησης για την επίτευξη διεγερτικών αποτελεσμάτων από τη χρόνια χρήση που είναι απαραίτητη για την επίτευξη του «αναβολικού αποτελέσματος» (108).

Τέλος, η εισαγωγή ως τέτοιων αναλύσεων τρίχας σε ελέγχους doping μπορεί να προσφέρει ισχυρή αποτρεπτική επίδραση στη χρήση απαγορευμένων ουσιών. Η συλλογή μαλλιών είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί χωρίς την αμηχανία που συνήθως σχετίζεται με τη δειγματοληψία ούρων. Τα δείγματα τρίχας μπορούν να αποθηκευτούν ή να μεταφερθούν χωρίς ψύξη, έλεγχο pH ή συντηρητικά που είναι συνήθως απαραίτητα για άλλα βιολογικά δείγματα όπως αίμα και ούρα. Διάφορα δείγματα μπορούν να ληφθούν σε διάφορα χρονικά διαστήματα εάν είναι απαραίτητο προκειμένου να επεκταθεί η ανάλυση σε επιπλέον αναλύσεις ή να επιβεβαιωθούν τα προηγούμενα ευρήματα, μια κατάσταση που έρχεται σε αντίθεση με τη δειγματοληψία αίματος ή ούρων (109).

Οι κύριες ενώσεις στόχος των δοκιμών ανάλυσης τριχών στον έλεγχο doping είναι (109):

- S0: μη εγκεκριμένες ουσίες,
- S1: αναβολικοί παράγοντες,

- S2: πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες,
- S3: βήτα-2αγωνιστές,
- S4: ρυθμιστές ορμονών και μεταβολισμού και
- S5: διουρητικά και παράγοντες κάλυψης.

Το όφελος των δοκιμών τρίχας για μη εγκεκριμένες ουσίες οφείλεται σαφώς στην προτιμησιακή ενσωμάτωση μητρικών ενώσεων στη μήτρα των τριχών. Αντίθετα, η απέκκριση στα ούρα περιορίζεται συχνά από τον βιομετασχηματισμό, ο οποίος δεν είναι διαθέσιμος για όλες τις ερευνητικές ουσίες ή τις ουσίες που κυκλοφορούν στη μαύρη αγορά (27).

Για παράδειγμα, αναβολικά στεροειδή έχουν βρεθεί στα μαλλιά που συλλέγονται από body-builders και συγκεκριμένα η νανδρολόνη κυμαίνεται μεταξύ 190 και 260 pg/mg, η στανοζολόλη από 130 έως 160 και η τεστοστερόνη από 45 έως 70 pg/mg. Άλλες ενώσεις που έχουν εντοπιστεί επιτυχώς στα μαλλιά είναι λίγες και μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η στανοζολόλη, η κλενβουτερόλη, η σαλβουταμόλη, οι εστέρες της, μεθυλο-τεστοστερόνης, δεϋδρομεθυλοτεστοστερόνη, μετενολόνη και η μετανδιενόνη (108). Οι αναλύσεις αίματος έχουν ήδη εφαρμοστεί με επιτυχία για την επίδειξη εξωγενούς εφαρμογής τεστοστερόνης με την ανίχνευση των εστέρων της από το GC -MS σε εθελοντές που λαμβάνουν μεμονωμένη εφαρμογή του ενός ή του άλλου εστέρα τεστοστερόνης. Σε αυτό το πλαίσιο η ανάλυση τριχών θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την επαλήθευση της λήψης εστέρων τεστοστερόνης και επιτεστοστερόνης και/ή άλλων σχετικών χημικών κατά τη διάρκεια διαχρονικών μελετών.

4.5. Νομοθεσία

Η διαδικασία ανάλυσης τριχών πρωτοεμφανίστηκε ως ιατροδικαστικό εργαλείο το 2008, όπου μια μητέρα που είχε απαγορευτεί να καταναλώνει αλκοόλ για ένα χρόνο σε μια διαμάχη επιμέλειας παιδιών έπρεπε να συλλέγει δείγμα μαλλιών, το οποίο οι τεχνικοί υποστήριξαν ότι είχε καταναλώσει αλκοόλ. Το Ανώτατο Δικαστήριο, αφού εξέτασε τα δεδομένα, απέρριψε τα αποτελέσματα των δοκιμών, θεωρώντας τα αναξιόπιστα. Πάνω από 10 χρόνια αργότερα, μια υπόθεση ανάλυσης τριχών ήρθε ξανά στο Ανώτατο Δικαστήριο, αλλά αυτή τη φορά το δικαστήριο δέχτηκε τα

ευρήματα. Όσο η εξέταση DNA έχει εξελιχθεί και έχει γίνει πιο ακριβής, η ανάλυση μαλλιών έχει γίνει επίσης πιο αξιόπιστη (110).

Ένα από τα κεντρικά ζητήματα που εντοπίζονται σχετικά με την ιατροδικαστική επιστήμη στην αίθουσα του δικαστηρίου είναι σε ποιο βαθμό ο δικαστής και η κριτική επιτροπή κατανοούν τα στοιχεία. Επίσης, κρίνεται κρίσιμο η κατανόηση να είναι ακριβής, και να είναι σε θέση να εφαρμόσουν τα σχετικά νομικά πρότυπα τη δεδομένη περίπτωση. Ωστόσο, η ανάπτυξη μιας σωστής κατανόησης των ιατροδικαστικών στοιχείων μπορεί να είναι δύσκολη. Η μέθοδος παρουσίασης της ιατροδικαστικής μαρτυρίας μπορεί να είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση των αποδεικτικών στοιχείων από τον δικαστή ή την ορκωτή επιτροπή. Σε περιπτώσεις που οι τρίτες είναι το μόνο στοιχείο ο εμπειρογνώμονας πρέπει να μεταφέρει με ακρίβεια την πραγματική αξία των αποδεικτικών στοιχείων (111).

