

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΣΤΩΝ: ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ
ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΙΣΤΟ
ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΟΥΣ
ΣΚΟΠΟΥΣ - ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Χρυσούλα Γούτα



Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία
Υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΜΣ Τοξικολογίας

Λάρισα, Φεβρουάριος 2023

**BONE TOXICOLOGICAL ANALYSIS: PHARMACOKINETICS OF BONE
DEPOSITION AND ACCUMULATION OF XENOBIOTICS IN SKELETAL TISSUE
AND THE ROLE OF ANALYTICAL METHODS FOR FORENSIC PURPOSES -
LIMITATIONS AND CHALLENGES**

By

Chrysoula Gouta



A Master's Thesis

Submitted to the Department of Biochemistry and Biotechnology
University of Thessaly

In fulfilment of the Requirements
For a Master's Degree in Toxicology

February 2023

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Δρ. Λήδα Κοβάτση, Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας

Τριμελής Επιτροπή:

Δρ. Λήδα Κοβάτση, Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας

Δρ. Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας

Δρ. Ευτυχία Ασπροδίνη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΟΣΤΟΥ	10
ΤΥΠΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	12
1. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ	12
2. ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ	13
3. ΟΣΤΕΟΚΥΤΤΑΡΑ	14
ΘΕΜΕΛΙΟΣ ΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΣ ΝΕΡΟΥ	15
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗΣ	16
1. ΟΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	16
2. ΟΣΤΕΟΣΥΝΘΕΣΗ	17
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗΣ	19

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	20
1. ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	21
2. ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ	23
3. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	24
4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ	26
5. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	27
6. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	29
7. ΧΗΜΙΚΑ ΟΠΛΑ	30
8. ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΑ	31
9. ΒΕΝΖΟΔΙΑΖΕΠΙΝΕΣ ΚΑΙ ΟΠΙΟΕΙΔΗ	32

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΟΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	32
1. ΟΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	34
2. ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ	35
3. ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	36
4. ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗΣ	37
5. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ	38
6. ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ	40
7. ΙΔΙΟΣΥΣΤΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	41
8. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	42
ΟΔΟΝΤΕΣ ΩΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	44
ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	45

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ	48
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	50
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	52
ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	54
1. ΠΑΘΗΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	55
2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	55
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ	56
4. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	57
ΜΕΘΟΔΟΣ QuEChERS	58
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	59
1. ELISA	60
2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	64
3. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	70
ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	73
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	80
1. ΣΧΗΜΑΤΑ	80
2. ΕΙΚΟΝΕΣ	81
3. ΠΙΝΑΚΕΣ	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επιστήμη της Τοξικολογίας έχει παρουσιάσει τα τελευταία χρόνια ραγδαία ανάπτυξη χάρη στη συμβολή μελετητών από πολλά διαφορετικά επιστημονικά πεδία. Η οστική τοξικολογία, ως υποκλάδος αυτής, άρχισε να εξελίσσεται δειλά στα μέσα του 20^{ου} αιώνα και εξ αρχής προϋπέθετε την συγκέντρωση ετερόκλητων γνώσεων και δεδομένων τόσο από βιολογικές επιστήμες και επιστήμες υγείας όσο και από θεωρητικούς κλάδους. Πρόκειται, επομένως, για ένα αντικείμενο βαθιά διεπιστημονικό, η μελέτη του οποίου μπορεί να διεξαχθεί σφαιρικά μόνον υπό την επίβλεψη ομάδας επιστημόνων, καθένας από τους οποίους μπορεί να συμβάλει με ξεχωριστό τρόπο στη γνώση. Το Σχήμα 1 δίνει μόνο μία ιδέα της πληθώρας των κλάδων που ασχολούνται με την τοξικολογία των οστών.

Σε μία προσπάθεια να ορίσουμε τον αναπτυσσόμενο αυτόν τομέα, θα λέγαμε πως η τοξικολογία των οστών αποτελεί επιστημονική εξειδίκευση, που έχει ως στόχο την εφαρμογή των αρχών της τοξικολογικής επιστήμης επί ενός συγκεκριμένου ιστού, του οστικού ιστού. Αναπτύσσεται τόσο στους κόλπους της ιατροδικαστικής επιστήμης όσο και έξω από αυτήν. Στην δεύτερη περίπτωση η οστική τοξικολογία ασχολείται με τις στοχευμένες τοξικές επιδράσεις των διαφόρων εξωγενών ενώσεων στα οστά αλλά και με το σχεδιασμό, την οργάνωση και τη διεξαγωγή προκλινικών και κλινικών μελετών κατά τη διαδικασία έγκρισης των νέων φαρμακευτικών ουσιών εστιάζοντας στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική αυτών στον οστίτη ιστό. Στα πλαίσια αυτά αξιοποιούνται εργαλεία που ανιχνεύουν την ανταπόκριση των οστών στα χημικά ερεθίσματα, μεταξύ των οποίων εξειδικευμένοι βιοχημικοί δείκτες, τεχνικές σκελετικής απεικόνισης, οργανοειδική οστική ιστοπαθολογία και ιστομορφομετρία και γνώσεις βιοτεχνολογίας και μηχανικής.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στις πληροφορίες και τις προκλήσεις που σχετίζονται με τον τομέα της ιατροδικαστικής οστικής τοξικολογίας, δηλαδή την μελέτη της αλληλεπίδρασης των ξενοβιοτικών ουσιών με τον οστίτη ιστό και τη σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής για την πρόοδο της ιατροδικαστικής διερεύνησης. Παρ' ότι η ανάπτυξη του εν λόγω κλάδου ήταν αξιοσημείωτη εδώ και περίπου μισό αιώνα, εντούτοις η γνώση βασίζεται ακόμα στην παρατήρηση. Όπως θα γίνει φανερό και στη συνέχεια, οι έρευνες στην πλειονότητά τους περιορίζονται στην ανίχνευση ή μη διαφόρων ουσιών στα οστά, στους οδόντες και στο μυελό των οστών, χωρίς τις περισσότερες φορές να εξάγεται κάποιο συμπέρασμα σχετικά με τη σημασία των αποτελεσμάτων. Ακόμη και μέσα σε αυτά τα περιορισμένα πλαίσια η βιβλιογραφία είναι ακόμα κάθε άλλο παρά πλήρης σχετικά με την καταλαγογράφηση των ανιχνεύσιμων ξενοβιοτικών.

Με απλά λόγια, η προσοχή των επιστημόνων έχει εστιαστεί μονομερώς σε ενώσεις αυξημένου ενδιαφέροντος, όπως οι ουσίες κατάχρησης, ενώ οι μελέτες που αφορούν άλλου τύπου δηλητήρια

όπως τοξίνες, ενδοκρινικούς διαταράκτες, φυτοπροστατευτικά και οργανικούς ρυπαντές είναι πολύ περιορισμένες και ελλιπείς. Σπανιότερα, οι προαναφερθείσες μελέτες εξάγουν συμπεράσματα ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μέχρι και σήμερα αξιοπρόσεκτη θέση για την τοξικολογία των οστών μέσα στους κόλπους της ιατροδικαστικής επιστήμης. Πράγματι, τα οστά, οι οδόντες και ο μυελός αποτελούν συνήθως τις τελευταίες επιλογές για διεξαγωγή τοξικολογικών μελετών καθώς όχι μόνον περιθωριοποιούνται από την ύπαρξη πιο προσιτών υλικών όπως το αίμα, αλλά επιπλέον η ανάλυσή τους δεν παρέχει την απαραίτητη ασφάλεια στον τοξικολόγο ούτε σε επίπεδο επιστημονικό αλλά ούτε και σε επίπεδο δικανικό.

Πρώτος και σημαντικότερος λόγος για την παραπάνω αβεβαιότητα αποτελεί η έλλειψη ύπαρξης σαφών μεθόδων δειγματοληψίας, ιστικής διατήρησης, απομόνωσης των ξενοβιοτικών και ανάλυσης (ανίχνευση, ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση). Αυτόματα, δεδομένης της μεθοδολογικής ελευθερίας τα αποτελέσματα κάθε επιστημονικής ομάδας παύουν να είναι συγκρίσιμα, πόσο μάλλον διαφωτιστικά για την επισφράγιση της αιτίας του θανάτου. Σε δεύτερο επίπεδο και ως συνέπεια του παραπάνω, σημείο πρόκλησης αποτελεί η ερμηνεία ενός οποιουδήποτε αποτελέσματος με σχέση αιτίου-αιτιατού. Για την θεμελίωση ενός τέτοιου ερμηνευτικού εργαλείου απαιτείται, εκτός από ανάπτυξη μεθοδολογίας, και η ταυτόχρονη δημιουργία βάσεων δεδομένων που θα λαμβάνουν υπόψιν πολυάριθμες παραμέτρους και θα υπολογίζουν τα επιτρεπτά ποσοτικά όρια για κάθε ένα από τα ξενοβιοτικά που δύνανται να ανιχνευτούν σε οστικό ιστό.

Η επίτευξη ενός τέτοιου στόχου είναι, προς το παρόν, πολύ μακριά από την πραγματικότητα με τα υπάρχοντα δεδομένα. Εντούτοις, οι νέες τεχνολογίες έχουν αρχίσει να διεισδύουν στην τοξικολογική έρευνα και να προσφέρουν νέες διεξόδους στον τομέα της τοξικολογίας οστών που, λόγω του τεράστιου όγκου και της πολυπλοκότητας των πληροφοριών, κινδυνεύει να βαλτώσει. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία, η στερεοσκοπία, η αναδυόμενη κουλτούρα των biomimetics, η γονιδιωματική και τα συστήματα νανοσωματιδίων έχουν ήδη κάνει εμφανή την παρουσία τους μέσα στα ευρύτερα πεδία της οστικής τοξικολογίας θέτοντας τα θεμέλια για πρόοδο μέσα από διαφορετικά μονοπάτια από τα μέχρι τώρα υπάρχοντα. Επίσης, οι δορυφόρες επιστήμες της ταφονομίας (γεωλογία, εντομολογία, αρχαιολογία κ.ά.) έχουν πολλά να προσφέρουν χάρη στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, που εξηγούν με ακρίβεια τα μεταθανάτια φαινόμενα της πορείας ζωής του ξενοβιοτικού.

Η εν λόγω ανασκόπηση, που εκπονείται στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Τοξικολογίας επιχειρεί να συγκεντρώσει το σύνολο των πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς εναπόθεσης των ξενοβιοτικών σε οστικό ιστό και να παραθέσει τα δεδομένα που η ιατροδικαστική επιστήμη έχει εξάγει σχετικά με την ποικιλότητα των παραμέτρων που

παρεμβάλλονται στη διαδικασία της ποσοτικοποίησης. Επιπλέον, επιχειρείται εκτενής συζήτηση σχετικά με την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων από διαφορετικές επιστημονικές ομάδες και συγκριτικός σχολιασμός αυτών. Ο μυελός των οστών και οι οδόντες δεν αποτελούν κεντρικό αντικείμενο της εργασίας παρά περιγράφονται ακροθιγώς.

Η συγγραφή της παρούσας ανασκόπησης δεν περιορίζεται από κανενός είδους σύγκρουση συμφερόντων και αντανakλά αποκλειστικά αποτέλεσμα εκτενούς βιβλιογραφικής έρευνας. Η συγγραφέας είναι υπεύθυνη για το πλήρες περιεχόμενο, που συντάχθηκε με βάση τις αρχές των Καλών Επιστημονικών Πρακτικών¹. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδονται στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ Λήδα Κοβάτση, για τη βιβλιογραφική και επιστημονική καθοδήγηση και τη συνολική υποστήριξη ως προς την εκπόνηση της έρευνας.

¹ Good Scientific Practices (GSP)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία εξαντλεί το θέμα της οστικής ιατροδικαστικής τοξικολογίας παραθέτοντας πλήθος πληροφοριών που έχουν εξαχθεί μέσα από την ερευνητική δραστηριότητα της τελευταίας εικοσαετίας. Θεμελιώδης γνώση για την περαιτέρω κατανόηση του τομέα προκύπτει μέσα από τις βασικές επιστήμες της βιολογίας, της βιοχημείας και της ιστολογίας. Επομένως, στο πρώτο μέρος της εργασίας δίνεται μία εκτεταμένη επεξήγηση και ανάλυση της οστικής δομής σε ανατομικό, κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, και παρουσιάζονται οι πληροφορίες αυτές που σχετίζονται με τη λειτουργία του εν λόγω ιστού σε συνάρτηση με τη φαρμακοκινητική² διαφόρων ουσιών. Καίριο ρόλο στη διαδικασία της εναπόθεσης διαδραματίζουν οι υδάτινες αποθήκες και οι διαδικασίες της οστικής αναδόμησης που, υπό φυσιολογικές συνθήκες, λειτουργούν αέναα με σκοπό τη ρύθμιση της οστικής επιδιόρθωσης. Στη συνέχεια γίνεται λόγος για τους πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εναπόθεση ουσιών στα οστά και επιχειρείται η όσο το δυνατόν πληρέστερη παρουσίαση των πληροφοριών σχετικά με τη συμπεριφορά κάθε ομάδας ξеноβιοτικών ή μη κατά τη διάρκεια της επαφής αυτών με το πλέγμα του υδροξυαπατίτη και τα συστατικά της θεμελίου ουσίας. Όπως είναι φανερό η μέχρι τώρα γνώση είναι σε μεγάλο βαθμό ελλιπής και το ζήτημα της εναπόθεσης απαιτεί μελέτη σε βάθος για να γίνει σε ικανοποιητικό βαθμό κατανοητό από την επιστημονική κοινότητα. Στο τρίτο μέρος της εργασίας το ενδιαφέρον στρέφεται στην ιατροδικαστική συνιστώσα του κλάδου και στους λόγους που η γνώση δεν είναι ακόμα εφαρμόσιμη για δικανικούς σκοπούς. Πιο συγκεκριμένα, η προσπάθεια για ποσοτικοποίηση και η δυνατότητα ερμηνείας και σύγκρισης των αποτελεσμάτων αντιμετωπίζουν έναν μεγάλο αριθμό προκλήσεων που σχετίζονται με πλήθος παραγόντων από τον οργανισμό, το ξеноβιοτικό, τις συνθήκες του θανάτου και την επιστημονική μεθοδολογία. Οι παράγοντες αυτοί παρατίθενται και αναλύονται με επαρκή βιβλιογραφική τεκμηρίωση. Το τελευταίο μέρος της εργασίας εστιάζει στις μεθόδους ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των ξеноβιοτικών και στον ρόλο της αναλυτικής χημείας με το οστό ως αναλυτικό υπόστρωμα. Η ποικιλότητα των δημοσιευμένων μελετών καθιστά αναγκαία τη συγκριτική ματιά και την αναζήτηση των προτερημάτων και των μειονεκτημάτων που κάθε μία από αυτές παρουσιάζει. Καταληκτικά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να εμφανίζει η ιδέα της δημιουργίας μίας βάσης δεδομένων που θα διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την ερμηνεία των ευρημάτων και την ένταξη της οστικής τοξικολογίας στην καθ' ημέραν ιατροδικαστική πράξη.

² Πρόκειται για τις επιδράσεις που ασκεί το σώμα στο φάρμακο σε αντιδιαστολή με τη φαρμακοδυναμική που περιλαμβάνει το σύνολο των επιδράσεων που ασκούνται από το φάρμακο στον ιστό.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΟΣΤΟΥ

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από διακόσια έξι οστά, που παρουσιάζουν ορισμένα κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά, αλλά και πολλές διαφορές τόσο στη μικροσκοπική δομή όσο και στη φυσιολογία, ανάλογα με την ανατομική θέση, τη λειτουργία, τη μηχανική και τα ιδιοσυγκρασιακά χαρακτηριστικά του ατόμου (ηλικία, φύλο, οστική επιβάρυνση, ηλεκτρολυτικό προφίλ, μυοσκελετικές παθήσεις). Ο σκελετός στο σύνολό του εξυπηρετεί την κινητικότητα και τη μηχανική υποστήριξη και, παράλληλα, παρέχει αντοχή του σώματος και προστασία των ζωτικών οργάνων³. Επιπλέον, τα οστά λειτουργούν ως αιμοποιητικά όργανα και παρουσιάζουν παράλληλα μεταβολικές, αποθηκευτικές και ενδοκρινικές λειτουργίες.

Κάθε ένα από τα οστά αποτελείται από δύο μορφές οστίτη ιστού σε άλλοτε άλλη αναλογία, το συμπαγές και το σπογγώδες ή δικτυωτό οστό. Το σπογγώδες οστό εμφανίζεται πρώτο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οστεογένεσης και σταδιακά αντικαθίσταται από συμπαγές οστό στις περιφερικές περιοχές υποπεριοστικά (φλοιός). Μικροσκοπικά αποτελείται από πολλαπλές οστικές δοκίδες μέσης διαμέτρου 200 μm που επικοινωνούν μεταξύ τους. Έχει υπολογιστεί πως η μέγιστη επιτρεπτή απόσταση από την αιματική παροχή είναι περίπου 250 μm για την εξασφάλιση επαρκούς ποσότητας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, αλλά και για την ανεμπόδιστη αποβολή προϊόντων του μεταβολισμού. Για τον λόγο αυτό, σε παθολογικές περιπτώσεις πάχυνσης των δοκίδων το οστό αναπτύσσει αντιρροπιστικούς μηχανισμούς δημιουργίας νέων αυλών [1].

Στον πυρήνα του οστού και σε συνέχεια με τον χώρο μεταξύ των δοκίδων εκτείνεται η μυελική κοιλότητα, που αποτελεί τον χώρο της διαδικασίας αιμοποίησης. Κατά τη γέννηση η κοιλότητα αυτή πληρείται εξ ολοκλήρου από τον ερυθρό μυελό, ο οποίος σταδιακά περιορίζεται μόνο σε ορισμένες περιοχές σπογγώδους οστού και δίνει τη θέση του στον κίτρινο μυελό. Ο ερυθρός μυελός δέχεται πλούσια αιματική παροχή και περιλαμβάνει τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ώριμων κυττάρων του αίματος. Αντίθετα, ο κίτρινος μυελός αναλαμβάνει κατά βάση την αποθήκευση λίπους, στερείται πλούσιας αιμάτωσης και συνήθως αιμοπαραγωγικής ικανότητας. Υπολογίζεται πως η αιματική ροή στον μυελό των οστών ενός υγιούς ενήλικα είναι περίπου 10 ml/min/100 cm³ [2], τιμή που μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας [3].

Στο σπογγώδες οστό συναντώνται τεσσάρων ειδών κύτταρα. Στη μία επιφάνεια της δοκίδας διατάσσονται μονόστοιβα κυβοειδή έως κυλινδρικά κύτταρα που ονομάζονται οστεοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά, μεταξύ των άλλων, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κολλαγόνων ινών τύπου Ι και για την αναγέννηση του οστεοειδούς, ενώ μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα όταν

³ Παραδείγματος χάριν, το κρανίο και τα πλευρά προστατεύουν ζωτικές δομές, ο τραυματισμός των οποίων επιφέρει εύκολα το θάνατο.

εγκλωβίζονται μέσα στη θεμέλια ουσία. Τα τελευταία αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα και εμφανίζουν μακριές, λεπτές προσεκβολές. Στη διαδικασία της οστικής αναδόμησης σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι οστεοκλάστες, πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, που έχουν ως αρμοδιότητα την απορρόφηση της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας. Ανευρίσκονται στην αντίθετη πλευρά κάθε δοκίδας από τους οστεοβλάστες, μέσα σε κοιλότητες που ονομάζονται βοθρία του Howship. Τέλος, αρχέγονα οστεοπρογονικά κύτταρα εδράζονται μέσα στον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό και δίνουν γένεση σε οστεοβλαστικά κύτταρα.

Το συμπαγές οστό περιορίζεται συνήθως στη διάφυση των μακρών οστών και στο εξωτερικό περίβλημα γύρω από το σπογγώδες οστό και παρουσιάζει ως βασική μικροσκοπική μονάδα τον οστεώνα. Κάθε οστεώνας αποτελείται από παράλληλα, ομόκεντρα πετάλια οστεοειδούς γύρω από έναν κεντρικό σωλήνα (σωλήνας του Havers). Αναγνωρίζονται δύο είδη οστεώνων, οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς οστεώνες. Οι πρωτογενείς ανευρίσκονται συνήθως υποπερι-οστικά και αναπτύσσονται *de novo* σε περιοχές όπου πριν δεν υπήρχε οστικός ιστός. Περιλαμβάνουν λιγότερα από δέκα πετάλια και έχουν διάμετρο 50-100 μm . Οι δευτερογενείς οστεώνες ανευρίσκονται πιο κεντρικά στον άξονα του οστού, αποτελούνται από περισσότερα πετάλια (20-25) και έχουν διάμετρο 100-250 μm . Δημιουργούνται σε περιοχές όπου προϋπήρχαν γηραιότεροι οστεώνες μέσα από μία διαδικασία απορρόφησης και αναδόμησης. Οι διάφοροι οστεώνες και οι κεντρικοί σωλήνες αυτών επικοινωνούν με τη βοήθεια εγκάρσιων σωληνωτών δομών που ονομάζονται σωλήνες του Volkman.

Οι σωλήνες του Havers, η μυελική κοιλότητα και οι οστικές δοκίδες του σπογγώδους οστού επενδύονται από μία στοιβάδα πεπλατυσμένων οστεοπρογονικών κυττάρων που ονομάζεται ενδόστεο, ενώ κάθε εξωτερική επιφάνεια του οστού (πλην των αρθρικών επιφανειών) καλύπτεται από δύο στοιβάδες ινώδους συνδετικού ιστού που συνθέτουν το περίοστεο. Το ενδόστεο συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία της οστικής αναδόμησης ρυθμίζοντας τη ροή του ασβεστίου και άλλων ιόντων ανάλογα με μηχανικά και βιολογικά ερεθίσματα. Το περίοστεο, από την άλλη, συντίθεται από κολλαγόνες ίνες τύπου I, ινοβλάστες, οστεοβλάστες, μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα⁴ και ελαστικές ίνες και αποτελεί το μέσο εισόδου των αιμοφόρων αγγείων, λεμφαγγείων και νεύρων⁵ μέσα στον οστικό ιστό. Αποτελεί επίσης το μέσο σύνδεσης του οστού με τους περιβάλλοντες τένοντες και συνδέσμους.

Ως συμπέρασμα από τα παραπάνω, ο οστικός ιστός έχει ως χαρακτηριστικό την παρουσία τριών διακριτών συστημάτων πόρωσης. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από μεγάλους πόρους (σωλήνες του Havers και του Volkman) με μέγιστη ακτίνα έως και 25 μm [4]. Στους πόρους

⁴ Τα κύτταρα αυτά αναλαμβάνουν σε περιπτώσεις αποκατάστασης κατάγματος και κατά τη διάρκεια της οστικής αύξησης στην παιδική και εφηβική ηλικία.

⁵ Τόσο συμπαθητικές όσο και αισθητικές ίνες

αυτούς πορεύονται αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα και ο υπόλοιπος χώρος πληρούται από νερό, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια. Το δεύτερο πορώδες σύστημα αποτελείται από μικρότερους χώρους ακτίνας από 0,15 έως 10 μm , που περιλαμβάνουν τα εγκλωβισμένα οστεοκύτταρα και μικρές ποσότητες διάμεσου υγρού. Τέλος, ελάχιστος χώρος περί το 1 nm συναντάται μεταξύ των κολλαγόνων ινών και των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη [5].

ΤΥΠΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

I. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ

Οι οστεοβλάστες είναι κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης και εμφανίζουν έναν κύκλο ζωής που ξεκινάει από τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων, συνεχίζεται με τη φάση παραγωγής συστατικών της θεμέλιας ουσίας και ολοκληρώνεται με την μετατροπή τους σε οστεοκύτταρα ή κύτταρα επένδυσης των οστικών κοιλοτήτων⁶ [6]. Ο πλήρως διαφοροποιημένος οστεοβλάστης χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κολλαγόνου τύπου I και αλκαλικής φωσφατάσης του οστού [7]. Ως κατεξοχήν οστεογενετικά κύτταρα, στην παραγωγική τους φάση εμφανίζουν κυτταρολογικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνοπαραγωγικών κυττάρων (μεγάλος πυρήνας, άφθονο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi) [8], ενώ εκτός από τις προαναφερθείσες ουσίες παράγουν επίσης οστεοκαλσίνη⁷ [9], οστική σιαλοπρωτεΐνη, οστεοποντίνη, οστεονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες προς σχηματισμό της οργανικής οστικής θεμέλιας ουσίας [10].

Ο πληθυσμός των οστεοβλαστών στο ανθρώπινο σώμα δεν είναι ομοιογενής. Μεταξύ των διαφόρων οστών παρατηρούνται υποκατηγορίες οστεοβλαστικών κυττάρων που ανταποκρίνονται διαφορετικά σε ορμονικά, μηχανικά και χημικά ερεθίσματα. Η ποικιλομορφία αυτή ενδεχομένως προέρχεται από διαφορές στην έκφραση των γονιδίων και επεξηγεί την ποικιλία στην μακροσκοπική αρχιτεκτονική, την ανατομική εκλεκτικότητα ορισμένων οστικών νοσημάτων και την ετερογενή ανταπόκριση των διαφόρων οστών στις θεραπείες. Τα κύτταρα επένδυσης, που αποτελούν την τελική μορφή διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, ρυθμίζουν την είσοδο και έξοδο διαφόρων ιόντων στο οστό σχηματίζοντας ενός είδους αιματο-οστικό φραγμό. Ωστόσο, έπειτα από έκθεση σε παραθορμόνη ή έπειτα από μηχανικά ερεθίσματα τα κύτταρα αυτά δύνανται να επαναδιαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες [11].

⁶ Τα κύτταρα αυτά αποτελούν εξειδικευμένο είδος οστεοβλαστών με αποπλάτυσμένη εμφάνιση και προσεκβολές που βοηθούν την επικοινωνία μεταξύ τους αλλά και με τα οστεοκύτταρα.

⁷ Η εν λόγω πρωτεΐνη φαίνεται πως εκτός από το οστό επιδρά και σε άλλα όργανα του σώματος, με αποτέλεσμα ο οστικός ιστός να εμφανίζει επίσης ενδοκρινικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, η μη καρβοξυλιωμένη της μορφή ανευρίσκεται στο πάγκρεας, το λιπώδη ιστό, τους όρχεις και το ΚΝΣ, όπου ασκεί δράσεις σχετικές με την παραγωγή ινσουλίνης και την ευαισθησία σε αυτήν, τη σύνθεση της τεστοστερόνης και διαφόρων νευροδιαβιβαστών [2].

II. ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

Πρόκειται για πολυπύρηννα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα που προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του αίματος έπειτα από επίδραση σε αυτά διαφόρων παραγόντων, όπως του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων (M-CSF) και του συστήματος RANK-RANKL-οστεοπροτεγερίνη [12]. Η παραγωγή τους δεν εμφανίζει την ίδια δυναμική σε όλα τα οστά, με τα μακρά οστά και εκείνα με εκτενή μυελική κοιλότητα να υπερέχουν έναντι των υπολοίπων [13]. Θεωρούνται ιστοειδικός τύπος πολυπύρηννων μακροφάγων που προκύπτουν όταν προγονικά μονοκύτταρα/μακροφάγα του αίματος έρθουν σε επαφή με την οστική επιφάνεια (Εικόνα 1). Η θεωρία αυτή ενισχύεται από σχετική πειραματική έρευνα κατά την οποία κύτταρα του μυελού των οστών (ή εναλλακτικά κύτταρα σπληνός) καλλιεργήθηκαν μαζί με μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη γένεση τυπικών οστεοκλαστών [14].

Ο υποδοχέας RANK, που αναφέρεται παραπάνω, εντοπίζεται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Ο συνδέτης αυτού, η κυτταροκίνη RANK Ligand, παράγεται τόσο από τους οστεοβλάστες όσο και από άλλα κύτταρα, και η πρόσδεσή της στον υποδοχέα προάγει την ωρίμανση και διαφοροποίηση των κυττάρων σε τελικής μορφής οστεοκλάστες. Άμεση συνέπεια αυτού είναι η ενεργοποίηση γονιδίων που επικυρώνουν τον οστεοκλαστικό χαρακτήρα του ώριμου κυττάρου και η επακόλουθη παραγωγή των σχετικών πρωτεϊνών (καθεψίνη K, $\beta 3$ ιντεγκρίνη, υποδοχέας καλσιτονίνης) [15]. Ανταγωνιστική σύνδεση της οστεοπροτεγερίνης στον RANKL συνδέτη αποτρέπει τη σύνδεση με τον RANK υποδοχέα αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη γένεση των πολυπύρηννων οστεοκλαστών [5].

Η γένεση και ωρίμανση των οστεοκλαστών αποτελεί το πρώτο σημαντικό βήμα στην έναρξη της διαδικασίας οστικής αναδόμησης, με αποτέλεσμα εκτροπή των παραπάνω μονοπατιών να συνεπάγεται αλυσιδωτή ανισορροπία σε όλες τις επακόλουθες διαδικασίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ανεξέλεγκτης οστεοκλαστικής δράσης αποτελούν η οστεοπόρωση, το πολλαπλούν μυέλωμα και οι διάφορες μορφές καταστροφικής φλεγμονώδους αρθρίτιδας (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα). Αντίθετα μειωμένη οστεοκλαστική δραστηριότητα παρατηρείται στη νόσο της οστεοπέτρωσης, που προκύπτει ως συνέπεια παρεμπόδισης της ομαλής πορείας ζωής των οστεοκλαστών. Σε μεταστατικούς όγκους στα οστά η ζυγαριά γέρνει κατά περίπτωση είτε προς τη μία είτε προς την άλλη κατεύθυνση. Σημαντικό ρόλο στην ισορροπία αυτή διαδραματίζουν ορμόνες όπως η παραθορμόνη, η καλσιτονίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και η 1,25 διυδροξυ-βιταμίνη D3 με μηχανισμούς που θα αναφερθούν παρακάτω [10].

III. ΟΣΤΕΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν τον πιο άφθονο κυτταρικό πληθυσμό του οστού (90-95% του συνολικού αριθμού των οστικών κυττάρων) και περιλαμβάνονται στα μακροβιότερα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος με διάρκεια ζωής έως και είκοσι πέντε έτη. Προέρχονται από διαφοροποίηση των οστεοβλαστικών κυττάρων και ανευρίσκονται εγκλωβισμένα μέσα στη θεμέλια ουσία, ενώ αναγνωρίζονται τέσσερα στάδια ωρίμανσής τους, μεταξύ των οποίων το οστεοειδές οστεοκύτταρο, το προ-οστεοκύτταρο, το νεαρό οστεοκύτταρο και το ώριμο οστεοκύτταρο [16]. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν εν ολίγοις οστεοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στο ανώτερο στάδιο της ωρίμανσης και διαφοροποίησής τους.

Κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση το κύτταρο υφίσταται μία σειρά από τροποποιήσεις τόσο μορφολογικές όσο και λειτουργικές. Το μέγεθος του κυττάρου ελαττώνεται και οργανύλια όπως το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi παύουν να έχουν καίριο ρόλο, καθώς η λειτουργία του οστεοκυττάρου δεν προσανατολίζεται σε μεγάλο βαθμό στην πρωτεϊνσύνθεση [17]. Από το κυτταρικό σώμα εκφύονται πολλαπλές (έως 50) προσεκβολές, οι οποίες εξυπηρετούν την επικοινωνία των οστεοκυττάρων μεταξύ τους αλλά και με τους οστεοβλάστες. Σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αυτές συνδέσεις παίζουν οι κονεξίνες και ιδίως η κονεξίνη 43 που μεσολαβεί στον διακυτταρικό μεταβολισμό. Σε λειτουργικό επίπεδο, η έκφραση πρωτεϊνών όπως κολλαγόνο, οστεοκαλσίνη και αλκαλική φωσφατάση καταστέλλεται, ενώ ενισχύεται η παραγωγή της DMP1⁸ και της σκληροστίνης⁹. Τα οστεοκύτταρα παράγουν επίσης τις πρωτεΐνες οστεοκαλσίνη, γαλεκτίνη 3 και CD44, καθώς και αρκετές από τις πρωτεΐνες της θεμελίου ουσίας.

Η ουσιώδης συμβολή των οστεοκυττάρων στην οστική λειτουργία συνοψίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τις μηχανικές επιβαρύνσεις και να τις μετατρέπουν σε βιοχημικά μονοπάτια ρυθμίζοντας ανάλογα με το ερέθισμα τις διαδικασίες της αναδόμησης και απορρόφησης. Ενδιάμεσοι μεσολαβητές αυτού του φαινομένου είναι πιθανώς ουσίες όπως ATP, NO, Ca²⁺, IGF-1¹⁰, προστακυκλίνες και προσταγλανδίνες [18]. Ο προγραμματισμένος θάνατος των οστεοκυττάρων προκύπτει συνήθως ως αποτέλεσμα της απώλειας των διακυτταρικών συνδέσεων. Οστεοκύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση φαγοκυτταρώνονται από οστεοκλάστες που επιστρατεύονται στην περιοχή, ενώ ζώντα γειτονικά οστεοκύτταρα φαίνεται πως προάγουν τη δημιουργία νέων οστεοκλαστών [19].

⁸ Dentine Matrix Protein 1

⁹ Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από το γονίδιο SOST και αναστέλλει τη δράση των οστεοβλαστών. Μετάλλαξη στο εν λόγω γονίδιο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτοσωμικών υπολειπόμενων νόσων (σκληροστέωση, νόσος του van Buchem) που χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα και μεγάλη πυκνότητα οστών.

¹⁰ Insulin-Like Growth Factor 1

Αντίστροφα, τα ίδια τα οστεοκύτταρα εμφανίζουν φαγοκυτταρικές ικανότητες χάρη στα λυσοσωμιακά ένζυμα που περιέχουν.

ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΣ ΝΕΡΟΥ

Η οστική θεμέλια ουσία αποτελείται από τρεις βασικές δομικές συνιστώσες, την οργανική θεμέλια ουσία (25%), την ανόργανη θεμέλια ουσία (65%) και το νερό (10%)¹¹. Η οργανική θεμέλιος ουσία παράγεται στο σύνολό της από τους οστεοβλάστες, όπως αναφέρεται και παραπάνω, και αποτελείται κατά βάση από κολλαγόνες ίνες τύπου I και τύπου V σε ποσοστά 95% και 5% αντίστοιχα [20]. Στα οργανικά συστατικά συγκαταλέγονται επίσης διάφορες γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, πρωτεΐνες του πλάσματος, αυξητικοί παράγοντες και πρωτεΐνες της οικογένειας RGD¹² (Πίνακας 1). Η ανόργανη θεμέλιος ουσία αντιπροσωπεύεται στο μεγαλύτερο ποσοστό από τον υδροξυαπατίτη, ενώ σε ποσοστό 3-8% ο φώσφορος αντικαθίσταται από καρβονικά ιόντα, γεγονός που προσδίδει στον κρύσταλλο μικρότερο μέγεθος¹³ και μεγαλύτερη επιφάνεια¹⁴ και διαλυτότητα [21].

Βασικό συστατικό του οστού και μεσολαβητή της οστικής εναπόθεσης αποτελεί το νερό [22], το οποίο εντοπίζεται σε τρεις ανατομικούς χώρους μέσα στον οστικό ιστό¹⁵. Καταλαμβάνει όλες τις ενδιάμεσες κοιλότητες (μυελική κοιλότητα, σωλήνες του Havers, σωλήνες του Volkmann) και τις ανατομικές οδούς μέσω των οποίων αυτές οι κοιλότητες επικοινωνούν. Οι ενδογενείς ή εξωγενείς ουσίες που πρόκειται να ενσωματωθούν στο οστό κατά τη διαδικασία της αναδόμησης ή που αποβάλλονται από αυτό χρησιμοποιούν τη δεξαμενή αυτή του νερού ως διαλύτη [23] όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια. Επιπλέον, το νερό δημιουργεί ένα επιφανειακό στρώμα πάχους 1 nm¹⁶ που περιβάλλει τις δομές της ανόργανης θεμέλιας ουσίας και υποκαθιστά τυχόν ελλείμματα και ασυνέχειες των κρυστάλλων και των συστατικών τους ιόντων [24]. Με άλλα λόγια νερό συναντάται και στα τρία πορώδη συστήματα του οστού που περιγράφονται αναλυτικά παραπάνω, ενώ συχνά ανευρίσκεται συνδεδεμένο σε συστατικά της θεμέλιας ουσίας δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με ιόντα αυτής με αποτέλεσμα τη σταθεροποίησή της.

Κάθε μία από τις θέσεις αυτές αποτελεί αποθήκη ουσιών που θα μπορούσαν δυνητικά να διακινηθούν από και προς την ανόργανη ουσία. Η αγγειακή άρδευση των μακρών οστών

¹¹ Περιέχονται επίσης λιπίδια σε ποσοστό <1%

¹² Πρωτεΐνες που περιέχουν το τριπεπτίδιο αργινίνη-γλυκίνη-ασπαργινικό οξύ

¹³ 5x25x50 nm

¹⁴ 85-170 m²/g

¹⁵ Το νερό απαρτίζει έως και 20% του βάρους του σπογγώδους οστού και έως και 10% του βάρους του συμπαγούς οστού.

¹⁶ Το πάχος αυτό εξαρτάται από το βαθμό ωριμότητας του κρυστάλλου υδροξυαπατίτη. Όσο πιο ώριμος είναι ο κρύσταλλος, τόσο μικρότερο είναι το πάχος του περιβάλλοντος στρώματος νερού.

περιλαμβάνει διατιτραίνουσες αρτηρίες της διάφυσης, της επίφυσης και της μετάφυσης που διακλαδίζονται περιφερικά και δημιουργούν αναστομώσεις. Οι αρτηρίες αυτές εμφανίζουν χαρακτηριστικά που εξυπηρετούν την επικοινωνία του οστού με τη συστηματική κυκλοφορία. Όλες παρουσιάζουν λεπτό τοίχωμα και επενδύονται από δύο στοίχους κυττάρων στη μυελική κοιλότητα και μόλις έναν στοίχο μέσα στους σωλήνες του Volkman και του Havers. Ομοίως, οι τελικοί κλάδοι, τα τριχοειδή, εμφανίζουν πολύ λεπτό τοίχωμα και εύκολα διαπερατή βασική μεμβράνη πάχους 40-60 nm χωρίς μυϊκή στοιβάδα. Η επένδυση τους από ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ασυνεχής και με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η παθητική διάχυση ουσιών όπως αμινοξέα, σάκχαρα, λιπαρά οξέα, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές κ.ά. από και προς την αποθήκη νερού των οστικών κοιλοτήτων [25].