Γενικά, τα αποτελέσματα των δοκιμών ουσιών, όπως όλες οι ιατρικές πληροφορίες σχετικά με τους εργαζόμενους, πρέπει να διατηρούνται εμπιστευτικές. Σύμφωνα με την Επιτροπή Ισότητας Ευκαιριών Απασχόλησης, "εάν τα αποτελέσματα μιας δοκιμής ουσιών αποκαλύπτουν την παρουσία μιας νόμιμα συνταγογραφούμενης φαρμάκου ή άλλων ιατρικών πληροφοριών, αυτές οι πληροφορίες πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εμπιστευτικό ιατρικό αρχείο". Ως βέλτιστη πρακτική, όλα τα αποτελέσματα των δοκιμών θα πρέπει να καταχωρούνται σε έναν εμπιστευτικό ιατρικό φάκελο ξεχωριστό από τον φάκελο του γενικού υπαλλήλου.

Το τμήμα που λαμβάνει αποτελέσματα δοκιμών ουσιών θα πρέπει να μοιράζεται αποτελέσματα μόνο σε βάση ανάγκης-γνώσης. Για παράδειγμα, η κοινή χρήση αποτελεσμάτων δοκιμών ουσιών με τους διαχειριστές πρώτης γραμμής είναι συχνά περιττή πέρα από τον προσδιορισμό του εάν τα αποτελέσματα είναι περασμένα ή αποτυγχάνουν. Οι κρατικοί νόμοι για τις δοκιμές ουσιών ή οι νόμοι περί απορρήτου μπορεί να ισχύουν για τα αποτελέσματα των δοκιμών ουσιών είτε συγκεκριμένα είτε γενικά ως θέμα προσωπικής ιδιωτικής ζωής (112).

Τα αποτελέσματα των δοκιμών ουσιών αναφέρονται γενικά ως θετικά ή αρνητικά. Το θετικό ή αρνητικό εύρημα αντικατοπτρίζει αν ο προσδιορισμός της ουσίας στο δείγμα είναι ίσος ή υπερβαίνει τα επίπεδα συγκέντρωσης αποκοπής που έχουν καθιερωθεί. Κάθε δικαστήριο πρέπει να καθορίσει τις τιμές αποκοπής και να ορίσει

το ποσοτικό επίπεδο πάνω από το οποίο θεωρείται ότι το τεστ είναι θετικό και κάτω από το οποίο δείχνει αρνητικό αποτέλεσμα (111).

ΕΠΙΛΟΓΟΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την τελευταία δεκαετία, η ανάλυση των τριχών έχει ενισχύσει σημαντικά τον ρόλο και τη φήμη της ως πολύτιμο εργαλείο έρευνας για την παροχή κρίσιμων πληροφοριών σχετικά με τη χρονολογική έκθεση των ατόμων σε στοχευόμενες χημικές ουσίες. Με τον αυξανόμενο ρόλο, αυξήθηκε επίσης η ευθύνη των τοξικολόγων να ερμηνεύσουν σωστά τα αποτελέσματα της ανάλυσης τρίχας, απαιτώντας σε βάθος μελέτη όλων των μηχανισμών με τους οποίους εξωγενείς ουσίες ενσωματώνονται μέσα στη δομή της κερατίνης και τελικά απελευθερώνονται στην τρίχα.

Μία από τις κύριες λειτουργίες του ιατροδικαστή-τοξικολόγου είναι να παράγει αποτελέσματα και να τα ερμηνεύει προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε ποινικές διώξεις, κάτι που συνεπάγεται αυστηρότητα για να επιβιώσει η δικαστική αντιπαράθεση και ο ιατροδικαστικός έλεγχος. Είναι σημαντικό οι αναλύσεις και οι ερμηνείες της παρουσίας φαρμάκων και άλλων δυνητικά τοξικών ενώσεων στις τρίχες να γίνονται με τρόπο που να είναι υπερασπιστές στο δικαστήριο.

Οι τοξικολογικές μελέτες στις τρίχες στοχεύουν στην κατανόηση των δυσμενών επιπτώσεων των φαρμάκων και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην υγεία, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία τεχνικών. Αυτές όλες οι τεχνικές πρέπει να ολοκληρώνονται με οργανωμένο τρόπο για να διασφαλιστεί η σωστή εξέλιξη της έρευνας. Μολονότι νέες μέθοδοι, τεχνικές και ιδέες έχουν φέρει πολλές προόδους στην κατανόηση των φαρμακοκινητικών μονοπατιών που ακολουθεί η κάθε ουσία στο σώμα, για τα αποτελέσματα οι τοξικολόγοι δεν παύουν να ανατρέχουν στη συγκέντρωση των πόρων ιστορικών θεμάτων και παρόμοιων υποθέσεων. Ένας σημαντικός αριθμός από τις πληροφορίες που μεταδίδονται στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία έχουν ληφθεί από περιπτωσιολογικές μελέτες που περιγράφονται σε δημοσιευμένες εργασίες, έρευνες ή προηγούμενες υποθέσεις. Ως εκ τούτου, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πολλές φορές μπορεί να είναι εμπειρική ή με τυπικά δεδομένα που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και χρησιμεύουν ως σημεία αναφοράς. Το γεγονός αυτό, η έλλειψη σαφών στοιχείων, οδηγεί σε επικρίσεις και προκαταλήψεις όσον αφορά την αξιοπιστία στην ποιότητα των μεθόδων και στη διαύγεια των αποτελεσμάτων.

Είναι σημαντικό να υπάρχει πάντα κατά νου, ότι οι έρευνες σε μεταθανάτια δείγματα δημιουργούν μια σειρά από πρόσθετες προκλήσεις στον ιατροδικαστή που δεν παρατηρούνται στην προθανάτια τοξικολογία, συγκεκριμένα προβλήματα που σχετίζονται με την αυτόλυση, τη μεταθανάτια ανακατανομή, την αποσύνθεση, ή την απουσία δειγμάτων. Ο καθορισμός του βέλτιστου μεγέθους ενός μεταθανάτιου ή εν ζώη δείγματος, προκειμένου να αποδοθεί αξιοπιστία στα αποτελέσματα είναι επίσης πάντα προβληματικός στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία. Για πολλά εργαστήρια, μεγέθη δειγμάτων μικρότερα από 10 είναι κοινά, αλλά όταν διεξάγονται περιπτώσεις ερευνών με σκοπό τη σύγκριση τους και την απεικόνιση κοινών χαρακτηριστικών, τα μεγέθη δειγμάτων θα πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερα. Για παράδειγμα, η κατανόηση της σχέσης μεταξύ της χρήσης παράνομων ουσιών και του κινδύνου ατυχήματος απαιτεί μεγέθη δειγμάτων πολλών εκατοντάδων. Επειδή η επαναδειγματοληψία είναι σπανίως δυνατή, συνιστάται η συλλογή ενός ελάχιστου συνόλου δειγμάτων. Συνεπώς, τα αποτελέσματα ερμηνεύονται αφού σταθμιστούν όλες αυτές οι μεταβλητές. Ακόμη και τότε, η ερμηνεία ορισμένων αποτελεσμάτων δεν είναι επαρκής. (3)