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗΣ

1. ΟΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Τον πρώτο ρόλο κατά την οστική αναδόμηση αναλαμβάνουν οι οστεοκλάστες. Βασική λειτουργία των οστεοκλαστών είναι η αποδόμηση του επασβεστωμένου οστού, και αυτό επιτυγχάνεται μέσα από μία πολύπλοκη διεργασία που προϋποθέτει την πόλωση του πολυπύρηνου κυττάρου [26]. Με τον όρο πόλωση εννοούμε την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης με τέτοιον τρόπο ώστε να συσσωρεύεται με τη μορφή δακτυλίου στις περιοχές που βρίσκονται σε επαφή με την επασβεστωμένη θεμέλια ουσία. Η επαφή αυτή αποτελεί και το εναρκτήριο σήμα για την αγκίστρωση του οστεοκλάστη και τη μεμβρανική προσαρμογή ώστε να σχηματίζονται μικρολάχνες που περιλαμβάνουν τα απαραίτητα λυτικά ένζυμα για την οστική καταστροφή (TRAP¹⁷, προκαθεψίνη K, ζελατινάση, μεταλλοπρωτεϊνάση 9). Τα ένζυμα αυτά μαζί με ιόντα υδρογόνου απελευθερώνονται χάρη στη δράση μίας H⁺-ATPάσης και τα άλατα του υδροξυαπατίτη οξειδώνονται. Παράλληλα, τα υδρογονοκατίοντα προκαλούν τοπική πτώση του pH και ευκολότερη κινητοποίηση των συστατικών του κρυστάλλου.

Τα προϊόντα της οξείδωσης (ιόντα ασβεστίου, φωσφόρου, κλάσματα κολλαγόνου) μεταφέρονται με ενδοκυττάρωση στην αντιδιαμετρική, λειτουργική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και έπειτα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο ώριμος οστεοκλάστης δεν ολοκληρώνει σε αυτό το σημείο τον κύκλο δράσης του, αλλά με τη βοήθεια κυτταροκινών και ορμονών συμμετέχει εκ νέου σε νέες διαδικασίες απορρόφησης. Στην επιμήκυνση της ζωής των οστεοκλαστών εμπλέκονται τόσο το σύστημα RANK, η ιντερλευκίνη 1 όσο και το μονοπάτι NF-

¹⁷ Σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα η πρωτεΐνη TRAP παράγεται επίσης από τα κύτταρα επένδυσης γεγονός που ευνοεί την ανεξέλεγκτη οστεόλυση.

κΒ [27]. Μέχρι σήμερα έχουν ανευρεθεί 24 γονίδια που ρυθμίζουν τη γένεση, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, μεταξύ των οποίων τα γονίδια που παράγουν το μεταγραφικό παράγοντα mi^{18} , τον αυξητικό παράγοντα tl^{19} και την oc^{20} ATP-άση.

Ο λίαν σημαντικός RANK συνδέτης παράγεται από τους οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Ορισμένες ορμόνες και κυτταροκίνες επιδρούν στην οστική αναδόμηση επηρεάζοντας την παραγωγή του RANK συνδέτη με τελικό σκοπό τη ρύθμιση του ασβεστίου του πλάσματος. Η δράση τους επομένως επηρεάζει τόσο την προκαταρκτική φάση της ενεργοποίησης όσο και την πρώτη σημαντική φάση της αναδόμησης, την απορρόφηση. Ουσίες σαν αυτές είναι η 1,25-διυδοξυ-βιταμίνη D₃, η παραθορμόνη, η ιντερλευκίνη 1β, η ιντερλευκίνη 6, τα κορτικοστεροειδή, η προλακτίνη, ο TNF-α και το πεπτίδιο PTHrP σχετιζόμενο με την παραθορμόνη. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της απορρόφησης και την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στο αίμα [28].

Στον αντίποδα αυτού, *in vitro* μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα προάγουν την οστική αποδόμηση οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, καθώς και αιματολογικές κακοήθειες ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για φαινόμενα οστικής απώλειας [29]. Τέλος, τα οιστρογόνα και η θρομβοποιητίνη [30] φαίνεται πως αυξάνουν την οστεοπροτεγερίνη και επακόλουθα αναστέλλουν την ενεργοποίηση και δράση των οστεοκλαστών. Το παραπάνω εύρημα εξηγεί την εμφάνιση οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αντίστοιχα, παράγοντες αρνητικής ρύθμισης των οστεοκλαστών είναι η καλσιτονίνη, ο TGF-β, η ιντερλευκίνη 17, ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων και το ασβέστιο.

2. ΟΣΤΕΟΣΥΝΘΕΣΗ

Ως αποτέλεσμα της οστεοκλαστικής δράσης έχουμε τη διάβρωση της εκτεθειμένης οστικής επιφάνειας και τη δημιουργία ενός κοίλου χώρου που περιλαμβάνει μονοκύτταρα, απελευθερωμένα οστεοκύτταρα και προ-οστεοβλάστες. Τον χώρο αυτό έρχονται να γεμίσουν οι ώριμοι οστεοβλάστες με τη δημιουργία νέων δομών υδροξυαπατίτη. Οι διαδικασίες της απορρόφησης και του ανασχηματισμού είναι άρρηκτα δεμένες με μηχανισμούς σύζευξης (coupling) που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Οι ινσουλινομόρφοι αυξητικοί παράγοντες I και II και οι κυτταροκίνες που παράγονται κατά την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας φαίνεται πως

¹⁸ Microphthalmic

¹⁹ Toothless

²⁰ Osteosclerotic

μεσολαβούν για τη διατήρηση της ισορροπίας [31]. Σε πιο πρόσφατες έρευνες αποδείχθηκε πως παρ' ότι οι οστεοκλάστες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ρύθμιση της οστεοσύνθεσης, εντούτοις, η εν λόγω διαδικασία εκκινείται ακόμη και σε περιπτώσεις δυσλειτουργίας των οστεοκλαστών [32].

Άλλοι μεσολαβητές σύζευξης είναι ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών, ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων και το TGF- β . Ο τελευταίος φαίνεται πως αναστέλλει την οστική απορρόφηση δρώντας αρνητικά στο σύστημα RANK. Σε κάθε περίπτωση οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ephrin B2 που παράγεται από τους οστεοβλάστες και τον υποδοχέα των οστεοκλαστών EPH B4 [33]. Επιπλέον, παρ' ότι οι αποθήκες νερού είναι σχεδόν πάντα σε συνθήκες υπερκορεσμού από μεταλλικά ιόντα, η διαδικασία της αναδόμησης δεν λειτουργεί ανεξέλεγκτα λόγω της παρουσίας του πυροφωσφορικού. Η αλκαλική φωσφατάση που συντίθεται από τους οστεοβλάστες είναι αυτή που δίνει το έναυσμα καταλύοντας την υδρόλυση του πυροφωσφορικού, γεγονός που επιτρέπει την ενσωμάτωση ιόντων ασβεστίου, φωσφόρου και άλλων ιχνοστοιχείων στο οστό (Εικόνα 2).

Η φάση της οστικής επαναδημιουργίας ξεκινάει με τη σύνθεση της οργανικής θεμελίου ουσίας από τους οστεοβλάστες. Τα ίδια κύτταρα ρυθμίζουν το δεύτερο βήμα της οστεογενετικής διαδικασίας, την επασβέστωση που πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Κυστίδια με περιεχόμενο ιόντων ασβεστίου παράγονται από τους οστεοβλάστες και συνδέονται στα οργανικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας (π.χ. πρωτεογλυκάνες). Από την άλλη πλευρά ιόντα φωσφόρου απελευθερώνονται χάρη στη δράση της οστεοβλαστικής αλκαλικής φωσφατάσης και συνενώνονται μέσα στα κυστίδια με τα ιόντα ασβεστίου σχηματίζοντας κρυστάλλους υδροξυαπατίτη $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Τόσο οι πρωτεογλυκάνες όσο και το πυροφωσφορικό λειτουργούν ως αναστολείς της κρυσταλλοποίησης, ενώ η δράση τους αναχαιτίζεται από ένζυμα που παράγονται επίσης από τους οστεοβλάστες [34].

Στη δεύτερη φάση της διαδικασίας τα κυστίδια αυτά ρήγνυνται με αποτέλεσμα οι κρύσταλλοι να εναποτίθενται πάνω στη θεμέλια ουσία. Στη σύνθεση του ανόργανου υλικού, εκτός από ασβέστιο και φώσφορο συναντώνται φυσιολογικά σε πολύ μικρές ποσότητες ανθρακικά/διττανθρακικά άλατα, κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, βάριο και στρόντιο [35]. Όλη αυτή η διαδικασία δημιουργίας έχει ως συνέπεια τον εγκλωβισμό των επιστρατευμένων οστεοβλαστών και τη μετατροπή τους σε οστεοκύτταρα και κύτταρα επένδυσης. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους και με τους οστεοβλάστες με τη βοήθεια των προσεκβολών, έτσι ώστε να δημιουργείται ένα λειτουργικό συγκύτιο [36]. Οι εναπομείναντες οστεοβλάστες, που συγκροτούν ένα 50-70% του συνόλου αυτών, υφίστανται απόπτωση.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗΣ

Η οστική αναδόμηση πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου και παρατηρείται τόσο στο συμπαγές όσο και στο σπογγώδες οστό. Όπως είναι φανερό, καίριο ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζει η λεγόμενη Βασική Πολυκυτταρική Μονάδα (Basic Multinuclear Unit – BMU/BPM) που αποτελείται από τα τρία βασικά είδη κυττάρων που αναφέρθηκαν παραπάνω, τους οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα (Εικόνα 3). Υπολογίζεται ότι στη διάρκεια ενός έτους ενεργοποιούνται συνολικά περί τα τρία εκατομμύρια BMU και αναδομείται μέχρι και 18% του ανθρώπινου σκελετού, με κάθε μία από τις μονάδες να συμβάλει σε αναδόμηση οστικού όγκου $0,05 \text{ m}^3$. Αντιστοίχως, ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για την αντικατάσταση ολόκληρου του ενήλικου σκελετού κυμαίνεται από 3-5 χρόνια για το δοκιδώδες οστό έως 20 ή περισσότερα χρόνια για το συμπαγές οστό.

Κατά τη διάρκεια της αναδόμησης αναγνωρίζονται τρεις διακριτές διαδικασίες. Αρχικά, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες εργάζονται συντονισμένα για την ανανέωση της θεμελίου ουσίας. Οι οστεοκλάστες απορροφούν μία μικροσκοπική περιοχή $40\text{-}50 \mu\text{m}^2$ οστού και στη συνέχεια οι οστεοβλάστες αναλαμβάνουν την πλήρωση της περιοχής με συστατικά του οστεοειδούς²² σε μία διαδικασία που διαρκεί σε φυσιολογικές συνθήκες 30-40 ημέρες [37]. Μετά το πέρας της πρώτης αυτής φάσης μεσολαβούν ορισμένες μέρες (περίπου 25 για το δοκιδώδες οστό και 35 για το συμπαγές οστό) για την έναρξη της εναπόθεσης οργανικής ουσίας, διαδικασία που εκκινείται όταν το οστεοειδές φτάσει σε πάχος $6 \mu\text{m}$.

Άπαξ και ενεργοποιηθεί η πρωτογενής ανόργανη εναπόθεση εξελίσσεται ταχέως με το 75% του συνολικού κρυστάλλου να τοποθετείται μέσα σε λίγες ημέρες. Ακολουθεί η δευτερογενής εναπόθεση που ολοκληρώνει τη διαδικασία βραδέως μέσα σε χρονικό διάστημα ενός χρόνου περίπου. Η συνολική διάρκεια ενός κύκλου οστικής αναδόμησης στο σπογγώδες οστό δύναται να κυμανθεί από 100 ημέρες, σε περιπτώσεις ταχείας υπερμεταβολικής δραστηριότητας (θυρεοτοξίκωση, πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός) έως 1000 ημέρες σε μυξοιδηματικούς ασθενείς και έπειτα από θεραπεία με διφωσφονικά [38].

Η οστική αναδόμηση αφορά κατά βάση τα μέρη του οστού που βρίσκονται σε επαφή με τις αποθήκες νερού. Με άλλα λόγια πραγματοποιείται κυρίως υποπεριοστικά, υπενδοστικά, στην επένδυση εντός των οστικών κοιλοτήτων του Havers, του Volkman και των σωλήνων επικοινωνίας αυτών, στη μυελική κοιλότητα, στους χώρους εισόδου και πορείας των αγγειακών

²¹ Οι τιμές αυτές φτάνουν στα ανώτερα όρια ($\sim 60 \mu\text{m}$) στη νεαρή ηλικία, ενώ κατά το γήρας η οστική διάβρωση είναι μόνο $40 \mu\text{m}$.

²² Οστεοειδές ονομάζεται το οργανικό υπόστρωμα του οστού πριν αυτό δεχτεί τους κρυστάλλους ανόργανης ουσίας.

και νευρικών κλάδων και στην εξωτερική στοιβάδα των δοκίδων του σπογγώδους οστού. Για το λόγο αυτό το σπογγώδες οστό υφίσταται ανανέωση ταχύτερα αλλά και αποτελεσματικότερα από το συμπαγές, με ορισμένους ερευνητές να εκτιμούν το ετήσιο ποσοστό αναδόμησης έως και 25% για το σπογγώδες οστό και μόλις 7,7% για το συμπαγές [39]. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το τμήμα του συμπαγούς οστού που συνορεύει με τον κίτρινο μυελό είναι ακόμη χαμηλότερα (μέχρι και 2%).

Ανάλογα με την κινητήριο δύναμη των διαδικασιών (μηχανική ή ορμονική) η αναδόμηση διακρίνεται σε στοχευμένη και μη [40]. Η στοχευμένη αναδόμηση ξεκινάει με αφορμή κάποια δομική βλάβη ή έλλειμμα σε συγκεκριμένη θέση του σκελετού που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο οστεοκυττάρων. Τα κατεστραμμένα οστεοκύτταρα ενεργοποιούν αφενός τις περιβάλλουσες της βλάβης βασικές πολυκυτταρικές μονάδες και αφετέρου δραστηριοποιούν τους οστεοκλάστες μέσω του συστήματος RANK και του M-CSF [41]. Από την άλλη πλευρά, η μη στοχευμένη αναδόμηση συμβαίνει διαρκώς και σε συνθήκες ηρεμίας ως μηχανισμός συντήρησης του σκελετού και ρυθμίζεται από ορμόνες όπως η παραθορμόνη, η αυξητική ορμόνη, οι θυρεοειδικές ορμόνες και οι ορμόνες φύλου.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εναπόθεση των ξενοβιοτικών στα οστά είναι πιθανώς οι ίδιοι φυσιολογικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν την οστική αναδόμηση [42]. Η κατά περίπτωση ουσία εισέρχεται στον οργανισμό και φτάνει σε μία δεδομένη συγκέντρωση στο πλάσμα. Μέσω της κυκλοφορίας μεταφέρεται στις αρτηρίες, τα αρτηριόλια και τα τριχοειδή που διαπερνούν το περίοστεο και αρδεύουν το εκάστοτε οστό. Με τη βοήθεια μηχανισμών παθητικής διάχυσης επιτρέπεται η μεταφορά των μορίων της ουσίας και η αύξηση των συγκεντρώσεων αυτής στις κοιλότητες του οστού που πληρούνται από νερό και στο λεπτό περιοστικό υδάτινο στρώμα, όπως αναφέρεται παραπάνω. Μεταξύ των δύο αυτών διακριτών υδάτινων χώρων πέριξ του οστού επιδιώκεται υδροστατική και κολλοειδοσμηωτική ισορροπία που επιτυγχάνεται με την ανταλλαγή ιόντων και μορίων. Η ισορροπία αυτή αποκαθίσταται σχεδόν άμεσα μετά τη λήψη της ουσίας, μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών.

Έπειτα, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της ουσίας επιτυγχάνεται ή όχι η ενσωμάτωση. Παρ' ότι έχουν προταθεί ορισμένα μοντέλα *in vivo* οστικής ενσωμάτωσης, εντούτοις δεν έχει διατυπωθεί σαφώς ένας επιστημονικά πλήρως τεκμηριωμένος και καθολικά αποδεκτός μηχανισμός. Ιδιότητες της ουσίας όπως το φορτίο, η συγγένεια και η πολικότητα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της εναπόθεσης. Ουσίες με υψηλή ενσωμάτωση είναι συνήθως εκείνες που μπορούν εύκολα να υποκαταστήσουν το ασβέστιο, το φωσφόρο ή

υδροξυλικές ομάδες του υδροξυαπατίτη. Στον Πίνακα 2 δίνεται ένας κατάλογος από ομάδες που παρουσιάζουν αξιολογική δυναμική υποκατάστασης των παραπάνω συστατικών του κρυστάλλου.

Αντίθετα, ουσίες με χαμηλή συγγένεια, παρ' ότι δύσκολα ενσωματώνονται, εντούτοις συγκεντρώνονται σε εξίσου υψηλές συγκεντρώσεις στο περιοστικό υγρό και είναι σε ετοιμότητα για πιθανή εναπόθεση. Επιπλέον, οι χαμηλής δυναμικότητας υποκαταστάτες μπορούν σπανιότερα να ενσωματωθούν και να ανιχνευτούν σε ίχνη έπειτα από πολυετή χρόνια έκθεση. Ξενοβιοτικά που ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό στους 37°C και σε pH πλησίον 7,4 έχουν αυξημένη συγκέντρωση στις οστικές υδάτινες αποθήκες και δυνατότητα ευχερέστερης ενσωμάτωσης στον υδροξυαπατίτη. Ορισμένες φορές τα ιόντα αυτά συνδέονται με οργανικές ενώσεις (αμινοξέα, πρωτεΐνες, ένζυμα), ή άλλα ιόντα (καρβονικά, θειικά, φωσφορικά) και σχηματίζουν σύμπλοκα που ενσωματώνονται ευκολότερα στον οστίτη ιστό. Καθώς η οστική αναδόμηση είναι ταχύτερη στο δοκιδώδες οστό, αυτή είναι και η συχνότερη θέση εναπόθεσης των ξενοβιοτικών σε σχέση με το συμπαγές οστό [43].

Στη συνέχεια της διαδικασίας, μόλις η ουσία αρχίσει να αποβάλλεται από τους νεφρούς ή την πεπτική οδό και οι συγκεντρώσεις αυτής παρουσιάσουν πτώση, η δυναμική ισορροπία τροποποιείται εκ νέου με τα ασταθώς ενσωματωμένα μόρια της ουσίας να επιστρέφουν πίσω στις υδάτινες αποθήκες πέριξ του οστού. Τα πλήρως ενσωματωμένα ιόντα δύσκολα διαφεύγουν του κρυσταλλικού πλέγματος και απαραίτητη προϋπόθεση για αυτό είναι η εκκίνηση μίας νέας διαδικασίας αναδόμησης. Ουσίες σαν αυτές παραμένουν ενσωματωμένες στο οστό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και ανιχνεύονται ευκολότερα, ακόμη και μετά από χρόνια χρήση χαμηλών δόσεων [44]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ιόντα φθορίου που καταλαμβάνουν τη θέση των υδροξυλικών ομάδων και παραμένουν εκεί για πολλά χρόνια μετά τη λήψη. Παρακάτω αναλύεται λεπτομερέστερα η φαρμακοκινητική ορισμένων ομάδων ουσιών:

1. ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ανάλογα με τη βιολογική αξία τους τα ιχνοστοιχεία διακρίνονται σε ουσιώδη, απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού, και μη ουσιώδη δηλαδή στοιχεία που εισάγονται στο σώμα τυχαία και δεν εμφανίζουν βιολογική δραστηριότητα. Η πορεία ζωής των εκπροσώπων των δύο ομάδων διαφέρει σημαντικά. Τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία συμμετέχουν ενεργά σε χημικές αντιδράσεις και μονοπάτια, κυρίως ως συνένζυμα, και συνδέονται με οργανικές ενώσεις για την επίτευξη κάποιου συγκεκριμένου σκοπού²³. Τα στοιχεία αυτά ορισμένες φορές εντοπίζονται σε

²³ Ουσιώδη ιχνοστοιχεία που έχουν βρεθεί στο οστό είναι ο φωσφόρος, το μαγνήσιο, το κάλιο, το νάτριο, το πυρίτιο, το βόριο και το σελήνιο.

μη παραδοσιακές ισότοπες μορφές [45]²⁴ (π.χ. βαρέα ισότοπα του μαγνησίου σε οστά και οδόντες [46]).

Αντίθετα, τα μη ουσιώδη ιχνοστοιχεία ακολουθούν παθητικά κάποια από τα στάδια επεξεργασίας άλλων ουσιωδών στοιχείων με τα οποία έχουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες²⁵. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της βιολογικής δραστηριότητας των στοιχείων αυτών στους οργανισμούς χρησιμοποιείται από τους ερευνητές ο λόγος των συγκεντρώσεών τους σε σχέση με το απαραίτητο στοιχείο με το οποίο παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα. Ως τέτοιο επιλέγεται το ασβέστιο για το στρόντιο και το βάριο (Sr/Ca, Ba/Ca), το νάτριο για το λίθιο (Li/Na) και το κάλιο για το ρουβίδιο (Rb/K). Οι παραπάνω λόγοι εμφανίζουν μείωση στα οστά σε κάθε ανώτερο είδος της τροφικής αλυσίδας με κορυφή τον άνθρωπο.

Δισθενή στοιχεία, όπως το μαγνήσιο, το στρόντιο και το βάριο, που ανευρίσκονται άφθονα στη φύση ενσωματώνονται εύκολα στο οστό παρ' ότι ανιχνεύονται στον οργανισμό σε πολύ μικρές ποσότητες. Η βασική αρχή της ενσωμάτωσης συνοψίζεται στην ιδέα ότι ένα άτομο του δισθενούς ιχνοστοιχείου που βρίσκεται σε ορισμένη συγκέντρωση στο υδατικό στρώμα που περιβάλλει το οστό υποκαθιστά ένα άτομο ασβεστίου στο μόριο του απατίτη²⁶. Η θεωρία αυτή εκφράζεται στην παρακάτω χημική αντίδραση:



Η τάση για εξισορρόπηση της φοράς της αντίδρασης προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση εξαρτάται από τη σταθερά ισορροπίας K_D που αποτελεί συνάρτηση πολλών παραγόντων, μεταξύ των οποίων η θερμοκρασία, η διαλυτότητα του κατιόντος στο υδατικό διάλυμα, η μοριακότητα αυτού κατά βάρος²⁷ κ.ά. Σε περιπτώσεις μη δισθενών στοιχείων οι αντιδράσεις ενσωμάτωσης αποκτούν πολύπλοκη μορφή. Απαραίτητη προϋπόθεση για να ενσωματωθεί στον κρύσταλλο ένα τρισθενές ιχνοστοιχείο είναι να πραγματοποιηθεί παράλληλη ενσωμάτωση ενός ατόμου Na^+ σε παρακείμενη θέση στον υδροξυαπατίτη με σκοπό την εξισορρόπηση του φορτίου στο μόριο.

²⁴ Η κλασματοποίηση των ισotόπων του χαλκού στα οστά έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για τον προσδιορισμό του βιολογικού φύλου, καθώς η εμμηναρχή στις γυναίκες προκαλεί αξιοσημείωτη μεταβολή της αναλογίας των ισotοπικών μορφών. Το σπογγώδες οστό ανανεώνεται περίπου ανά πενταετία και η εμμηνόπαυση πραγματοποιείται περί το 52ο έτος της ηλικίας. Επομένως, αναμένεται ότι το κλασματικό προφίλ ανδρών και γυναικών θα διαφέρει από την εφηβεία έως και την 6^η δεκαετία της ζωής, ενώ θα είναι όμοιο στην παιδική ηλικία και το γήρας. Παρόμοιες πληροφορίες είναι αδύνατον να εξαχθούν από την αδαμαντίνη των δοντιών που δομείται εξολοκλήρου πριν την εμμηναρχή, με εξαίρεση ίσως τους φρονιμίτες που σχηματίζονται μεταγενέστερα.

²⁵ Το φθόριο, το στρόντιο και το βάριο είναι οι βασικότεροι εκπρόσωποι που ανιχνεύονται στα οστά σε αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις.

²⁶ Η αντίδραση εφαρμόζεται εξίσου είτε πρόκειται για υδροξυαπατίτη, είτε για άλλες μορφές απατίτη, όπως ο φθοριοαπατίτης που ανευρίσκεται στην αδαμαντίνη των δοντιών και ο χλωροαπατίτης που δεν συναντάται ως συστατικό του ανθρώπινου σώματος αλλά εμφανίζει κυρίως γεωλογικό ενδιαφέρον.

²⁷ Molality

Σε σπανιότερες περιπτώσεις η ισορροπία αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη συνεισφορά ατόμων φθορίου ή καρβονικών ομάδων [48].

Ωστόσο, πριν την ενσωμάτωση το οποιοδήποτε κατιόν οφείλει να έχει αποκτήσει ορισμένη συγκέντρωση στο περιβάλλον νερό μέσω της διαδικασίας της διάχυσης. Δεδομένου ότι τα προαναφερθέντα συστήματα πόρωσης εμφανίζουν διάμετρο από ορισμένα μικρόμετρα έως ελάχιστα νανόμετρα μέσα σε ένα ιεραρχικά διακλαδιζόμενο πλέγμα πόρων, γίνεται φανερό ότι η διάχυση δεν είναι εξίσου απλή σε κάθε περιοχή του οστού με αποτέλεσμα εκτεταμένες περιοχές να είναι δύσκολα προσπελάσιμες. Επιπλέον, η υποκατάσταση ιόντων με άλλα που εμφανίζουν διαφορές στο φορτίο και την ιονική ακτίνα έχει ορισμένες φορές ως αποτέλεσμα μεταβολές στη δομή και τις μηχανικές ιδιότητες του οστού. Με αφορμή τη γνώση αυτή πρόσφατη έρευνα επιχείρησε να συνδέσει την οστική εναπόθεση με ορισμένες παθήσεις των οστών [49].

2. ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ

Παρ' ότι δεν πρόκειται για μόρια με ιδιαίτερο ιατροδικαστικό ενδιαφέρον, εντούτοις τα διφωσφονικά έχουν μελετηθεί εκτεταμένα λόγω της μεγάλης τους συμβολής στη θεραπεία πολλών ασθενειών των οστών²⁸. Η ομάδα των ουσιών αυτών συγγενεύει με τα πυροφωσφορικά, ωστόσο, σε αντίθεση με αυτά, φέρει τη χαρακτηριστική ομάδα P-C-P (Εικόνα 4) που ευθύνεται για πολλές από τις χρήσιμες ιδιότητες των μορίων [50]. Η μελέτη των ουσιών αυτών έχει προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη φαρμακοκινητική και την οστική ενσωμάτωση των ξενοβιοτικών. Μαζί με τις τετρακυκλίνες και ορισμένα ολιγοπεπτίδια, τα διφωσφονικά αξιοποιούνται ως μόρια μεταφορείς για φαρμακευτικούς παράγοντες που προορίζονται για στοχευμένη δράση στα οστά²⁹.

Η ανάγκη για τη διαμεσολαβούμενη μεταφορά προκύπτει από μία σειρά θεραπευτικών περιορισμών. Αρχικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα κύτταρα επένδυσης των οστικών κοιλοτήτων λειτουργούν ως αιματομυελικός φραγμός που παρεμποδίζει μόρια μεγάλου μεγέθους να εισέρθουν στο οστικό παρέγχυμα³⁰. Επίσης, ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των ουσιών που εναποτίθενται στα οστά είναι η υψηλή συγγένεια με το πλέγμα του υδροξυαπατίτη, ιδιότητα που δεν έχουν όλες οι ουσίες ενδιαφέροντος. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση άλλων

²⁸ Οστεοπόρωση, οστεοαρθρίτιδα, οστικές μεταστάσεις, χρόνιες λοιμώξεις των οστών

²⁹ Τα συστήματα μεταφοράς ουσιών διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: μεταφορά με ελεγχόμενο χρόνο απελευθέρωσης και μεταφορά με ελεγχόμενο ιστό στόχο. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται εμφυτεύσιμα υλικά που απελευθερώνουν βιοδραστικές ουσίες τοπικά και επομένως στερούνται συστηματικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Τα διφωσφονικά συγκαταλέγονται στη δεύτερη κατηγορία.

³⁰ Για τον ίδιο λόγο ως μόρια μεταφορείς δεν επιλέγονται μεγαλομοριακές ενώσεις όπως τα λιποσώματα

ενζύμων και υποδοχέων που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως στόχοι για θεραπευτικούς παράγοντες είναι περιορισμένη, καθιστώντας τον υδροξυαπατίτη τη μοναδική σχεδόν επιλογή.

Η μεγάλη συγγένεια της ομάδας P-C-P με τον υδροξυαπατίτη έχει ως συνέπεια το συνδυασμένο μόριο διφωσφονικού-φαρμάκου να εγκλωβίζεται μέσα στο πλέγμα του υδροξυαπατίτη σχεδόν άμεσα μετά τη λήψη [51]. Επιπρόσθετα, η παραπάνω ομάδα υφίσταται δύσκολα ενζυματική μεταβολή (π.χ. υδρόλυση) με αποτέλεσμα τα διφωσφονικά να παραμένουν στο οστό για μεγάλο χρονικό διάστημα³¹ και να απομακρύνονται κατά βάση μέσω της διαδικασίας αναδόμησης του οστού και όχι νωρίτερα από αυτήν [52]. Έτσι, ο οστικός ιστός καθίσταται αυτόματα θέση αποθήκευσης και βραδείας αποδέσμευσης ουσιών.

Σε σχετική έρευνα [53] διαπιστώθηκε ότι τα διφωσφονικά εμφανίζουν ενδοστική εκλεκτικότητα, καθώς συσσωρεύονται κυρίως σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση ανόργανης κρυσταλλικής ουσίας και αυξημένο δείκτη αναδόμησης (π.χ. η επίφυση και η μετάφυση υπερτερούν σε σχέση με τη διάφυση)³². Ως μόρια πολικά, υδατοδιαλυτά και όξινα δύσκολα διαπερνούν τις λιποειδικές μεμβράνες και δεν ανευρίσκονται σε αξιόλογες ποσότητες στα μαλακά μόρια. Σε κάθε περίπτωση, τα μεταφερόμενα μόρια αναπóτρεπτα αλλάζουν ορισμένες από τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Η επιλογή των ομάδων R1 και R2 επηρεάζει σημαντικά τη συγγένεια με το μόριο του υδροξυαπατίτη. Πιο συγκεκριμένα, η πλήρωση των θέσεων αυτών με ένα υδροξύλιο ή μία αμινομάδα ευνοεί την ευκολότερη ενσωμάτωση και τη σταθερότητα του μορίου [54].

3. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα βαρέα μέταλλα ακολουθούν σε γενικές γραμμές τις ίδιες αρχές ενσωμάτωσης με τα ιχνοστοιχεία. Συγκεκριμένα, τα δισθενή βαρέα μέταλλα, μεταξύ των οποίων ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος, υποκαθιστούν το ιόν ασβεστίου στο μόριο του υδροξυαπατίτη, ωστόσο συναντώνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ότι το μαγνήσιο. Ανεύρεση σε οστά σπάνιων στοιχείων, όπως το θόριο και το ουράνιο συνήθως υποδεικνύουν άμεση μεταθανάτια ενσωμάτωση και χρησιμοποιούνται ευρέως στις αρχαιολογικές μελέτες με σκοπό την χρονολόγηση [47]. Σε σπάνιες περιπτώσεις δεν αποκλείεται in vivo δηλητηρίαση με τα εν λόγω στοιχεία, γεγονός που προσδίδει σε αυτά ιατροδικαστικό ενδιαφέρον.

Ένας δευτερογενής μηχανισμός ενσωμάτωσης περιλαμβάνει τη σύνδεση του μετάλλου με έναν χηλικό παράγοντα που μπορεί να έχει τη μορφή ανόργανης ή οργανικής ένωσης (π.χ. χουμικό οξύ)

³¹ Χρόνος ημιζωής αρκετοί μήνες

³² Για το λόγο αυτό οι υπερμεταβολικές οστικές μεταστατικές εστίες προσλαμβάνουν τους διφωσφονικούς μεταφορείς πολύ ευκολότερα από το γύρω υγιές οστό.

και συνήθως εμφανίζει πολλαπλές προσφερόμενες θέσεις σύνδεσης και δομική ευελιξία. Το σύμπλοκο που δημιουργείται εναποτίθεται αυτούσιο στην κρυσταλλική επιφάνεια και παραμένει εκεί χρονικό διάστημα που εξαρτάται από την ιοντική ακτίνα του στοιχείου, όπως διαπιστώθηκε από μελέτη συμπλόκων του χηλικού παράγοντα EDTMP³³ με διαφορετικές ακτινοθεραπευτικές λανθανίδες (ακτίνιο, δημήτριο, σαμάριο, γαδολίνιο, θούλιο) [55]. Εντούτοις, ανεξάρτητα από ιδιότητες όπως η ακτίνα και το φορτίο, η δυνατότητα του οστού για ενσωμάτωση βαρέων και μη μετάλλων είναι μεγάλη.

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα από τα βαρέα μέταλλα που εξασκούν τοξικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό ανευρίσκονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις ή και καθόλου, γεγονός που αποδίδεται στους προστατευτικούς μηχανισμούς εισόδου (δέρμα, αναπνευστικοί κροσσοί κ.ά.) αλλά και στα ενδογενή μεταβολικά μονοπάτια που δεν προβλέπουν τον μεταβολισμό τρισθενών μετάλλων³⁴. Στον οστίτη ιστό έχουν ανιχνευθεί μέταλλα, όπως ο μόλυβδος, το νικέλιο, το γαδολίνιο [56], ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός. Ορισμένα από αυτά είναι απαραίτητα για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού και συγκαταλέγονται στα ουσιώδη ιχνοστοιχεία³⁵.

Αλλα εμφανίζουν τοξικές ιδιότητες και η ενσωμάτωσή τους στην οστική αποθήκη ευνοεί τη βραδεία αποδέσμευσή τους στην κυκλοφορία και την επακόλουθη άσκηση καθυστερημένων τοξικών φαινομένων [57]. Χαρακτηριστικά, σε ομάδες ατόμων με αυξημένη οστική απορρόφηση (οστεοπόρωση, εμμηνόπαυση, κύηση, γαλουχία) έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα μολύβδου στο πλάσμα σε σχέση με άτομα των οποίων η οστική αναδόμηση γίνεται με φυσιολογικούς ή βραδείς ρυθμούς [58]. Από πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των διαφόρων βαρέων μετάλλων εμφανίζουν διαφορές ανάμεσα στο δικτυωτό και το συμπαγές οστό, με τα τρισθενή στοιχεία (αργίλιο, γαδολίνιο, σίδηρος) να δείχνουν εκλεκτικότητα υπέρ του δικτυωτού οστού και τα ουσιώδη μέταλλα να εγκλωβίζονται κατά βάση στο συμπαγές [49].

Εκτός από τη διαφορά στη δυναμική αναδόμησης, τα παραπάνω ευρήματα ερμηνεύονται μέσα από μία σειρά υποθέσεων που αφορούν κάθε στοιχείο ξεχωριστά. Παραδείγματος χάριν, ο σίδηρος ως συστατικό της αιμοσφαιρίνης εναποτίθεται ευκολότερα στο δικτυωτό οστό που δέχεται πλούσια αιμάτωση και γειτονεύει με τον μυελό των οστών [59]. Το αργίλιο, από την άλλη πλευρά, εμφανίζει υψηλό λόγο φορτίου/ακτίνα ιόντος, ιδιότητα που ενδεχομένως ενισχύει τις δυνάμεις σύνδεσης με τον υδροξυαπατίτη, περιορίζει την απορρόφηση και μειώνει τη διαλυτότητά του στο περιβάλλον νερό. Ανάλογες ερμηνείες για το γαδολίνιο δεν υπάρχουν, ωστόσο, κατέχουμε τη

³³ Εθυλδιαμινετρετραμεθυλενεφωσφονικό

³⁴ Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν έχει μεταφορείς τρισθενών μετάλλων. Αντίθετα, ο μεταφορέας δισθενών μετάλλων 1 (DMT-1) εξυπηρετεί τα κατιόντα σιδήρου, χαλκού και ψευδαργύρου.

³⁵ Απαραίτητα βαρέα μέταλλα του ανθρώπινου σώματος είναι ο ψευδάργυρος, το κοβάλτιο, ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο (III), το μαγγάνιο, το βόριο, το μολυβδένιο και το βανάδιο.

γνώση πως οι οστικές συγκεντρώσεις αυτού είναι σαφώς μεγαλύτερες σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε GBCA³⁶ σκιαγραφικό και παραμένουν υψηλές μέχρι και οχτώ χρόνια μετά την έκθεση [60].

Τέλος, ο μόλυβδος παρατηρείται στο συμπαγές οστό σε συγκεντρώσεις ανώτερες του δικτυωτού. Σε αυτήν την περίπτωση θεωρείται πως η ανάλυση αντικατοπτρίζει την περιβαλλοντική πρόοδο σχετικά με τη βιομηχανική έκθεση στο εν λόγω τοξικό στοιχείο τα τελευταία χρόνια. Με άλλα λόγια το δικτυωτό οστό, καθώς αναδομείται τακτικά, μπορεί να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με την έκθεση του ατόμου την τελευταία πενταετία σε αντίθεση με το συμπαγές που φέρει τα αποτελέσματα της έκθεσης μέχρι και είκοσι έτη νωρίτερα της ανάλυσης, σε εποχές δηλαδή που υπήρχε πολύ λιγότερη μέριμνα σχετικά με την περιβαλλοντική τοξικότητα των βαρέων μετάλλων. Η χρονική αυτή διάκριση μπορεί να βρει πλήθος εφαρμογών και να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την ιατροδικαστική τοξικολογία.

4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι τετρακυκλίνες είναι αντιβιοτικά ευρέος φάσματος που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων, κατά βάση σε δερματικές και οδοντιατρικές παθήσεις. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1948 και το 1956 άρχισε να μελετάται η σημαντική επίδρασή τους στα οστά και στα δόντια. Ο Milch και η επιστημονική του ομάδα συνέβαλαν σε μεγάλο βαθμό στη διαλεύκανση της φαρμακοκινητικής των ουσιών αυτών διεξάγοντας μία σειρά πειραμάτων σε ζώα. Έπειτα από τη χορήγηση χλωρτετρακυκλίνης σε ποντίκια, αρουραίους, ινδικά χοιρίδια, κουνέλια και σκύλους παρατήρησαν ότι τα οστά όλων των υποκειμένων εξέπεμπαν φθορισμό κίτρινου χρώματος υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας [61].