Η βιβλιογραφική αυτή έρευνα επιχειρεί να αποδώσει πίστωση στις συνεχείς προσπάθειες που καταβάλλει η επιστημονική κοινότητα για να εξισορροπήσει τις ταχέως διευρυνόμενες ευκαιρίες έρευνας που προσφέρουν οι τεχνολογικές εξελίξεις των αναλυτικών οργάνων, με την ανάγκη να ενισχυθεί η γνώση σχετικά με τους επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις δυσκολίες της εφαρμογής που τελικά καθορίζουν το αναλυτικό αποτέλεσμα της ανάλυσης της τρίχας. Ειδικότερα, εντοπίζονται οι πιθανές δυσκολίες από τη ζημιά που προκαλείται στη δομή της τρίχας και στα συστατικά της από φυσικούς και χημικούς παράγοντες, από το είδος της τρίχας και της περιεκτικότητάς της σε μελανίνη, από την εξάρτηση των κατανομών αναλυτών-στόχων κατά μήκος του άξονα της τρίχας, από τον κυρίαρχο τρόπο ενσωμάτωσης και αποβολής τους.

Λαμβάνοντας υπόψη έναν μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων επιστημονικών βιβλίων, ερευνών και άρθρων από το έτος 2013 μέχρι σήμερα, ο τομέας της ανίχνευσης φαρμάκων στις τρίχες φαίνεται να βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως η εγκληματολογία, ο έλεγχος ντόπινγκ, περιστάσεις επιμέλειας και φροντίδας παιδιών, έλεγχος στον εργασιακό χώρο και αρκετές ακόμα υποκατηγορίες, παρουσιάζοντας μάλιστα μεγάλη ανάπτυξη και ενασχόληση. Παρατηρήθηκαν σαφώς πολλές

δυσκολίες στον εντοπισμό ουσιών και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, πολλές μελλοντικές προτάσεις των μελετητών για γενικότερη βελτίωση στη μεθοδολογία και την οργάνωση αλλά και πιο ειδικές προτάσεις, βασιζόμενες σε πολύ συγκεκριμένες ουσίες που μελέτησαν οι ερευνητές.

Παρόλες τις επιστημονικές και τεχνολογικές προόδους, είναι αδύνατον να ανιχνευθούν όλες οι πιθανές ουσίες σε όλα τα δείγματα που λαμβάνονται. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να λαμβάνεται σαφώς υπόψη ο λόγος για οποιαδήποτε ανάλυση. Αν και οι βασικές αρχές παραμένουν οι ίδιες στους διαφορετικούς κλάδους της αναλυτικής τοξικολογίας, η φύση και η ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος μπορεί να ποικίλλουν ευρέως, όπως και η χρονική κλίμακα της οποίας απαιτείται το αποτέλεσμα και ο σκοπός του οποίου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί το αποτέλεσμα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν την επιλογή μεθόδων για μια συγκεκριμένη ανάλυση.

Οι στόχοι μιας τέτοιας ανάλυσης, για να εξυπηρετεί όλους τους προαναφερθέν σκοπούς, πρέπει να περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό των σαφών, κοινώς αποδεκτών και παγκοσμίως καθορισμένων επιτρεπτών επιπέδων έκθεσης του ενήλικα, παιδιού, νεκρού, εγκυμονούσας γυναίκας, εργαζομένου, αθλητή και όποιων άλλων ομάδων, στις εκάστοτε κατηγορίες παράνομων ή επιβλαβών ουσιών και κατ' επέκταση, τα όρια ανίχνευσής τους στις τρίχες. Τη μέτρηση των επιπέδων ενδογενών ενώσεων και μορίων για την αξιολόγηση της λειτουργίας και της βλάβης των οργάνων (κλινική χημεία). Την αναγνώριση μεταβολιτών και μακρομορίων για τον εντοπισμό μηχανισμών δράσης. Την συνεχή εξέλιξη και την πρόοδο των οργάνων χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας με επιστάμενη την προσοχή την ευαισθησία και την ειδικότητα. (4)

Η μη ιατρική χρήση νόμιμων συνταγογραφούμενων φαρμάκων από υγιή άτομα έχει αυξηθεί τρομερά τις τελευταίες δεκαετίες, ιδιαίτερα στους νέους. Οι ανησυχίες για την υγεία σχετικά με τον πιθανό εθισμό σε αυτά τα φάρμακα έχουν δημιουργήσει μια υψηλή ευαισθητοποίηση τόσο για τη φαρμακοβιομηχανία όσο και για τις κυβερνητικές υπηρεσίες σε όλον τον κόσμο, για βαθύτερη διερεύνηση της πιθανότητας κατάχρησης. Με γνώμονα τις κατευθυντήριες γραμμές του επιστημονικού χώρου και των επιτροπών των κυβερνήσεων, η φαρμακοβιομηχανία αναγκάζεται να αναλάβει αυξημένη ευθύνη για να προσδιορίζει λεπτομερέστερα τη δυνατότητα κατάχρησης νέων υποψήφιων φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ, κυρίως

για την προστασία του ασθενούς που θα χρησιμοποιήσει αυτό το φάρμακο όπως έχει συνταγογραφηθεί, αλλά και για την ευκολία διάθεσης και πρόσβασης σε αυτό εντός του υγιούς πληθυσμού. Ως εκ τούτου, πρέπει να υποβληθεί στους ρυθμιστικούς φορείς μια εκτενής Αξιολόγηση Ευθύνης κατά της κατάχρησης, η οποία να αποτελείται από προκλινικές έρευνες της φυσικής εξάρτησης και των ανταποδοτικών και ενισχυτικών ιδιοτήτων νέων υποψηφίων φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ, αλλά και των συνεπειών στην κλινική, ρυθμιστική και επίπεδο μορφής τελικού προϊόντος και τον επακόλουθο προγραμματισμό ως ελεγχόμενες ουσίες (DEA). (5) Η μέλετη της τρίχας για την ανίχνευση φαρμάκων μπορεί να βοηθήσει πολύ στο θέμα αυτό καθώς ως μήτρα, τα κύρια οφέλη της για ιατροδικαστικές δοκιμές φαρμάκων οφείλονται στην εξαιρετική αναδρομική της ιδιότητα, δηλαδή στη σημαντική αύξηση του χρονικού παραθύρου ευκαιριακής ανίχνευσης και στην ενσωμάτωση τόσο μητρικών ενώσεων όσο και των μεταβολιτών τους σε αυτήν. Όμως πέραν του επιστημονικού επιπέδου, η ηθική είναι ένα ζωτικό μέρος της τοξικολογικής λήψης αποφάσεων. Συχνά έχουμε επαρκείς πληροφορίες ή δεδομένα για να λάβουμε ορθές αποφάσεις προστασίας της υγείας. Η διευρυνόμενη επιρροή των τοξικολογικών επιστημών σε ατομικά, επιχειρηματικά και κοινωνικά ζητήματα προσδίδει μεγάλη ευθύνη που απαιτεί αυξανόμενη ευαισθησία στις ηθικές, νομικές και κοινωνικές επιπτώσεις της τοξικολογίας και της περιβαλλοντικής υγείας. (6)

Η προσοχή που δόθηκε στην ανάλυση τριχών χρονολογείται από τη δεκαετία του 60-70 για την ανίχνευση μετάλλων και από τη δεκαετία του 70-80 για ουσίες κατάχρησης και ιατρικά φάρμακα, σημειώνοντας σημαντική πρόοδο έως σήμερα και παρόλο το ευρύ φάσμα εφαρμογής, το ενδιαφέρον για αυτή τη μήτρα και την αξιολόγηση της έκθεσης σε οργανικούς ρύπους έχει καθυστερήσει εδώ και πολύ καιρό λόγω αναλυτικών περιορισμών. Η γενικότερη πρόοδος στις αναλυτικές επιστήμες τα τελευταία χρόνια συνοδευόμενη από μελέτες πεδίου που περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό ατόμων και από έρευνες για νέες χημικές οικογένειες ρύπων, έχει φτάσει στα επίπεδα ευαισθησίας που είναι απαραίτητα για τον εντοπισμό των (OPs) στα μαλλιά. Προκύπτουν ωστόσο ερωτήματα σχετικά με τη συγκεκριμένη εφαρμογή, όπως το ζήτημα της επαρκούς απολύμανσης των μαλλιών πριν από την ανάλυση. (7)

Ένας άλλος ευρύτατα διαδεδομένος τομέας κατάχρησης απαγορευμένων ουσιών και φαρμάκων είναι ο χώρος του αθλητισμού. Η ραγδαία αύξηση ανφερθέντων ατυχημάτων σε προσωπικό επίπεδο, ή και καταγγελιών, στο χώρο του αθλητισμού, με

την άτυπη κατηγορία ευθυνών στη χρήση παράνομων και επιβλαβών ουσιών οδηγεί στην ανάγκη άμεσης επιστημονικής πρόληψης. Ο έλεγχος ντόπινγκ ή το «αθλητικό τεστ» είναι ένα υψηλού προφίλ, αν και μικρό συστατικό της τοξικολογίας. Αυτό περιλαμβάνει πρωτίστως τον έλεγχο σε ούρα ή αίμα για ενώσεις που θεωρείται ότι προσφέρουν αθέμιτα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα. Ορισμένες ενώσεις χρησιμοποιούνται «εκτός συναγωνισμού» ή για να βοηθήσουν στην προπόνηση, ενώ άλλες είναι φάρμακα «αγωνιστικά» που δίνουν πλεονέκτημα τη στιγμή που ο αθλητής αγωνίζεται. Η αναδρομική όψη στην ανάλυση τριχών όπου επιτρέπει την κάλυψη μεγαλύτερων χρονικών περιόδων με βάση μια μόνο συλλογή δειγμάτων, αποτελεί εργαλείο κλειδί στην εξέταση και την αποφυγή τέτοιων περιστατικών. Κατάλληλη είναι η χρήση της και σε περιπτώσεις χαμηλών συχνοτήτων δοκιμών όπως απομακρυσμένες γεωγραφικές περιοχές ή ομάδες αθλητών χαμηλού κινδύνου. Η εμφάνιση περισσότερων και μεγαλύτερων φαρμάκων που βασίζονται σε πεπτίδια θα παρουσιάσει αναλυτικές προκλήσεις για τους τοξικολόγους. (116) Η εφαρμογή της ανάλυσης της τρίχας είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα σε περιπτώσεις ουσιών που απαγορεύονται ανά πάσα στιγμή (εντός και εκτός ανταγωνισμού) και θα μπορούσε να εφαρμοστεί με επιτυχία σε αναβολικούς παράγοντες, β-2 αγωνιστές, ορμόνες και ρυθμιστές μεταβολισμού. Για παράδειγμα η διαφοροποίηση της ενδογενούς τεστοστερόνης από την εξωγενή χορήγηση ενέσιμων εστέρων αντιπροσωπεύει μια εξαιρετική προσέγγιση για την ανάλυση τρίχας στον έλεγχο ντόπινγκ.(8)

Άλλες μελέτες εστιάζουν την προσοχή τους σε συγκεκριμένα χημικά μόρια που ανιχνεύονται συχνά στις τρίχες, επιστώντας την προσοχή και του τοξικολόγου και προτίνοντας βελτιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η πρόοδος της γνώσης σχετικά με τις μεθόδους αναλυτικού προσδιορισμού και την ερμηνεία σημαντικών χημικών μορίων όπως το αιθυλο γλυκουρονίδιο (EtG), και οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEEs) οδηγεί στην πρακτική εφαρμογή της ανάλυσης τριχών μεγαλύτερης κλίμακας από την ιατροδικαστική μελέτη μεταθανάτιας έκθεσης. Παρά την τεράστια όμως πρόοδο, απαιτούνται περαιτέρω προσπάθειες για να εναρμονιστούν οι αναλυτικές μέθοδοι και να αυξηθεί η ευαισθησία και η ακρίβεια για το EtG και το FAEE, να βελτιωθεί ο ποιοτικός έλεγχος, να βελτιστοποιηθούν οι αποκοπές και να αυξηθεί η αξιοπιστία της ερμηνείας. Συγκεκριμένα, ο τοξικολόγος θα πρέπει να γνωρίζει τους περιορισμούς αυτών των δεικτών και θα πρέπει να αποφεύγει την επίσημη και μη κρίσιμη εφαρμογή τους.(9)