Η οστική ενσωμάτωση και ο συνεπαγόμενος φθορισμός αποδείχτηκε ότι δεν επηρεάζονταν από το μέγεθος της δόσης ή την οδό χορήγησης, εμφανίζονταν ωστόσο εξασθενημένα σε ενήλικα ζώα σε σχέση με τα νεότερα³⁷. Ένας από τους πρώτους μηχανισμούς εναπόθεσης που προτάθηκε περιλάμβανε τη σύνδεση ατόμων ασβεστίου του υδροξυαπατίτη με την ομάδα του ναφθακενεκαρβοξαμιδίου που ανευρίσκεται στο μόριο των τετρακυκλινών και περιλαμβάνει τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους [62]. Σε μεταγενέστερες μελέτες η αρχική αυτή ιδέα εξελίχθηκε ακόμη περισσότερο, καθώς διαπιστώθηκε φασματοσκοπικά ότι η φαινολική δικετονική ομάδα του μορίου αλληλοεπιδρά με ορισμένα άτομα άνθρακα, γεγονός που διευκολύνει τη δημιουργία συμπλόκου με το ασβέστιο του οστικού κρυστάλλου [63]. Καθώς ο

³⁶ Gadolinium-based MRI contrast agent

³⁷ Είναι πλέον γνωστό ότι οι τετρακυκλίνες αντενδείκνυνται σε παιδιά, εγκύους και θηλάζουσες, καθώς μόνιμο χρωματισμό των επασβεστωμένων αναπτυσσόμενων δομών και παρεμποδίζουν τη φυσιολογική τους δόμηση.

στόχος των αντιβιοτικών αυτών είναι τα άτομα ασβεστίου, η εναπόθεσή τους γίνεται όπως είναι αναμενόμενο εκτός από τα οστά σε οποιονδήποτε ασβεστοποιημένο ιστό.

Η εναπόθεση τετρακυκλινών στα οστά πραγματοποιείται πολύ σύντομα μετά την έκθεση και διαρκεί για τουλάχιστον 5-7 μήνες, καθιστώντας το οστό θέση μακροχρόνιας αποθήκευσης. Μία άλλη τετρακυκλίνη, η μινοκυκλίνη, δεν παρουσιάζει φαινόμενα φθορισμού, ωστόσο προκαλεί αποχρωματισμό των οστών και των οδόντων ιδίως έπειτα από χρόνια χρήση. Τα δόντια και οι ιστοί της στοματικής κοιλότητας (ενίστε και άλλοι ιστοί³⁸) [64] λαμβάνουν μία μπλε/μαύρη απόχρωση που αποδίδεται στην εναπόθεση της οξειδωμένης μορφής της μινοκυκλίνης στις υποκείμενες οστικές δομές και στην αδαμαντίνη. Παρόμοια απόχρωση μπορεί να λάβουν και μαλακοί ιστοί όπως ο θυρεοειδής, η γλώσσα, το δέρμα κ. ά [65].

Η ικανότητα φθορισμού των περισσότερων τετρακυκλινών έχει βοηθήσει σημαντικά στη μελέτη των διαδικασιών της οστικής αναδόμησης. Μία από τις βασικότερες μεθόδους είναι η παρακάτω: μία δόση τετρακυκλίνης χορηγείται σε χρόνο 0 και παρατηρείται ο ανοσοφθορισμός αυτής στο υπό μελέτη οστό. Σε δεύτερο χρόνο, 11-14 ημέρες από το χρόνο 0 χορηγείται δεύτερη δόση και πραγματοποιείται νέα μέτρηση του ανοσοφθορισμού. Με σύγκριση των δύο εικόνων φθορισμού μπορούμε να παρατηρήσουμε την εξέλιξη της οστικής αναδόμησης στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε [66]. Ωστόσο, πολλαπλές μελέτες έχουν αναδείξει την πολύπλευρη επίδραση των αντιβιοτικών αυτών τόσο στους οστεοβλάστες όσο και στους οστεοκλάστες, θέτοντας αμφιβολίες για το πόσο αξιόπιστη είναι εν τέλει η χρήση τους στη μελέτη της αναδόμησης [67]. Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται τα ευρήματα αυτών των μελετών.

5. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Στη βιβλιογραφία ανευρίσκονται μόνο τρεις ανασκοπήσεις σχετικά με την φαρμακοκινητική των αντιβιοτικών σε σχέση με τον οστικό ιστό και αποσκοπούν κατά βάση στη συγκέντρωση της αποκτηθείσας γνώσης όσον αφορά τη βέλτιστη αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων, παρά στην αξιοποίηση των δεδομένων για ιατροδικαστικούς σκοπούς. Αρχικά ο Boselli και οι συνεργάτες του συμπεριέλαβαν τα πορίσματα των ερευνών που δημοσιεύτηκαν μεταξύ 1978 και 1997 [68], ενώ στη συνέχεια ο Landersdorfer μελέτησε σε βάθος τα δεδομένα από τις πειραματικές μελέτες από το 1998 έως το 2007 [69]. Πολύ πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία τρίτη ανασκόπηση που παραθέτει το σύνολο της γνώσης και περιλαμβάνει έρευνες για νεότερα αντιβιοτικά που αναρτήθηκαν σε επιστημονικά περιοδικά έως και το 2018 [70].

³⁸ Επαγόμενη από μινοκυκλίνη χρώση των οστών έχει παρατηρηθεί και εκτός της στοματικής κοιλότητας (κλείδα, ακρώμιο, κνήμη, σπόνδυλοι, μηριαίο, μετατάρσια, μετακάρπια).

Από όλα τα αντιβιοτικά που έχουν μελετηθεί, η πενικιλίνη G και η μετρονιδαζόλη φαίνεται πως δεν εμφανίζουν σημαντική συγγένεια για τον οστικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα, η προεγχειρητική χορήγηση πενικιλίνης σε ασθενείς που πραγματοποίησαν αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση της ουσίας στο πλάσμα αλλά όχι στο οστικό παρασκεύασμα [71]. Ομοίως, έπειτα από χορήγηση μετρονιδαζόλης σε αρουραίους μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού σε ιστοτεμάχια μηριαίου οστού και ωμοπλάτης, και οι ανευρεθείσες τιμές υπολογίστηκαν ως εξαιρετικά χαμηλές [72]. Και στις δύο περιπτώσεις δεν προτείνεται κάποιος συγκεκριμένος μηχανισμός που να εξηγεί την παρεμπόδιση της εναπόθεσης. Η κλοξακιλλίνη και η φλουκλοξακιλλίνη, από την άλλη, έχουν μεγάλη συγγένεια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την συγκέντρωσή τους σε άλλους ιστούς, όπως το οστό.

Τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, μεταξύ των οποίων η αμοξικιλίνη³⁹ [73], η πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες, οι αμινογλυκοσίδες, οι φθοριοκινολόνες, η βανκομυκίνη και η τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη ανευρίσκονται ευκολότερα στο οστό με τη χρήση κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων. Η συγκέντρωση της αμοξικιλίνης σε συμπαγές και σπογγώδες οστό εμφανίζει παρόμοιες τιμές [74], ενώ έχει επιχειρηθεί συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές του ορού (λόγος 10:1) [75]. Η αζτρεονάμη εμφανίζει το παράδοξο ότι ανιχνεύεται στο οστό μόνο σε περιπτώσεις που η χορήγηση γίνεται bolus και όχι έπειτα από απλή ενδοφλέβια έγχυση [76]. Νεότερα αντιβιοτικά όπως η φωσφομυκίνη και τα γλυκοπεπτίδια οριταβανκίνη και νταλμπαβανσίνη έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό και ιδίως σε πειραματόζωα και η οστική φαρμακοκινητική τους είναι επομένως πολύ λιγότερο κατανοητή.

Η τοξικότητα των κινολονών στο αναπτυσσόμενο οστό και χόνδρο είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Για τον λόγο αυτό η χρήση τους αντενδείκνυται σε παιδιά και εφήβους. Παρ' ότι οι πληροφορίες για την εναπόθεσή τους είναι πενιχρές, γνωρίζουμε πλέον ότι οι χηλικές τους ιδιότητες εμπλέκονται στις διαδικασίες αλληλεπίδρασής τους με το οστό. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια των αντιβιοτικών αυτών δημιουργούν δεσμούς με δισθενή και τρισθενή κατίοντα και παρουσιάζουν σημαντική εκλεκτικότητα για το μαγνήσιο. Έτσι, στερούν από τον οργανισμό κατίοντα που είναι υψίστης σημασίας για την ανάπτυξη των οστικών δομών, οδηγώντας σε παραγωγή ριζών οξυγόνου και καταστροφή των χονδροκυττάρων [77]. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται σε περιπτώσεις υπομαγνησισμίας άλλης αιτιολογίας σε παιδιά. Επιπλέον δίαιτα πλούσια σε μαγνήσιο φαίνεται πως μειώνει τις τοξικές επιδράσεις των κινολονών. Ο παραπάνω

³⁹ Απ' ότι φαίνεται δεν υπάρχει προς το παρόν πειστικός μηχανισμός ενσωμάτωσης των β λακταμικών στους οστικούς κρυστάλλους. Η ανίχνευση αυτών στα οστά οφείλεται πιθανώς αποκλειστικά στην ύπαρξη των μορίων τους εντός των αγγειακών δομών που διατρέχουν τα οστά και στις αποθήκες ύδατος πέριξ των οργανικών και ανόργανων δομών. Οι μοριακές δομές των μορίων τους δεν περιλαμβάνουν πρόσφορες περιοχές σύνδεσης με τον υδροξυαπατίτη και επομένως δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη κάποιας σχετικής θεωρίας.

μηχανισμός ενδεχομένως να δώσει μελλοντικά απαντήσεις σχετικά με την πιθανή ενσωμάτωση των εν λόγω αντιβιοτικών στο οστό για ιατροδικαστικούς σκοπούς.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων έχουν επίσης διερευνηθεί σε συνάρτηση με τον βαθμό της ισχαιμίας. Ο Lozano-Alonso διαπίστωσε πως οι συγκεντρώσεις της λεβοφλοξασίνης και της λινεζολίδης δεν αλλάζουν σημαντικά μεταξύ ασθενών με ήπια, μέτρια και σοβαρή ισχαιμία του οστού, εύρημα που υποστηρίζει πως η ισχαιμία, παραδόξως, δεν εμπλέκεται ουσιωδώς στη φαρμακοκινητική των εν λόγω φαρμάκων [78]. Αντίθετα, στην ίδια έρευνα αποδείχθηκε πως η βανκομυκίνη δεν παρουσιάζει εξίσου καλά αποτελέσματα ενσωμάτωσης στο οστό σε περιπτώσεις παρεμπόδισης της αιματικής κυκλοφορίας. Όλες οι παραπάνω μελέτες στην πλειοψηφία τους παραβλέπουν τον παράγοντα χρόνο, καθώς εστιάζουν στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας άμεσα ή σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη χορήγηση. Επιπλέον, υπάρχει σαφές έλλειμμα στη βιβλιογραφία σχετικά με τα εμπλεκόμενα βιοχημικά μονοπάτια και τους μηχανισμούς εναπόθεσης των παραπάνω αντιβιοτικών, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες στο συγκεκριμένο πεδίο.

6. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Λίγες είναι οι ουσίες ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος που μπορούν να ενσωματωθούν χρονίως στον υδροξυαπατίτη με μηχανισμούς κατανοητούς για τους επιστήμονες. Φαίνεται πως τα τελευταία χρόνια έχουν δοθεί αρκετές απαντήσεις σχετικά με την ενσωμάτωση και εναπόθεση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στον οστικό ιστό. Το μόριο των ουσιών αυτών περιλαμβάνει ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου που συνδέεται με τρία άτομα υδρογόνου με δύο απλούς και έναν διπλό δεσμό (Εικόνα 5), μοτίβο που συναντάται σε παραλλαγές σε ενδογενείς ουσίες, όπως το πυροφωσφορικό, και εξωγενείς ενώσεις που έχουν μελετηθεί εξίσου καλά, όπως τα διφωσφονικά (Εικόνα 6). Ουσίες σαν αυτές αποτελούν πρόσφορο υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση των οστών με αποτέλεσμα οι παραγόμενοι μεταβολίτες να αποκτούν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης και επομένως ανίχνευσης με αναλυτικές μεθόδους [79].

Τις προηγούμενες δεκαετίες είχε δοθεί σημαντική έμφαση στις οξείες τοξικές επιδράσεις των οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων, ενώ η χρόνια εναπόθεσή τους παραμελήθηκε ως προς την κατανόηση με ελάχιστες εξαιρέσεις. Σε αναδρομική μελέτη του περιοδικού Lancet [80] διαπιστώθηκε πως η χρόνια έκθεση εργαζομένων στη γεωργία σε οργανοφωσφορικά είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη οστική πυκνότητα ιδίως του συμπαγούς οστού που αποδόθηκε σε ελλιπή

οστεοβλαστική δραστηριότητα⁴⁰. Επίσης, σε πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκαν οι πολλαπλές αρνητικές επιδράσεις τριών εντομοκτόνων (endosulfan⁴¹, monocrotophos⁴², fenvalerate⁴³) στην οστική υγεία σε πειραματόζωα (κοτόπουλα Boiler), χωρίς ωστόσο ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων των εντομοκτόνων στον οστικό ιστό [81]. Δεδομένης της τεράστιας ποικιλίας παλαιότερων και νέων αγροτικών φαρμάκων, συμπληρωματικές έρευνες απαιτούνται επί του εν λόγω θέματος για την πληρέστερη κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών.

7. ΧΗΜΙΚΑ ΟΠΛΑ

Τα χημικά όπλα, που λειτουργούν ως δηλητήρια του κεντρικού νευρικού συστήματος, έχουν συγκεντρώσει την προσοχή των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια λόγω της παράνομης χρήσης τους για στρατιωτικούς σκοπούς και της διαρκώς αυξανόμενης ανάγκης για διασφάλιση των διεθνών συμβάσεων περί προστασίας των ανθρωπίνων δικαιωμάτων. Κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους παράγοντες G και τους παράγοντες V. Οι παράγοντες G περιλαμβάνουν τις ουσίες ταμπούν, σαρίν, σομάν και κυκλοσαρίν με συντομογραφίες GA, GB, GD και GF αντίστοιχα. Πρόκειται για ουσίες εξαιρετικά πτητικές που ασκούν την τοξική τους δράση μέσω της εισπνοής, σε αντίθεση με τους παράγοντες V (με κύριο εκπρόσωπο το VX) που προσλαμβάνονται κυρίως από το δέρμα και τους βλεννογόνους⁴⁴.

Οι μελέτες που στοχεύουν στην ταυτοποίηση των παραπάνω παραγόντων σε ιστούς βασίζονται στην ανίχνευση των μεταβολιτών τους που έχουν συνήθως τη μορφή αλκυλιωμένων μεθυλ-φωσφονικών οξέων (aMPA) και προέρχονται έπειτα από υδρόλυση του μητρικού μορίου (Πίνακας 4). Παρ' ότι βιολογικά υγρά όπως ο ορός του αίματος και τα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα για την ανίχνευση των μεταβολιτών αυτών, η πρόσβαση σε αυτά άμεσα μετά τον θάνατο καθίσταται συχνά δύσκολη έως ανέφικτη λόγω της υψηλής επικινδυνότητας στην προσέγγιση της τοποθεσίας του θανάτου αλλά και της ίδιας της σωρού⁴⁵. Επομένως, η απομόνωση και ταυτοποίηση χημικών όπλων σε ιστούς αφενός αποτελεί κατεξοχήν ιατροδικαστική πράξη,

⁴⁰ Μετρήθηκαν αρκετές συνιστώσες της οστικής αναδόμησης όπως η περίμετρος του οστεοειδούς, ο ρυθμός της οστικής αναγέννησης, ο ρυθμός εναπόθεσης οργανικής ύλης στη θεμέλια ουσία, η συνολική οστική ελεύθερη επιφάνεια κ. ά.

⁴¹ Χλωριωμένος υδρογονάνθρακας

⁴² Οργανοφωσφορικό

⁴³ Συνθετικό πυρεθροειδές

⁴⁴ Οι ουσίες αυτές εμφανίζουν δράση αντιχολινεστεράσης, προκαλούν δηλαδή τη φωσφορυλίωση της χολινεστεράσης των νευρικών συνάψεων παρεμποδίζοντας τη δράση της και αυξάνοντας την ποσότητα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Με τον τρόπο αυτό η ενεργοποίηση της σύναψης τίθεται ανεξέλεγκτη.

⁴⁵ Ορισμένες φορές απαιτείται η πάροδος ετών ή δεκαετιών για την ασφαλή προσέγγιση της προσβεβλημένης περιοχής.

αφετέρου διευκολύνεται από την ανάλυση μη συμβατικών ιστών όπως τα οστά, καθώς άλλα υποστρώματα είναι συχνά μη διαθέσιμα [82].

Από πρόσφατες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι τα αMPA ως οργανοφωσφορικές ενώσεις εμφανίζουν μία μεγάλη ευκολία ενσωμάτωσης στον οστικό ιστό και αυξημένες συγκεντρώσεις σε αυτόν έπειτα από έκθεση. Η μεγάλη αυτή συγγένεια εξηγείται αρχικά από τη δομική ομοιότητά τους⁴⁶ με άλλες ενδογενείς και εξωγενείς ουσίες που παρουσιάζουν επίσης υψηλή ενσωμάτωση, όπως το φωσφορικό ανιόν, το πυροφωσφορικό και τα διφωσφονικά που υποκαθιστούν τις φωσφορικές και καρβονικές ομάδες του υδροξυαπατίτη. Η συνύπαρξη των αMPA με ιόντα ασβεστίου στο περιοστικό υγρό προάγει τη δημιουργία συμπλόκων που εναποτίθεται εξίσου εύκολα στο κρυσταλλικό πλέγμα [83].

Επιπρόσθετα, ορισμένοι από τους G παράγοντες περιλαμβάνουν στο μόριό τους άτομα φθορίου που εύκολα αποσπώνται κατά το μεταβολισμό, ενσωματώνονται στον υδροξυαπατίτη υποκαθιστώντας υδροξυλικές ομάδες και διεγείρουν την εκκίνηση της οστικής αναδόμησης [84]. Για τον λόγο αυτό η έκθεση σε χημικά δηλητήρια έχει ως αποτέλεσμα την υπερμεταβολική δραστηριότητα των οστών και την αυξημένη πρόσληψη σε αυτά οποιουδήποτε ξενοβιοτικού κυκλοφορεί στον οργανισμό τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Μέχρι στιγμής έχει δημοσιευτεί μία μόνο πειραματική μελέτη που εξετάζει τη δυνατότητα ανίχνευσης των αMPA στα οστά. Η επιστημονική ομάδα της Rubin ανέπτυξε μία μέθοδο απομόνωσης, ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του VX και του μεταβολίτη του EMPA σε οστά χοίρων που είχαν εκτεθεί *in vivo* χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας και επιβεβαίωσε αρκετές από τις προαναφερθείσες θεωρητικές γνώσεις [82].

3. ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

Η μελέτη των πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας έχει ανοίξει τον δρόμο για την κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των πεπτιδικών ενώσεων με τον υδροξυαπατίτη. Ουσίες του οστεοειδούς όπως η οστική σιαλοπρωτεΐνη και η οστεοποντίνη εμφανίζουν στο μόριό τους επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες από αμινοξέα όπως το L-ασπαραγινικό οξύ και το L-γλουταμινικό οξύ [85]. Ως συνέχεια αυτού, μελέτες έδειξαν ότι οποιαδήποτε ενδογενής ή εξωγενής ολιγοπεπτιδική ουσία με αλληλουχίες των δύο αυτών αμινοξέων εμφανίζει αυξημένη συγγένεια για τον υδροξυαπατίτη [86]. Αυτός είναι και ο λόγος που ουσίες σαν αυτές μελετώνται τα τελευταία χρόνια για αξιοποίηση σε συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων στα οστά για

⁴⁶ Πιθανολογείται ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο διπλός δεσμός του οξυγόνου με το φωσφόρο (O=P) όπως αναλύεται παραπάνω για τα οργανοφωσφορικά (Εικόνα 6).

τη θεραπεία οστικών ασθενειών, όπως ακριβώς χρησιμοποιούνται κατ' εξοχήν τα διφωσφονικά με τη διαφορά ότι δεν εμφανίζουν άμεσες ή μακροπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες.

4. BENZOΔΙΑΖΕΠΙΝΕΣ ΚΑΙ ΟΠΙΟΕΙΔΗ

Ορισμένες έρευνες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι οι βενζοδιαζεπίνες όχι μόνον εναποτίθενται στα οστά, αλλά παρουσιάζουν παρατεταμένο χρόνο κάθαρσης από τον μυελό των οστών. Η πρώτη σχετική μελέτη που διεξήχθη το 1991 σύγκρινε τα επίπεδα της διαζεπάμης σε διάφορους ιστούς (αίμα, σπείλος, εγκέφαλος, μυελός των οστών) σε αρουραίους μία, δύο, τέσσερις και οχτώ ώρες έπειτα από τη χορήγηση του φαρμάκου [87]. Η επιστημονική ομάδα διαπίστωσε με έκπληξη ότι οι τιμές της ουσίας στον μυελό ήταν σαφώς υψηλότερες σε σχέση με τους άλλους ιστούς, και αποτελούσαν αξιόπιστο εργαλείο για τον υπολογισμό των αντίστοιχων τιμών του αίματος. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν μετέπειτα και άλλες επιστημονικές ομάδες τόσο για τη διαζεπάμη [88] όσο και για την φαιντανύλη. Χαρακτηριστικά, η τιμή της διαζεπάμης στον μυελό έχει υπολογιστεί έως και 8,5 φορές όσο η αντίστοιχη τιμή του αίματος [89].

Το παραπάνω φαινόμενο δεν έχει επεξηγηθεί πλήρως βιοχημικά, ωστόσο η επικρατέστερη ερμηνεία είναι πως η μεγάλη λιποφιλικότητα των μορίων αυτών ευνοεί τη βιοσυσώρευση στον λιπώδη κίτρινο μυελό, που λειτουργεί ως φαρμακευτικό ντεπόζιτο, και τη βραδεία εναπόθεσή τους στις γειτονικές οστικές δομές. Από εκεί, με εξίσου βραδύ ρυθμό, τα εν λόγω ξενοβιοτικά απελευθερώνονται και πάλι στον μυελό και στις υδάτινες δεξαμενές και επιστρέφουν πίσω στο πλάσμα προς απόρριψη από τους νεφρούς. Με αυτά τα δεδομένα προτείνεται πως οι περιοχές του οστού πλησίον της μυελικής κοιλότητας (π.χ. μετάφυση) αποτελούν ιδανικότερο υπόστρωμα για την αντίχνευση λιπόφιλων ουσιών. Επιπλέον, το σενάριο της λιποφιλικότητας θα μπορούσε ενδεχομένως να δώσει κατευθύνσεις στη φαρμακοκινητική ερμηνεία των υπολοίπων βενζοδιαζεπινών και των λιπόφιλων συνθετικών οπιοειδών (αλφεντανύλη, ρεμιφεντανύλη και σουφεντανύλη).

ΟΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η επιστήμη της ιατροδικαστικής τοξικολογίας αξιοποιεί τις γνώσεις της τοξικολογίας για δικανικούς σκοπούς, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο την ανάλυση βιολογικών υγρών ή ιστών για την αντίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση υπεύθυνων μητρικών ουσιών και των μεταβολιτών τους. Σε ένα δεύτερο επίπεδο η ίδια επιστήμη μελετά την επίδραση του σώματος και των φυσιολογικών διεργασιών αυτού επί της πορείας ζωής, μεταβολισμού, εναπόθεσης και αποβολής του ξενοβιοτικού (φαρμακοκινητική – τοξικοκινητική) με σκοπό την εξυπηρέτηση της

ιατροδικαστικής διερεύνησης. Βιολογικά υγρά όπως αίμα, ούρα, σίελος, γαστρικό περιεχόμενο και ενίοτε υαλοειδές υγρό, πλευριτικό υγρό, ENY⁴⁷ και χολή αποτελούν εύκολα διαχειρίσιμα βιολογικά υποστρώματα, ενώ δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που απαιτείται ανάλυση συμπαγών οργάνων όπως ήπαρ, σπλήνας, νεφροί κ.ά [90].

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται σε πιο εξεζητημένους ιστούς (τρίχες, νύχια, οστό, δόντια, μυελός των οστών), η ανάλυση των οποίων, παρ' ότι φέρει τους επιστήμονες ενώπιον προκλήσεων, εντούτοις προσφέρει νέες δυνατότητες στην ιατροδικαστική επιστήμη [91]. Το οστό ως επιλογή δύναται να εξυπηρετήσει σε μεγάλο βαθμό ιατροδικαστικά προβλήματα που μπορούν δύσκολα να λυθούν με άλλα μέσα. Ο οστικός ιστός εμφανίζει μεγάλη αντοχή σε μηχανικά ερεθίσματα τόσο προθανάτια όσο και μεταθανάτια, και ανθίσταται στην αποσύνθεση πολύ περισσότερο από τους μαλακούς ιστούς. Το γεγονός αυτό καθιστά τα οστά και τους οδόντες ιδανικά βιολογικά υλικά και ενδεχομένως μοναδική επιλογή σε περιπτώσεις πλήρους σήψης, διαμελισμού και σκελετοποίησης, όπως και σε περιστατικά στα οποία ο χρόνος που έχει επέλθει από το θάνατο είναι μεγάλος (παραδείγματος χάριν σε αρχαιολογικές έρευνες ή σε ανάγκη εκταφής).

Χαρακτηριστικά, η ανίχνευση ουσιών σε οστά μπορεί να δώσει θετικά αποτελέσματα ακόμη και χρόνια μετά τον θάνατο [92]. Η ανίχνευση και μόνον αυτή προσφέρει στον επιστήμονα την πληροφορία ότι το υποκείμενο εκτέθηκε στην ουσία κάποια απροσδιόριστη στιγμή σε προθανάτιο χρόνο. Η παραπάνω τοποθέτηση βρίσκει πάντοτε εφαρμογή με ελάχιστες μόνον εξαιρέσεις που σχετίζονται με γεωλογικά φαινόμενα. Αναμφίβολα, οι σκληροί ιστοί δεν αποτελούν επιλογή σε ζώντα υποκείμενα ή σε περιπτώσεις που πιο αξιόπιστοι ιστοί είναι διαθέσιμοι. Ωστόσο, μία αλληλουχία από κενά στη γνώση περιορίζουν σημαντικά την εφαρμογή των οστικών αναλύσεων στην πράξη και ιδίως αποκλείουν σε κάθε περίπτωση την ποσοτική συνιστώσα. Πιο συγκεκριμένα, η σύγχρονη ανίχνευση μίας ουσίας στον ορό δεν συνεπάγεται αυτόματα και την ανίχνευσή της στα οστά, πόσο μάλλον με κάποιον ποσοτικό συσχετισμό.

Αντιστρόφως και κόντρα στο επιστημονικά προσδοκώμενο, έχουν δημοσιευτεί μελέτες που αποδεικνύουν ανίχνευση ουσιών σε οστά χωρίς ταυτόχρονη ανεύρεση σε δείγματα αίματος [89]. Σε κάποιες περιπτώσεις (πεντοβαρβιτάλη [93], δεσιπραμίνη [94], φλουραζεπάμη [95]) η συγκέντρωση της ουσίας στα οστά, και ιδίως στον μυελό, μπορεί να μετρηθεί έως και 30 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση στο αίμα. Σε γενικές γραμμές, σύμφωνα με έρευνα που περιλάμβανε βενζοδιαζεπίνες και οπιοειδή, μία ουσία είναι πιο πιθανό να ανευρεθεί στο αίμα παρά στο οστό, ωστόσο, όταν ανευρίσκεται στο οστό συχνά παρουσιάζεται σε μεγαλύτερες

⁴⁷ Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

συγκεντρώσεις [96]. Οι ποσοτικές διαφοροποιήσεις οφείλονται σε μία σειρά παραγόντων, μεταξύ των οποίων οι παρακάτω:

1. ΟΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η ανομοιογένεια του οστίτη ιστού μέσα στο ίδιο οστό⁴⁸ αλλά και οι δομικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις των διαφόρων οστών του ανθρώπινου σώματος μεταξύ τους έχουν ως αποτέλεσμα την εξίσου ανομοιογενή κατανομή των ουσιών και συνεπώς σημαντικές διαφορές στην ποσοτική ανίχνευση⁴⁹. Η αναλογία συμπαγούς/σπογγώδους ιστού, το μέγεθος, το σχήμα⁵⁰, οι διαστάσεις [96] είναι παράγοντες που επιδρούν στο συνολικό εμβαδόν της ελεύθερης επιφάνειας των δοκίδων και επομένως στον ρυθμό εναπόθεσης υποδοξυαπατίτη ή υποκαταστατών αυτού. Ακόμη και μέσα στην ίδια οστική δομή παρατηρείται ποσοτική διαβάθμιση, με τις σπογγώδεις περιοχές να εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του ξενοβιοτικού σε σχέση με τις συμπαγείς [97]. Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί σαφώς ποιο από τα οστά του ανθρώπινου σώματος αποτελεί την αρτιότερη επιλογή για ανάλυση και όσο το δυνατόν ακριβέστερη ποσοτικά ανίχνευση ξενοβιοτικών.

Οι περισσότεροι συγγραφείς εστιάζουν σε κλάσματα του μηριαίου, σπονδύλους και λαγόνιο οστό. Άλλα υποστρώματα όπως πλευρές, κνήμη, βραχιόνιο, ωμοπλάτη, ωλένη χρησιμοποιούνται ενίοτε στη βιβλιογραφία. Πρόσφατα, ομάδα Ελλήνων [98] επιστημόνων πρότεινε το οστό της κλείδας ως εναλλακτική λύση με αρκετά προτερήματα⁵¹, ενώ και το ινιακό οστό του κρανίου φαίνεται να παρουσιάζει εξίσου καλά ποιοτικά αποτελέσματα [99]. Με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά, θα μπορούσε κανείς να πει ότι το μηριαίο οστό είναι αυτό που υπερέχει σε σχέση με τα υπόλοιπα, καθώς δέχεται πλούσια αιμάτωση και εμφανίζει μεγάλη μυελική κοιλότητα και εκτεταμένη επιφάνεια ανταλλαγής ουσιών, ιδίως στην περιοχή του σπογγώδους οστού της επίφυσης.

Ομοίως, οι σπόνδυλοι, και ιδίως αυτοί της οσφυϊκής μοίρας, είναι κατ' εξοχήν σπογγώδη οστά, με εξίσου μεγάλη αγγειοβρίθεια που επιπλέον συγγενεύουν ανατομικά με όργανα ζωτικής

⁴⁸ Παραδείγματος χάριν διάφυση και επίφυση μακρού οστού

⁴⁹ Έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωση μίας ουσίας ή μεταβολίτη αυτής μπορεί να διαφέρει κατά μία ή δύο τάξεις μεγέθους ανάμεσα σε διαφορετικά οστά του ίδιου οργανισμού.

⁵⁰ Αναγνωρίζονται τέσσερα είδη οστών ανάλογα με το σχήμα: τα μακρά οστά (π.χ. μηριαίο), τα βραχέα οστά (π.χ. οστάρια του ωτός), τα αποπλατυσμένα οστά (π.χ. οστά της πυέλου) και τα οστά ακανονίστου σχήματος (π.χ. σπόνδυλοι). Τα μακρά οστά δέχονται πλούσια αιμάτωση, ενώ οι υπόλοιπες τρεις κατηγορίες αιματώνονται σε μικρότερο βαθμό. Ως συνέπεια αυτού οι ξενοβιοτικές ουσίες παρουσιάζουν κατά κανόνα υψηλότερες συγκεντρώσεις στα μακρά οστά σε σχέση με τα υπόλοιπα.

⁵¹ Η ανατομική θέση της κλείδας την καθιστά εύκολα προσβάσιμη κατά τη νεκροτομή, ενώ παράλληλα ο ιστός δέχεται μικρότερη ποσότητα βιολογικών υγρών κατά την αποσύνθεση με αποτέλεσμα μικρότερη επιμόλυνση και ακριβέστερα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης.

σημασίας. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στα οστά του κορμού να δέχονται τις μεταθανάτιες επιδράσεις των φαινομένων ανακατανομής, όπως θα αναλυθούν παρακάτω. Επίσης, ο τύπος και η ποσότητα του μυελού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας τόσο την αφθονία της αιμάτωσης όσο και τη συγκέντρωση των ξενοβιοτικών ουσιών στο περίξ των δοκίδων περιβάλλον. Σε πολλές έρευνες φαίνεται πως η ποσοτική ποικιλότητα των ευρημάτων αποδίδεται πρώτα και κύρια στις ιδιαιτερότητες των διαφόρων τύπων οστών του ίδιου οργανισμού και δευτερευόντως σε όλους τους υπόλοιπους παράγοντες [100].

Η μεγάλη ποικιλότητα στις τιμές συγκεντρώσεων θέτει την ανάγκη δημιουργίας μίας βάσης δεδομένων [101] με τιμές αναφοράς για κάθε ουσία και για κάθε οστό του σώματος⁵². Σε μία προσπάθεια ποσοτικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων των τοξικολογικών ερευνών κάθε ανευρεθείσα τιμή μητρικής και θυγατρικής ουσίας θα μπορούσε να αξιολογηθεί σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς και να εξαχθούν συμπεράσματα που θα προσανατολίζουν σε σχέση με τον τρόπο χορήγησης και το μέγεθος της δόσης. Έχει διαπιστωθεί ότι η μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στις τιμές συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών στα μικρότερα οστά σε περιφερικές θέσεις του σώματος.

2. ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ

Σημαντικό ρόλο τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαδραματίζει ο χρόνος που μεσολάβησε από τη στιγμή της λήψης της ουσίας μέχρι τη στιγμή του θανάτου αλλά και ο χρόνος από τον θάνατο ως την ανεύρεση των οστών και τη διενέργεια της αναλυτικής μεθόδου. Σε σχετική έρευνα διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωση της μορφίνης σε οστικό ιστό που παρέμεινε θαμμένος για διάστημα ενός έτους μειώθηκε σε ποσοστό 54,4% σε σχέση με την αντίστοιχη μέτρηση παρακείμενου οστικού ιστού αμέσως μετά τον θάνατο [102]. Ωστόσο, στον αντίποδα αυτού, δεν είναι ανάξιες λόγου οι μελέτες που πέτυχαν την ανίχνευση διαφορετικών ουσιών όπως η μεθαμφεταμίνη [103] και η τριαζολάμη [104] σε μυελό των οστών πέντε και τέσσερα χρόνια μετά τον θάνατο του ατόμου αντίστοιχα.

Επίσης, ξενοβιοτικά, όπως βαρέα μέταλλα, οπιοειδή και βαρβιτουρικά, φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική σταθερότητα στον οστικό ιστό και επομένως είναι δυνατόν να ανιχνευθούν σε αυτόν αρκετά χρόνια μετά τον θάνατο [105]. Πολλαπλές μελέτες της καναδικής επιστημονικής ομάδας του Watterson κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όσο μικρότερο είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της λήψης της ουσίας και του θανάτου, τόσο ευκολότερη είναι η απομόνωση της ουσίας σε οστικό ιστό [106,107]. Συνεπώς, η ανίχνευση μίας ουσίας

⁵² Ενδεχομένως και για διαφορετικά μέρη του οστού, εφόσον πρόκειται για μεγάλων διαστάσεων οστό με ανομοιογενή τμήματα.

πιθανώς αντικατοπτρίζει οξεία έκθεση ή θανατηφόρα δόση ακριβώς πριν τον θάνατο και σπανιότερα χρόνια ή επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Η ίδια ομάδα διεξήγαγε σειρά πειραμάτων σε ζώα για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου που μεσολαβεί από τη στιγμή του θανάτου έως τη διενέργεια της ανάλυσης [101]. Τα οστά αρουραίων διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, οι δύο από τις οποίες αφέθηκαν σε αποσύνθεση για μία και δύο εβδομάδες αντίστοιχα, ενώ η τρίτη υπέστη επεξεργασία αμέσως μετά τη θανάτωση. Οι τιμές των υπό μελέτη ουσιών παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις τρεις ομάδες χωρίς σαφή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ασάφεια αυτή αντικατοπτρίζει φαινόμενα που επιδρούν παράλληλα και προκαλούν αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης μίας ουσίας στον χρόνο:

- Η μητρική ουσία μεταβολίζεται με τη βοήθεια του περιβαλλοντικού μικροβιώματος. Ως αποτέλεσμα αυτού τα επίπεδα της ουσίας πέφτουν, ενώ παράλληλα αυξάνονται τα επίπεδα των μεταβολιτών της.
- Η ουσία υφίσταται οποιουδήποτε είδους χημική μετατροπή (π.χ. υδρόλυση, αναγωγή, οξειδωση), γεγονός που μειώνει τα επίπεδά της και δυσχεραίνει την ανίχνευσή της.
- Τα φαινόμενα ανακατανομής έχουν ως αποτέλεσμα τη διαπότιση του οστικού ιστού με ποσότητες της ουσίας. Το γεγονός αυτό επεξηγεί γιατί σε ορισμένες περιπτώσεις και κυρίως σε οστά του κορμού πέριξ των ζωτικών οργάνων η συγκέντρωση της ουσίας αυξάνεται στις δύο εβδομάδες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές σε μικρότερους χρόνους αποσύνθεσης.
- Ποσότητες από την ουσία διαφεύγουν από τον οστικό ιστό στο περιβάλλον με την πάροδο του χρόνου.
- Ουσίες που έχουν την τάση να συγκεντρώνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στη μυελική κοιλότητα (π.χ. λιπόφιλες) απελευθερώνονται σταδιακά στο γύρω συμπαγές οστό.

3. ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ

Ως συνέχεια του παραπάνω, ο τρόπος λήψης της ουσίας και η κατανομή των δόσεων στον χρόνο επιφέρουν αλλαγές στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Τόσο η οδός χορήγησης όσο και η σχέση της οδού χορήγησης με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ξενοβιοτικού είναι παράμετροι με μεγάλη σημασία. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στην οξεία, την υποξεία-επαναλαμβανόμενη και τη χρόνια μέθοδο λήψης. Ο προσδιορισμός της χρονιότητας διευκολύνεται από την ταυτόχρονη ποσοτική μέτρηση του ξενοβιοτικού και των μεταβολιτών του.

Σε πρόσφατη έρευνα μελετήθηκαν τα αποτελέσματα ελεγχόμενης χορήγησης κεταμίνης σε αρουραίους και έγινε σύγκριση των τιμών τόσο της κεταμίνης όσο και του μεταβολίτη της, της νορκεταμίνης, σε οστά υποκειμένων που έλαβαν την ουσία άπαξ σε υψηλή δόση, σε μικρότερες επαναλαμβανόμενες δόσεις (υποξέως) και χρονίως [108]. Η μεταβλητότητα που παρατηρείται

στις τιμές της μητρικής ουσίας και του μεταβολίτη αυτής μειώνεται σημαντικά με τον υπολογισμό του λόγου τους, πληροφορία που μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα στην αναλυτική προοπτική του οστίτη ιστού. Στην εν λόγω μελέτη, ο λόγος αυτός παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ειδών χορήγησης⁵³, ενώ στην ομάδα που έλαβε την ουσία χρονίως η κεταμίνη ήταν επί το πλείστον μη ανιχνεύσιμη και η νορκεταμίνη ελάχιστα ανιχνεύσιμη.