Η ιατροδικαστική τοξικολογία εξακολουθεί να είναι ένας δυναμικός τομέας με εξελισσόμενες τεχνολογικές εφαρμογές. Οι μέθοδοι διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, ιδιαίτερα η υγρή χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), έχουν αυξηθεί σε σημασία. Αυτές οι τεχνολογίες παρέχουν μεγαλύτερες ευαισθησίες και ευελιξία για την ανίχνευση μεγαλύτερων και πιο πολικών ενώσεων που είναι δύσκολο ή αδύνατο να αναλυθούν με αέριες χρωματογραφικές μεθόδους. Η συνεχής ανάπτυξη ανοσοδοκιμών για ένα ευρύτερο φάσμα ενώσεων έχει διατηρήσει τους ανοσοπροσδιορισμούς ζωτικής σημασίας για το αναλυτικό οπλοστάσιο. Η φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης έχει επίσης γίνει πιο σημαντική στο πεδίο. Πιθανότατα, τα επόμενα χρόνια θα δούμε τη συνεχιζόμενη επιρροή του LC-MS/MS ως κυρίαρχου αναλυτικού εργαλείου. Αυτό είναι ιδιαίτερα αληθινό καθώς τα όργανα γίνονται μικρότερα, πιο προσιτά, αξιόπιστα και ευαίσθητα.

Επίσης, ο αυξανόμενος τομέας της φαρμακογονιδιοματικής και η έννοια της γενετικής αυτοψίας μπορεί να αλλάξουν δραματικά την ερμηνεία των συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Καθώς αποκτώνται περισσότερα στοιχεία σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ του γονότυπου και των φαινοτύπων ενός ατόμου και του μεταβολισμού του. Είναι πολύ πιθανό να συμβούν αλλαγές στη δοσολογία και στην ερμηνεία του τι θεωρείται τοξικό και θεραπευτικό.(116)

Η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα κρίσιμο βήμα στην εγκληματολογική αναλυτική τοξικολογία. Χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης με στόχο την αφαίρεση παρεμβολών από τα βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα, τους ιστούς και τα μαλλιά, τη μείωση των επιδράσεων της μήτρας και τη συγκέντρωση των αναλυτών-στόχων, μεταξύ άλλων. Με στόχο την ανάπτυξη ταχύτερων και πιο οικολογικών διαδικασιών, οι τεχνικές μικροεκχύλισης επεκτείνουν τις εφαρμογές τους τα τελευταία χρόνια. Η πλήρως αυτοματοποιημένη διαδικασία όχι μόνο θα βελτιώσει την απόδοση της ανάλυσης αλλά και θα μειώσει τα σφάλματα που προκαλούνται από τη χειροκίνητη λειτουργία. Η προετοιμασία νανοϋλικών και υλικών εξόρυξης σχεδιαστών που διαθέτουν λειτουργική επιλεκτικότητα θα ήταν χρήσιμη για την τεχνολογία μικροεξαγωγής. Όπως συμβαίνει σε άλλα πεδία, η προετοιμασία δειγμάτων με βάση τη μικροεκχύλιση θα βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές στη ρουτίνα και την έρευνα εγκληματολογικής τοξικολογικής ανάλυσης.(10)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Still KR, Watson KD, Wexler P. (2020). *History of toxicology*. In: *Information Resources in Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2021 Oct 23]. p. 11–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137246000025>
2. Caoa Y, Xi H, Zhang J. FORENSIC SCIENCE SEMINAR. In. Available from: <http://fss.xxyy.info/>
3. Elliott SP. (2021). Fundamentals of Analytical Toxicology, Clinical and Forensic, 2nd Edition. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2021 Mar 12 [cited 2021 Oct 24];45(3):e10–e10. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/45/3/e10/6047170>
4. soht [Internet]. Available from: <https://www.soht.org/>
5. Flanagan RJ, Braithwaite RA, Brown SS, Widdop B, de Wolff FA. *Analytical Toxicology Book Who.Pdf*. p. 212–9.
6. Mantinieks D, Gerostamoulos D, Wright P, Drummer O. (2018), The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis. *Forensic Sci Med Pathol*. 2018;14(3):349–57.
7. Moeller MR, Feyta P, Sachs H. (1993), Forensic Intmathal Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sci Int*. 1993;63:43–53.
8. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remião F, Marques A, Santos A, et al. (2010), Collection of biological samples in forensic toxicology. Vol. 20, *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010. p. 363–414.
9. ΓΚΟΛΙΑ Ι. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΛΗΨΗΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΟΠΙΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.
10. Kintz P. Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2018 Jan 31 [cited 2021 Mar 11];23(36). Available from: <http://www.eurekaselect.com/155997/article>
11. Βασιλική Γ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΑΙΣΘΗΤΙΚΗΣ-ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΓΥΝΑΙΚΩΝ. 2011.