Παρόμοια έρευνα μελέτησε επίσης τις επιπτώσεις της δοσολογίας για τα αντικαταθλιπτικά αμιτριπτυλίνη⁵⁴ και σιταλοπράμη⁵⁵ και τους μεταβολίτες αυτών νορτριπτυλίνη, δεσμεθυλσιταλοπράμη και διδεσμεθυλσιταλοπράμη σε αρουραίους [100]. Στην εν λόγω έρευνα είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η ποσοτική διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα οστά μεταξύ της οξείας και της επαναλαμβανόμενης μεθόδου χορήγησης δεν παρατηρήθηκε στο πλάσμα. Επομένως, ο οστικός ιστός ενδεχομένως να δίνει λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο έκθεσης σε σχέση με συμβατικά βιολογικά υγρά.

Με βάση την θεμελιώδη τοξικολογική γνώση, η οξεία χορήγηση πριν ακριβώς από τον θάνατο θα έχει ως αποτέλεσμα υψηλή συγκέντρωση της μητρικής ουσίας και χαμηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών αυτής, τόσο σε οστικό ιστό όσο και στον μυελό. Το αντίθετο παρατηρείται σε χορήγηση που πραγματοποιήθηκε μεγάλο χρονικό διάστημα πριν από τον θάνατο ή σε χρόνια χρήση της ουσίας. Ωστόσο, το δεδομένο αυτό μεταβάλλεται κατά περίπτωση ανάλογα με τη σταθερότητα και τις μεταβολικές ιδιαιτερότητες της ουσίας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την ιδιοσυστατικότητα του οργανισμού. Τέλος, έγινε προσπάθεια συσχέτισμού του μεγέθους της δόσης με τη δυνατότητα οστικής ανίχνευσης με τη μέθοδο ELISA, και εξήχθη το συμπέρασμα ότι υπάρχει στην πλειονότητα των περιπτώσεων θετική ποσοτική συσχέτιση, χωρίς, ωστόσο, να έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον τομέα αυτό [109].

4. ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Ανάλογα με τον βαθμό αποσύνθεσης και σήψης μεταβάλλονται και οι τιμές κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό μίας ουσίας σε κάθε ιστό και συγκεκριμένα στον οστίτη ιστό. Με την πάροδο του χρόνου από τη στιγμή του θανάτου ξεκινάει μία διαδικασία μικροβιακής επιμόλυνσης και λύσης των κυττάρων των μαλακών μορίων. Ως εκ τούτου, τα διάφορα όργανα μεταβάλλονται σε όγκο και σύσταση και η συγκέντρωση των ουσιών σε αυτά άλλοτε μειώνεται και άλλοτε αυξάνεται.

Ιστοί εντός του σώματος, όπως τα οστά, διαποτίζονται με ποσότητες βιολογικών υγρών και προϊόντα τήξης κατά τη διάρκεια του φαινομένου της μεταθανάτιας ανακατανομής. Αντίθετα,

⁵³ Η μεγαλύτερη οξεία μη θανατηφόρος δόση είναι πιο πιθανό να ανιχνευτεί στο οστό σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

⁵⁴ Ανήκει στην κατηγορία των τρικυκλινών αντικαταθλιπτικών.

⁵⁵ Ανήκει στην κατηγορία των εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs).

ιστοί εκτός των σπλαχνικών κοιλοτήτων (τρίχες, οδόντες), αν και λιγότερο προστατευμένοι από εξωτερικούς παράγοντες, προστατεύονται επαρκώς από φαινόμενα ανακατανομής και προσφέρονται ως περισσότερο αξιόπιστα βιολογικά υποστρώματα. Επιπλέον, ακόμη και μεταξύ των οστών η μεταθανάτια ανακατανομή γίνεται αισθητή, καθώς οι σπόνδυλοι, τα πλευρά και η πύελος, δηλαδή τα σημαντικότερα οστά του κορμού πλησίον των ζωτικών οργάνων, είναι αυτά που παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ξеноβιοτικών σε σχέση με τα μακρά οστά των άκρων [110].

Στο σημείο αυτό τίθεται το ερώτημα: το φαινόμενη της ανακατανομής λειτουργεί επιβοηθητικά ή παραπλανητικά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων; Αρχικά οφείλουμε να λάβουμε υπόψη την πρακτική εφαρμογή του συνόλου των γνώσεων επί του θέματος, καθώς στην ιατροδικαστική πράξη σπάνια θα καταστεί ανάγκη για τοξικολογική οστική ανάλυση σε ευρήματα που δεν έχουν υποστεί αποσύνθεση, λόγω της πρόσβασης σε ιστούς που παρέχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία. Επομένως, τα φαινόμενα της ανακατανομής είναι αναπότρεπτα σχεδόν σε κάθε περίπτωση που πρόκειται να αναζητηθούν απαντήσεις σε οστικό υλικό.

Από την άλλη πλευρά, δεδομένου του σφάλματος της ποσοτικοποίησης οι στόχοι του τοξικολόγου αναπροσαρμόζονται. Πιο συγκεκριμένα, ένα θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα είναι το πρώτο ζητούμενο στην οστική ανάλυση και σε αυτό εξυπηρετούν οι όσο το δυνατόν πιο υψηλές τιμές συγκέντρωσης. Επομένως, οι επιστήμονες συγκλίνουν στην ιδέα ότι, με τα τωρινά δεδομένα, τα οστά που δέχονται τη μεγαλύτερη διαπότιση έπειτα από περίοδο σήψης είναι και τα καταλληλότερα υποστρώματα για διεξαγωγή αναλυτικών μεθόδων. Την ίδια στιγμή ακριβώς αυτά τα φαινόμενα είναι που απομακρύνουν ακόμα περισσότερο το ενδεχόμενο ενσωμάτωσης της ποσοτικής συνιστώσας στην ιατροδικαστική οστική τοξικολογία.

5. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες διατήρησης των νεκρών ιστών επηρεάζουν την ποιότητα του ιατροδικαστικού υλικού με πολλούς τρόπους. Το περιβάλλον επιδρά συνήθως έμμεσα επιδρώντας στον βαθμό αποσύνθεσης και τα μεταθανάτια φαινόμενα ανακατανομής. Μία από τις πρώτες έρευνες σχετικά με την περιβαλλοντική επίδραση διεξήχθη από τους Gorczynski και Melbye που πειραματίστηκαν με τις συνθήκες μεταθανάτιας αποθήκευσης του υλικού προτού προχωρήσουν σε ποιοτική ανίχνευση βεζοδιαζεπινών σε οστίτη ιστό [111]. Το γενικότερο συμπέρασμα της μελέτης αυτής αλλά και μίας αντίστοιχης μελέτης που ακολούθησε το 2007 [112] συνοψίζεται στην ιδέα ότι, τόσο οι βενζοδιαζεπίνες όσο και τα οπιοειδή, παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές σε οστά που δεν έχουν υποστεί ταφή σε σχέση με οστά που τάφηκαν σε στείρο ή μη έδαφος.

Όπως φαίνεται η ταφή επιταχύνει την απώλεια του μυελού των οστών με αποτέλεσμα ορισμένες ουσίες να μην είναι πλέον ανιχνεύσιμες σε αυτόν [113]. Η επιστήμη της γεωλογίας δύναται να συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη μεταθανάτια πορεία ζωής των ξενοβιοτικών με εστίαση στη διαδικασία της διαγένεσης⁵⁶. Η πορεία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει μηχανική επιβάρυνση, ανταλλαγή ιόντων με το υπέδαφος, μικροβιακή ή μακροβιακή προσβολή, μεταθανάτια κρυσταλλική εναπόθεση, διάσπαση της θεμελίου ουσίας, συμπίκνωση και μεταβολή των συστημάτων πόρωσης [114]. Τα παραπάνω φαινόμενα αποκτούν ακόμη μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στα πλαίσια αρχαιολογικών ερευνών.

Άλλοι παράγοντες που συγκαταλέγονται στους περιβαλλοντικούς ρυθμιστές είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, η εξωτερική επιμόλυνση, η γεωλογική σύσταση του εδάφους, η χλωρίδα και πανίδα της περιοχής κ.ά. Ορισμένοι μελετητές ασχολήθηκαν με τις επιπτώσεις του μικροπεριβάλλοντος⁵⁷ και μελέτησαν τις διαφορές στις περιπτώσεις που το υλικό αποθηκεύεται σε σκιερό και υγρό περιβάλλον σε σχέση με την έκθεση στον ήλιο [115]. Έχει διαπιστωθεί ότι η αφυδάτωση που προκαλείται σε ξηρά μικροκλίματα επιβραδύνει την εντομολογική δραστηριότητα και επομένως τη διαδικασία της αποσύνθεσης. Ως αποτέλεσμα αυτού, οι περιβαλλοντικές απώλειες του ξενοβιοτικού είναι λιγότερες και οι μετρούμενες τιμές περισσότερο αντιπροσωπευτικές⁵⁸.

Η διατήρηση των οστών σε αμιγώς υδάτινο περιβάλλον θέτει νέα δεδομένα που εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων η συγκέντρωση του νερού σε οξυγόνο, η οξύτητά του, η εποχή του χρόνου, το βάθος, οι ζωικοί και μικροβιακοί πληθυσμοί που διαβιούν σε αυτό [116] κ.ά. Σε περιβάλλον σαν κι αυτό ακόμα και ο ανθεκτικός οστικός ιστός δύναται να υποστεί σημαντική φθορά, ενώ είναι περιορισμένα τα επιστημονικά τεκμηριωμένα δεδομένα σχετικά με αντίστοιχες συνθήκες [99]. Μέσα από πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε ότι η τοξικολογική ανίχνευση ουσιών σε οστά που ανασύρθηκαν από υδάτινο περιβάλλον είναι εφικτή και δίνει τουλάχιστον ποιοτικά αν όχι ποσοτικά αποτελέσματα [117]. Επιπλέον, ιαπωνική ερευνητική ομάδα διεξήγαγε πειράματα σε συνθήκες εργαστηρίου και διαπίστωσε ότι ουσίες όπως η αμφεταμίνη και η μεθαμφεταμίνη είναι ανιχνεύσιμες στο οστό έπειτα από καταβύθιση σε ενάλιο νερό βρύσης [118].

⁵⁶ Πρόκειται για μία σειρά γεωλογικών και φυσικοχημικών φαινομένων που αφορούν τα ασύζευκτα ιζήματα και έχουν ως αποτέλεσμα την αφυδάτωση αυτών και τη μετατροπή τους σε συμπαγή πετρώματα.

⁵⁷ Πρόκειται για εντοπισμένες κλιματικές συνθήκες σε μικρή γεωγραφική έκταση που διαφοροποιούνται από τις αντίστοιχες παρακείμενων περιοχών.

⁵⁸ Η επιτάχυνση της αποσύνθεσης που πραγματοποιείται σε σκιερά, υγρά περιβάλλοντα, από την άλλη, οδηγεί αφενός σε μεγαλύτερες απώλειες και αφετέρου σε πιο εκτεταμένα φαινόμενα ανακατανομής. Με αυτά τα δεδομένα οι μετρούμενες τιμές της ουσίας ενδέχεται να είναι χαμηλότερες ή υψηλότερες, ωστόσο, σε κάθε περίπτωση λιγότερο ενδεικτικές της πραγματικότητας.

Τέλος, η θέση του σώματος κατά την αποσύνθεση αποτελεί παράγοντα υψίστης σημασίας που καθορίζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Σε αντίστοιχη έρευνα διαπιστώθηκε ότι διαφορετικές τιμές της υπό εξέταση ουσίας ανευρίσκονται αν το σώμα του πειραματόζωου τοποθετηθεί σε θέση πρηνή, ύπτια ή κατακόρυφη κατά τη διάρκεια της αποσύνθεσης [119]. Η θέση βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με το περιβάλλον και τον χρόνο αποσύνθεσης, και επεξηγεί ορισμένες από τις παρατηρήσεις των τοξικολόγων. Παραδείγματος χάριν, η κατακόρυφη θέση ευνοεί τα οστά που βρίσκονται στα κατωφρέστερα μέρη του σώματος (μηριαίο, πύελος, οσφυϊκοί σπόνδυλοι), ενώ ευθύνεται για τη μεγαλύτερη απώλεια της ουσίας σε σχέση με άλλες θέσεις τοποθέτησης.

6. ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

Όπως σε κάθε περίπτωση τοξικολογικής μελέτης, έτσι και εδώ η φύση της ουσίας και τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά της (χρόνος ημιζωής, λιποδιαλυτότητα, πολικότητα, φορτίο, μέγεθος του μορίου, βαθμός ιονισμού, συγγένεια με υποδοχείς κ.ά.) επιδρούν σημαντικά στη φαρμακοκινητική και τη διαδικασία του ADME⁵⁹. Ουσίες με μικρό χρόνο ημιζωής, εξαιρετικά πολικές ή με μεγάλη συγγένεια με την αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες του αίματος ενσωματώνονται σε μικρότερο βαθμό στα οστά. Αντίθετα, δισθενή ιόντα, μέταλλα ή μη, [120] ενσωματώνονται πολύ εύκολα υποκαθιστώντας το ασβέστιο⁶⁰. Όπως μελετήθηκε εκτενώς παραπάνω, η δυνατότητα ενσωμάτωσης στον υδροξυαπατίτη επηρεάζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων δομών μέσα στο μόριο της εκάστοτε ουσίας.

Μία γενική αρχή είναι πως ανιοντικές ομάδες υποκαθιστούν το υδροξύλιο και το φωσφορικό ανιόν και κατιοντικές το ασβέστιο του κρυστάλλου, με τον αριθμό οξείδωσης να παίζει δευτερεύοντα ρόλο. Κάθε νέα ενσωμάτωση έχει διαφορετική επίδραση στη δομή και θέση του κρυστάλλου στον χώρο με τις διαφορετικές ουσίες να εξασκούν ξεχωριστή τροποποίηση του μορίου στην περαιτέρω απορροφητική του ικανότητα, την αντοχή και τη μηχανική του. Το μέγεθος του μορίου, επίσης, επιτρέπει ή όχι τη διόδο αυτού μέσα από τα πολυεπίπεδα συστήματα πόρωσης με τα πολύ μεγάλα μόρια να έχουν ελάχιστες ή και καθόλου πιθανότητες για πρόσβαση και ενσωμάτωση. Όσον αφορά τις πρωτεϊνικές ενώσεις, έχει γίνει ήδη λόγος για ορισμένες αλληλουχίες αμινοξέων που ευνοούν στην εναπόθεση με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα κατανοητοί.

⁵⁹ Absorption, distribution, metabolism, excretion

⁶⁰ Ο συνολικός μόλυβδος του ανθρώπινου σώματος ανευρίσκεται σε ποσοστό 90% στα οστά και εμφανίζει χρόνο ημιζωής 27 έτη. Για τους λόγους αυτούς, ο οστικός ιστός αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανίχνευση του βιοσυσσωρευμένου μολύβδου και άλλων βαρέων μετάλλων.

Η λιποφιλικότητα αποτελεί χαρακτηριστικό που ευνοεί σε κάποιον βαθμό και έμμεσα τη φαρμακοκινητική προς τις οστικές αποθήκες. Λιπόφιλες ουσίες όχι μόνο προτιμούν αυτόματα το υποδόριο λίπος, τις ενδοκοιλιακές λιπώδεις δομές, τον μαστό και τον μυελό των οστών αλλά παραμένουν σε αυτές τις θέσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα και αντιστέκονται στην κάθαρση μέσω των νεφρών και του πεπτικού συστήματος. Η μακροχρόνια παραμονή τους σε συγγένεια με το δικτυωτό οστό διευκολύνει την ενσωμάτωση στον υδροξυαπατίτη ακόμα κι αν οι λοιπές παράμετροι δεν προδιαθέτουν θετικά. Επιπρόσθετα, μόρια με λιπόφιλες ιδιότητες διαπερνούν εύκολα τις λιποειδικές διπλοστοιβάδες και παρακάμπτουν φραγμούς και μεμβράνες φτάνοντας ευκολότερα σε θέσεις οστικής αναδόμησης. Δεν είναι επομένως παράδοξο να ανευρίσκεται στο οστό μία ουσία η οποία εμφανίζει συγκέντρωση στο αίμα χαμηλότερη από το όριο ποσοτικοποίησης.

7. ΙΔΙΟΣΥΣΤΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Ομοίως, ιδιοσυστατικά χαρακτηριστικά του οργανισμού καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την κατανομή του ξενοβιοτικού μεταξύ των διαφόρων ιστών. Με την πάροδο της ηλικίας ο μυελός των οστών υφίσταται μεταβολές, καθώς ο αγγειοβριθής ερυθρός μυελός αντικαθίσταται στα μακρά οστά σταδιακά από τον πλούσιο σε λιπώδη ιστό κίτρινο μυελό. Επομένως, λιπόφιλα μόρια έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα ενσωμάτωσης στην ενήλικη ζωή σε σχέση με την παιδική ηλικία. Επιπλέον, οι ιδιαιτερότητες στη σωματική κατανομή του λιπώδους ιστού (παχυσαρκία, απίσχναση, γυναικείο φύλο), όπως είναι αναμενόμενο, επιδρούν σημαντικά στη φαρμακοκινητική και την οστική εκλεκτικότητα των ξενοβιοτικών και συχνά τροποποιούν τα μονοπάτια μεταβολισμού αυτών.

Πολλές νοσολογικές οντότητες παρεμβάλλονται στη διαδικασία εναπόθεσης άλλοτε δυσχεραίνοντας και άλλοτε ενισχύοντάς την. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει κάθε κατάσταση παρεμπόδισης της οστικής τροφοδοσίας (αναιμία, καρδιαγγειακό νόσημα, ορμονικές διαταραχές, θυρεοειδικές νόσοι), καθώς και μεταβολές της οστικής πυκνότητας (οστεοπόρωση, ακινητοποίηση, ορθοπεδικά νοσήματα) και κατ' επέκταση της ελεύθερης επιφάνειας ανταλλαγής των οστικών δοκίδων. Σε περιπτώσεις έντονης οστεοκλαστικής δραστηριότητας οι συγκεντρώσεις ενός ξενοβιοτικού στο πλάσμα αναμένονται υψηλότερες σε σχέση με αυτές στο οστό, καθώς πλέον ο οστικός ιστός χάνει σε μεγάλο βαθμό την αποθηκευτική του ιδιότητα.

Εφόσον η ενσωμάτωση των ξενοβιοτικών συνδέεται άμεσα με την οστική αναδόμηση, είναι κατανοητό πως ιδιοσυστατικοί παράγοντες που μεταβάλλουν τη δυνατότητα και ταχύτητα της αναδόμησης θα απεικονιστούν στο ποιοτικό και ποσοτικό αποτέλεσμα της ανάλυσης. Οι

παράγοντες αυτοί μπορεί να αφορούν το φύλο, την ηλικία, την ορμονική κατάσταση (π.χ. γυναίκες παραγωγικής ηλικίας, μετεμηνόπαυσιακές γυναίκες, φάση του κύκλου), τη σωματική δραστηριότητα, το σωματότυπο, το βάρος, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) κ.ά. Επιπλέον, γεγονότα που προηγούνται ή έπονται της εναπόθεσης είναι δυνατόν να εκτραπούν από την αναμενόμενη πορεία λόγω ιδιορρυθμίας του εκάστοτε οργανισμού. Με άλλα λόγια κάθε γεγονός που επηρεάζει την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την απέκκριση της ουσίας δύναται να ανατρέψει τον οστικό εγκλωβισμό είτε υπέρ είτε κατά αυτού. Ορισμένα παραδείγματα είναι τα σύνδρομα δυσαπορρόφησης, η συγγενής έλλειψη ενζύμων και οι νεφρικές νόσοι.

Τέλος, η διατροφή και η θρεπτική κατάσταση του οργανισμού επηρεάζει τη σύσταση του υδροξυαπατίτη από πολλές πλευρές. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης του ασβεστίου αλλά και της βιοδιαθεσιμότητας πολλών ξενοβιοτικών ουσιών. Οι αποθήκες ασβεστίου ρυθμίζονται επίσης από τη βιταμίνη D, την καλσιτονίνη και την παραθορμόνη και οποιαδήποτε μεταβολή στις τιμές τους αντανακλάται στην οστική υγεία. Η έλλειψη νερού, η αιμορραγία ή αντίθετα καταστάσεις κατακράτησης ύδατος όπως το οίδημα και η δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια δημιουργούν αντίστοιχα συνθήκες αφυδάτωσης και αύξησης των συγκεντρώσεων των διαφόρων ουσιών στο περιοστικό υγρό ή αραίωσης και μεταβολής της σταθεράς ισορροπίας K_D . Είναι φανερό πως ο κατάλογος των ομοιοστατικών ιδιοτεροτήτων που μπορούν να ανευρεθούν στον άνθρωπο είναι ανεξάντλητος.

8. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δεδομένου του ότι δεν υπάρχει, προς το παρόν, επικυρωμένη μέθοδος δειγματοληψίας και προετοιμασίας του δείγματος, κάθε επιστημονική ομάδα παρουσιάζει ερευνητικά δεδομένα σε συνδυασμό με επιλεγμένες κατά περίπτωση μεθόδους διαχωρισμού και ανάλυσης. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την επίτευξη ομοιογένειας και άμεσης σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων και θέτει ερωτηματικά σχετικά με την ακρίβεια και την αξιοπιστία των ευρημάτων των διαφόρων επιστημονικών μελετών. Εφόσον συνεχίζει να υφίσταται αυτού του τύπου η ετερογένεια, κανενός είδους ποσοτική συσχέτιση δεν είναι ασφαλής. Επιπλέον, οι συνθήκες αποθήκευσης του δείγματος φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά τα ευρήματα.

Η άμεση ανάλυση μετά την ανεύρεση των ιστών, παρ' ότι είναι και η ενδεικνυόμενη τεχνική, δεν είναι πάντοτε εφικτή, γεγονός που γεννά την ανάγκη για διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών μεταφοράς και διατήρησης του δείγματος μέχρι τη διενέργεια της αναλυτικής μεθόδου. Ερευνητές πραγματοποίησαν μελέτη σε ποντίκια και διαπίστωσαν πως η αποθήκευση των σωμάτων σε παγωμένο ή στείρο περιβάλλον είχε εξίσου καλά αποτελέσματα στην ανίχνευση μιδαζολάμης σε αντίθεση με την αποθήκευση σε μη στείρες συνθήκες [111]. Άλλη ερευνητική ομάδα κατέληξε

στο συμπέρασμα ότι δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στις τιμές συγκέντρωσης της ισοπροπανόλης στον μυελό των οστών αν αυτός διατηρηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σχέση με χαμηλότερες θερμοκρασίες (4° C) για τις πρώτες 24 ώρες μετά τον θάνατο [121].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις όπου εγείρεται ανάγκη για τοξικολογική ανάλυση οστών σε δεύτερο χρόνο, έπειτα από ταρίχευση⁶¹ ή μονιμοποίηση των οστών σε διάλυμα φορμόλης. Είναι πλέον γνωστό ότι η φορμαλδεΐδη αντιδρά με ενώσεις που περιλαμβάνουν άζωτο στο μόριό τους (π.χ. αμίνες) με αποτέλεσμα να παράγονται νέοι μεταβολίτες, των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται σταδιακά μέσα στο διάλυμα του μονιμοποιητικού. Ο Winek σε έρευνα του 1993 πρότεινε τη Ν-μεθυλίωση⁶² ως έναν από τους πιθανούς μηχανισμούς χημικής μετατροπής των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών αμιτριπτυλίνη, νοτριπτυλίνη, δεσιπραμίνη και ιμιπραμίνη, έπειτα από μακρόχρονη μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης [122]. Αντιστρόφως, μηχανισμοί απομεθυλίωσης ενοχοποιούνται για επίπλαστη αύξηση των επιπέδων διαφόρων ουσιών σε ανάλογες συνθήκες μονιμοποίησης.

Όπως είναι αναμενόμενο, η συγκέντρωση της μητρικής ουσίας ενδιαφέροντος ως επί το πλείστον μειώνεται τόσο λόγω της μετατροπής αυτής στις θυγατρικές ενώσεις όσο και λόγω διάχυσης ποσότητάς της από τον ιστό στη φορμόλη. Για όλους τους παραπάνω λόγους σε περιπτώσεις διεξαγωγής τοξικολογικής μελέτης σε μονιμοποιημένους ιστούς απαιτείται η αθροιστική μέτρηση των επιπέδων των ουσιών και των μεταβολιτών τους στο διάλυμα μονιμοποίησης [105]. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή δεδομένα για άλλα μονιμοποιητικά μέσα⁶³ που ενίοτε στην καθ' ημέραν πράξη υποκαθιστούν τη φορμόλη, ούτε για την επίδραση των αφαλατωτικών διαλυμάτων⁶⁴ στην αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου. Επίσης, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται σχετικά με την επίδραση διαλυμάτων φορμαλδεΐδης με διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά, όπως η συγκέντρωση της φορμόλης κατ' όγκο, το pH, η συνύπαρξη ρυθμιστικού διαλύματος και η επιλογή του περιεχόμενου άλατος.

Σε κάθε περίπτωση, οποιοσδήποτε ποσοτικός προσδιορισμός δεν θα μπορούσε με τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα να αξιοποιηθεί προς όφελος της διάγνωσης. Το σύνολο των πειραματικών

⁶¹ Έγχυση διαλύματος φορμαλδεΐδης διά μέσου των μεγάλων αιμοφόρων αγγείων.

⁶² Οι πρωτοταγείς αμίνες μεθυλιώνονται παρουσία φορμαλδεΐδης ή φορμικού οξέος σύμφωνα με την αντίδραση Eschweiler-Clarke. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται διοξείδιο του άνθρακα (Εικόνα 7).

⁶³ Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία προτιμάται συχνά η γλουταραλδεΐδη (C₅H₈O₂) και το τετροξείδιο του οσμίου (OsO₄). Άλλα δημοφιλή μονιμοποιητικά μέσα είναι τα μείγματα ακλοολών (αιθανόλη, μεθανόλη), που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις ταχείες βιοψίες, η ακετόνη, το ακετοξυκό οξύ, το πικρικό οξύ (Bouin) και διάφορα διαλύματα που περιέχουν χλωριούχο υδράργυρο (Zenker, B-5). Τα τελευταία χρόνια η παθολογική ανατομική στρέφεται προς μία νέα μονιμοποιητική ουσία με μειωμένη καρκινογονικότητα σε σχέση με την φορμαλδεΐδη, τη γλυοξάλη (COH=COH).

⁶⁴ Πρόκειται κυρίως για ισχυρά οξέα (υδροχλωρικό οξύ, νιτρικό οξύ), ασθενέστερα οργανικά οξέα (φορμικό οξύ) ή χηλικούς παράγοντες (EDTA).

μελετών με ελεγχόμενες συνθήκες που στοχεύουν στην προώθηση της γνώσης σχετικά με τον εν λόγω κλάδο πραγματοποιούνται αποκλειστικά σε ζώα, καθώς ανάλογες έρευνες είναι αδύνατον και ανεπίτρεπτο από τη σκοπιά της βιοηθικής να πραγματοποιηθούν σε ανθρώπους. Ως εκ τούτου, η προσαρμογή των αποτελεσμάτων από ζωικούς ιστούς στον ανθρώπινο οργανισμό είναι συχνά επισφαλής.

Επιπλέον, λόγω της μεταβλητότητας των τιμών κρίνεται αβέβαιη η συσχέτισή τους με τις αντίστοιχες του αίματος και με τις επιβλαβείς επιπτώσεις που η ουσία επιφέρει σε διάφορα επίπεδα. Η μη ανίχνευση μίας ουσίας σε οστικό ιστό δεν αποκλείει την προθανάτια λήψη της ουσίας αυτής, ούτε απαλλάσσει την ουσία από την πιθανή ευθύνη της πρόκλησης του θανάτου [123]. Με άλλα λόγια το αρνητικό αποτέλεσμα από μόνο του είναι σχεδόν άχρηστο σαν πληροφορία για την ιατροδικαστική έρευνα. Από την άλλη πλευρά, το θετικό αποτέλεσμα αν και μας πληροφορεί για την ύπαρξη του ξενοβιοτικού στον οργανισμό, εντούτοις δεν παρέχει έγκυρη χρονική, ποσοτική ή άλλου είδους κατεύθυνση. Η ποικιλότητα των αναλυτικών μεθόδων, τα προτερήματα και τα μειονεκτήματα αυτών καθώς και τα σημεία προβληματισμού θα αναλυθούν διεξοδικά στο τελευταίο μέρος της εργασίας.

ΟΔΟΝΤΕΣ ΩΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η εκτεταμένη ανάλυση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη θέση των οδόντων στην ιατροδικαστική τοξικολογία ξεπερνάει τους στόχους την παρούσας εργασίας, ωστόσο αξίζει μία αναφορά στις πληροφορίες που έχουν εξαχθεί από την υπάρχουσα, αν και περιορισμένη, βιβλιογραφία. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω τα δόντια αποτελούν ιστό άμεσα προσβάσιμο και εξαιρετικά ανθεκτικό τόσο σε μηχανικές βλάβες όσο και στις επιπτώσεις της διαδικασίας αποσύνθεσης. Εμφανίζουν ιστική ετερογένεια, καθώς αποτελούνται από το λευκό πολφό και τα σκληρά συστατικά αδαμαντίνη, οδοντίνη και οστεΐνη. Όπως και ο μυελός των οστών, έτσι και ο πολφός, ο μαλακός ιστός εντός της σκληρής οδοντικής κοιλότητας, περιλαμβάνει αγγεία και νεύρα και αποσυντίθεται αρκετά γρήγορα μετά τον θάνατο, γεγονός που του προσδίδει περιορισμένη τοξικολογική αξία.

Αντίθετα, η αδαμαντίνη δεν υφίσταται κανενός είδους αναδόμηση κατά τη διάρκεια της ενήλικου ζωής, με αποτέλεσμα η ανίχνευση μίας ουσίας στον ιστό αυτό να αντανακλά εναπόθεση κατά την παιδική ηλικία, οπότε και πραγματοποιείται η διαδικασία της ενσωμάτωσης ανόργανου υλικού στους νεοσύστατους μόνιμους οδόντες. Ομοίως, η οδοντίνη εμφανίζει ελάχιστη αναδόμηση και αποτελεί εξίσου χρήσιμο υπόστρωμα για εξειδικευμένες ιατροδικαστικές περιπτώσεις. Η οξεία θανατηφόρος λήψη, η υποξεία έκθεση ή η χρόνια έκθεση στην ενήλικη ζωή δεν μπορούν, τουλάχιστον με τα μέχρι τώρα δεδομένα, να ανιχνευτούν αποκλειστικά από τους

σκληρούς οδοντικούς ιστούς [79]. Πρόσφατες μελέτες των ισοτοπικών κλασμάτων του ψευδαργύρου στην αδαμαντίνη ανέδειξαν σημαντική συσχέτιση αυτών με διατροφικές παραμέτρους κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου [124].

Ωστόσο, δεν είναι λίγες οι μελέτες που υποστηρίζουν την ποιοτική ανίχνευση διαφόρων ουσιών (οπιοειδή, βενζοδιαζεπίνες, κοκαΐνη, αμφεταμίνες, νικοτίνη κ.ά.) έπειτα από εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων σε οδόντες. Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες η μέθοδος που ακολουθήθηκε δεν προέβλεψε τη διάκριση του πολφού από την αδαμαντίνη και την οστεΐνη, με αποτέλεσμα ο τελικός ποιοτικός προσδιορισμός να απεικονίζει ενδεχομένως τη συγκέντρωση του ξενοβιοτικού στον αγγειοβριθή πολφό και κατ' επέκταση στο πλάσμα. Επιπλέον, το μικρό χρονικό παράθυρο από τη στιγμή του θανάτου έως τη διενέργεια της ανάλυσης, αφενός αποτρέπει την απώλεια του μαλακού ιστού που επέρχεται με την πάροδο του χρόνου και αφετέρου απομακρύνει το σενάριο από την πραγματικότητα και τις ιδιαίτερες ανάγκες που ωθούν τον τοξικολόγο να ανατρέξει σε μη συμβατικά βιολογικά υλικά όπως οι οδόντες. Έρευνες που λαμβάνουν υπόψιν το μεγάλο μεταθανάτιο διάστημα είναι σαφώς πιο αξιοποιήσιμες [125,126].

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Λίγα λόγια για την αξία του μυελού των οστών ως αναλυτικό υπόστρωμα θα μπορούσαν να συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην τοξική επιβάρυνση του οστίτη ιστού. Ο μυελός εδράζεται μέσα στη μυελική κοιλότητα των μακρών οστών και ανάμεσα από τις δοκίδες του σπογγώδους τμήματος των πλατέων οστών και εμφανίζει βιολογική συμπεριφορά μεταξύ του αίματος και των συμπαγών οργάνων. Πρόκειται για ιστό του τύπου του συνδετικού ιστού, αγγειοβριθή, μαλακό και ζελατινώδη στην υφή που εμφανίζεται με δύο διακριτές μορφές ανάλογα με την ηλικία και την ανατομική θέση: τον ερυθρό και τον κίτρινο μυελό⁶⁵. Υπολογίζεται ότι το συνολικό βάρος του είναι περί τα 3 κιλά στους άνδρες και τα 2,6 στις γυναίκες και αποτελεί το 4% του βάρους σώματος [2].

Αποτελείται από λιπώδη ιστό, νερό, αιμοποιητικά κύτταρα (από προγονικές μορφές έως ώριμα κύτταρα του αίματος) και πρωτεΐνες, με την αναλογία αυτών να διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία, την ανατομική θέση και τον τύπο του μυελού. Παραδείγματος χάριν, στον ενήλικα ο ερυθρός μυελός αποτελείται κατά 40-60% από λίπος, 30-40% από νερό, ενώ οι πρωτεΐνες συγκροτούν ένα 10-20%. Ο κίτρινος μυελός από την άλλη καταλαμβάνεται από λίπος σε ποσοστό

⁶⁵ Τα νεογνικά οστά περιλαμβάνουν σχεδόν αποκλειστικά ερυθρό μυελό. Άμεσα μετά τη γέννηση η μετατροπή του ερυθρού μυελού προς κίτρινο ξεκινάει αρχικά στις τελικές φάλαγγες των δακτύλων των άκρων. Έπειτα ακολουθεί η διάφυση των μακρών οστών και η επέκταση προς τη μετάφυση και προς τις δύο κατευθύνσεις. Στο 25^ο έτος της ηλικίας ο ερυθρός μυελός περιορίζεται στο κρανίο, τους σπονδύλους, το στέρνο, τις κλείδες, τις ωμοπλάτες, τα πλευρά και την πύελο, ενώ μικρή ποσότητα υπάρχει στο εγγύς άκρο των μακρών οστών (Εικόνα 8).

80% ενώ το νερό και οι πρωτεΐνες αποτελούν το υπόλοιπο 20% (15% και 5% αντίστοιχα) [127]. Τα παραπάνω ποσοστά εμφανίζουν τοπική ή πιο γενικευμένη ετερογένεια. Τα οστά που συνήθως επιλέγονται για τοξικολογικές αναλύσεις είναι το στέρνο, τα πλευρά [128], οι σπόνδυλοι, το μηριαίο και τα οστά της πυέλου, ενώ η μεταθανάτια απόσπαση του μυελού μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους μεταξύ των οποίων [129]:

1. Είσοδος στη μυελική κοιλότητα με τη χρήση βελόνας οστεομυελικής βιοψίας
2. Εγκάρσια διατομή του οστού και αποκάλυψη της μυελικής κοιλότητας
3. Σύνθλιψη του οστού
4. Διαβροχή του οστού με διάλυμα φυσιολογικού ορού

Ως τοξικολογικό υλικό, ο μυελός παρουσιάζει μία σειρά από προτερήματα σε σχέση με πιο παραδοσιακά υλικά [130]. Αρχικά, ανευρίσκεται τοποθετημένος μέσα στη στείρα μυελική κοιλότητα και περιβάλλεται από ανθεκτικό συμπαγές οστό, παραμένοντας έτσι προστατευμένος από μηχανικές, χημικές και μικροβιακές επιδράσεις του περιβάλλοντος. Τα μεταθανάτια φαινόμενα ανακατανομής και σήψης πραγματοποιούνται σε αυτόν με πολύ βραδύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά και συμπαγή όργανα, ενώ παράλληλα η αγγειοβρίθειά του έχει ως αποτέλεσμα οποιαδήποτε μεταβολή στη σύσταση του πλάσματος να έχει άμεση αντανάκλαση σε αυτήν του μυελού. Επομένως, μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανίχνευση ξеноβιοτικών σε περιπτώσεις που βιολογικά υλικά όπως αίμα και ούρα δεν είναι πλέον διαθέσιμα.

Η διάρκεια ζωής του εξαρτάται από την ακεραιότητα του οστικού του περιβλήματος και η τοξικολογική αξία του φθίνει όταν ρωγμές στο πέριξ οστό εκθέσουν τον μυελό σε μικροβιακούς παράγοντες (βακτήρια, μύκητες), ζωικές προσβολές και επιμολύνσεις από το γύρω περιβάλλον. Σύμφωνα με μελέτες τα γεγονότα αυτά ξεκινούν έπειτα από τρεις μήνες μετά τον θάνατο [131], ωστόσο, ο μυελικός ιστός είναι σε θέση να δώσει τοξικολογικές απαντήσεις έως και πέντε χρόνια αργότερα [132]. Η μακροσκοπική του εικόνα ενδέχεται να μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χροιά σκουρόχρωμη, καστανόφαιη και υφή υγρή, ελαιώδη, κηρώδη ή μικροκοκκώδη.

Η πρώτη τοξικολογική μελέτη σε μυελό διεξήχθη το 1943 και έκτοτε έχουν δημοσιευθεί πολλαπλές έρευνες που επιβεβαιώνουν την αναλυτική του αξία [133]. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στον μυελό των οστών 46 διαφορετικές χημικές ουσίες με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και της φαρματομετρίας μάζας [134]. Μεταξύ των ουσιών αυτών περιλαμβάνονται οπιοειδή, β αποκλειστές, αντικαταθλιπτικά του τύπου των SSRIs και SNRIs, βενζοδιαζεπίνες, διεγερτικά του ΚΝΣ, αναισθητικά, αναλγητικά, αντιχολινεργικά,

αντιψυχωσικά κ.ά. Στην πραγματικότητα η ιστορία έχει δείξει ότι, κατά πάσα πιθανότητα, δεν υπάρχει ουσία που να ανευρίσκεται στο πλάσμα και να μην μπορεί να ανευρεθεί στο μυελό των οστών δεδομένης της άμεσης επικοινωνίας του με την αιματική κυκλοφορία. Οι διάφορες μελέτες έχουν αποδώσει στο μυελό ευαισθησία που κυμαίνεται από 45% έως 100% [89,94]. Παρά ταύτα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες μία ουσία ανιχνεύεται στο αίμα αλλά όχι στον μυελό των οστών, ωστόσο, καταστάσεις σαν αυτές αντανakλούν αποκλειστικά και μόνο ανεπάρκεια των μεθόδων απομόνωσης και ανάλυσης που ακολουθήθηκαν.

Σε αντίθεση με τον οστίτη ιστό οι περισσότερες από τις ουσίες που απομονώνονται στον μυελό εμφανίζουν σχεδόν γραμμική ποσοτική συσχέτιση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα, γεγονός που διευκολύνει κατά πολύ την ερμηνεία των αποτελεσμάτων για ιατροδικαστικούς σκοπούς [135]. Ουσίες λιπόφιλες έχουν την τάση να συσσωρεύονται στον μυελό σε αυξημένες συγκεντρώσεις, ωστόσο αυτό μεταβάλλεται ανάλογα με την αναλογία νερού-λίπους στο εκάστοτε δείγμα [136]. Ο Winek σε μελέτη του για την αιθυλική αλκοόλη πρότεινε μία μέθοδο για τη διόρθωση της ανευρεθείσας τιμής συγκέντρωσης μίας ουσίας στον μυελό που ενίσχυσε ακόμη περισσότερο τη θεωρία της γραμμικότητας [137].

Η μέθοδος αυτή λαμβάνει υπόψιν το ποσοστό νερού, το οποίο υπολογίζεται από τη διαφορά του βάρους του λιπώδους περιεχομένου του μυελού από το συνολικό βάρος του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό ο υπολογισμός της πιθανής συγκέντρωσης του ξενοβιοτικού στο αίμα γίνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η ποσοτική γραμμικότητα επιβεβαιώνεται επίσης για πτητικές ουσίες όπως η ακετόνη, κυανίδια, το υδρόθειο, η αιθανόλη και το τολουόλιο [138], αν και φαίνεται πως ουσίες σαν αυτές παρουσιάζουν ταχεία μείωση των συγκεντρώσεών τους αμέσως τις πρώτες ώρες μετά την απόσπαση του δείγματος και πρέπει να αναλύονται άμεσα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της διαζεπάμης και του μεταβολίτη της κλοναζεπάμης 7-αμινοκλοναζεπάμη, οι τιμές των οποίων στον μυελό φαίνεται να αποκλίνουν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες του αίματος. Σχετικές έρευνες έχουν δείξει καθυστερημένη απομάκρυνση των βενζοδιαζεπινών αυτών από τον μυελό χωρίς να προτείνεται κάποιος συγκεκριμένος υπεύθυνος μηχανισμός όπως αναλύεται και παραπάνω [87]. Εικασίες σχετικά με τη διάσταση των τιμών συγκεντρώσεων μεταξύ αίματος και μυελού έχουν γίνει κατά καιρούς και αφορούν κυρίως την ποιότητα του δείγματος⁶⁶ ή προθανάτια κυκλοφοριακή κατάρρευση και καταπληξία που παρεμποδίζει την ομαλή άρδευση των ιστών. Ενίοτε η ουσία ενδιαφέροντος ενδέχεται να μην έχει προλάβει να φτάσει στην ανώτερη τιμή συγκέντρωσής της στο μυελό λόγω του θανάτου [139].

⁶⁶ Ο κίτρινος μυελός των υπερηλίκων αποτελεί δείγμα λιγότερο αξιόπιστο λόγω της χαμηλής του αιμάτωσης.

Στο τελευταίο αυτό μέρος της εργασίας κρίνεται αναγκαία η συζήτηση σχετικά με τις χημικές μεθόδους που στοχεύουν στον διαχωρισμό, την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των ξеноβιοτικών ουσιών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος στον οστίτη ιστό με ή χωρίς τον μυελό αυτού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η απουσία πρωτοκόλλων σχετικά με την αναλυτική διαχείριση του συγκεκριμένου ιστού καθιστά δυσχερή όχι μόνο τη διεξαγωγή της ακριβούς και αξιόπιστης ανάλυσης αλλά και την ερμηνεία των αναλυτικών αποτελεσμάτων και κατ' επέκταση το συγκριτικό έλεγχο και την εξαγωγή συμπερασμάτων που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ιατροδικαστική επιστήμη.

Παρ' ότι κάθε επιστημονική ομάδα ακολουθεί διαφορετικά βήματα προετοιμασίας του δείγματος και ανάλυσης, επιχειρείται συχνά επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου με τη βιβλιογραφία να βρίθει μεθοδολογιών που αποδεικνύονται στατιστικά επαρκείς. Εντούτοις, για την άμεση σύγκριση δύο ή περισσότερων δημοσιεύσεων ή ακόμα και για τη συγγραφή μίας μετα-ανάλυσης απαιτείται όλες οι πρωτότυπες έρευνες να πληρούν πολλαπλά κριτήρια, γεγονός που είναι σχεδόν ανέφικτο, ιδίως εφόσον οι μελέτες διεξάγονται σε ανθρώπινο οστικό ιστό, από περιστατικά βίαιου θανάτου άγνωστων συνθηκών. Ως άμεση συνέπεια όσων αναλύθηκαν διεξοδικά παραπάνω αλλά και ως αντίστροφη ροή της ίδιας σκέψης, δύο πειραματικές μελέτες είναι συγκρίσιμες εφόσον πληρούνται όλες οι παρακάτω προϋποθέσεις (ή όλες πλην μίας η οποία αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης):

- Οι μελέτες διεξάγονται στο ίδιο είδος οργανισμών (π.χ. αρουραίοι Wistar, άνθρωπος κ.ά.)
- Αφορούν το ίδιο οστό και το ίδιο τμήμα του οστού (π.χ. μηριαίο οστό, τμήμα επίφυσης)
- Επιλέγουν δείγμα ίδιων διαστάσεων και συνολικής μάζας
- Προσδιορίζουν την ύπαρξη στο δείγμα μυελού των οστών ή όχι και την ποσότητα αυτού
- Ο ιστός προέρχεται από υποκείμενο με παρόμοια ιδιοσυστατικά χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία, παθήσεις των οστών κ.ά.)
- Αναζητείται η ίδια ουσία
- Η δόση, η οδός χορήγησης, το δοσολογικό σχήμα και η κατανομή στον χρόνο είναι παρόμοια
- Τα προθανάτια και μεταθανάτια διαστήματα συμφωνούν⁶⁷
- Τα σώματα διατηρήθηκαν στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, ηλιοφάνεια κ.ά.) μετά τον θάνατο και στην ίδια θέση

⁶⁷ Δηλαδή είναι ίδιος ο χρόνος από τη λήψη της ουσίας μέχρι τον θάνατο, όπως και ο χρόνος από τον θάνατο ως τη διενέργεια της αναλυτικής μεθόδου.

- Ταυτίζεται η αιτία του θανάτου, είτε αυτός οφείλεται στην ίδια την ουσία είτε όχι
- Το δείγμα διατηρείται στις ίδιες συνθήκες μέχρι τη διεξαγωγή της ανάλυσης
- Τέλος, το δείγμα υφίσταται την ίδια προετοιμασία και υπόκειται στην ίδια αναλυτική μέθοδο

Είναι σαφές ότι για να καταλήξουμε στη δυνατότητα σύγκρισης απαιτούνται ακόμα αναρίθμητες έρευνες για κάθε μία ουσία ξεχωριστά. Ωστόσο, σε αυτό το σημείο τίθεται το ερώτημα: τι είναι αυτό που κάνει τον οστικό ιστό δυσκολότερο στη διαχείριση σε σχέση με άλλους ιστούς; Στην πραγματικότητα οι μόνοι ιστοί που έχουν μελετηθεί διεξοδικά και μπορούν να αξιοποιηθούν χωρίς φόβο είναι το αίμα, τα ούρα και, σε μικρότερο βαθμό, άλλα ρευστά βιολογικά υποστρώματα (π.χ. κόπρανα). Όλα τα συμπαγή όργανα βρίσκονται ακόμα υπό το πρίσμα της τοξικολογικής επιστήμης για τη δημιουργία πρωτοκόλλων επεξεργασίας. Ως στερεό υλικό, το οστό δεν διαφέρει από αυτά, ενώ παρουσιάζει και επιπρόσθετες προκλήσεις.

Αρχικά, ο οστίτης ιστός εμφανίζει μία ιδιότητα που δεν χαρακτηρίζει κανένα άλλο όργανο του σώματος, και αυτή είναι η αυξημένη σκληρότητα. Αυτόματα, το χαρακτηριστικό αυτό εκτροχιάζει τη διαδικασία της προκατεργασίας που στοχεύει, σε ένα πρώτο στάδιο, στη μετατροπή του σε μαλακό ιστό ή στη δημιουργία εναιωρήματος. Επιπλέον, σημαντική διαφορά ανάμεσα στο οστό και στο αίμα είναι η διαφορά στην ομοιογένεια. Τα διαφορετικά είδη οστού που συναντώνται σε στενή γειτνίαση μέσα στο ίδιο ιστοτεμάχιο, αλλά και η δια-οστική ετερογένεια έχουν ως αποτέλεσμα στην ανισότιμη κατανομή των ξеноβιοτικών στην έκταση του σκελετού, κάτι που δεν συμβαίνει με τα ομοιογενή ρευστά. Τα ούρα από την άλλη ανευρίσκονται περιορισμένα σε μία σαφώς περιγεγραμμένη κοιλότητα και το δείγμα είναι μικρής ποσότητας και, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, πλήρως αντιπροσωπευτικό.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που δυσχεραίνει την επεξεργασία είναι η ύπαρξη του μυελού σε προσκόλληση με τον ιστό ενδιαφέροντος. Αναπόφευκτα η απόσπασή του δεν είναι πάντοτε επιτυχής, γεγονός που συνεπάγεται την επιμόλυνση του δείγματος και την παρουσία ψευδών αποτελεσμάτων. Ας μην ξεχνάμε ότι πρόκειται για έναν ιστό αγγειοβριθή που αποτελεί σε μεγάλο βαθμό αντανάκλαση της σύστασης του αίματος. Ο ίδιος αυτός ιστός ρυπαίνει το δείγμα με ανεπιθύμητες ενώσεις (π.χ. λίπος), ενώ και το οστό καθ' εαυτό εμφανίζει μία πολύ σαφή δομή από εξωκυττάρια οργανικές και ανόργανες ενώσεις, που, στην ουσία, αποτελούν βιολογικά απόβλητα για τη διαδικασία της ανάλυσης. Σε αντίθεση λοιπόν με άλλους ιστούς που χρησιμοποιούνται σχεδόν αυτούσιοι, το οστό περιλαμβάνει πλήθος συστατικών που πρέπει να απομακρυνθούν με διαδικασίες που ακόμη βρίσκονται υπό διερεύνηση.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος είναι στοιχείο που ταλαιπωρεί σε μεγάλο βαθμό τους τοξικολόγους, και ιδίως τον κλάδο της οστικής τοξικολογίας, γεγονός που γίνεται φανερό από την πληθώρα των μελετών που επιχειρούν να εντάξουν τη δια- και ενδοστική εντόπιση στις παραμέτρους. Ιδιαίτερα η ενδοστική ετερογένεια της κατανομής θέτει συχνά την αμφιβολία της παραπλανητικής δειγματοληψίας, και ο επιστήμονας οφείλει ενίοτε να καταφεύγει στην εκτεταμένη επιλογή μέχρι εξαντλήσεως του υλικού. Κάτι τέτοιο φυσικά πρέπει να δικαιολογείται από την υψηλή αναγκαιότητα και να μην καταστρατηγεί τον οικονομικό προϋπολογισμό. Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι μελέτες που παρατηρούν ποσοτικές διαφορές ανάμεσα σε απολύτως συμμετρικές περιοχές με άξονα το μέσο οβελιαίο επίπεδο. Επομένως, σε περιπτώσεις που είναι διαθέσιμος ολόκληρος ο σκελετός, προτείνεται συχνά η ταυτόχρονη ανάλυση ιστών τόσο από τη δεξιά όσο και από την αριστερή πλευρά και ο προσδιορισμός της μέσης τιμής.

Παρ' ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων αναφερόμαστε σε μεταθανάτια υλικά, υπάρχει η δυνατότητα ακόμη και δειγματοληψίας *in vivo* χάρη σε μία τεχνική που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια⁶⁸. Πρόκειται για τη μικροδιάλυση, μία ελάχιστα επεμβατική τεχνική που έχει εφαρμοστεί σε πληθώρα πειραματικών και προκλινικών μελετών σε πειραματόζωα, ενώ ενίοτε έχει βρει εφαρμογή και στον άνθρωπο για τη μέτρηση εξωγενών ή ενδογενών ουσιών σε διάφορους ιστούς⁶⁹. Η μέθοδος βασίζεται στην εισαγωγή ενός τριχοειδικού καθετήρα μέσα στον ιστό ενδιαφέροντος. Όπως είναι αναμενόμενο, στην περίπτωση του οστού απαιτείται η δημιουργία οπής με ιστικό τρυπάνι [140]. Ο καθετήρας στο ελεύθερο άκρο του φέρει ημιδιαπερατή μεμβράνη που μιμείται το τριχοειδικό τοίχωμα και επιτρέπει την παθητική διάχυση ουσιών από το διακυτταρικό περιβάλλον του ιστού στο εσωτερικό του καθετήρα. Εν προκειμένω, το διακυτταρικό αυτό περιβάλλον αντιστοιχεί στις οστικές αποθήκες νερού στις οποίες συγκεντρώνονται τα ξеноβιοτικά πριν την εναπόθεση αλλά και έπειτα από την οστική αναδόμηση.

Σε πρόσφατη μελέτη αναζητήθηκε η οστική φαρμακοκινητική του αντιβιοτικού κεφουροξίμη σε συμπαγές, φλοιώδες οστό χοίρων με τη μέθοδο της μικροδιάλυσης [141]. Στην εν λόγω έρευνα εισήχθη υδατικό διάλυμα της κεφαλοσπορίνης μέσω ενός προσαγωγού κλάδου του καθετήρα. Ο ίδιος καθετήρας περιλάμβανε επίσης έναν απαγωγό κλάδο, από τον οποίο οι επιστήμονες έλαβαν το διάλυμα που επρόκειτο να υποστεί την αναλυτική επεξεργασία. Παράλληλα, υπολογίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

⁶⁸ Το ποια ιατροδικαστική αναγκαιότητα θα απαιτούσε την οστική δειγματοληψία *in vivo* είναι αντικείμενο προς συζήτηση.

⁶⁹ Χαρακτηριστικά, χρησιμοποιείται στη μέτρηση της γλυκόζης σε διαβητικούς σε συνδυασμό με αντλία έκκρισης ινσουλίνης.

$$RR\%gain^{70} = 100 \times \left(\frac{C_{out}}{C_m} \right)$$

Όπου:

- $RR\%_{gain}$ η ποσοστιαία αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στο εξαχθέν διάλυμα (απαγωγός κλάδος καθετήρα) σε σχέση με το εξωκυττάριο περιβάλλον του ιστού
- C_{out} η συγκέντρωση της ουσίας στο εξαχθέν διάλυμα
- C_m η συγκέντρωση της ουσίας στο εξωκυττάριο περιβάλλον (δηλαδή στις διακυτταρικές αποθήκες νερού του οστού) στην περιοχή πέριξ του καθετήρα

$$RR\%loss^{71} = 100 \times \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \right)$$

Όπου:

- $RR\%_{loss}$ η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της ουσίας στο εξαχθέν διάλυμα (απαγωγός κλάδος καθετήρα) σε σχέση με το εισαχθέν διάλυμα (προσαγωγός κλάδος καθετήρα)
- C_{out} η συγκέντρωση της ουσίας στο εξαχθέν διάλυμα
- C_{in} η συγκέντρωση της ουσίας στο εισαχθέν διάλυμα

Τέλος, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της απόλυτης τιμής συγκέντρωσης της ουσίας στον ιστό υπολογίζοντας το λόγο C_{out}/RR . Ωστόσο, σπάνια οι σχετικές μελέτες καταφεύγουν σε αυτή την ποσοτική μέθοδο, ενώ συνήθως η τεχνική της μικροδιάλυσης χρησιμοποιείται μόνον ως μέσο δειγματοληψίας. Το εξαχθέν υδατικό διάλυμα υφίσταται επεξεργασία και υπόκειται σε κάποια ή κάποιες από τις αναλυτικές μεθόδους που περιγράφονται στη συνέχεια. Οι δημοσιευμένες μελέτες που αξιοποιούν την τεχνική της μικροδιάλυσης είναι αρκετά περιορισμένες, παρ' ότι πρόκειται για μέθοδο πολλά υποσχόμενη. Ως κλασσική πρακτική θεωρείται η λήψη ιστοτεμαχίου και η προετοιμασία και επεξεργασία αυτού ακολουθώντας τα βήματα που παρατίθενται στη συνέχεια.

⁷⁰ Ο υπολογισμός αυτός έχει νόημα σε περιπτώσεις που ο ιστός εμφανίζει συγκέντρωση της ουσίας μεγαλύτερη από αυτήν του εισαχθέντος υδατικού διαλύματος ή εναλλακτικά το διάλυμα αυτό είναι ελεύθερο ξενοβιοτικού.

⁷¹ Ο υπολογισμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα θετική τιμή σε περιπτώσεις που ο ιστός εμφανίζει συγκέντρωση της ουσίας μικρότερη από αυτήν του εισαχθέντος υδατικού διαλύματος ή εναλλακτικά ο ιστός είναι ελεύθερος ξενοβιοτικού. Αντίθετα λαμβάνει αρνητική τιμή σε περίπτωση που το οστό φέρει την ουσία σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτήν του προσαγωγού κλάδου του καθετήρα. Μία αρνητική $RR\%_{loss}$ είναι αυτόματα μία θετική τιμή $RR\%_{gain}$ και μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε τη C_m . Στην πράξη σπάνια οι δύο αυτές τιμές ταυτίζονται απόλυτα λόγω του πειραματικού σφάλματος.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η προετοιμασία του μη ρευστού δείγματος αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην αναλυτική διαδικασία, παρ' ότι συχνά επισκιάζεται από την περιπλοκότητα των αναλυτικών μεθόδων. Μία λανθασμένη, ανεπαρκής ή πρόχειρη προετοιμασία συνεπάγεται αυτόματα χαμηλή αναλυτική ποιότητα ακόμα και αν έχουν επιλεγεί οι καταλληλότερες και ακριβέστερες αναλυτικές μέθοδοι. Σε γενικές γραμμές, ο κύριος σκοπός του πρώτου σταδίου είναι η δημιουργία συμβατότητας μεταξύ του δείγματος και του αναλυτικού συστήματος στο οποίο αυτό θα εισαχθεί. Αυτό πραγματοποιείται με διάφορα βήματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 5. Από το πρώτο ακόμα προ-αναλυτικό επίπεδο παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιστημονικών ομάδων. Η προετοιμασία ξεκινάει έπειτα από την εξαγωγή του ιστού από το σώμα του πειραματόζωου ή του πτωματικού υποκειμένου, και το πρώτο βήμα συνήθως συνίσταται στην μηχανική απομάκρυνση των μαλακών μορίων, με τη χρήση χειρουργικού νυστεριού, ψαλιδιού ή άλλων ιατρικών εργαλείων, έως ότου το οστό φαίνεται πλήρως απογυμνωμένο μακροσκοπικά.

Ενίστε βοηθητικά μέσα, όπως μικρές βούρτσες [82] συμβάλλουν στην πληρέστερη απομάκρυνση των υπολειμμάτων, ενώ ορισμένες ομάδες, με κυριότερη την Καναδική ομάδα του Λαυρεντιανού Πανεπιστημίου του Οντάριο, επιτυγχάνουν τον καθαρισμό με χημικά μέσα. Ο Watterson προτείνει τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) μαζί με χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε ίση αναλογία και συνολική συγκέντρωση 0,5 mol/L σε συνδυασμό με υπερηχητική διέγερση με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των μαλακών ιστών [142]. Ο χρόνος επώασης του οστού εξαρτάται τόσο από το μέγεθος και τον τύπο αυτού όσο και από την ουσία που επιδιώκουμε να απομονώσουμε. Ορισμένες φορές το βασικό διάλυμα υποκαθίσταται από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, ιδίως όταν η αναλυτική μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση τεχνικής ELISA⁷². Σε άλλες μελέτες προτείνεται κατά περίπτωση ξέπλυμα του οστού με διαλύματα ακετόνης και μεθανόλης ή αποσταγμένο νερό [143].

Σε περιπτώσεις προηγηθείσας ταφής ή ανεύρεσης ιστών εκτεθειμένων σε περιβαλλοντικούς ρύπους συνίσταται επίσης το ξέπλυμα με απιονισμένο νερό⁷³ μέχρι πλήρους διαύγασης αυτού [144]. Ελάχιστες είναι οι έρευνες που παραλείπουν το στάδιο του καθαρισμού και της αφαίρεσης των πέριξ ιστών με ό,τι αυτό συνεπάγεται στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Επόμενο βήμα στην προετοιμασία αποτελεί η αποξήρανση/αφυδάτωση του οστού, που επιτυγχάνεται είτε σε απλή

⁷² Έχει παρατηρηθεί έκπτωση στην ποιότητα της αναλυτικής ισχύος της ELISA όταν η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει τη χρήση ισχυρού βασικού διαλύματος.

⁷³ Οι έννοιες του αποσταγμένου και του απιονισμένου νερού συχνά συγχέονται, παρ' ότι προέρχονται από δύο τελείως διαφορετικές χημικές διεργασίες. Το αποσταγμένο νερό προκύπτει έπειτα από απόσταξη και επομένως καθαρισμό αυτού από πιθανούς ρύπους. Το απιονισμένο νερό, από την άλλη, στερείται μεταλλικών ιόντων και αλάτων.

πολύωρη διατήρηση σε φυσικές συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και ανέμου είτε με τη συνδρομή βοηθητικών μέσων (π.χ. στέγνωμα με αέριο αργό). Συχνή τακτική είναι η αφύγρανση σε εργαστηριακό κλίβανο σε θερμοκρασία 50-75°C για 24 ώρες, διαδικασία που είτε προηγείται είτε έπεται της διάσπασης σε μικρότερα ιστοτεμάχια [145]. Κατά τον θρυμματισμό επιλέγεται η διατήρηση ή η απόσπαση του μυελού των οστών ανάλογα με τις ανάγκες της έρευνας.

Η αφαίρεση του μυελού επιτυγχάνεται βέλτιστα στο συμπαγές οστό με μηχανικές μεθόδους και στο σπογγώδες με ξέπλυμα με υδατικά διαλύματα. Δημοσιευμένες μελέτες, που δεν κάνουν αναφορά στη διαχείριση του μυελού των οστών, διαπράττουν αναπόφευκτα σφάλμα κατά την αξιολόγηση της αναλυτικής αξιοπιστίας της μεθόδου και της δυνατότητας συγκριτικής ποσοτικοποίησης. Η Fernandez-Lopez και η επιστημονική της ομάδα έχει δημοσιεύσει πλήθος ερευνών κατά τις οποίες επιλέγεται με συνέπεια η μηχανική διάσπαση του οστού σε κλάσματα μήκους 4 mm και ύψους 6 mm [146], πρακτική που ωστόσο ποικίλει ανάλογα με τις προτιμήσεις των μελετητών. Τελικός στόχος είναι η μετατροπή των μικρών αυτών κλασμάτων σε μορφή σκόνης με τη βοήθεια εργαστηριακών μηχανημάτων άλεσης (σφαιρόμυλοι). Η σκόνη αποθηκεύεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες από πλαστικό ή ύαλο και σε θερμοκρασίες συντήρησης ή ψύξης⁷⁴ μέχρι την περαιτέρω ανάλυση.

Η φύση της ουσίας θέτει ορισμένες φορές προκλήσεις στη διαδικασία προετοιμασίας. Σε περιπτώσεις που η ουσία προς απομόνωση εμφανίζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με εγγενή συστατικά του οστού, τότε, ανεξάρτητα με τις διαδικασίες που ακολουθούνται, είναι πολύ δύσκολος ο διαχωρισμός από άχρηστες προσμίξεις και ορισμένα από τα πολύτιμα συστατικά απορρίπτονται εσφαλμένα. Παραδείγματος χάριν, τα προϊόντα υδρόλυσης των νευρικών παραγόντων παρουσιάζουν πανομοιότυπες συχνά παραμέτρους (πολικότητα, pKa, μοριακή μάζα, φωσφορικές ομάδες στο μόριό τους) με ουσίες όπως το κιτρικό οξύ, τα φωσφολιπίδια και τα διάφορα οξέα του οστού με βάση το φωσφόρο [82]. Για ουσίες σαν αυτές δεν έχει ακόμα θεσπιστεί κάποιο βέλτιστο πρωτόκολλο προετοιμασίας και κάθε επιστημονική ομάδα επιδίδεται σε μία σειρά πειραματικών μεθόδων καθαρισμού.

Τέλος, ορισμένες μελέτες, προτού προχωρήσουν στο διαχωρισμό, επιδιώκουν την απομάκρυνση των μεταλλικών στοιχείων και των ιόντων του υδροξυαπατίτη από το δείγμα ακολουθώντας τη διαδικασία της αφαλάτωσης. Σαφώς η εφαρμογή μιας τέτοιας μεθόδου δεν έχει θέση σε περιπτώσεις που αναζητούνται βαρέα μέταλλα ή ενδογενή ιχνοστοιχεία στο οστό. Μία συνήθης μέθοδος είναι η προσθήκη στην οστική σκόνη ποσότητας νιτρικού οξέος (HNO₃) που εξασκεί ισχυρές αφαλατωτικές και διαβρωτικές ιδιότητες [102]. Ως ισχυρό οξύ αντιδρά τόσο με μεταλλικά όσο και με μη μεταλλικά ιόντα που αποτελούν συστατικά της ανόργανης οστικής

⁷⁴ Στη βιβλιογραφία αναφέρεται αποθήκευση σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από -80°C έως -20°C.

ουσίας, μεταξύ των οποίων ο φωσφόρος, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός (Εικόνα 9). Πλήρης μεταλλική διάλυση πραγματοποιείται επίσης με την επώαση σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) για 1-1,5 ώρα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Πριν τη διεξαγωγή της διαδικασίας εκχύλισης, στην οστική πούδρα προστίθεται το επιθυμητό εσωτερικό πρότυπο και ένας επιλεγμένος διαλύτης (συνήθως μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου, υδροξείδιο του αμμωνίου, αιθανικός αιθυλεστέρας ή ακετονιτρίλιο) και το μείγμα υφίσταται υπερηχογραφική επώαση. Η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο επιτυγχάνουν την κατακάθιση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στο μείγμα, ενώ ενίοτε επιδιώκεται ενζυματική υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση [145]. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση⁷⁵ και το υπερκείμενο ανακτάται προς περαιτέρω επεξεργασία. Οι επιθυμητές ουσίες απομονώνονται σε ένα πρώτο στάδιο με τη διαδικασία της εξάτμισης των διαλυτών υπό την επίδραση ρεύματος αέρα υψηλής θερμοκρασίας (π.χ. 70°C) ή αέριου αζώτου. Το ίζημα διαλύεται εκ νέου στον κατάλληλο διαλύτη και προετοιμάζεται για την εισαγωγή σε ένα επιλεγμένο κατά περίπτωση σύστημα εκχύλισης.

Οποιαδήποτε από τις τεχνικές εκχύλισης έχει ως στόχο τη διευκόλυνση στη διεξαγωγή των διαδικασιών ανίχνευσης που συναντώνται στα επόμενα στάδια της αναλυτικής μεθοδολογίας. Η εκχύλιση προσφέρει κατά βάση τρία σημαντικά προτερήματα στο υπό εξέταση δείγμα. Αρχικά μέσω της διαδικασίας αυτής επιτυγχάνεται καθαρισμός του δείγματος από περιττές ενώσεις που περιλαμβάνονται στον οστικό ιστό. Επιπλέον, σε περιπτώσεις χαμηλών συγκεντρώσεων των ξενοβιοτικών επιδιώκεται συμπύκνωση αυτών, έτσι ώστε να ξεπερνούν το κατώτατο όριο ανίχνευσης της εκάστοτε αναλυτικής μεθόδου. Τέλος, χάρη στην εκχύλιση δίνεται η δυνατότητα μεταφοράς του δείγματος από έναν διαλύτη σε κάποιον περισσότερο κατάλληλο για την πραγματοποίηση των επόμενων βημάτων ανάλυσης. Στη βιβλιογραφία υπάρχει σαφής ασυμφωνία σχετικά με την επιλογή του τύπου εκχύλισης, οι συνηθέστεροι από τους οποίους αναλύονται παρακάτω:

⁷⁵ Με τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης μεγαλομοριακές ουσίες, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια που περιέχονται στον οστικό ιστό και βρίσκονται ελεύθερες αιωρούμενες στο μείγμα, υποχρεούνται σε κατακάθιση λόγω της επίδρασης σε αυτές φυγόκεντρου δύναμης. Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω, ο οστικός ιστός περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που αποτελούν συστατικά της οργανικής θεμελίου ουσίας, ενώ η ατελής απόσπαση ή η σκόπιμη διατήρηση του μυελού των οστών έχει ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του δείγματος με συστατικά του λιπώδους ιστού. Το δείγμα θα πρέπει να υποστεί επομένως κάθαρση πριν από την έναρξη της ανάλυσης.

1. ΠΑΘΗΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η Desrosiers ακολουθεί και αξιολογεί σε ορισμένες δημοσιευμένες μελέτες της την απλούστερη μορφή εκχύλισης που στηρίζεται αποκλειστικά στην επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας [142]. Κατά την παθητική εκχύλιση τα αποτρίμματα του οστού ζυγίζονται και ισοβαρείς ποσότητες χωρίζονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους προστίθεται μεθανόλη ως διαλύτης. Πραγματοποιείται ελεγχόμενη επώαση του δείγματος στους 50°C και ο διαλύτης ανανεώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με σκοπό την παρακολούθηση της διαδικασίας εκχύλισης στον χρόνο. Η ανακτηθείσα μεθανόλη στο σύνολό της υφίσταται εξάτμιση υπό την επίδραση αργού αερίου με αποτέλεσμα την απομόνωση των επιθυμητών ουσιών που στη συνέχεια διαλύονται και πάλι σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου για τη συνέχιση της επεξεργασίας. Συγγενής μέθοδος είναι και η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet.

Το βασικότερο μειονέκτημα των πρωτογενών αυτών μεθόδων είναι ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας και την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος. Σε σχετική μελέτη επιχειρήθηκε μία αδρή ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και παράθεση των μελετών έως το 2009 που επέλεξαν την παθητική εκχύλιση ως βασική μέθοδο εκχύλισης κατά την απομόνωση ουσιών από οστά. Διαπιστώθηκε πως ανεξάρτητα από την ουσία ενδιαφέροντος, την προέλευση και φύση του οστικού κλάσματος⁷⁶ ή το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος της εκχύλισης ήταν δώδεκα ώρες, ενώ σε περιπτώσεις έφτανε μέχρι και τα τρία εικοσιτετράωρα. Φαίνεται πως συχνά ο μέγιστος ρυθμός εκχύλισης παρατηρείται μεταξύ των 12 και των 24 ωρών γεγονός που αποδίδεται στις διαφορετικές αποθήκες εντός του οστού⁷⁷. Η ανάγκη για συνεχή ανανέωση των διαλυτών έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη σπατάλη σημαντικών ποσοτήτων αναλώσιμου εξοπλισμού και τη μείωση του κλάσματος όφελος/κόστος.

2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελεί κατ' εξοχήν μέθοδο διαχωρισμού στην ιατροδικαστική τοξικολογία που συναντάται στη μεγαλύτερη μερίδα των πειραματικών ερευνών. Όπως είναι αναμενόμενο, η επιλογή της στερεάς φάσης και των εμπλεκόμενων διαλυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ουσίες που θέλουμε να απομονώσουμε και τις ιδιότητες αυτών. Η διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης χωρίζεται σε τέσσερα ή πέντε κατά περίπτωση διαδοχικά στάδια. Κατά

⁷⁶ Συμπαγές, δοκιδώδες, διάφυση ή επίφυση

⁷⁷ Η ποσότητα του ξενοβιοτικού που ανευρίσκεται στην οστική επιφάνεια αποδεσμεύεται από αυτήν νωρίς και ευκολότερα σε σχέση με τα μόρια της ουσίας που βρίσκονται εμβυθισμένα μέσα στη θεμέλια ουσία και υποκαθιστούν ιόντα στον υδροξυαπατίτη. Τα μόρια αυτά μετακινούνται αργότερα στη διαδικασία παθητικής εκχύλισης δημιουργώντας το δεύτερο peak μετά τις δώδεκα ώρες.

το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης και εξισορρόπησης της στερεής φάσης στο σωλήνα της εκχύλισης προστίθεται συνήθως μεθανόλη και έπειτα υδατικό διάλυμα ορισμένου pH. Άπαξ και το σύστημα είναι έτοιμο ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, το οποίο συνίσταται στη φόρτωση του δείγματος. Εν προκειμένω πρόκειται για το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τις ουσίες ενδιαφέροντος.

Το δείγμα αφήνεται να πραγματοποιήσει τη διαδικασία εκχύλισης με κινητήριο δύναμη τη βαρύτητα ή ασκείται σε αυτό ορισμένη πίεση με σκοπό την επίτευξη συγκεκριμένου ρυθμού εκχύλισης⁷⁸. Στη συνέχεια το σύστημα απαιτεί έκπλυση και καθαρισμό που συνήθως επιτυγχάνεται με αποσταγμένο/απιονισμένο νερό, μεθανόλη και διάφορα όξινα διαλύματα (υδροχλωρικό οξύ, οξικό οξύ), ενώ η διαδικασία ολοκληρώνεται με την έκλουση των αναλυτών με την προσθήκη διαλύματος διχλωρομεθάνιου-ισοπροπανόλης. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα της Fernandez-Lopez επιλέγει για την έκλουση διάλυμα διχλωρομεθάνι-ου/ισοπροπανόλης/ αμμωνίας σε αναλογία όγκων 78:20:2 αντίστοιχα. Ο διαλύτης αλλάζει και πάλι για την εξυπηρέτηση των νέων αναγκών, καθώς πραγματοποιείται εξάτμιση αυτού και προσθήκη του ιζήματος σε νέο διαλύτη, με σκοπό την εισαγωγή του μείγματος σε σύστημα χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας.

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ

Στη βιβλιογραφία συναντάται όλο και πιο συχνά τα τελευταία χρόνια η ενσωμάτωση μίας μεθόδου εκχύλισης που περιλαμβάνει τη χρήση συσκευών μικροκυμάτων. Τα μικροκύματα αποτελούν μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος που κυμαίνεται από 1 μέτρο έως 1 χιλιοστόμετρο και συχνότητα από 300 MHz έως 300 GHz αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό της ακτινοβολίας αυτής είναι ότι προκύπτει χάρη σε ταλαντούμενα, κάθετα μεταξύ τους ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία και έχει ως αποτέλεσμα την περιστροφική ταλάντωση των εμπλεκόμενων μορίων και συνεπώς την ταχεία θέρμανση του συστήματος. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα⁷⁹ στην ουσία συνιστά εξέλιξη της παθητικής εκχύλισης και διαφέρει από αυτήν στην τεχνική θέρμανσης, ενώ το αποτέλεσμα της εκχύλισης είναι ανάλογο, ωστόσο διεξάγεται σε μικρότερο χρόνο και με μεγαλύτερη αποδοτικότητα.

Η μέθοδος, αν και χρησιμοποιείται σπανίως για ιατροδικαστικούς σκοπούς, δεν αποτελεί καινοτομία στην περιβαλλοντική τοξικολογία που καταφεύγει συχνά σε αυτήν για την απομόνωση ουσιών ενδιαφέροντος από ιζήματα, μεταξύ των οποίων αρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα [147]. Όπως φαίνεται από τη βιβλιογραφία, η MAE τα τελευταία χρόνια κερδίζει συνεχώς έδαφος και στον τομέα της οστικής

⁷⁸ Περίπου 1-2 σταγόνες το δευτερόλεπτο ή 1ml/min.

⁷⁹ Microwave Assisted Extraction (MAE)

τοξικολογίας χάρη στην υψηλή της εκχυλιστική απόδοση σε σχέση με πιο παραδοσιακές μορφές εκχύλισης και στην κατανάλωση μικρότερων ποσοτήτων πολικού ή λιγότερο συχνά⁸⁰ μη πολικού διαλύτη. Πρόκειται για μία διαδικασία που πραγματοποιείται σε σύντομο χρόνο⁸¹ και επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση πολλαπλών δειγμάτων σε ορισμένες συνθήκες αυξημένης πίεσης και θερμοκρασίας. Από τους πρώτους επιστήμονες που εισήγαγε τη μέθοδο αυτή ήταν ο Franke [148], ο οποίος παρατήρησε εξαιρετικά θετικά αποτελέσματα εκχύλισης από ορό αίματος, κάτι που επιβεβαιώθηκε αργότερα στα οστά και από την ομάδα του Watterson⁸² [142].

4. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η υγρή-υγρή εκχύλιση σπάνια απαντάται σε τοξικολογικές μελέτες οστών [96], καθώς εξ ορισμού το δείγμα προς ανάλυση δεν είναι σχεδόν ποτέ υγρό αλλά περιέχει στερεά σωματίδια ορισμένης μάζας που προέρχονται από την άλεση των οστικών ιστοτεμαχίων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει θέση στην ανάλυση του μυελού των οστών και την ανεύρεση σε αυτόν ξενοβιοτικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος [149]. Το δείγμα, αφού υποστεί μία αρχική επεξεργασία που περιλαμβάνει την προσθήκη εσωτερικού προτύπου και τη δημιουργία υδατικού διαλύματος με διαλύτη συνήθως κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα, εισάγεται, έπειτα, στη συσκευή εκχύλισης και η επαναλαμβανόμενη διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των επιθυμητών ουσιών στον νέο οργανικό διαλύτη (π.χ. αιθανικός αιθυλεστέρας⁸³).

Η διαφορά στην προετοιμασία του δείγματος μυελού των οστών ή ακόμα και οστικού δείγματος που περιέχει τμήμα μυελού έγκειται στην προσθήκη δύο σημαντικών βημάτων [132]. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την ομογενοποίηση του δείγματος με διάφορες τεχνικές που

⁸⁰ Οι πολικές ενώσεις απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις μη πολικές, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη θέρμανση του συστήματος και συνεπώς την ενίσχυση της εκχύλισης.

⁸¹ Περί τα 5-30 λεπτά με τις συνήθεις συσκευές εργαστηριακού εξοπλισμού. Ωστόσο, δεν είναι λίγες οι μελέτες που χρησιμοποιούν απλούς φούρνους μικροκυμάτων οικιακής χρήσης. Ο χρόνος εξαρτάται από τη φύση της εκχυλιζόμενης ουσίας, τον διαλύτη, τη συγκέντρωση της ουσίας και τη μάζα των θραυσμάτων της οστικής σκόνης.