12. Cooper GAA. Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection. In: Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology [Internet]. Elsevier Inc.; 2015. p. 1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801700-5.00001-7>
13. Στεργίου Β. Τα μέρη και η σύσταση της τρίχας. p. <https://www.beautyview.gr/%CF%84%CE%B1-%CE%BC%CE%A>.
14. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli E, et al. The human hair: From anatomy to physiology. *Int J Dermatol*. 2014 Mar;53(3):331–41.
15. Pascal Kintz, Alberto Salomone, Marco Vincenti. Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology - Pascal Kintz, Alberto Salomone, Marco Vincenti - Google Books [Internet]. 2015 [cited 2021 Feb 9]. Available from: [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=k__IBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=hair+analysis+forensic+toxicology+&ots=e1b6F516Ar&sig=KxCWNsbxgP_G6inqNKxjoQhWGgs&redir_esc=y#v=onepage&q=hair analysis forensic toxicology&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=k__IBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=hair+analysis+forensic+toxicology+&ots=e1b6F516Ar&sig=KxCWNsbxgP_G6inqNKxjoQhWGgs&redir_esc=y#v=onepage&q=hair%20analysis%20forensic%20toxicology&f=false)
16. Erdoğan B. Anatomy and Physiology of Hair. In: Hair and Scalp Disorders. InTech; 2017.
17. Murphrey MB, Agarwal S, Zito PM. Anatomy, Hair [Internet]. StatPearls. 2019 [cited 2021 Feb 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020684>
18. Poetzsch M, Baumgartner MR, Steuer AE, Kraemer T. Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging. *Drug Test Anal* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2021 Apr 27];7(2):143–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.1674>
19. Kuwayama K, Miyaguchi H, Iwata YT, Kanamori T, Tsujikawa K, Yamamuro T, et al. Different localizations of drugs simultaneously administered in a strand of hair by micro-segmental analysis. *Drug Test Anal*. 2018;10(4):750–60.
20. Palamar JJ, Le A, Guarino H, Mateu-Gelabert P. A comparison of the utility of urine- and hair testing in detecting self-reported drug use among young adult opioid users. *Drug Alcohol Depend*. 2019 Jul 1;200:161–7.
21. Chatterton C. External Contamination: Still a Debate? *Hair Anal Clin Forensic Toxicol*. 2015;47–70.

22. Pötsch L, Skopp G, Moeller MR. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. In: *Forensic Science International*. Elsevier; 1997. p. 25–35.
23. Taylor M, Lees R, Henderson G, Lingford-Hughes A, Macleod J, Sullivan J, et al. Comparison of cannabinoids in hair with self-reported cannabis consumption in heavy, light and non-cannabis users. *Drug Alcohol Rev* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Mar 14];36(2):220–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/dar.12412>
24. Flanagan RJ. Developing an analytical toxicology service: Principles and guidance. *Toxicol Rev*. 2004;23(4):251–63.
25. Cuypers E, Flinders B, Boone CM, Bosman IJ, Lusthof KJ, Van Asten AC, et al. Consequences of Decontamination Procedures in Forensic Hair Analysis Using Metal-Assisted Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis. *Anal Chem*. 2016;88(6):3091–7.
26. Society of Hair Testing. Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases Society of Hair Testing Criteria for mass spectrometric analysis. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2004;145:83–4. Available from: http://www.soht.org/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf
27. Salomone A, Gazzilli G, Di Corcia D, Gerace E, Vincenti M. Determination of cathinones and other stimulant, psychedelic, and dissociative designer drugs in real hair samples. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(8):2035–42.
28. Palamar JJ, Salomone A, Vincenti M, Cleland CM. Detection of “bath salts” and other novel psychoactive substances in hair samples of ecstasy/MDMA/“Molly” users. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Mar 14];161:200–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.02.001>
29. Caudevilla-Gálligo F, Ventura M, Indave Ruiz BI, Fornís I. Presence and composition of cathinone derivatives in drug samples taken from a Drug Test Service in Spain (2010-2012). *Hum Psychopharmacol Clin Exp* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2021 Mar 21];28(4):341–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hup.2296>
30. 22. Montesano C, Vannutelli G, Massa M, Simeoni MC, Gregori A, Ripani L, et al. Multi-class analysis of new psychoactive substances and metabolites in hair by pressurized liquid extraction coupled to HPLC-HRMS.

- Drug Test Anal [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Mar 28];9(5):798–807. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2043>
31. 23. Oliveira M, Amorim A. Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(24):10377–91.
 32. Kintz P. (2017). Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls. *Current pharmaceutical design*, 23(36), 5480–5486. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170929155628>.
 33. Barbosa J, Faria J, Carvalho F, Pedro M, Queirós O, Moreira R, et al. Hair as an alternative matrix in bioanalysis. *Bioanalysis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2021 May 17];5(8):895–914. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.13.50>
 34. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Vol. 218, *Forensic Science International*. 2012. p. 20–4.
 35. Usman, M., Naseer, A., Baig, Y. et al. (2019). Forensic toxicological analysis of hair: a review. *Egypt J Forensic Sci* 9, 17 <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0119-5>.
 36. Boumba, V. A., Ziavrou, K. S., & Vougiouklakis, T. (2006). Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *International journal of toxicology*, 25(3), 143–163. <https://doi.org/10.1080/10915810600683028>.
 37. Samanidou, V., (2016), The challenges in hair analysis from the perspective of an analytical chemist, *Journal of Applied Bioanalysis*, 2(4), 103-107.
 38. Eastman, R. R., Jursa, T. P., Benedetti, C., Lucchini, R. G., & Smith, D. R. (2013). Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environmental science & technology*, 47(3), 1629–1637. <https://doi.org/10.1021/es3035297>.
 39. Khajuria, H., Nayak, BP., Badiye, A., (2018), Toxicological hair analysis: pre-analytical, analytical and interpretive aspects. *Med Sci Law*, 58, 137–146.
 40. Chen Y, Guo J, Xing S, Yu H, Huan T. (2021). Global-Scale Metabolomic Profiling of Human Hair for Simultaneous Monitoring of Endogenous Metabolome, Short- and Long-Term Exposome. *Front Chem*. 12;9:674265. doi: 10.3389/fchem.2021.674265. PMID: 34055742; PMCID: PMC8149753.