⁸² Στη μελέτη αυτή έγινε συγκριτικός έλεγχος ανάμεσα στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και στην παθητική εκχύλιση για τις ουσίες φαινοβαρβιτάλη, διαζεπάμη και κεταμίνη και έπειτα ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους με τη μέθοδο της ELISA. Η εντοπισμένη (ψευδο)γραμμικότητα του ποσοστού %DA (decrease of absorption) σε σχέση με τη συγκέντρωση επέτρεψε την ημι-ποσοτική σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης. Από τη σύγκριση αυτή εξήχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Ο λόγος των αθροιστικών %DA της MAE προς την παθητική εκχύλιση ήταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις >1, συνεπώς η αποδοτικότητα των μικροκυμάτων κρίνεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων βελτιωμένη
2. Η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται σε ορισμένο βαθμό από την ουσία ενδιαφέροντος
3. Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα ως διαλύτης υπερέχει έναντι της μεθανόλης στην αποδοτικότητα της υποβοηθούμενης από μικροκύματα εκχύλισης

⁸³ Η κατεύθυνση της ροής εκχύλισης εξαρτάται από την παράμετρο διαλυτότητας Hildebrand (δ). Μία αδρή ταξινόμηση των διαλυτών με κριτήριο την αύξουσα πολικότητα είναι η εξής: αιθυλικός αιθυλεστέρας < ακετόνη < αιθανόλη < μεθανόλη < νερό. Είναι προφανές ότι υδατοδιαλυτές ενώσεις δεν μπορούν να απομονωθούν με τη μέθοδο αυτή, ενώ το νερό ως διαλύτης δεν αποτελεί εφικτή επιλογή. Επιπλέον διαλύτες σαν τους ανωτέρω δεν είναι εκλεκτικοί με αποτέλεσμα μη επιθυμητές ουσίες αν εκχυλίζονται επίσης.

περιλαμβάνουν τη θέρμανση αυτού, τη μηχανική ανακίνηση ή τη χρήση υπερήχων πιο επισταμένα σε σχέση με πλήρως οστικά δείγματα. Το δεύτερο βήμα πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση της μεγάλης ποσότητας λιπώδους ιστού που αναμένεται να περιλαμβάνει το οστεομυελικό παρασκεύασμα.

Στο στάδιο αυτό έχει θέση και η εν λόγω μέθοδος, καθώς ο καθαρισμός από το ανεπιθύμητο λίπος συνήθως πραγματοποιείται με την πραγματοποίηση διαδοχικών κύκλων υγρής-υγρής εκχύλισης, χωρίς ωστόσο να απορρίπτεται και η εκχύλιση στερεάς φάσης σε μερική υποκατάσταση αυτής. Το νέο διάλυμα που προκύπτει έπειτα από την εκχύλιση είτε εισάγεται απευθείας σε σύστημα ανάλυσης είτε υφίσταται εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και επαναδιαλύεται σε νέο πιο κατάλληλο διαλύτη (για να αποτελέσει παραδείγματος χάριν την κινητή φάση συστήματος χρωματογραφίας).

ΜΕΘΟΔΟΣ QuEChERS

Η ονομασία της μεθόδου προκύπτει ως ακρωνύμιο από τα χαρακτηριστικά αυτής που την καθιστούν πολύτιμο εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe)⁸⁴. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον στην προκατεργασία δειγμάτων τροφών με σκοπό την ανίχνευση φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων και παρασιτοκτόνων κυρίως σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και επεξεργασμένα τρόφιμα, ενώ μόλις την τελευταία δεκαετία προτάθηκε η χρήση της κατά την προετοιμασία βιολογικών υλικών για τοξικολογικές μελέτες με εφαρμογές που παρουσίασαν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα [150]. Βιολογικά υποστρώματα όπως αίμα [151], ούρα [152] και συμπαγή όργανα (π.χ. ήπαρ) προετοιμάζονται με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία με χρωματογραφικές και φαρμακομετρικές μεθόδους ανάλυσης, ωστόσο, δεν υπάρχει αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την εφαρμογή της τεχνικής QuEChERS στην προκατεργασία οστικού ιστού.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι σαφή και συστηματοποιημένα και παρατίθενται αδρά στη συνέχεια:

- Ζύγιση 10 γραμμ. του δείγματος
- Προσθήκη σε αυτό 10 ml οργανικού διαλύτη εκχύλισης (ακετονιτρίλιου⁸⁵) και εσωτερικού προτύπου
- Έντονη ανάδευση (vortex)

⁸⁴ Γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική, ασφαλής

⁸⁵ Ονομάζεται αλλιώς και μεθυλ-κυανίδιο και έχει χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$

- Προσθήκη αλάτων (χλωριούχο νάτριο, θειικό μαγνήσιο, κιτρικά άλατα, ρυθμιστικά άλατα) με σκοπό τη ρύθμιση του pH και τη διευκόλυνση της κατανομής στην επικείμενη εκχύλιση
- Έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρωση
- Παραλαβή του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης και εισαγωγή του σε σύστημα εκχύλισης στερεής φάσης διασποράς (d-SPE)⁸⁶
- Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρωση
- Συνέχιση της ανάλυσης με τεχνικές υγρής ή αέριας χρωματογραφίας

Όπως είναι φανερό, αν όχι όλα, τουλάχιστον μερικά από τα παραπάνω βήματα συναντώνται συχνά στην προετοιμασία των οστικών ιατροδικαστικών δειγμάτων αν διατρέξει κανείς τη σχετική βιβλιογραφία, γεγονός που υποδηλώνει πως η τεχνική QuEChERS είναι κάθε άλλο παρά αφανής στο πεδίο της οστικής τοξικολογίας. Σε κάθε περίπτωση πρόκειται για μία μέθοδο εξαιρετικά ταχεία (έως και 4 φορές ταχύτερη από την κλασική εκχύλιση στερεάς φάσης), οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον, καθώς δεν προκαλεί επιβάρυνση με την παραγωγή χλωριωμένων ρύπων.

Επομένως, η μερική ή ασαφής χρήση αυτής στην ανάλυση οστικού υλικού για ιατροδικαστικούς σκοπούς αποτελεί αντικείμενο προς συζήτηση, ενώ γόνιμη θα ήταν η αναζήτηση των χημικών περιορισμών που η μέθοδος θέτει στο εν λόγω υπόστρωμα. Δεδομένου του ότι ένα από τα βασικότερα προβλήματα του κλάδου είναι η έλλειψη μεθοδολογικής ομοιογένειας και η συνεπακόλουθη αδυναμία άμεσης συγκρισιμότητας των αποτελεσμάτων και ποσοτικοποίησης αυτών, θα μπορούσε κανείς να προτείνει πως η μέθοδος QuEChERS ενδεχομένως έχει πολλά περισσότερα να προσφέρει στην οστική τοξικολογία πέρα από μερικές απλές οδηγίες προκατεργασίας.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι περισσότερες πειραματικές μελέτες στα πλαίσια της οστικής ιατροδικαστικής τοξικολογίας καταλήγουν λίγο πολύ στις ίδιες μεθόδους ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης με τον συνδυασμό χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας να δεσπόζει στη σχετική βιβλιογραφία σε διάφορες παραλλαγές. Η χρωματογραφία στην πραγματικότητα μπορεί να εκληφθεί είτε ως αναλυτική είτε ως προπαρασκευαστική τεχνική διαχωρισμού ανάλογα με τη σύνδεση ή όχι του χρωματογράφου σε έναν ανιχνευτή, κάτι που βέβαια εν προκειμένω είναι ο κανόνας. Η τεχνική

⁸⁶ Στο στάδιο αυτό το δείγμα αναμειγνύεται με θειικό μαγνήσιο και μία προσροφητική ουσία (π.χ. PSA) με σκοπό την απομάκρυνση του νερού και των ανεπιθύμητων προσμίξεων.

της ELISA, αν και όχι τόσο διαδεδομένη στον εν λόγω κλάδο, φαίνεται να προσφέρει πολλά προτερήματα και να προτείνει λύσεις για δύσκολες προκλήσεις που συναντώνται στην ανάλυση, με αποτέλεσμα να κερδίζει συνεχώς έδαφος μεταξύ έμπειρων αναλυτικών ομάδων. Παρακάτω αναλύονται οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές διεξοδικά:

1. ELISA⁸⁷

Πρόκειται για μία ευρέως διαδεδομένη ενζυμική μέθοδο ανοσοπροσρόφησης που χρησιμοποιείται ήδη εδώ και μισό αιώνα κυρίως ως ποιοτική και σπανιότερα ως ημιποσοτική τεχνική ανίχνευσης στα πλαίσια ιατρικής, βιοχημικής και τοξικολογικής έρευνας. Έχουν περιγραφεί τέσσερις μορφές αυτής, μεταξύ των οποίων η άμεση, η έμμεση, η ανταγωνιστική και ELISA sandwich. Ανεξάρτητα από τον τύπο η κύρια αρχή είναι πως το δείγμα που περιλαμβάνει μία ουσία ενδιαφέροντος επωάζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό επίτοπο επί της εν λόγω ουσίας. Η συνύπαρξη και προσκόλληση στο σύστημα ενός ενζύμου προκαλεί τη μετατροπή του υποστρώματος και την παραγωγή ενός σήματος (συνήθως χρωμογόνο, ενίοτε φθορίζον ή ηλεκτροχημικό), γεγονός που γνωστοποιεί στον επιστήμονα την ύπαρξη της ουσίας στο δείγμα. Με τον τρόπο αυτό το ξеноβιοτικό ανιχνεύεται και ταυτόχρονα ταυτοποιείται εφόσον αναγνωρίζεται σε αυτό μία ειδική πρωτεϊνική αλληλουχία.

Στα πλαίσια της οστικής τοξικολογίας δεν είναι λίγες οι πειραματικές μελέτες που αξιοποιούν τη συγκεκριμένη μέθοδο με σκοπό την επίλυση προβληματικών πτυχών του κλάδου. Οι Gorczynski και Melbye [111] ήταν οι πρώτοι που επιχείρησαν την ανίχνευση βενζοδιαζεπινών με ELISA σε οστίτη ιστό, παρ' ότι οι ίδιες ουσίες είχαν συχνά αναζητηθεί στον μυελό σε προγενέστερες έρευνες. Κατά τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε συγκριτικός έλεγχος των ουσιών διαζεπάμη, λοραζεπάμη, μιδαζολάμη και τριαζολάμη και η ELISA κρίθηκε μέθοδος περισσότερο ευαίσθητη στην ανίχνευση της μιδαζολάμης. Στη συνέχεια τη σκυτάλη ανέλαβε η εξαιρετικά ενεργή ομάδα του Watterson, που για μία ακόμη φορά επιδόθηκε σε λεπτομερείς μελέτες επί της μεθοδολογίας. Η ομάδα αυτή διεξήγαγε σειρά ερευνών με σκοπό τη διερεύνηση των δυνατοτήτων της ELISA και την επικύρωση αυτής ως γόνιμης μεθόδου στην επεξεργασία οστών για ιατροδικαστικούς σκοπούς.

Οι δύο βασικότερες μελέτες που δημοσιεύτηκαν η μία ως συνέχεια της άλλης το 2009 χρησιμοποιούν την ανοσοενζυμική προσρόφηση με σκοπό την ανίχνευση του οπιοειδούς φαιντανύλη σε οστά και μυελό [109,153]. Η προετοιμασία του δείγματος δεν διαφέρει σημαντικά σε σχέση με όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω με μοναδική προϋπόθεση να επιλέγεται ως τελικός διαλύτης το νερό με τη μορφή φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Σε όλες τις μελέτες του ο

⁸⁷ Enzyme-linked immunosorbent assay

Watterson υπολογίζει τη μείωση στην απορρόφηση με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας, η οποία δίνεται από τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$\%DA^{88} = 100\% \times \left(\frac{A_{ctrl} - A}{A_{ctrl}} \right)$$

όπου A η απορρόφηση του δείγματος και A_{ctrl} η απορρόφηση του αντίστοιχου δείγματος ελέγχου⁸⁹

Ο παραπάνω τύπος προσφέρει ένα ποσοτικό μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων, ωστόσο δεν προσεγγίζει αριθμητικά τη συγκέντρωση της ουσίας, και έτσι δεν γίνεται λόγος για ποσοτικοποίηση αλλά για ημι-ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια της μεθόδου ELISA. Η αποφυγή ενός σαφούς υπολογισμού γίνεται συνειδητά, καθώς δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η ακρίβεια στον υπολογισμό της συγκέντρωσης, δεδομένου του ότι προηγούνται τεχνικές εκχύλισης των οποίων η αποδοτικότητα είναι μη υπολογίσιμη. Άλλωστε η ποσοτική ασάφεια είναι άγνωστο αν πράγματι αποδίδεται στις προηγούμενες μεθόδους εκχύλισης, στην τεχνική δειγματοληψίας ή στην οστική ετερογένεια. Ως πιο αξιόπιστος δείκτης έχει προταθεί ο λόγος $\%DA/\mu\alpha\acute{\alpha}\zeta\alpha$ του οστικού ιστοτεμαχίου που αναλύθηκε, έτσι ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των σχετικών συγκεντρώσεων μεταξύ δειγμάτων διαφορετικών χαρακτηριστικών.

Συνήθης πρακτική είναι η παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων με σκοπό τη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Στον άξονα των ψ τοποθετούνται οι τιμές της επί τοις εκατό μείωσης απορρόφησης και στον άξονα των χ οι γνωστές συγκεντρώσεις της ουσίας στα διαλύματα. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μίας μη γραμμικής καμπύλης, συνήθως εκθετικής μορφής, που θα μπορούσε δυνητικά να μας πληροφορήσει για τις ακριβείς τιμές συγκεντρώσεων στα υπό μελέτη δείγματα. Εντούτοις, όπως αναφέρεται και παραπάνω, η εξαγωγή μίας τέτοιας γνώσης δεν επιχειρείται, καθώς θα οδηγούσε αναπόφευκτα σε μία σειρά υποθέσεων και ερωτήσεων συχνά αναπάντητων. Ενδεικτικά ο επιστήμονας ξετυλίγει τον λογισμό του ως εξής:

Η ανευρεθείσα τιμή συγκέντρωσης είναι αληθής ή όχι;

- Αν η τιμή της συγκέντρωσης είναι ψευδής αυτό οφείλεται:
 - ο Στις διασταυρούμενες αντιδράσεις με μεταβολίτες της ουσίας, συγγενείς δομικά ουσίες ή ενδογενή συστατικά του ιστού (Σφάλμα στο επίπεδο της ELISA)

⁸⁸ Decrease of absorbance

⁸⁹ Πρόκειται για πανομοιότυπο δείγμα ιστού που ελήφθη από υποκείμενα, στα οποία δεν χορηγήθηκε φαιντανύλη

Επομένως η γνώση της συγκέντρωσης είναι μη ασφαλές να αξιοποιηθεί

- Αν η τιμή της συγκέντρωσης είναι αληθής, αυτή αντανakλά την πραγματική συγκέντρωση στο δείγμα;

- Αν δεν την αντανakλά, αυτό οφείλεται:

- Στην μικρή αποδοτικότητα της μεθόδου εκχύλισης (Σφάλμα στο επίπεδο της εκχύλισης)
- Στην απώλεια ουσιών κατά την αφαλάτωση (Σφάλμα στο επίπεδο της αφαλάτωσης)
- Στη συνύπαρξη ρύπων και άλλων άχρηστων ουσιών (Σφάλμα στο επίπεδο του καθαρισμού)
- Στην απώλεια ξενοβιοτικού κατά την προαναλυτική περίοδο (Σφάλμα στο επίπεδο συντήρησης και αποθήκευσης)

Επομένως η γνώση της συγκέντρωσης είναι μη ασφαλές να αξιοποιηθεί

- Αν την αντανakλά, το δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό;

- Αν όχι, αυτό συμβαίνει επειδή:

- ♦ Το οστό δεν εμφανίζει ομοιογενή κατανομή του ξενοβιοτικού (Σφάλμα στο επίπεδο της δειγματοληψίας⁹⁰)
- ♦ Δεν έγινε σωστή απόσπαση των μαλακών μορίων (Σφάλμα στο επίπεδο του μηχανικού καθαρισμού)
- ♦ Δεν έγινε σωστή απόσπαση του μυελού των οστών (Σφάλμα στο επίπεδο της διαχείρισης μυελού)

Επομένως η γνώση της συγκέντρωσης είναι μη ασφαλές να αξιοποιηθεί

- Αν ναι, η τιμή της συγκέντρωσης πιθανώς άλλαξε από τη στιγμή του θανάτου;

- ♦ Αν ναι, αυτό συνέβη επειδή:

- ▲ Επήλθε ορισμένο⁹¹ χρονικό διάστημα από τον θάνατο (Παράγοντας μεταθανάτια χρονικά διαστήματα)
- ▲ Επέδρασαν ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες (Παράγοντες περιβάλλον και σήψη)
- ▲ Το σώμα είχε ορισμένη διαχείριση και τοποθέτηση (Παράγοντες θέση του σώματος και φαινόμενα ανακατανομής)

Επομένως η γνώση της συγκέντρωσης είναι μη ασφαλές να αξιοποιηθεί

- ♦ Αν όχι, η ανευρεθείσα τιμή μπορεί να αξιολογηθεί, να συγκριθεί και να δώσει μη ποσοτικά δικανικά συμπεράσματα και σε τι πλαίσια θα γίνει αυτό;

⁹⁰ Ενίοτε παράγοντας αναπόφευκτος που δεν αποδίδεται σε σφάλμα του επιστήμονα

⁹¹ Η θέσπιση ενός σαφούς μεταθανάτιου χρονικού ορίου, έπειτα από την έλευση του οποίου η ποσοτική οστική ανάλυση κρίνεται αναξιόπιστη, θα ήταν ουσιώδους σημασίας στη δημιουργία σχετικού πρωτοκόλλου.

Στο τελευταίο ερώτημα οι απαντήσεις είναι πολλές και όλες καταλήγουν στη λύση της βάσης δεδομένων που πρόκειται να αναλυθεί διεξοδικά στη συνέχεια. Όπως είναι φανερό στην πλειονότητα των περιπτώσεων η πορεία του αλγόριθμου διακόπτεται από πιθανά σφάλματα και παράγοντες, μην επιτρέποντας την πρόοδο στην ποσοτικοποίηση, γεγονός που αποτρέπει τον επιστήμονα από το να εισέλθει καν στη ροή αυτή της σκέψης. Το μεγαλύτερο πρόβλημα ωστόσο συναντάται όχι επειδή οι απαντήσεις είναι συχνά ανασταλτικές, αλλά επειδή ο λογισμός μπλοκάρει από επανειλημμένα «δεν γνωρίζουμε» που αυτόματα αναιρούν την όλη διαδικασία.

Από τις προαναφερθείσες έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι σφάλματα τύπου I (ψευδώς θετικά) είναι περιορισμένα με τη μέθοδο ELISA, καθώς εν προκειμένω οι εσφαλμένες αναγνώσεις του μεταβολίτη της φαιντανύλης νορφαιντανύλη ή άλλων ενδογενών συστατικών του οστού έχουν ελάχιστες πιθανότητες να συμβούν. Επίσης, η ταυτόχρονη μελέτη των δειγμάτων ελέγχου και ο υπολογισμός της επί τοις εκατό μείωσης απορρόφησης περιορίζουν ακόμη περισσότερο το πιθανό σφάλμα. Αντίθετα, σε παρόμοια μελέτη παρατηρήθηκε πως η ανίχνευση της διαζεπάμης παρεμβάλλεται σε αυτή της νορδιαζεπάμης και της οξαζεπάμης, με αποτέλεσμα η μόνη ασφαλής πληροφορία να είναι τελικά η έκθεση σε κάποια από τις ουσίες της οικογένειας των βενζοδιαζεπινών [88]. Σε κάθε περίπτωση προτείνεται η αξιοποίηση της μεθόδου αυτής όχι αυτοτελώς, αλλά με παράλληλο συγκριτικό έλεγχο με κάποια χρωματογραφική τεχνική για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος και τη συγκεκριμενοποίηση του ξενοβιοτικού.

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίζεται αξιοσημείωτα υψηλή και δίνεται από τον τύπο:

$$S = 100\% \times \left(\frac{TP}{FN+TP} \right) \quad \text{όπου TP τα αληθώς θετικά αποτελέσματα και FN τα ψευδώς αρνητικά}$$

Στις δεδομένες μελέτες η ευαισθησία της ELISA κρίθηκε ανάλογη ή και ανώτερη εκείνης άλλων τεχνικών όπως η υγρή ή η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Σε άλλες μελέτες που αφορούν την ανίχνευση ουσιών στον μυελό των οστών η ευαισθησία κυμάνθηκε από 66% έως 100%, τιμή που όπως φαίνεται εξαρτάται από τη δόση, τον τύπο του ιστού και τα προθανάτια διαστήματα [132]. Τέλος, το όριο ανίχνευσης⁹² της φαιντανύλης υπολογίστηκε μεταξύ 0,05 και 0,1 ng/ml. Οι αντίστοιχες τιμές για τη διαζεπάμη, τη νορδιαζεπάμη και την οξαζεπάμη είναι 2 ng/ml, 0,5 ng/ml και 5 ng/ml. Οι συνθήκες αποθήκευσης φαίνεται πως επηρεάζουν την ανιχνευσιμότητα της ELISA, καθώς οστό που έχει ταφεί σε μη στείρο έδαφος παρουσιάζει συχνότερα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με αντίστοιχα ιστοτεμάχια που έχουν διατηρηθεί σε ψύξη ή σε στείρες συνθήκες [111].

⁹² Limit of detection

2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η τεχνική της χρωματογραφίας, σε οποιαδήποτε μορφή κι αν αυτή συναντάται, αποτελεί την κατ' εξοχήν αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται στην τοξικολογική επιστήμη και χαρακτηρίζεται τόσο ως μέθοδος προετοιμασίας, με μοναδικούς σκοπούς τον διαχωρισμό και την απομόνωση, όσο και ως μέθοδος ανίχνευσης, ιδίως όταν συνδέεται με κάποιο αντίστοιχο σύστημα ταυτοποίησης (π.χ. φασματομετρία μάζας). Ο διαχωρισμός βασίζεται στην παρακάτω αρχή: Η επιθυμητή ουσία διαλύεται σε ένα ρευστό (υγρό ή αέριο⁹³) και μαζί συνιστούν την κινητή φάση. Η δίοδος της κινητής φάσης διαμέσου ή σε επαφή με τη στατική φάση έχει ως αποτέλεσμα τη ροή των διαφόρων συστατικών με διαφορετική ταχύτητα μέσα σε ένα σύστημα επιμήκων σωλήνων⁹⁴ και την έξοδό τους από το σύστημα αυτό σε άλλοτε άλλους χρόνους. Με βάση τον τρόπο διαχωρισμού και την επιλογή της κινητής και της στατικής φάσης η χρωματογραφική τεχνική διακρίνεται σε ορισμένες κατηγορίες⁹⁵.

Τόσο διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές όσο και ποικίλοι τύποι συζευγμένων ανιχνευτών χρησιμοποιούνται στις μελέτες της οσμικής τοξικολογίας. Η αέρια χρωματογραφία συνδυάζεται με φασματομετρία μάζας (MS), ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) ή ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Η υγρή χρωματογραφία από την άλλη χρησιμοποιείται είτε απλή σε συνδυασμό με σύστημα φασματομετρίας μάζας, είτε με τη μορφή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC και UHPLC) και υγρής χρωματογραφίας δύο διαστάσεων (2D-LC). Η απλή φασματομετρία μάζας συχνά υποκαθίσταται από διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS), φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) και χρησιμοποιεί όχι σπάνια σύγχρονους αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF).

Όπως είναι κατανοητό, στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση βρίσκεται σε υγρή φυσική κατάσταση, ενώ η στατική μπορεί να είναι άλλοτε υγρή και άλλοτε στερεή⁹⁶. Ανάλογα με την σχετική πολικότητα των δύο φάσεων η τεχνική κατηγοριοποιείται επιπλέον σε κανονικής φάσης και ανάστροφης φάσης. Στην υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση είναι πιο

⁹³ Η τεχνική χαρακτηρίζεται ως εκ τούτου σαν υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography - LC) ή αέρια χρωματογραφία (gas chromatography - GC) αντίστοιχα.

⁹⁴ Πρόκειται για τη χρωματογραφία στήλης σε αντίθεση με την επίπεδη χρωματογραφία, που δεν συνίσταται από ανάλογο σύστημα. Η τελευταία χωρίζεται στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και τη χρωματογραφία επί χάρτου, τεχνικές που δεν συναντώνται στη ρουτίνα της οσμικής τοξικολογίας.

⁹⁵ Πρόκειται για τις εξής πέντε κατηγορίες που καταγράφονται παρακάτω. Η διεξοδικότερη ανάλυσή τους ξεφεύγει από τους στόχους της παρούσας εργασίας.

1. Χρωματογραφία προσρόφησης
2. Χρωματογραφία κατανομής
3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
4. Χρωματογραφία συγγένειας
5. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

⁹⁶ Liquid-Liquid Chromatography (LLC) και Liquid-Solid Chromatography (LSC) αντίστοιχα.

πολική από την κινητή φάση, ενώ το αντίθετο ισχύει για τη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης - HPLC⁹⁷, η οποία διαφέρει από την κλασσική υγρή χρωματογραφία καθώς χρησιμοποιεί αντλίες που προκαλούν υψηλές πιέσεις⁹⁸ σε αντίθεση με συμβατικά χρωματογραφικά συστήματα, στα οποία η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια της βαρύτητας ή ελάχιστης χειροκίνητης πίεσης. Επιπλέον, για την επιλογή της στατικής φάσης χρησιμοποιούνται λεπτόκοκκα υλικά πλήρωσης της στήλης, που επιτρέπουν καλύτερη απόδοση και διαχωριστική ικανότητα.

Η χρήση της αέριας χρωματογραφίας είναι εξίσου διαδεδομένη με αυτήν της υγρής στις μελέτες τοξικολογικού ενδιαφέροντος. Όπως είναι προφανές, κατά τη διαδικασία αυτή η κινητή φάση βρίσκεται σε αέρια φυσική κατάσταση, ενώ η στατική αποτελείται από στερεό ή υγρό αυξημένου ιξώδους που πληροί τη χρωματογραφική στήλη ή επενδύει τα τοιχώματα αυτής (Εικόνα 11). Σε όλες τις σχετικές έρευνες που μελετήθηκαν στα πλαίσια της εν λόγω εργασίας ως αέριο φορέας της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με υψηλή καθαρότητα και ρυθμό ροής από 1 έως 26 ml/min [145]. Οι υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της μεθόδου (μέχρι 300°C εν προκειμένω [136]) καθιστούν τη μέθοδο ακατάλληλη σε περιπτώσεις χειρισμού πρωτεϊνικών δομών που υφίστανται μη επιθυμητή μετατροπή της στερεοδιάταξης.

Σχεδόν κάθε μελέτη που εισάγει μία νέα χρωματογραφική διαδικασία στους κόλπους της οστικής τοξικολογίας καταπιάνεται με το ζήτημα της επικύρωσης εξετάζοντας διάφορες παραμέτρους που αποδεικνύουν την επιστημονική αξία της μεθόδου για τις δεδομένες συνθήκες και με σκοπό την ανίχνευση των συγκεκριμένων υπό μελέτη ουσιών. Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την ορθή επικύρωση δόθηκαν ρητά το 2013 από την Επιστημονική Ομάδα Εργασίας για την Ιατροδικαστική Τοξικολογία μέσα από δημοσίευσή της στο *Journal of Analytical Toxicology* και ακολουθούνται πιστά μέχρι και σήμερα [154]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η επικύρωση αφορά το σύνολο των μεθοδολογικών επιλογών από την αποθήκευση του δείγματος μέχρι τη λήψη των αποτελεσμάτων και δεν περιορίζεται μόνο στη χρωματογραφική τεχνική. Πιο συγκεκριμένα παράγοντες που αξιολογούνται είναι οι εξής:

I. Αποτελεσματικότητα

Στις χρωματογραφικές τεχνικές στήλης η ποιότητα της επίδοσης εκφράζεται με μία μεταβλητή που χαρακτηρίζει τη στήλη, μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής αυτής και επηρεάζεται από πλήθος παραμέτρων. Πρόκειται για τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, ένα μέγεθος που δεν έχει ρεαλιστικό ανάλογο αλλά εκφράζει μία ιδεατή κατάσταση, κατά την οποία η στήλη ορισμένου

⁹⁷ Ενίοτε παραφράζεται ως χρωματογραφία υψηλής πίεσης

⁹⁸ 5x10⁵ – 35x10⁵ Pa

μήκους L διαχωρίζεται σε πλάκες ύψους H , στα πλαίσια καθεμίας από τις οποίες πραγματοποιείται η προσρόφηση συγκεκριμένων ουσιών με διακριτά χαρακτηριστικά. Διατηρώντας σταθερό το μήκος της στήλης είναι σαφές πως ο αριθμός των πλακών μπορεί να αυξηθεί μόνον εφόσον μειωθεί το ύψος της καθεμίας. Μία τέτοια τροποποίηση αντικατοπτρίζεται στο χρωματογραφικό λογισμικό καταγραφής ως οξυκόρυφη κανονική κατανομή του Gauss και συνεπάγεται αυξημένη αποτελεσματικότητα και ποιότητα διαχωρισμού.

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών συνήθως υπολογίζεται αυτόματα από το λογισμικό που βρίσκεται συνδεδεμένο με το χρωματογραφικό σύστημα και δίνεται από τον τύπο:

$$N = \frac{L}{H}$$
 όπου N ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, L το μήκος της στήλης και H το ύψος της κάθε θεωρητικής πλάκας. Με απλά λόγια ο αριθμός αυτός εκφράζει την απόσταση μέσα στη στήλη που πρέπει να διανύσει μία ουσία της κινητής φάσης για να επιτευχθεί η ισορροπία με τη στατική και να επιτευχθεί η απορρόφηση. Όπως είναι φανερό το μήκος της στήλης επηρεάζει άμεσα την εν λόγω μεταβλητή. Εκτός όμως από αυτό πολλαπλοί παράγοντες επιδρούν ισχυρά ή ασθενέστερα στη διαμόρφωση της παραπάνω εξίσωσης. Οι παράγοντες αυτοί φαίνονται αναλυτικότερα στον Πίνακα 6.

II. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση μίας ουσίας σε ένα δοσμένο διάλυμα που μπορεί να προκαλέσει παραγωγή σήματος στο χρωματογραφικό ανιχνευτή, με λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο ή ίσο με το τριπλάσιο του αντίστοιχου λόγου σε διάλυμα προερχόμενο από τον ίδιο ιστό ελεύθερο της ουσίας ($S^{99}/N^{100} \geq 3$). Στον παραπάνω υπολογισμό το σήμα ορίζεται ως το ύψος της χρωματογραφικής απόκρισης και ο θόρυβος ως το μέγιστο εύρος ανάμεσα στο υψηλότερο και στο χαμηλότερο επίπεδο της τεθλασμένης γραμμής περίξ της απόκρισης. Με τη χρήση στατιστικών μέσων η παράμετρος αυτή υπολογίζεται ως το άθροισμα της μέσης τιμής απόκρισης διαλύματος ελεύθερου ξενοβιοτικού με το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης σ^{101} . Οι διάφορες επιστημονικές ομάδες χρησιμοποίησαν οριακές συγκεντρώσεις του επιπέδου των ng (και σπανιότερα pg) ανά mg για στερεούς ιστούς ή ml για βιολογικά υγρά, για να προσδιορίσουν την παραπάνω τιμή για τις διάφορες ουσίες ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος σε οστά.

⁹⁹ Signal

¹⁰⁰ Noise

¹⁰¹ $LOD = \bar{X} + 3, 3\sigma$

Αντίθετα, το όριο ποσοτικοποίησης αφορά την ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή στατιστική βεβαιότητα και $S/N \geq 10$ και αφορά κάθε ποσοτική μέθοδο μεταξύ των οποίων η φασματομετρία μάζας και η χρωματογραφία. Ένας αδρός τρόπος υπολογισμού είναι η εμπειρική προσέγγιση έπειτα από πολλαπλές μετρήσεις διαλυμάτων με σταδιακά αυξανόμενη ή μειούμενη συγκέντρωση, ωστόσο, για τον υπολογισμό αυτού, εκτός από την επιτυχή ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση, επιπρόσθετα κριτήρια ακρίβειας πρέπει να πληρούνται. Το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή ακόμα και ίσο με το όριο ανίχνευσης, αλλά δεν μπορεί να λάβει χαμηλότερες τιμές. Και οι δύο παράμετροι αναμένονται να τοποθετούνται μέσα στα όρια της καμπύλης βαθμονόμησης. Ορισμένες φορές χρησιμοποιείται προσεγγιστικά η εξίσωση $LOQ=3,3 \times LOD$ για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης [144].

III. Εκλεκτικότητα, επίδραση της μήτρας και επαναληψιμότητα

Ως εκλεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα της εκάστοτε μεθόδου να διακρίνει την επιθυμητή ουσία από άλλες ουσίες, με τις οποίες παρουσιάζει ομοιότητες στη δομή ή σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι τόσο ενδογενή συστατικά του οστού όσο και ρύποι ή ήσσονος σημασίας ενώσεις που περιέχονται στο διάλυμα που αναλύεται. Ως τυποποιημένη διαδικασία των περισσότερων μελετητών είναι η αναζήτηση για παρεμβολές στο χρωματογράφημα κορυφών που εμφανίζονται μέσα στα πλαίσια του χρόνου κατακράτησης¹⁰². Η αναζήτηση αυτών πραγματοποιείται στο υπό μελέτη διάλυμα, σε ελεύθερο ξενοβιοτικών διάλυμα οστού και σε διάλυμα στο οποίο έχει προστεθεί γνωστή συγκέντρωση της ουσίας, με πολλαπλά δείγματα και κύκλους χρωματογραφικής ανάλυσης για το καθένα. Σε περιπτώσεις που μελετώνται πολλές ενώσεις ταυτόχρονα κρίνεται σκόπιμη η μελέτη της εκλεκτικότητας για κάθε ένωση ξεχωριστά αλλά και για το σύνολο αυτών, καθώς αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ενδέχεται να επηρεάσουν το αναλυτικό αποτέλεσμα [155].

Η επίδραση της μήτρας στο ποσοτικό αποτέλεσμα έχει απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια με εναρκτήριο λάκτισμα την αρχική παρατήρηση από τους Kebabian και Tang το 1993 [156] πως η ύπαρξη πολλαπλών οργανικών βάσεων σε ένα διάλυμα παρεμποδίζει την ορθή εκτίμηση σε σύστημα φασματομετρίας μάζας. Αργότερα διατυπώθηκε η υπόθεση πως ιόντα της ουσίας ενδιαφέροντος ενδεχομένως ανταγωνίζονται με ιόντα από μη

¹⁰² Χρόνος κατακράτησης (Retention time - Rt) ονομάζεται το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή που η κινητή φάση εισάγεται στο σύστημα χρωματογραφίας μέχρι τη στιγμή που η ουσία ενδιαφέροντος ανιχνεύεται και καταγράφεται στο χρωματογράφημα αποδίδοντας το μεγαλύτερο σήμα.

μετρήσιμα συστατικά του ιστού προέλευσης με αποτέλεσμα την ενίσχυση ή μείωση του σήματος σε αναλυτικές τεχνικές και τη μειωμένη επαναληψιμότητα¹⁰³.

Για τον έλεγχο της επίδρασης αυτής στα πλαίσια επικύρωσης η επιστημονική ομάδα του Matuszewski [157] πρότεινε το 2003 μία μεθοδολογία που περιλαμβάνει τη δημιουργία τριών ομάδων δειγμάτων ίδιας περιεκτικότητας και την άμεση σύγκριση των συγκεντρώσεων, όπως αυτές υπολογίζονται από αναλυτικές μεθόδους υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και φασματομετρίας μάζας. Το πρώτο σετ παρασκευάζεται εργαστηριακά σε επιλεγμένο διαλύτη, ενώ τα άλλα δύο σετ χρησιμοποιούν ως διαλύτη πλάσμα αίματος από διαφορετικά υποκείμενα, που έχει υποστεί (σετ 2) ή όχι (σετ 3) καθαρισμό με εκχύλιση. Η ίδια μεθοδολογία ακολουθείται μέχρι και σήμερα.

IV. Γραμμικότητα

Η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι από τις βασικότερες διαδικασίες που ακολουθεί κάθε αναλυτική επιστημονική ομάδα. Δείγματα εκχύλισης ιστού με γνωστές συγκεντρώσεις του ξενοβιοτικού παρασκευάζονται και υπόκεινται διαδοχικά σε χρωματογραφικό έλεγχο. Η τιμή του σήματος που ανακτάται από το καθένα τοποθετείται σε άξονα x/y αντίστοιχα προς την τιμή της εκάστοτε συγκέντρωσης με αποτέλεσμα να δημιουργείται γραμμική καμπύλη της μορφής $y=ax+b$, που, υπό ιδεατές συνθήκες, διέρχεται από την αρχή των αξόνων, δεδομένου ότι μηδενική συγκέντρωση θα αποδώσει μηδενικό σήμα. Στην πράξη, λόγω του χρωματογραφικού θορύβου και του αναπόφευκτου πειραματικού σφάλματος, η σταθερά b δεν λαμβάνει ποτέ την τιμή 0.

Αξιομνημόνευτα σημεία σε αυτή την καμπύλη αποτελούν το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, ενώ εισάγεται και η έννοια του ορίου γραμμικότητας¹⁰⁴, καθώς η παραχθείσα καμπύλη αποτελεί μόνον εστιακά γραμμικό τμήμα μίας μη γραμμικής καμπύλης που εκφράζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά των διαφόρων συγκεντρώσεων της ουσίας. Στα πλαίσια των διαφόρων τοξικολογικών ερευνών ελέγχεται ο βαθμός γραμμικότητας με κριτήριο ο συντελεστής προσδιορισμού r^2 να λαμβάνει τιμή ίση ή μεγαλύτερη του 0,990 [136]. Ο περιορισμός αυτός εξασφαλίζει ότι η τιμές συγκεντρώσεων που ανευρίσκονται από την εκάστοτε μεθοδολογία προσεγγίζουν όσο το δυνατόν περισσότερο την πραγματικότητα.

¹⁰³ Ως επαναληψιμότητα ορίζεται η ιδιότητα μίας πειραματικής μεθόδου να παράγει μετρήσιμο αποτέλεσμα που δεν διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων που διεξάγονται με τον ίδιο εξοπλισμό και στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

¹⁰⁴ Limit of Linearity

V. Ακρίβεια και πιστότητα

Η ακρίβεια και η πιστότητα πολλές φορές συγχέονται στα πλαίσια της πειραματικής έρευνας, ωστόσο πρόκειται για παραμέτρους πλήρως ανεξάρτητες μεταξύ τους. Η ακρίβεια εκφράζεται ως η σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD^{105}$) και, εν προκειμένω, αντικατοπτρίζει την απόκλιση των μορίων του ξενοβιοτικού από την προσδοκώμενη συμπεριφορά που προβλέπει την έξοδό τους από το σύστημα στηλών σε συγκεκριμένο χρόνο [129]. Η πιστότητα από την άλλη ορίζεται ως η σχετική εκατοστιαία απόκλιση ($\%RPD$) ή αλλιώς το επί τοις εκατό σφάλμα και, στην ουσία, υπολογίζει την ποσοστιαία διαφοροποίηση της πειραματικής τιμής συγκέντρωσης από την αληθή. Και οι δύο αυτές παράμετροι αξιολογούνται θετικά κατά τη επικύρωση της μεθόδου εφ' όσον δεν ξεπερνούν το 20%. Σε αντίθετη περίπτωση, η μέθοδος κρίνεται ανεπαρκής.

VI. Σταθερότητα

Με την έννοια σταθερότητα οι επιστημονικές μελέτες αναφέρονται στην ιδιότητα της ουσίας προς ανάλυση να μην υφίσταται χημική τροποποίηση όταν υπόκειται σε χρωματογραφική επεξεργασία υπό ορισμένες συνθήκες και για δεδομένο χρονικό διάστημα. Η ιδιότητα αυτή σαφώς δεν αξιολογείται μόνο για τη συγκεκριμένη τεχνική, αλλά αφορά κάθε στάδιο διαχείρισης του υλικού, από την αποθήκευση και την προ-επεξεργασία έως την έξοδο από τα συστήματα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης. Οι προβλεπόμενες διαδικασίες επικύρωσης συνιστούν τον έλεγχο της σταθερότητας σε αληθή δείγματα και δείγματα ελέγχου όσον αφορά τις ακραίες εναλλαγές της θερμοκρασίας (ψύξη στους -20°C και έπειτα απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου), δεδομένου ότι οι χρωματογραφικές τεχνικές εκθέτουν το υλικό σε αντίστοιχες μεταβολές, ενώ παράλληλα εξετάζουν την παράμετρο του χρόνου [154]. Εφόσον η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης εμπίπτει εντός των επιτρεπτών ορίων (εν προκειμένω $\%RPD$ έως 20%), τότε η μέθοδος εκτιμάται ως έγκυρη.

VII. Φαινόμενο μεταφοράς¹⁰⁶

Η ακούσια μεταφορά ιχνών της ουσίας από θετικό δείγμα σε επακόλουθους αναλυτικούς κύκλους άλλων θετικών ή αρνητικών δειγμάτων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αναπόφευκτο σφάλμα τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο. Η

¹⁰⁵ Ονομάζεται επίσης και συντελεστής μεταβλητότητας $CV\%$ και υπολογίζεται από τον λόγο της τυπικής απόκλισης προς τον μέσο όρο των τιμών σήματος της κανονικής κατανομής για την κάθε ουσία ($\%RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$).

¹⁰⁶ Συναντάται στη διεθνή βιβλιογραφία ως φαινόμενο carryover

μέθοδος που ακολουθείται για τη διαπίστωση τέτοιου σφάλματος περιλαμβάνει τη μέτρηση της ουσίας σε ελεύθερο ξενοβιοτικό δείγμα (δείγμα Β) άμεσα, έπειτα από την ανάλυση θετικού δείγματος υψηλής περιεκτικότητας για το εν λόγω ξενοβιοτικό (δείγμα Α). Η συγκέντρωση του δείγματος Α αυξάνεται κλιμακούμενα μέχρις ότου παρατηρηθεί το φαινόμενο της μεταφοράς. Η μέγιστη συγκέντρωση του δείγματος Α, για την οποία το δείγμα Β παραμένει αρνητικό, αποτελεί τιμή που χαρακτηρίζει την ποιότητα της μεθόδου, με απώτερο σκοπό την εξάλειψη του φαινομένου μεταφοράς τουλάχιστον στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης βαθμονόμησης ή τον περιορισμό στα ανώτερα όρια αυτής [154]. Όλες οι δημοσιευμένες μέθοδοι τοξικολογικής ανάλυσης οστών επιδεικνύουν ελάχιστα έως ανύπαρκτα φαινόμενα μεταφοράς.

3. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων που επιλέγεται η χρωματογραφία ως αναλυτική τεχνική, αυτή ακολουθείται από την τεχνική της φασματομετρίας μάζας με σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ξενοβιοτικών ουσιών. Βασική αρχή της μεθόδου είναι η δημιουργία ιόντων και η ανίχνευση αυτών με βάση τον λόγο μάζα (m) /φορτίο (z), που ονομάζεται εναλλακτικά λόγος απόκρισης (RR). Το φασματομετρικό σύστημα αποτελείται από τρία διακριτά μέρη, την πηγή ιονισμού, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή, και οι διαφορετικοί συνδυασμοί αυτών συνεπάγονται διαφορετικά φασματομετρικά εργαλεία που υπερτερούν ή υπολείπονται ανάλογα με τις εκάστοτε ιδιότητες. Ο ιονισμός, παραδείγματος χάριν, μπορεί να υλοποιηθεί με πληθώρα μεθόδων και διακρίνεται στις κατηγορίες που φαίνονται στον Πίνακα 7. Η επιλογή της κατάλληλης πηγής ιόντων εξαρτάται από ιδιότητες που εμφανίζει η υπό μελέτη ουσία, όπως η πολικότητα και το μοριακό βάρος.

Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν ενίσχυση ή καταστολή του ιονισμού με σημαντικότερο από αυτούς την ύπαρξη ενδογενών ουσιών με παρόμοια δομή με την υπό μελέτη ουσία. Το ζήτημα αυτό απασχόλησε την επιστημονική ομάδα της Rubin [82] που επιχείρησε να ανιχνεύσει σε οστά πειραματόζωων τον νευρικό παράγοντα VX μέσω του μεταβολίτη του EMPA. Ο υπολογισμός της καταστολής γίνεται με τη συγκριτική ανάλυση δύο σετ δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων, προερχόμενα από οστικό ιστό και από απλό διαλύτη, και δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Καταστολή Ιονισμού \%} = \left(\frac{\text{Επιφάνεια καμπύλης φάσματος οστού}}{\text{Επιφάνεια καμπύλης φάσματος διαλύτη}} - 1 \right) \times 100$$

Με τον τρόπο αυτό στην εν λόγω μελέτη η καταστολή του ιονισμού υπολογίστηκε εξαιρετικά μεγάλη (μέχρι 88,6 %), γεγονός που επιβεβαίωσε την ανεπάρκεια της μεθόδου και έστρεψε την προσοχή των εμπλεκομένων στην απομάκρυνση του υπαίτιου ενδογενούς συστατικού και την εξάλειψη του φαινομένου της μήτρας. Με τη βοήθεια αναλυτή χρόνου πτήσης διαπιστώθηκε πως το υπεύθυνο ιόν εμφάνιζε τιμή RR ίση με 191,0191. Με βάση τις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί από την οστική βιοχημεία πρόκειται πιθανώς για το κιτρικό ανιόν, μία ουσία που διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διατήρηση της κρυσταλλικής δομής του υδροξυαπατίτη και έχει γνωστή τιμή RR 191,0192 [158]. Η ουσία αυτή έχει παρόμοιες ιδιότητες με τα αMPA (μέγεθος μορίου, πολικότητα, pKa) και επιπλέον βρίσκεται σε αφθονία στον οστικό ιστό καθώς αποτελεί 1-2% του συνολικού βάρους του σκελετού και ανευρίσκεται σε ποσότητες έως και είκοσι πέντε φορές μεγαλύτερες απ' ό,τι στα μαλακά μόρια [159].

Το δεύτερο τμήμα του φασματομετρικού συστήματος, οι αναλυτές μαζών, εμφάνισαν εξελικτικές τροποποιήσεις με την ανάπτυξη της αναλυτικής χημείας κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα και σήμερα υπάρχει πληθώρα επιλογών ανάλογα με τις ανάγκες (Πίνακας 8). Σε κάθε περίπτωση η διαδοχική φασματομετρία μάζας (MSⁿ) προσφέρει οφέλη, όπως αυξημένη εκλεκτικότητα και μειωμένα όρια ανίχνευσης, που αποτελούν κεντρικό ζήτημα στην ιατροδικαστική τοξικολογία, ιδίως για ουσίες υψηλής τοξικότητας. Τέλος, ο ανιχνευτής αναλαμβάνει την ευθύνη να παρουσιάσει γραφικά τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στο φάσμα μαζών, ένα γράφημα με τον λόγο m/z στον άξονα των x και τη σχετική αφθονία επί τοις εκατό στον άξονα των y. Ισοτοπικές μορφές της ίδιας ουσίας εμφανίζουν διαφορετικές κορυφές στο φάσμα, με αποτέλεσμα κάθε διακριτή ένωση να κατέχει ένα μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα.

Κατ' αναλογία με τον σχετικό υπολογισμό της συγκέντρωσης που αναλύθηκε παραπάνω, στη μέθοδο της ELISA ο Watterson καταφεύγει και πάλι σε έναν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό, καθώς θεωρεί πως ούτε η συνδυασμένη μέθοδος GC/LC-MS μπορεί να λειτουργήσει απόλυτα ποσοτικά [108]. Η σύγκριση των ποσοτικών αποτελεσμάτων και οποιαδήποτε στατιστική ανάλυση ακολουθεί την πειραματική διαδικασία βασίζονται στις μελέτες των Καναδών στον λόγο RR/M, όπου RR ο λόγος απόκρισης m/z και M η συνολική μάζα του οστικού ιστοτεμαχίου που εξετάστηκε. Το υπολογιζόμενο μέγεθος, αν και όχι απόλυτο, φαίνεται πως έχει αναλογική σχέση με αυτή καθαυτή την τιμή της συγκέντρωσης της ουσίας στο ιστοτεμάχιο. Η επιλογή αυτή θεωρείται ως μία σύμβαση που ομαλοποιεί τις ιδιαιτερότητες που προκαλούνται από την ανομοιογένεια του ιστού και περιορίζει εν μέρει τη σύγχυση που προέρχεται από τις ασύμφωνες αναλυτικές μεθοδολογίες και τις ποικίλες πειραματικές συνθήκες των διαφόρων επιστημονικών ομάδων. Φαίνεται, λοιπόν, καθαρά πως ο τρόπος σκέψης των εν λόγω ερευνητών είναι βαθιά ιατροδικαστικός, καθώς πρωταρχικής σημασίας παύει να είναι η ακριβής και στείρα

ποσοτικοποίηση, αλλά δίνεται βάση στη σχετική και εξατομικευμένη επίδραση μίας ουσίας σε ολόκληρο τον οργανισμό.

Τα τελευταία χρόνια νέες τεχνικές ανάλυσης αναπτύσσονται με πυρήνα την αρχή της φασματομετρίας μάζας. Μία από τις πολλά υποσχόμενες είναι η απεικονιστική μέθοδος φασματομετρίας που αξιοποιεί τις ιδιότητες του ιονισμού εκρόφησης με λέιζερ με υποβοήθηση από τη μήτρα (MALDI-MSI¹⁰⁷), η οποία εφαρμόζεται πλέον με ευκολία σε μαλακούς ιστούς και πολύ πρόσφατα δοκιμάστηκε σε μη αφαλατωμένο οστό ανθρώπων και πειραματόζωων [160]. Πρόκειται για μία συνδυασμένη τεχνική, κατά την οποία λαμβάνονται ιστολογικές τομές μικρού πάχους από το όργανο ενδιαφέροντος και το υλικό υποβάλλεται σε φασματομετρία μάζας, καθώς ένας MALDI αναλυτής διατρέχει την επιφάνεια σε δύο διαστάσεις. Το αποτέλεσμα είναι ο ταυτόχρονος υπολογισμός *in situ* του φάσματος για πολλές ουσίες, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, ενδογενείς ενώσεις και ξеноβιοτικά, και η σύσταση μίας οπτικής αναπαράστασης της μοριακής κατανομής αυτών με παράλληλη διατήρηση της ιστικής ακεραιότητας [161].

Ο Vandenbosch και η διεθνής επιστημονική του ομάδα, που συστήνεται από επιστήμονες από το Βέλγιο, την Ολλανδία και την Αυστρία, επιχείρησε την εφαρμογή της μεθόδου σε μη αφαλατωμένο οστό, καθώς η διαδικασία της αφαλάτωσης θεωρήθηκε ακρωτηριαστική για τον ιστό και υπεύθυνη για την ανακατανομή του ξеноβιοτικού και την απόδοση ψευδών αναλυτικών αποτελεσμάτων [162]. Ο αναπόφευκτος συνδυασμός του σκληρού οστού με υπόσκληρους ιστούς (τένοντες, χόνδρος, σκελετικός μυς) και μαλακές δομές (περίοστεο, μυελός των οστών) καθιστά αυτό το εγχείρημα μία πρόκληση που, χάρη στην παραπάνω ομάδα, αντιμετωπίστηκε επιτυχώς.

Η μελέτη που δημοσίευσαν πολύ πρόσφατα, μόλις το 2020, σχεδίασε ένα βελτιστοποιημένο και εφαρμόσιμο πρωτόκολλο δράσης που περιλαμβάνει τη σκλήνωση σε 20% ζελατίνη και 7,5% καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνη w/v και διατομή στα 12μm. Στην ίδια μελέτη επετεύχθη η ανίχνευση του οπιοειδούς μεθαδόνη και του μεταβολίτη αυτής EDDP¹⁰⁸. Η μέθοδος αυτή ανοίγει πολλαπλές πόρτες τόσο στη μοριακή διάγνωση, στα πλαίσια της επιστήμης της παθολογικής ανατομικής, όσο και στην τοξικολογική ανάλυση για ιατροδικαστικούς σκοπούς. Παράλληλα, η δυνατότητα που προσφέρει για χαρτογράφηση της κατανομής θα μπορούσε ενδεχομένως να απαντήσει πολλά από τα ερευνητικά ερωτήματα που τέθηκαν παραπάνω σχετικά με την δια- και ενδο- οστική ετερογένεια και την οστική φαρμακοκινητική ξеноβοτικών ουσιών δικανικού ενδιαφέροντος.

¹⁰⁷ Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging

¹⁰⁸ 2-αιθυλιδενο-1,5-διμεθυλ-3,3-διφαινυλπυρρολιδίνη

ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η λογική της βάσης δεδομένων παρουσιάστηκε το 2011 στα πλαίσια της οστικής τοξικολογίας από τους Watterson και Donohue με αφορμή την αδυναμία σύγκρισης των συγκεντρώσεων της κεταμίνης σε διαφορετικά οστά [101]. Η ιδέα δεν έχει έκτοτε αναφερθεί σε μεταγενέστερες μελέτες από άλλους επιστήμονες, ωστόσο, τα πλεονεκτήματά της στην εξασφάλιση της εγκυρότητας του κλάδου είναι αδιαμφισβήτητα, και, για τον λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, γίνεται μία πρώτη προσπάθεια συγκέντρωσης όλων εκείνων των στοιχείων που θα ήταν χρήσιμο να περιλαμβάνονται σε μία τέτοια βάση δεδομένων. Βασική προϋπόθεση για την ποσοτική σύγκριση είναι η καταστάλαξη της επιστημονικής κοινότητας σε μία σαφή και βέλτιστη μεθοδολογία προετοιμασίας και ανάλυσης του οστικού δείγματος. Απουσία ενός οριοθετημένου πρωτοκόλλου καμία βάση δεδομένων δεν πρόκειται να συμβάλλει ουσιαστικά στη διαδικασία της σύγκρισης, καθώς η ποικιλότητα στην ανάλυση συνεπάγεται αυτόματα σφάλμα στην ερμηνεία.

Ιδανικά η βάση δεδομένων θα περιλαμβάνει πληροφορίες για κάθε μία ουσία ξεχωριστά, κάτι που προϋποθέτει την αθροιστική δράση πολλών μεμονωμένων μελετών τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Στην εν λόγω εργασία μελετώνται κατά βάση οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί από το 2000 και έπειτα. Από εκτεταμένη βιβλιογραφική μελέτη είναι σαφές η προτίμηση των επιστημόνων για τις οικογένειες των οπιοειδών και των βενεδιαζεπινών, ενώ άλλα ξενοβιοτικά έχουν μελετηθεί ελάχιστα ή και καθόλου. Επιπλέον, για μεγάλο ποσοστό των ουσιών οι πληροφορίες έχουν εξαχθεί αποκλειστικά από πειράματα σε ζώα, ενώ η συμπεριφορά τους στο ανθρώπινο οστό δεν έχει διευκρινιστεί. Η επέκταση της λίστας των σχετικών πειραματικών ερευνών θα ήταν σαφώς καίριας σημασίας για τη διαλεύκανση του τοπίου. Μία τόσο εκτεταμένη βιβλιογραφία θα υποκαθιστούσε σε κάποιο βαθμό, έστω και προσωρινά, την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών εναπόθεσης, τομέα που, όπως φαίνεται, δεν εξελίσσεται ικανοποιητικά.

Πράγματι, η λεπτομερής βιολογική γνώση σχετικά με την οστική φαρμακοκινητική φαίνεται ως η ταχύτερη οδός στην εγκαθίδρυση ενός πλαισίου κατανόησης, όχι κάθε ουσίας ξεχωριστά, αλλά ομάδων ουσιών. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε γενικευμένη γνώση μπορεί να εξατομικευθεί, ενώ το αντίθετο δεν είναι εφικτό. Η περιορισμένη, ωστόσο, πρόσβαση στην πληροφορία καθιστά αναγκαία την όσο το δυνατόν πιο εκτεταμένη και εξατομικευμένη έρευνα. Τελικός σκοπός στη δημιουργία βάσης δεδομένων είναι η σύγκριση της ανευρεθείσας τιμής με αντίστοιχες τιμές του αίματος, με σκοπό τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας της έκθεσης και των συνεπειών αυτής στα πλαίσια της ιατροδικαστικής επιστήμης. Με απλά λόγια ο στόχος θα επιτευχθεί όταν σε κάθε τιμή συγκέντρωσης σε οστικό ιστοτεμάχιο μπορεί να γίνει αντιστοίχιση μίας τιμής συγκέντρωσης στο αίμα.

Από το σημείο αυτό και έπειτα ο τοξικολόγος προχωράει τη διαδικασία ερμηνείας ακολουθώντας τις συνήθεις πρακτικές. Τίθενται δηλαδή ερωτήματα που μπορούν να απαντηθούν πλήρως ή μερικώς από το μέγεθος της τιμής σε συνδυασμό με άλλα δεδομένα από το ιστορικό, την παθολογοανατομική έκθεση και το ιατροδικαστικό πόρισμα. Μερικά από αυτά είναι τα παρακάτω:

Η ουσία χορηγήθηκε άπαξ ή επαναλαμβανόμενα;

Ποια θα μπορούσε να είναι η πιθανότερη οδός χορήγησης;

Πρόκειται για οξεία ή χρόνια έκθεση;

Η συγκέντρωση αυτή τι επιδράσεις μπορεί να έχει στα διάφορα όργανα;

Η ουσία σε αυτή την ποσότητα είναι ικανή να επιφέρει τον θάνατο;

Οι σημαντικότερες πληροφορίες που θα πρέπει να περιλαμβάνει μία όσο το δυνατόν πιο άρτια βάση δεδομένων φαίνονται στον Πίνακα 9. Οι πληροφορίες αυτές παρατίθενται με τη μορφή φόρμας, την οποία θα μπορούσε να συμπληρώνει κάθε επιστημονική ομάδα ή να ακολουθεί ως πρότυπο για την επιβεβαίωση πως η έρευνα πληροί βασικές προϋποθέσεις έτσι ώστε να συμβάλει στη δημιουργία της βάσης δεδομένων. Η απομάκρυνση του μυελού των οστών και των μαλακών μορίων από το δείγμα κρίνεται αναγκαία κατά τη φάση της προκατεργασίας, καθώς η ύπαρξη ποσότητας άλλου ιστού αυτόματα αυξάνει την περιπλοκότητα της ερμηνείας. Επιπλέον, οι τιμές αναφοράς προτείνεται να προκύπτουν ως ο μέσος όρος των τιμών από πλήρως συμμετρικές περιοχές ως προς το οβελιαίο επίπεδο, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Εφόσον οι παραπάνω θεμελιώδεις αρχές εξασφαλίζονται, είναι αναμενόμενο πως διαφορετικά χαρακτηριστικά από το υποκείμενο, την ουσία και τον χειρισμό του δείγματος θα οδηγήσουν σε διαφορετική ποσοτική ανταπόκριση.

Μία πρώτη σημαντική διάκριση πρέπει να γίνει ανάμεσα στα βιολογικά φύλα αλλά και στην αναπτυξιακή και αναπαραγωγική φάση του οργανισμού. Η ηλικία αποτελεί καίριο παράγοντα, ωστόσο, αυτή εκφράζεται πληρέστερα ως κατηγοριοποίηση με σταθμούς την εμμηναρχή, την εμμηνόπαυση και την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του σκελετού. Επιπλέον, ένας τέτοιος διαχωρισμός καθιστά πιο λειτουργικό το προτεινόμενο σύστημα. Με άλλα λόγια, σε περιπτώσεις που όλες οι άλλες παράμετροι είναι πανομοιότυπες, αναμένουμε διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων μιας ουσίας ανάμεσα σε άτομα διαφορετικού φύλου ή ανάμεσα σε γυναίκες διαφορετικής αναπαραγωγικής ηλικίας ή ακόμα ανάμεσα σε έναν ενήλικα και σε έναν έφηβο. Το ίδιο ισχύει για διαφορές που έχουν να κάνουν με το σωματότυπο, το βάρος, το ύψος και το ποσοστό του λίπους στο σώμα. Ο ευκολότερος τρόπος να εντάξουμε όλα αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ο δείκτης μάζας σώματος.

Τέλος, όσον αφορά το υποκείμενο από το οποίο ελήφθη το δείγμα, ο επιστήμονας οφείλει να λάβει υπόψιν του τους παράγοντες της ιδιοσυστατικότητας του οργανισμού αλλά και νοσολογικές οντότητες που έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ή ενίσχυση της κυκλοφορίας ή τη διαταραγμένη λειτουργία των οστών. Σαφώς, συνιστώσες σαν αυτές δεν μπορούν παρά να εκφραστούν μόνον ποιοτικά στην ερμηνεία του αποτελέσματος. Παραδείγματος χάριν, ο υπολογισμός μίας τιμής α για τη συγκέντρωση του ξενοβιοτικού σε άτομο με σηπτική καταπληξία τα τελευταία εικοσιτετράωρα πριν από το θάνατο, μας πληροφορεί ότι η αληθινή συγκέντρωση της ουσίας στο αίμα είναι πιθανώς μεγαλύτερη από αυτήν που προκύπτει από τους υπολογισμούς, καθώς η υποκείμενη νόσος παρεμποδίζει την κατανομή του ξενοβιοτικού στους ιστούς. Με τον ίδιο τρόπο ιδιότητες της ίδιας της ουσίας εμφανίζουν ιδιαίτερη σημασία (λόγου χάριν ο χρόνος ημιζώης).

Σε ένα δεύτερο επίπεδο η βάση δεδομένων κρίνεται απαραίτητη για την εξίσωση των αποτελεσμάτων που ανακύπτουν από διαφορετικά οστά ή τμήματα αυτών. Τα ιατροδικαστικά τεκμήρια σε πολλές περιπτώσεις είναι ελλιπή, με αποτέλεσμα να γεννάται η ανάγκη για θεμελίωση τοξικολογικής απάντησης παρά τα περιορισμένα μέσα. Χάρη σε μία πλήρη βάση δεδομένων, κάθε ιστοτεμάχιο, από όπου κι αν προέρχεται, θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο ακόμη και για ποσοτική απάντηση. Για τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου θα ήταν σκόπιμος ο προσδιορισμός του οστικού θραύσματος ως προς τη μάζα και τον όγκο. Ενδεικτικά θα μπορούσαν ως παραδοχή να θεσπιστούν οι διαστάσεις μήκος_{cm} πλάτος_{cm} ύψος_{cm} δείγματος οστού κυβοειδούς ή άλλου στερεού σχήματος.

Οποιαδήποτε ποιότητα του ιστού, είτε πρόκειται για συμπαγές, σπογγώδες, πλατύ ή επιφυσιακό οστό, θα πρέπει τελικά να βρίσκει ακριβές ανάλογο σε κάποια άλλη ή ιδανικά να αντανακλάται με μία συγκέντρωση αίματος. Το τελευταίο προϋποθέτει τη διεξαγωγή μελετών που θα εστιάζουν τόσο στον οστικό όσο και στον αιματολογικό ποσοτικό προσδιορισμό. Ολοκληρώνοντας, τα προθανάτια και μεταθανάτια χρονικά διαστήματα δύνανται να συμβάλουν στην κατανόηση των αποτελεσμάτων. Εδώ αναγνωρίζονται δύο βασικές προκλήσεις. Πρώτον, η πορεία της λογικής είναι πολύ καλά (ή έστω ικανοποιητικά) δομημένη μονόδρομα αλλά όχι αμφίδρομα. Είναι δηλαδή εύκολο να συμπεράνουμε πως η οξεία προθανάτια χορήγηση θα δώσει υψηλότερη τιμή, αλλά πολύ πιο επισφαλές να αποδώσουμε μία υψηλή τιμή σε οξεία χορήγηση. Δεύτερον, τα χρονικά όρια που προτείνονται στον Πίνακα 10 είναι λίγο έως πολύ αυθαίρετα¹⁰⁹. Τεκμηρίωση για πιο κατάλληλα όρια κρίνεται απαραίτητη από συμπληρωματικές μελέτες.

¹⁰⁹ Για τον χρόνο που μεσολαβεί από την έκθεση έως το θάνατο, λαμβάνονται υπόψιν οι ορισμοί της οξείας (<24 ώρες) και χρόνιας (>1έτος) τοξικότητας όπως και ο ευρωπαϊκός κανονισμός 440/2008, που προβλέπει μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης 28 και 90 ημερών. Όσον αφορά τον χρόνο από τον θάνατο μέχρι την ανάλυση, τα όρια επιλέχθηκαν με βάση τις συνήθειες πρακτικές της βιβλιογραφίας. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ανάλυση

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φαρμακοκινητική των διαφόρων ξενοβιοτικών ιστροδικαστικού ενδιαφέροντος εξελίσσεται ως αναμένεται με βάση τις πολλαπλές εξειδικευμένες έρευνες στο επίπεδο της απορρόφησης και της κατανομής. Από τη στιγμή εκείνη και έπειτα η ενσωμάτωση στο οστό αποτελεί διαδικασία μάλλον παθητική, καθώς η μη στοχευμένη και ενίοτε η στοχευμένη αναδόμηση βρίσκονται ανά πάσα στιγμή σε εξέλιξη. Μοναδική προϋπόθεση για την ενσωμάτωση ενός ξενοβιοτικού σε οστικό ιστό και σε οποιαδήποτε ποσότητα αποτελεί η ύπαρξη αυτού σε ένα από τα οστικά ντεπόζιτα, δηλαδή τον μυελό των οστών, το νερό των τριών πορωδών συστημάτων και τα τροφοφόρα αγγεία που αρδεύουν τον εν λόγω ιστό. Δεδομένου ότι ο μυελός προσφέρει φιλικό περιβάλλον για λιπόφιλες ουσίες και το πέριξ αυτού νερό για υδρόφιλες, δεν υπάρχει στην πραγματικότητα ουσία που δεν έχει δυναμική εναπόθεσης, έστω και για ελάχιστο χρονικό διάστημα, και σε ποσότητες που ισοδυναμούν με ίχνη.

Επομένως, η ενδογενής αδυναμία εναπόθεσης της ουσίας δεν αποτελεί πειστική απάντηση στο ερώτημα γιατί δεν είναι εφικτή η ανίχνευση κάθε είδους ξενοβιοτικού στον οστικό ιστό. Αντίθετα, η λειτουργία και αρτιότητα ορισμένων ιδιοσυστατικών μηχανισμών του οργανισμού φαίνεται πως ευθύνεται εν μέρει όχι τόσο για την εναπόθεση όσο για την εύρυθμη εξέλιξη της οστικής αποδόμησης και αναδόμησης που παρασέρνει αυθόρμητα την ουσία ενδιαφέροντος. Τέτοιοι μηχανισμοί αναλύθηκαν διεξοδικά στην εργασία και περιλαμβάνουν το σύμπλεγμα RANK-RANKL-οστεοπροτεγερίνη, τον αυξητικό παράγοντα των μακροφάγων, τη δράση των ορμονών, το μηχανικό αισθητήρα των οστεοκυττάρων και τυχαία συμβάντα που οφείλονται στο γονιδίωμα, τη νόσο, το τραύμα κ.ά. Από κει και έπειτα το πώς θα συμπεριφερθεί η ουσία ως συστατικό του πλέγματος υδροξυαπατίτη είναι ένα εκτενές, ακροθιγώς μελετημένο κεφάλαιο, που σχετίζεται με τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά.

Το ζήτημα αυτό εξετάζεται στο δεύτερο μέρος της εργασίας και εξάγεται το συμπέρασμα ότι όλες οι ουσίες μπορούν αδρά να χωριστούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την μορφή εναπόθεσης. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ενώσεις που δύνανται να υποκαταστήσουν ένα από τα βασικά ιόντα (ασβέστιο, φωσφόρο, υδροξυλική ομάδα) στο μόριο του υδροξυαπατίτη. Τέτοιες ενώσεις είναι αδιαμφισβήτητα ιχνοστοιχεία και ιόντα που εμφανίζουν επαρκή ιονισμό στις συνθήκες που επιβάλλει το ανθρώπινο σώμα (37°C και pH 7,4) και βαρέα μέταλλα που συμπεριφέρονται, επί το πλείστον, όπως τα μη μεταλλικά ιχνοστοιχεία. Επιπλέον, τα οργανοφωσφορικά, οι τετρακυκλίνες, τα διφωσφονικά και τα πρόσφατα επίκαιρα χημικά όπλα

διεξάγεται άμεσα, έπειτα από διάστημα μίας ή δύο εβδομάδων και έπειτα από φύλαξη του ιστού για ένα έτος και πλέον.

εμφανίζουν ομοιότητες στη δομή και συνιστούν μία διακριτή ομάδα ουσιών που εμφανίζουν αξιοσημείωτη ευκολία εναπόθεσης και χρόνιας παραμονής στον οστίτη ιστό.

Από την άλλη πλευρά, σχετικές έρευνες έχουν καταλήξει στη θεωρία ότι πολλές, αν όχι όλες, οι οργανικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς στο οστό ως συνδεδεμένα μόρια με φορέα κάποιο ιόν που κατατάσσεται στην κατηγορία 1. Ουσίες όπως οι βενζοδιαζεπίνες, τα οπιοειδή, τα ολιγοπεπτίδια και, ενδεχομένως, πολλά αντιβιοτικά και ψυχοτρόπα φάρμακα, τα οποία ανιχνεύονται στα οστά αλλά ο μηχανισμός της εναπόθεσής τους δεν είναι ακόμα κατανοητός, περιλαμβάνονται στη δεύτερη διακριτή κατηγορία ουσιών. Οι απαντήσεις που αναμένονται να δοθούν για την οστική φαρμακοκινητική τέτοιων ουσιών προϋποθέτουν πολλές ακόμα πειραματικές μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο, καθώς επί του θέματος κυριαρχεί σε μεγάλο βαθμό η ασάφεια. Δυστυχώς, στην κατηγορία 2 συγκαταλέγεται η πλειονότητα των ουσιών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, γεγονός που περιπλέκει ακόμα περισσότερο τη δικανική ερμηνεία.

Η επιλογή του οστού ως ιστού τοξικολογικής ανάλυσης ενισχύεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια καθώς αναδεικνύονται οι ιδιότητές του αυτές που το καθιστούν βέλτιστη επιλογή σε ειδικές περιπτώσεις έναντι των συμβατικών υλικών και των βιολογικών υγρών. Αν και τα ερωτήματα σχετικά με την οστική ανάλυση είναι πολλά, επίκεντρο της αμφιβολίας αποτελεί η απόδοση ενός ποσοτικού αποτελέσματος και η ερμηνεία αυτού με κριτήριο την σχετική τιμή του ξενοβιοτικού στο αίμα αλλά και τη δυνατότητα υπολογισμού της δοσοεξαρτώμενης τοξικότητας. Κανένας από τους δύο στόχους δεν έχει ακόμα επιτευχθεί, τουλάχιστον με τον απόλυτο τρόπο που προσδοκάται από την επιστημονική κοινότητα. Ωστόσο, μπορούν με τα ως τώρα δεδομένα να καταλογηθούν οι αιτίες, ο συνδυασμός των οποίων φέρει ως αποτέλεσμα την αστάθεια στην ποσοτικοποίηση.

Οι αιτίες αυτές μπορούν να χωριστούν σε παράγοντες προερχόμενους από την ίδια την ουσία (φυσικοχημικές ιδιότητες), τον οργανισμό (ιδιοσυστατικότητα, επιλογή οστού), τις συνθήκες (περιβάλλον, θέση του σώματος, προθανάτιοι και μεταθανάτιοι χρόνοι, αποσύνθεση, ανακατανομή) και την επιστημονική τοξικολογική μεθοδολογία (αναλυτική μέθοδος, αποθήκευση, δειγματοληψία). Κάθε ένας από τους παραπάνω παράγοντες αποτελεί συνιστώσα της διάγνωσης, με αποτέλεσμα η ερμηνευτική σύνθεση αυτών, παρά ο καθένας ξεχωριστά, να μπορεί να προσεγγίσει ιατροδικαστικές απαντήσεις. Με αυτόν τον τρόπο δίνονται, παραδείγματος χάριν, πιθανές κατευθύνσεις σχετικά με το αν η χορήγηση ήταν χρόνια ή οξεία και θανατηφόρος, αν το ποσοτικό αποτέλεσμα ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα και σε τι ποσοστό ή αν η ουσία ελήφθη αμέσως πριν τον θάνατο ή μεγάλο χρονικό διάστημα νωρίτερα.

Σε κάθε περίπτωση χρήσιμη αποδεικνύεται η συγκριτική ανάλυση οστού και πλάσματος, για περιπτώσεις που και τα δύο υλικά είναι διαθέσιμα, καθώς και ο υπολογισμός του λόγου της

σχετικής απόκρισης μεταξύ μητρικής ουσίας και μεταβολίτη για τη λήψης επιπρόσθετης επιβοηθητικής πληροφορίας. Η μελέτη των παραπάνω παραγόντων φέρει αυτόματα στο προσκήνιο την ανάγκη δημιουργίας μίας βάσης δεδομένων, με άλλα λόγια μίας τράπεζας τιμών προερχόμενων από σαφές αναλυτικό πρωτόκολλο. Καθώς οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν στην ανάλυση είναι πολλοί και περίπλοκοι, η βάση αυτή ιδεατά πρόκειται να περιλαμβάνει πολλαπλές μετρήσεις, που θα συνυπολογίζουν κάθε πιθανή συνθήκη, και ο ιατροδικαστής θα παραπέμπεται στην πειραματική περίπτωση που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συμβατότητα με το εκάστοτε περιστατικό. Στην παρούσα εργασία προτείνεται ο σχεδιασμός μίας τέτοιας βάσης δεδομένων, που αναπόφευκτα απαιτεί πολλές ακόμα πειραματικές διαδικασίες για όλα τα πιθανά ξενοβιοτικά, ως εναλλακτική λύση μέχρι να διασαφηνιστεί η οστική φαρμακοκινητική (η ενδεχομένως ως η μοναδική λύση).

Τέλος, η ελλιπής ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων αποτελεί τομέα που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αδυναμία εδραίωσης του κλάδου της οστικής τοξικολογίας. Η προβληματική στην ανάλυση ξεκινάει ήδη από τη δειγματοληψία και την προετοιμασία του δείγματος, καθώς αυτό εύκολα παραποιείται από την ύπαρξη υπολειμμάτων ενός άλλου ιστού με τελείως διαφορετικές ιδιότητες, του μυελού των οστών. Το μόνο σίγουρο είναι ότι εφόσον αποζητούμε έγκυρα ποσοτικά αποτελέσματα, αυτά μπορούν να εξαχθούν με προϋπόθεση την πλήρη και σχολαστική απόσπαση του μυελού τόσο με μηχανικά όσο και με χημικά μέσα. Στο κομμάτι της δειγματοληψίας οι επιστήμονες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι απαιτείται εκτεταμένη συλλογή ιστοτεμαχίων από όλα τα διαθέσιμα οστά και από συμμετρικές περιοχές, και το αποτέλεσμα πρέπει να υπολογίζεται ως η μέση τιμή αυτών.

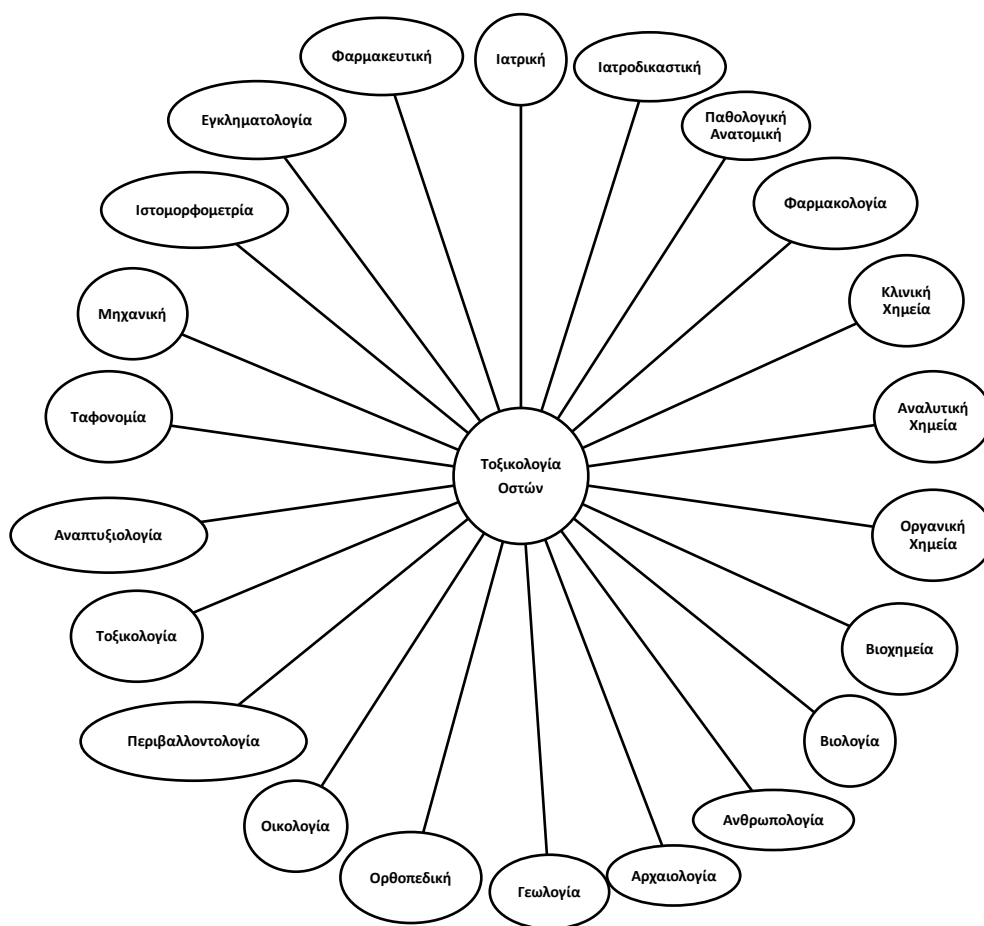
Η καινοτόμα μέθοδος της μικροδιάλυσης αποτελεί ίσως τη μοναδική τεχνική *in vivo* δειγματοληψίας και ενδεχομένως αποτελέσει ουσιώδες τοξικολογικό εργαλείο στο μέλλον. Η τεχνική αυτή επιβεβαιώνει την ιδέα ότι κάθε αναλυτική μέθοδος των οστών ανιχνεύει όχι μόνο το ενσωματωμένο ξενοβιοτικό αλλά και την ποσότητα αυτού που βρίσκεται διαλυμένη στις υδάτινες αποθήκες, καθιστώντας έτσι τη μελέτη της ενσωμάτωσης μη διακριτή από τη μελέτη του περιοστικού υδατικού κορεσμού. Ανεξάρτητα από την επιλογή της διαδικασίας προκατεργασίας, κοινός τόπος των επιστημονικών μεθόδων είναι η προσπάθεια καθαρισμού του δείγματος από ρύπους και άχρηστες ενδογενείς ουσίες, η αφαλάτωση του οστού (πλην ίσως της μεθόδου MALDI-MSI) και η δημιουργία εναιωρήματος οστικής πούδρας, ιστική μορφή που θα εξυπηρετήσει τις μεθόδους απομόνωσης που ακολουθούν στη ροή της διαδικασίας. Η μέθοδος QuEChERS παρ' ότι δεν συμπεριλαμβάνεται στην αναλυτική ρουτίνα προτείνεται εδώ ως μέσο επιβολής μίας μορφής καθολικότητας στην οστική ανάλυση.