41. Kronstrand, R., Forsman, M., & Seldén, T. (2015). Hair Sample Preparation, Extraction, and Screening Procedures for Drugs of Abuse and Pharmaceuticals. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*, 23–46. doi:10.1016/b978-0-12-801700-5.00002-9.
42. Klein, J., Karaskov, T., Koren, G., (2000), Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience. *Forensic Sci Int*, 107:281–288.
43. Negrusz A and Cooper G. (2013), *Clarke's analytical forensic toxicology*. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press.
44. Zafarina, Z., & Panneerchelvam, S. (2009). Analysis of hair samples using microscopical and molecular techniques to ascertain claims of rare animal species. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 16(3), 35–40.
45. FBI, <https://www.fbi.gov/>.
46. Wang, X., & Drummer, O. H. (2015). Review: Interpretation of drug presence in the hair of children. *Forensic Science International*, 257, 458–472. doi:10.1016/j.forsciint.2015.10.0.
47. Orfanidis, A., Mastrogianni, O., Koukou, A., Psarros, G., Gika, H., Theodoridis, G., & Raikos, N. (2017). A GC-MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1047, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.011>.
48. Remane, D., Wissenbach, D. K., & Peters, F. T. (2016). Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry*, 49(13-14), 1051–1071. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.07.
49. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. (2012), *Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair*. Vol. 218, Forensic Science International. 2012. p. 20–4.
50. Shah, I., Petroczi, A., Uvacsek, M., Ránky, M., & Naughton, D. P. (2014). Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic multiple reaction monitoring with LC-MS/MS. *Chemistry Central journal*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0073-0>.
51. Hegstad, S., Khiabani, H. Z., Kristoffersen, L., Kunøe, N., Lobmaier, P. P., & Christophersen, A. S. (2008). Drug screening of hair by liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 32(5), 364–372. <https://doi.org/10.1093/jat/32.5.364>.
52. Gottardo, R., Bortolotti, F., De Paoli, G., Pascali, J. P., Miksik, I., & Tagliaro, F. (2007). Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1159(1-2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.011>
 53. https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitatin_g_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf.
 54. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goulle J, Ludes B (2000) Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography–ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 107:381–388.
 55. Sabzevari O, Abdi Kh, Amini M and Shafice A. (2004), Application of a simple and sensitive GC-MS method for determination of morphine in the hair of opium abusers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004; 379: 120–124.
 56. Matos, M. P. V., & Jackson, G. P. (2020). Compound-specific isotope analysis of human hair: predicting behaviors and biometrics beyond dietary factors. *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/acs.analchem.9b04085.
 57. Kintz, P., Bundeli, P., Brenneisen, R., & Ludes, B. (1998). Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program. *Journal of analytical toxicology*, 22(3), 231–236. <https://doi.org/10.1093/jat/22.3.231>.
 58. Musshoff, F., Lachenmeier, K., Wollersen, H., Lichtermann, D. and Madea, B. (2005). Opiate concentrations in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program and from opiate-associated fatalities. *Journal of Analytical Toxicology*, 29, 345-352.
 59. Pragst, F., Rothe, M., Moench, B., Hastedt, M., Herre, S., & Simmert, D. (2010). Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. *Forensic Science International*, 196(1-3), 101–110. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.0.
 60. <https://gtfch.org>
 61. <https://www.iso.org/home.html>

62. Nielsen, M., & Johansen, S. S. (2020). Internal quality control samples for hair testing. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 188, 113459. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113459>.
63. <https://reliabledrugtest.com/child-exposure-testing/>
64. Wang, X., Johansen, S. S., Nielsen, M. K. K., & Linnet, K. (2018). Hair analysis in toxicological investigation of drug-facilitated crimes in Denmark over a 8-year period. *Forensic Science International*, 285, e1–e12. doi:10.1016/j.forsciint.2018.01.021.
65. Falcon, M., Pichini, S., Joya, J., Pujadas, M., Sanchez, A., Vall, O., ... Pellegrini, M. (2012). Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains. *Forensic Science International*, 218(1-3), 92–96. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.0.
66. Høiset, G., Arnestad, M., Karinen, R., Morini, L., Rogde, S., Sempio, C., ... Øiestad, Å. M. L. (2017). Is Hair Analysis Useful in Postmortem Cases? *Journal of Analytical Toxicology*, 42(1), 49–54. doi:10.1093/jat/bkx077.
67. Kempson, I. M., & Lombi, E. (2011). Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status. *Chemical Society reviews*, 40(7), 3915–3940. <https://doi.org/10.1039/c1cs15021a>.
68. https://www.samhsa.gov/sites/default/files/meeting/documents/july_2013_bourland.pdf.
69. Huang, L., & Beauchemin, D. (2014). Ethnic background and gender identification using electrothermal vaporization coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry for forensic analysis of human hair. *J. Anal. At. Spectrom.*, 29(7), 1228–1232. doi:10.1039/c4ja00071d
70. https://research.gold.ac.uk/id/eprint/25875/1/9_1_2018.pdf.
71. Chojnacka K. (2010). Biosorption and bioaccumulation--the prospects for practical applications. *Environment international*, 36(3), 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>.
72. Shimomura, Y., & Christiano, A. M. (2010). Biology and genetics of hair. *Annual review of genomics and human genetics*, 11, 109–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-021610-131501>.

73. Appenzeller, B.M.R., Hardy, E.M., Grova, N. et al. (2017). Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model. *Arch Toxicol* 91, 2813–2825 <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1910-9>.
74. Al-Delaimy, W. K. (2002). Review: Hair as a Biomarker for Exposure to Tobacco Smoke. *Tobacco Control*, 11(3), 176–182. <http://www.jstor.org/stable/20208044>
75. Gerstenberg B, Schepers G, Voncken P, et al. (1995), Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab Dispo*;23:143–8.
76. <https://www.sciencedirect.com>
77. Pragst F., R.M., Spiegel K., Sporkert F. (1998). Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments—A timetable of drug exposure? *Forensic Science Reviews* 10, 30.
78. <https://www.healthline.com>
79. <https://www.lantanarecovery.com>.
80. Meng P, Zhu D, He H, Wang Y, Guo F, Zhang L (2009) Determination of amphetamines in hair by GC/MS after small-volume liquid extraction and microwave derivatization. *Anal Sci* 25:1115–1118
81. Iglesias-González, A., Hardy, E. M., & Appenzeller, B. M. R. (2020). Cumulative exposure to organic pollutants of French children assessed by hair analysis. *Environment International*, 134, 105332. doi:10.1016/j.envint.2019.105332.
82. Bost R. O. (1993). Hair analysis--perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forensic science international*, 63(1-3), 31–42. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90257-b](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90257-b).
83. Kidwell, D. A., Lee, E. H., & DeLauder, S. F. (2000). Evidence for bias in hair testing and procedures to correct bias. *Forensic science international*, 107(1-3), 39–61. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(99\)00148-6](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(99)00148-6).
84. Pichini, S., Altieri, I., Pellegrini, M., Pacifici, R., & Zuccaro, P. (1997). Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic science international*, 84(1-3), 243–252. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(96\)02068-3](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(96)02068-3).

85. Tsanaclis L, Wicks J. (2015), Workplace Drug Testing. In: Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology [Internet]. Elsevier Inc.; 2015. p. 197–239. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801700-5.00008-X>.
86. Tsanaclis, L., & Wicks, J. F. (2007). Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample. *Forensic science international*, 170(2-3), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.033>.
87. Marrinan, S., Roman-Urrestarazu, A., Naughton, D., Levvari, E., Collins, J., Chilcott, R., ... Corazza, O. (2017). Hair analysis for the detection of drug use-is there potential for evasion? *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 32(3), e2587. doi:10.1002/hup.2587.
88. Luong, S., & Fu, S. (2013). Detection and identification of 2-nitro-morphine and 2-nitro-morphine-6-glucuronide in nitrite adulterated urine specimens containing morphine and its glucuronides. *Drug Testing and Analysis*, 6(3), 277–287. doi:10.1002/dta.1476.
89. Ammann, D., Becker, R., Kohl, A., Hänisch, J., & Nehls, I. (2014). Degradation of the ethyl glucuronide content in hair by hydrogen peroxide and a non-destructive assay for oxidative hair treatment using infra-red spectroscopy. *Forensic Science International*, 244, 30–35. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.
90. Eisenbeiss, L., Binz, T. M., Baumgartner, M. R., Kraemer, T., & Steuer, A. E. (2020). Towards Best Practice in Hair Metabolomic Studies: Systematic Investigation on the Impact of Hair Length and Color. *Metabolites*, 10(10), 381. <https://doi.org/10.3390/metabo10100381>.
91. Chèze, M., Duffort, G., Deveaux, M., & Pépin, G. (2005). Hair analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003–May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Science International*, 153(1), 3–10. doi:10.1016/j.forsciint.2005.04.0.
92. Salomone, A., Gerace, E., Di Corcia, D., Alladio, E., Vincenti, M., & Kintz, P. (2019). Hair analysis can provide additional information in doping and forensic cases involving clostebol. *Drug testing and analysis*, 11(1), 95–101. <https://doi.org/10.1002/dta.2469>

93. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/attachments/13346/Analysis%20of%20practices%20of%20PM%20toxicology%20of%20DRD%20in%20Europe_EM_CDDA%20Technical%20report.pdf.
94. Salomone A, Gazzilli G, Di Corcia D, Gerace E, Vincenti M. (2016), Determination of cathinones and other stimulant, psychedelic, and dissociative designer drugs in real hair samples. *Anal Bioanal Chem.* 408(8):2035–42.
95. Castro, A.L., Tarelho, S., Dias, M., Reis, F., Teixeira, H.M. (2016), Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the postmortem interval. *International, Journal of Legal Medicine*, 130, 959–965.
96. Auwärter, V., Kiessling, B., & Pragst, F. (2004). Squalene in hair--a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. *Forensic science international*, 145(2-3), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.030>
99. Chatterton C. (2015), External Contamination: Still a Debate? *Hair Anal Clin Forensic Toxicol.* 2015;47–70.
100. Robertson J. Clarke's analytical forensic toxicology. *Aust J Forensic Sci* [Internet]. (2008)40(2):172–172. Available from: [https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=UmWCCDcmqEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=forensic+toxicology+analysis&ots=IYYYP4jaRWW&sig=aznCYg9fV4n5ol-8l8ik4uYr_GM&redir_esc=y#v=onepage&q=forensic toxicology analysis&f=false](https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=UmWCCDcmqEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=forensic+toxicology+analysis&ots=IYYYP4jaRWW&sig=aznCYg9fV4n5ol-8l8ik4uYr_GM&redir_esc=y#v=onepage&q=forensic%20toxicology%20analysis&f=false).
101. Barroso M, Gallardo E, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz JA. Hair: A complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology [Internet]. Vol. 3, Bioanalysis. 2011 [cited 2021 Mar 11]. p. 67–79. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.10.171>
102. Moosmann B, Roth N, Auwärter V. (2015) Finding cannabinoids in hair does not prove cannabis consumption. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Oct 7 [cited 2021 Jul 25];5(1):1–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep14906>
103. Yin S. (2010), Malicious use of pharmaceuticals in children. *J Pediatr* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jul 25];157(5). Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022347610004464?token=0A708CB2275FAD7BC235528C5D4B85E79681D8CC471917E3E5D83D83112F2B6CC5>

[F9A8394412D243A4DD217AA8A3D196&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210725161608.](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5764-0_11)

104. Carroquino MJ, Posada M, Landrigan PJ. (2013), Environmental Toxicology: Children at Risk. *Environ Toxicol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jul 26];239–91. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5764-0_11.
105. Kintz P. *Experiences in Child Hair Analysis*. In: *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. Elsevier Science Ltd.; 2015. p. 161–78.
106. Jurado C. *Forensic Applications of Hair Analysis*. In: *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. Elsevier Science Ltd.; 2015. p. 241–73.
107. WADA, <https://www.wada-ama.org/>.
108. Rivier, L. (2000). Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Science International*, 107(1-3), 309–323. doi:10.1016/s0379-0738(99)00175-.
109. Thieme, D., & Anielski, P. (2015). Doping, Applications of Hair Analysis. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*, 275–299. doi:10.1016/b978-0-12-801700-5.00010-8.
110. <https://www.criminallnews.org>.
111. <https://www.ojp.gov>.
112. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remião F, Marques A, Santos A, et al. (2010), Collection of biological samples in forensic toxicology. Vol. 20, *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010. p. 363–414.
113. Gad SC. (2020), *Analytical Toxicology*. In: *Information Resources in Toxicology* (Fifth Edition) [Internet]. Academic Press; 2020 p. 355–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137246000074>.
114. Teuns GBA. *Substances of abuse*. In: *Information Resources in Toxicology*. Academic Press; 2020. p. 513–20.
115. Gilbert SG. *Ethical considerations*. *Inf Resour Toxicol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Nov 1];355–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137246000323>.
116. Bobst S. (2020), Forensic toxicology. *Inf Resour Toxicol*. 1;387–90.
117. He Y, Concheiro-Guisan M. (2019). Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(1):1–