Μετά τον καθαρισμό και την απομόνωση η αναλυτική μεθοδολογία ακολουθεί είτε το δρόμο της τεχνικής ELISA, είτε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση με τη συνδυασμένη μέθοδο

χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας. Και οι δύο επιλογές οδηγούν στην ημι-ποσοτικοποίηση, όπως ωραία διατυπώθηκε από τον Watterson, καθώς το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως σχετική παρά ως απόλυτη τιμή. Προσπάθειες να εξαχθεί απόλυτο αποτέλεσμα γίνονται συνεχώς, χωρίς ωστόσο μεγάλη επιτυχία και ευρεία εφαρμογή. Επιπλέον, κάθε νέα μελέτη περιλαμβάνει εκτός των άλλων την επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου, όπως αυτή προβλέπεται από διεθνείς οδηγίες. Ο συνδυασμός των αναλυτικών μεθόδων της ELISA με υγρή ή αέρια χρωματογραφία και διαδοχική φασματομετρία μάζας μοιάζει να εμφανίζει τα καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα ως προς την ευαισθησία. Τέλος, η βασισμένη στην φασματομετρία μάζας απεικονιστική τεχνική MALDI-MSI διαφαίνεται πως πρόκειται να μεταμορφώσει ριζικά τον τομέα της οστικής τοξικολογίας στο άμεσο μέλλον.

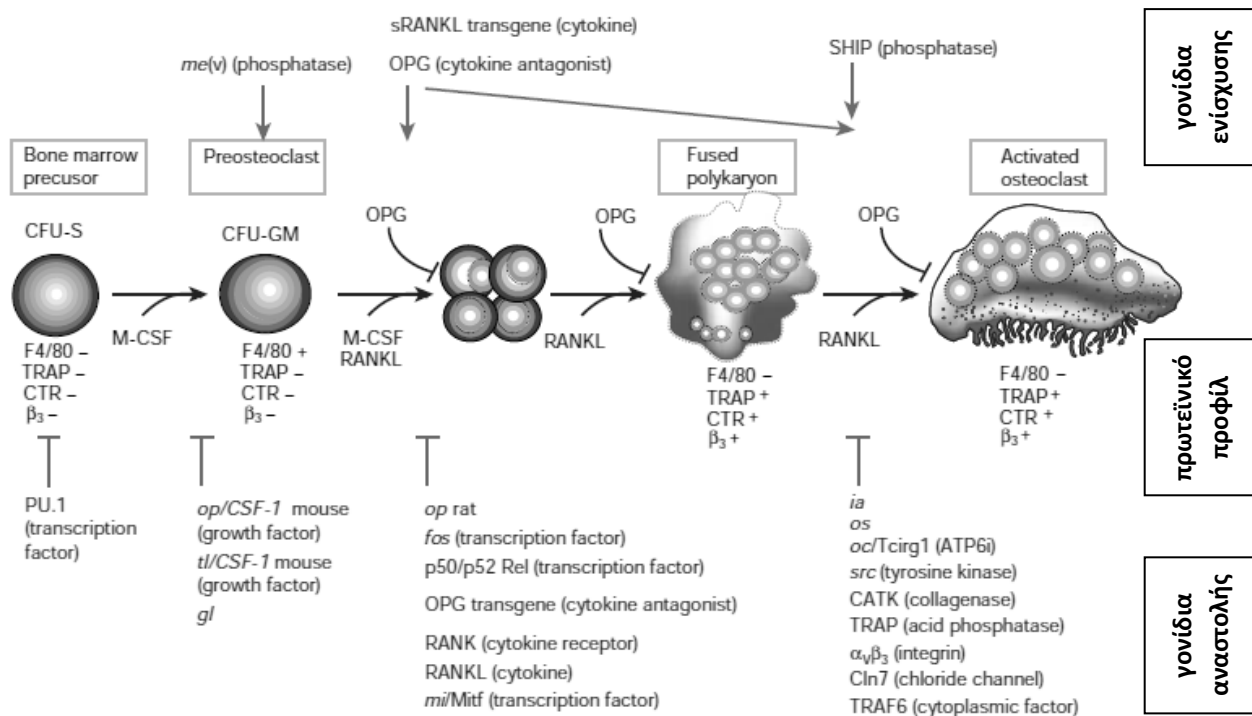
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΣΧΗΜΑΤΑ

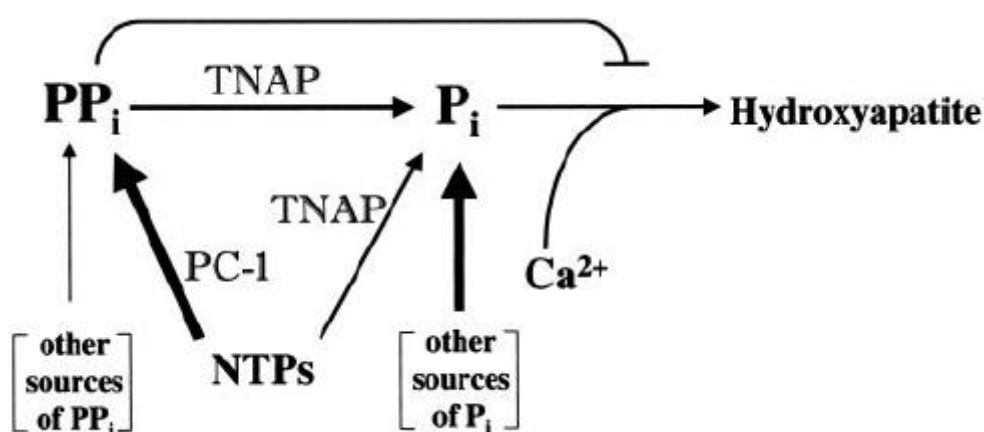


Σχήμα 1 Διεπιστημονικοί κλάδοι που συμβάλουν στην εξέλιξη του τομέα της τοξικολογίας οστών

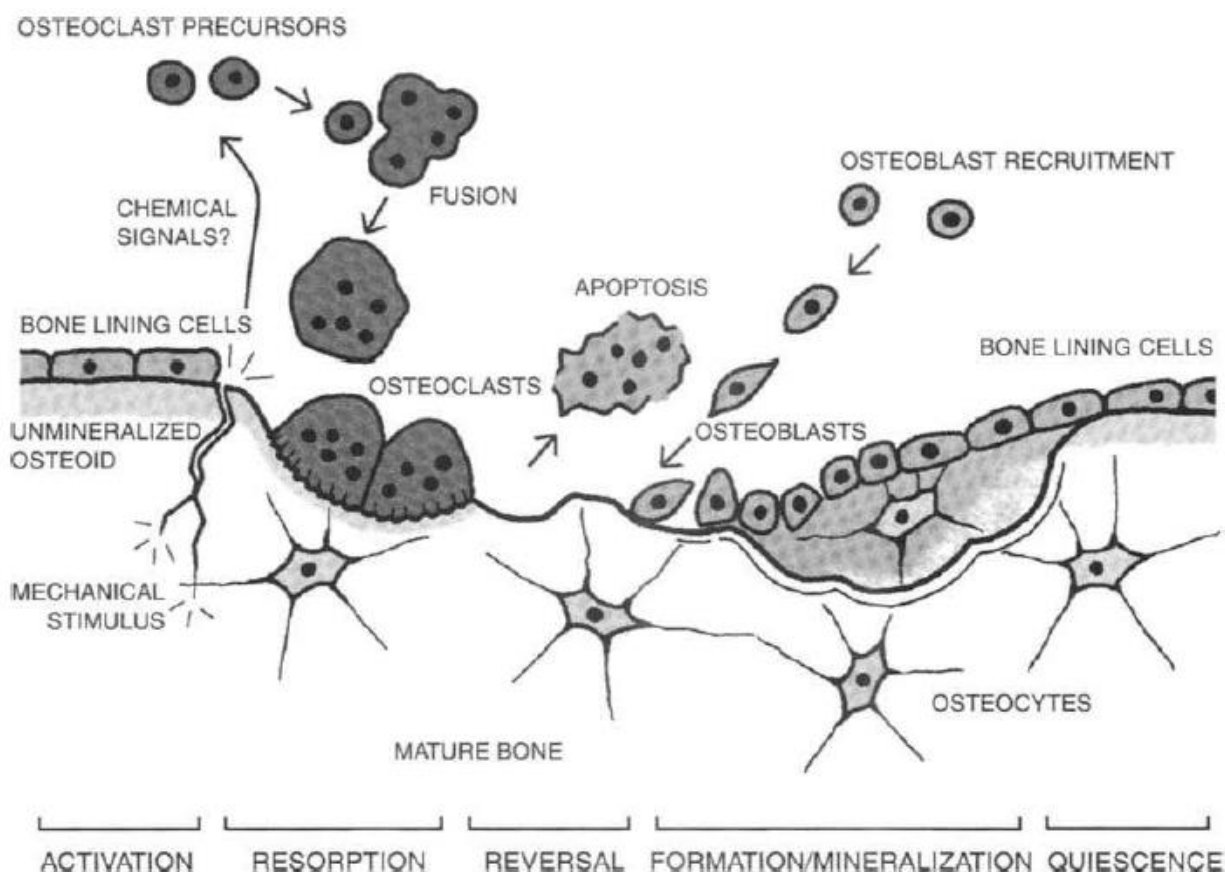
2. ΕΙΚΟΝΕΣ



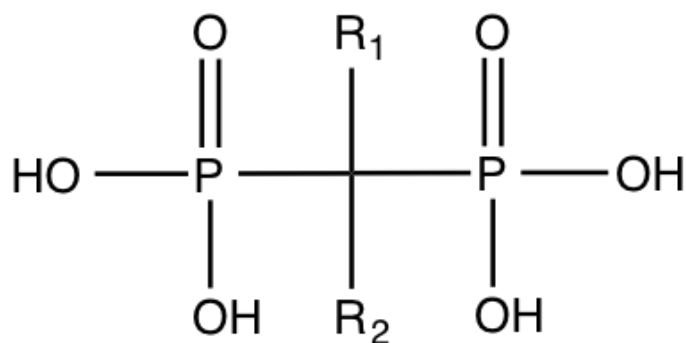
Εικόνα 1 Το προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο υφίσταται την επίδραση των πρωτεϊνών του συστήματος RANK/RANKL και της οστεοπτοτεγερίνης, με τελικό αποτέλεσμα την εξέλιξη σε ώριμο ενεργοποιημένο οστεοκλάστη. Στην πορεία αυτή το πρωτεϊνικό προφίλ των κυττάρων μεταβάλλεται. Στην εικόνα φαίνονται τα 24 γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού φαινομένου. Μεταλλάξεις σε γονίδια ενίσχυσης, όπως το γονίδιο της οστεοπτοτεγερίνης (OPG) και το SHIP, έχουν ως αποτέλεσμα ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και οστεοπενία. Αντίθετα, μεταλλάξεις σε γονίδια αναστολής μπλοκάρουν τη διαδικασία της ενεργοποίησης και παρεμποδίζουν τη δράση των οστεοκλαστών προκαλώντας υπερανάπτυξη οστικού ιστού και χόνδρου [163].



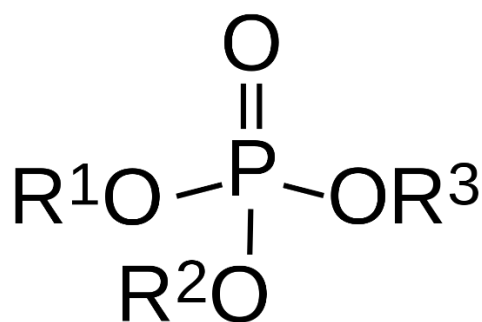
Εικόνα 2 Το πυροφωσφορικό (PP_i) υδρολύεται σε φωσφορικά ανιόντα (Pi) χάρη στην μη ιστοειδική αλκαλική φωσφατάση (TNAP) που παράγεται από τους οστεοβλάστες. Η αφθονία του πυροφωσφορικού στο περιτοστικό εξωκυττάριο νερό ρυθμίζεται από τη γλυκοπρωτεΐνη 1 της μεμβράνης των πλασματοκυττάρων (PC-1) [164]



Εικόνα 3 Οστική αναδόμηση σε περίπτωση οστικής βλάβης: Η Βασική Πολυκυτταρική Μονάδα δρα συντονισμένα έπειτα από ένα μηχανικό ή χημικό ερέθισμα. Στην εικόνα αυτή φαίνονται σε σειρά οι διαδοχικές φάσεις από το τραύμα ως την επαναφορά στην πρότερη μορφή. Στο 4^ο στάδιο (formation/mineralization) συγκαταλέγεται η δημιουργία του οστεοειδούς και η εναπόθεση υδροξυαπατίτη [37]



Εικόνα 4 Γενικός μοριακός τύπος διφωσφονικών με τη χαρακτηριστική ομάδα P-C-P

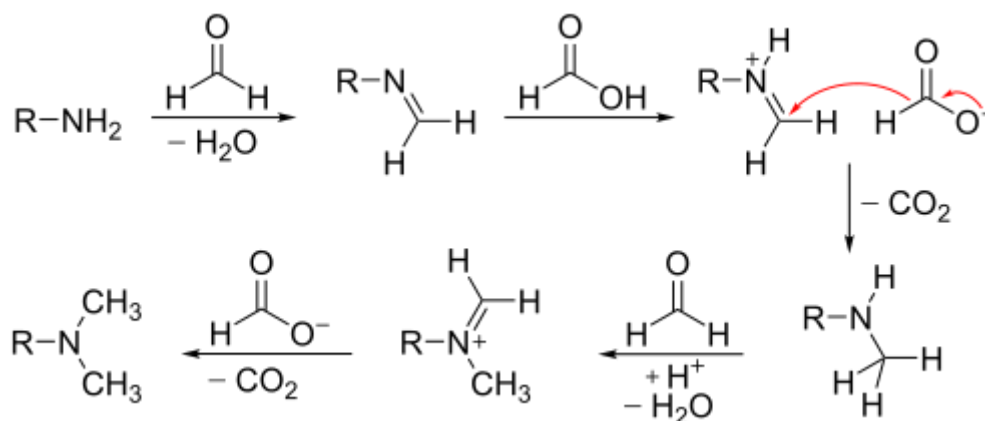


Εικόνα 5 Γενικός μοριακός τύπος οργανοφωσφορικών

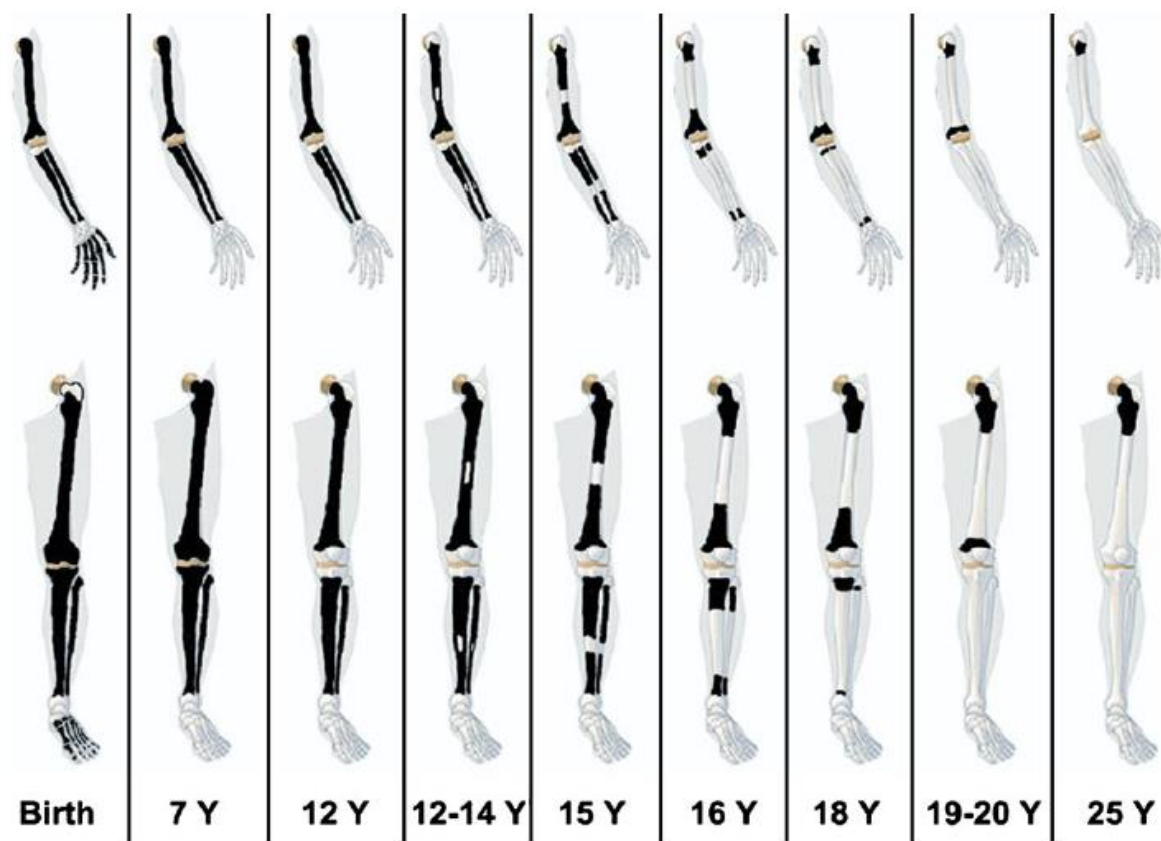
Hydrogen phosphate (found in the hydrated layer of bone)*	MPA (the common secondary metabolite of nerve agents)*	EMPA (the primary metabolite of VX)*	IMPA (the primary metabolite of sarin)*	PMPA (the primary metabolite of soman)*	CMPA (the primary metabolite of cyclosarin)*

Pyrophosphate (an endogenous bone-seeking compound) ~	TEPP (an OP pesticide)*	Zoledronic acid (a bisphosphonate used to treat osteoporosis)*

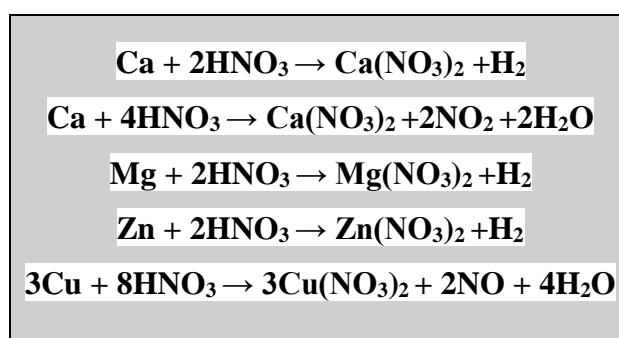
Εικόνα 6 Ομοιότητα στη δομή των χημικών όπλων με το πυροφωσφορικό, το οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο TEPP και τα διφωσφονικά. Ο διπλό δεσμός O=P που παρατηρείται σε όλες τις ενώσεις ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την οστική ενσωμάτωση [79].



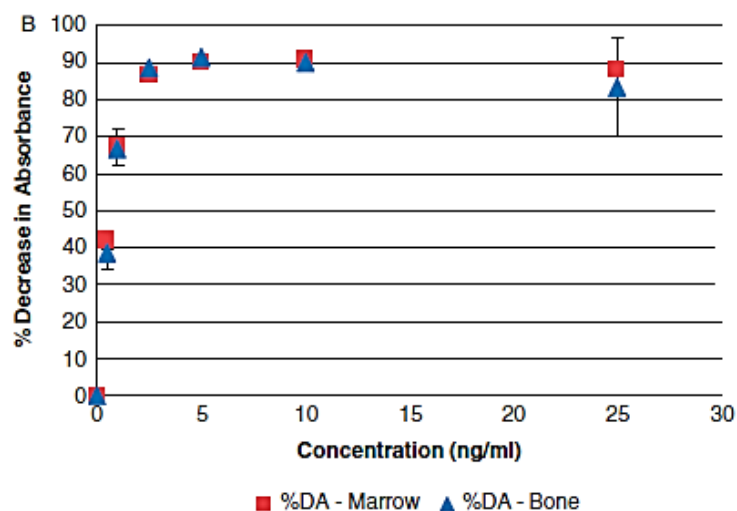
Εικόνα 7 Αντίδραση Eschweiner-Clarke παρουσία φορμαλδεΐδης



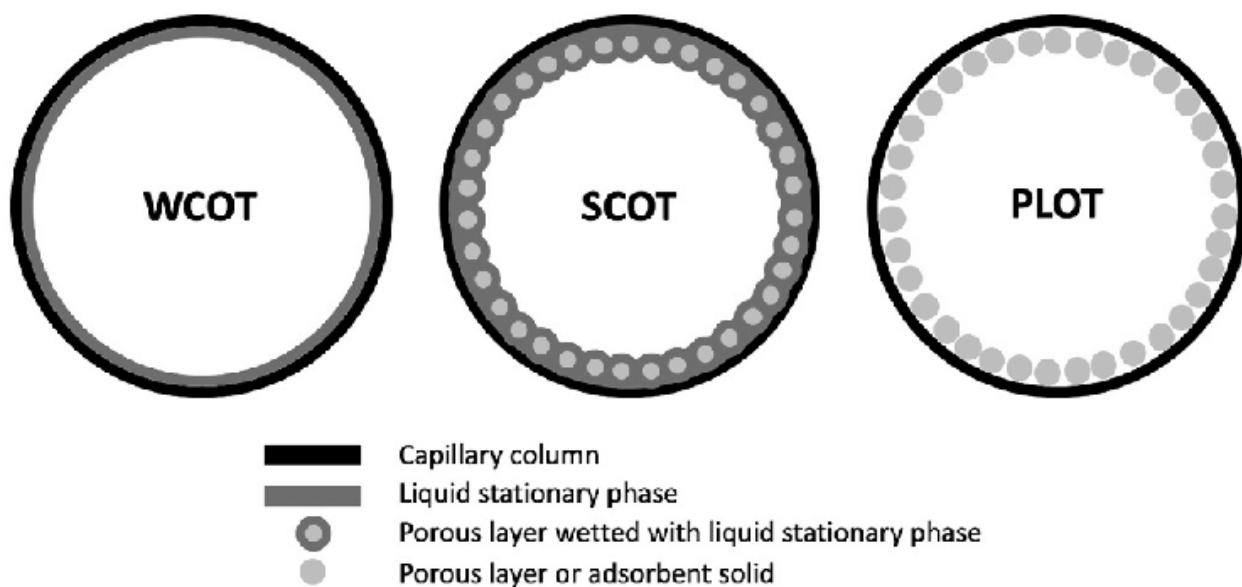
Εικόνα 8 Αναλογία ερυθρού και κίτρινου μυελού στα μακρά οστά από τη γέννηση έως τα είκοσι πέντε χρόνια ζωής. Ο ερυθρός μυελός απεικονίζεται με μαύρο και ο κίτρινος με λευκό [2]. Υπολογίζεται ότι το κλάσμα του κίτρινου μυελού αυξάνεται κατά περίπου 7% ανά δεκαετία ζωής [165]. Σε ηλικία 80 ετών ο ερυθρός μυελός αποτελεί μόλις το 30% του συνολικού μυελού του σώματος [166].



Εικόνα 9 Μερικές από τις αντιδράσεις με τις οποίες το νιτρικό οξύ εξασκεί διαβρωτική δράση στο οστό



Εικόνα 10 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για μία ουσία α. Στον άξονα των χ τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε ng/ml και στον άξονα των ψ η %DA έπειτα από μέτρηση αυτών σε μηχανήμα φασματοφωτομετρίας. Στο εν λόγω παράδειγμα φαίνονται στο ίδιο σχήμα δύο πρότυπες καμπύλες που αντιστοιχούν σε πρότυπα διαλύματα παρασκευασμένα επί οστίτη ιστού και επί μυελού των οστών υγιών, ελεύθερων ξενοβιοτικών¹¹⁰ υποκειμένων [114].



Εικόνα 11 Τριχοειδική χρωματογραφική στήλη συστήματος αέριας χρωματογραφίας με στατική φάση που επενδύει το τοίχωμα [167]. Τέτοιου είδους στήλες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης:

- I. *Wall-coated open tubular (WCOT)*: Λεπτή στοιβάδα (~25nm) υγρής στατικής φάσης επενδύει το τοίχωμα.
- II. *Porous layer open tubular (PLOT)*: Πορώδες στερεό υλικό αποτελεί τη στατική φάση.
- III. *Support-coated open tubular (SCOT)*: Συνδυασμός των δύο παραπάνω. Το στερεό πορώδες υλικό επενδύεται από υγρή στατική φάση.

¹¹⁰ Free-drug

3. ΠΙΝΑΚΕΣ

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΘΕΜΕΛΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΟΣΤΟΥ

<i>Κολλαγόνο</i>	Τύπου I Τύπου II Τύπου V
<i>Πρωτεογλυκάνες</i>	Διγλυκάνη Δεκορίνη Κερατοκάνη Ασπορίνη Υαλουρονάνη Θεεική χονδροϊτίνη
<i>Πρωτεΐνες με γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ</i>	Οστεοκαλσίνη Περιοστίνη MGP ¹¹²
<i>Γλυκοπρωτεΐνες</i>	Οστεονεκτίνη R-σπονδίνες Αλκαλική φωσφατάση
<i>RGD γλυκοπρωτεΐνες</i>	Ινιδονεκτίνη Θρομβοσπονδίνες Οστεποντίνη Βιτρονεκτίνη Οστική σιαλοπρωτεΐνη
<i>Πρωτεΐνες πλάσματος</i>	Αλβουμίνη α2-SH-γλυκοπρωτεΐνη
<i>Αυξητικοί παράγοντες</i>	IGF-I IGF-II TGF-β PDGF
<i>Γλυκοπρωτεΐνες SIBLINGS¹¹¹</i>	Οστική σιαλοπρωτεΐνη Οστεοποντίνη DMP1 ¹¹³ DSPP ¹¹⁴ MEPE ¹¹⁵

Πίνακας 1 Συστατικά οργανικής θεμέλιας ουσίας οστού [79,168]

¹¹¹ Small Integrin Binding N-Linked Glycoproteins

¹¹² Matrix Gla Protein

¹¹³ Dentine Matrix Protein 1

¹¹⁴ Dentin Sialo-Phosphoprotein

¹¹⁵ Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein

Υποκαταστάτες ιόντων υδροξυαπατίτη								
Ca^{2+}				PO_4^{3-}			OH^-	
Pb^{2+}	Mn^{2+}	K^+	Al^{3+}	VO_4^{3-}	CO_3^{2-}	SiO_4^{4-}	F^-	CO_3^{2-}
Cd^{2+}	Ba^{2+}	Na^+	Fe^{3+}	AsO_4^{3-}	SO_4^{2-}	GeO_4^{4-}	Cl^-	O^{2-}
Zn^{2+}	Mg^{2+}	Li^+	La^{3+}	MnO_4^{3-}	HPO_4^{2-}		I^-	S^{2-}
Ni^{2+}	Sr^{2+}	Ag^+					Br^-	

Πίνακας 2 Παρατίθενται ορισμένοι από τους σημαντικότερους υποκαταστάτες των βασικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Η υποκατάσταση του φωσφορικού ανιόντος με ανθρακικό ανιόν ονομάζεται α υποκατάσταση και η υποκατάσταση του υδροξυλίου με ανθρακικό ανιόν β υποκατάσταση [169]. Η παραπάνω λίστα εμπλουτίζεται συνεχώς με την πρόοδο της επιστημονικής έρευνας.

Τετρακυκλίνες και οστεοβλάστες	Τετρακυκλίνες και οστεοκλάστες
Αυξημένη παραγωγή οστεοβλαστών σε χαμηλές δόσεις [170]	Αναστολή της δράσης των μεταλλοπρωτεασών που παράγονται από τους οστεοκλάστες [171]
Προαγωγή διαφοροποίησης προγονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες [170]	Μείωση της IL-6 που προάγει την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών [172]
Επιδιόρθωση της δομής των οστεοβλαστών [173]	Προαγωγή απόπτωσης των οστεοκλαστών [174]
Αναστολή παραγωγής οστεοβλαστών σε υψηλές δόσεις (>60mg/ml) [175]	Αναστολή της παραγωγής και ανάπτυξης νέων οστεοκλαστών [174]
	Μεταβολή του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος (ιόντα Ca^{2+} , καθεψίνες, ζελατινάση κ.ά) [176]

Πίνακας 2 Οι τετρακυκλίνες εξασκούν πολλές και διαφορετικές δράσεις στους οστεοκλάστες και στους οστεοβλάστες. Οι παραπάνω δράσεις συνοψίζονται στην ιδέα ότι οι ουσίες αυτές σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<50 mg/ml) προκαλούν οστεογένεση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (>50 mg/ml) την αναστέλλουν. Η γνώση αυτή ενδέχεται να έχει εφαρμογή τόσο τοξικολογική όσο και ιατροδικαστική.

Νευρικός Παράγοντας	Μεταβολίτης
GA	Εθυλ-διμεθυλ-αμινο-φωσφορικό οξύ (<i>EDMPA</i>) C₄H₁₂NO₃P
GB	Ισοπροπυλ-μεθυλ-φωσφονικό οξύ (<i>IMPA</i>) C₄H₁₁O₃P
GD	Πινακολυλ-μεθυλ-φωσφονικό οξύ (<i>PMPA</i>) C₇H₁₇O₃P
GF	Κυκλο-εξυλ-μεθυλ-φωσφονικό οξύ (<i>CMPA</i> ή <i>CHPMA</i>) C₇H₁₅O₃P
VX	Εθυλ-μεθυλ-φωσφονικό οξύ (<i>EMPA</i>) C₃H₉O₃P
Russian VX	Ισοβουτυλ-μεθυλ-φωσφονικό οξύ (<i>iBuMPA</i>) C₅H₁₃O₃P

Πίνακας 4 Τα σημαντικότερα χημικά δηλητήρια και οι βασικοί τους μεταβολίτες. Κάθε ένας από τους μεταβολίτες αυτούς μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε μεθυλ-φωσφονικό οξύ (MPA- CH₃O₃P) έπειτα από υδρόλυση [177].

ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΙΤΕΥΞΗΣ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ
Διάλυση στερεών προσμίξεων και γαλακτωμάτων
Ομογενοποίηση του μείγματος
Προσθήκη εσωτερικού προτύπου
Διάσπαση πρωτεϊνικών δεσμών
Απομάκρυνση αδιάλυτων προσμίξεων, άχρηστων ουσιών και ρύπων
Επίτευξη επιθυμητής συγκέντρωσης είτε πρόκειται για συμπύκνωση είτε για αραιώση
Υδρόλυση, διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών
Επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή μεταφορά του δείγματος σε κάποιον περισσότερο συμβατό διαλύτη

Πίνακας 5 Η προετοιμασία και προκατεργασία του δείγματος επιτρέπει την βελτιστοποίηση αυτού για τη αποτελεσματικότερη διεξαγωγή της αναλυτικής μεθόδου [178]

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ
Μήκος της στήλης
Σύνθεση της κινητής φάσης
Σύνθεση της στατικής φάσης
Θερμοκρασία της στήλης
Ρυθμός ροής της κινητής φάσης
Μέγεθος σωματιδίων της στατικής φάσης
Σχήμα σωματιδίων της στατικής φάσης
Ομοιομορφία σωματιδίων της στατικής φάσης
Μέγεθος των πόρων της στατικής φάσης
Νεκρός όγκος ¹¹⁶

Πίνακας 6 Παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των θεωρητικών πλακών

ΤΡΟΠΟΙ ΙΟΝΙΣΜΟΥ
Ιονισμός κρούσης με ηλεκτρόνια
Χημικός ιονισμός
Ηλεκτροψεκασμός
Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από τη μήτρα (MALDI)

Πίνακας 7 Τρόποι ιονισμού και πηγές ιόντων σε φασματομετρία μάζας

ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΩΝ
Αναλυτής μαζών μαγνητικής εστίασης
Αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης (TOF)
Τετραπολικός αναλυτής μαζών
Αναλυτής παγίδας ιόντων
Τροχιακός αναλυτής παγίδας ιόντων (Orbitrap)

Πίνακας 8 Οι βασικότεροι τύποι αναλυτών μάζας που συναντώνται σε φασματομετρικά συστήματα

¹¹⁶ Η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) ορίζει τον νεκρό όγκο ως τον όγκο που καταλαμβάνει κλάσμα της κινητής φάσης έξω από το σύστημα των χρωματογραφικών στηλών. Ο όγκος αυτός συνίσταται στο άθροισμα των όγκων της μονάδας εισαγωγής του δείγματος, του ανιχνευτή και των μεταξύ των στηλών σωληναριακών δομών του συστήματος.

ΠΑΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ξενοβιοτικό (και μεταβολίτες)	
Φύλο	
Θήλυ <input type="checkbox"/>	Έως την ηλικία της εμμηναρχής <input type="checkbox"/> Από την εμμηναρχή έως την ολοκλήρωση του σκελετού <input type="checkbox"/> Από την ολοκλήρωση του σκελετού έως την εμμηνόπαυση <input type="checkbox"/> Από την εμμηνόπαυση και έπειτα <input type="checkbox"/>
Άρρεν <input type="checkbox"/>	Έως την ολοκλήρωση του σκελετού <input type="checkbox"/> Από την ολοκλήρωση του σκελετού και έπειτα <input type="checkbox"/>
BMI	<18,5 <input type="checkbox"/> ≥18,5 και ≤24,9 <input type="checkbox"/> ≥25 και ≤29,9 <input type="checkbox"/> ≥30 και ≤34,9 <input type="checkbox"/> >35 <input type="checkbox"/>
Νόσημα	Καρδιαγγειακό Νόσημα <input type="checkbox"/> _____ Αρτηριακή Υπέρταση <input type="checkbox"/> Καταπληξία/Υπόταση <input type="checkbox"/> Νόσος θυρεοειδούς <input type="checkbox"/> _____ Κακοήθεια <input type="checkbox"/> Αναιμία <input type="checkbox"/> Ακινητοποίηση <input type="checkbox"/> Οστεοπόρωση <input type="checkbox"/> Ορμονική Διαταραχή <input type="checkbox"/> _____ Νόσος των Οστών <input type="checkbox"/> _____ Εμπύρετο <input type="checkbox"/> Νεφρική Νόσος <input type="checkbox"/>

Οδός χορήγησης	Per os <input type="checkbox"/> Αναπνευστική οδός <input type="checkbox"/> Ενδοφλέβια <input type="checkbox"/> Ενδομυϊκά <input type="checkbox"/> Υποδόρια <input type="checkbox"/> Από του δέρματος <input type="checkbox"/>	Ενδοραχιαία <input type="checkbox"/> Ενδοπρωκτικά <input type="checkbox"/> Οφθαλμικά <input type="checkbox"/> Ενδοωτιαία <input type="checkbox"/> Ενδορρινικά <input type="checkbox"/> Ενδοστικά <input type="checkbox"/>
Τύπος οστού		
Μακρύ <input type="checkbox"/>	Βραχιόνιο <input type="checkbox"/> Μηριαίο <input type="checkbox"/> Κνήμη <input type="checkbox"/> Κλείδα <input type="checkbox"/> Άλλο (ωλένη, περόνη, κερκίδα) <input type="checkbox"/>	Διάφυση <input type="checkbox"/> Επίφυση <input type="checkbox"/> Μετάφυση <input type="checkbox"/>
Πλατύ <input type="checkbox"/>	Πύελος <input type="checkbox"/> Πλευρό <input type="checkbox"/> Ωμοπλάτη <input type="checkbox"/> Άλλο <input type="checkbox"/>	
Βραχύ <input type="checkbox"/>		
Ακανόνιστο <input type="checkbox"/>	Σπόνδυλος <input type="checkbox"/> Άλλο <input type="checkbox"/>	
Μέρος οστού	Συμπαγές <input type="checkbox"/> Σπογγώδες <input type="checkbox"/>	
Περιβάλλον	Θερμό <input type="checkbox"/> Υγρό <input type="checkbox"/> Στείρο <input type="checkbox"/> Εκτεθειμένο στον αέρα <input type="checkbox"/>	Ψυχρό <input type="checkbox"/> Ξηρό <input type="checkbox"/> Μολυσματικό <input type="checkbox"/> Περιορισμένο/Θαμμένο <input type="checkbox"/>
Μονιμοποιητικό	Ναι <input type="checkbox"/> Ποιο _____ Όχι <input type="checkbox"/>	
Αφαλατωτικό	Ναι <input type="checkbox"/> Ποιο _____ Όχι <input type="checkbox"/>	
Θέση του σώματος	Πρηνής <input type="checkbox"/> Ύπτια <input type="checkbox"/> Κατακόρυφη <input type="checkbox"/> Τα πόδια κατωφερέστερα <input type="checkbox"/> Η κεφαλή κατωφερέστερα <input type="checkbox"/>	

Χρόνος 1 (από την έκθεση ως τον θάνατο)	<24 ώρες ¹¹⁷ (οξεία τοξικότητα) <input type="checkbox"/> ≥24 ώρες και <1 έτος <input type="checkbox"/> ≥24 ώρες και <14 μέρες <input type="checkbox"/> ≥14 μέρες και <28 μέρες (υποξεία τοξικότητα) <input type="checkbox"/> ≥28 μέρες και <90 μέρες (υποχρόνια τοξικότητα) <input type="checkbox"/> ≥90 μέρες και <1 έτος <input type="checkbox"/> ≥1 έτος (χρόνια τοξικότητα) <input type="checkbox"/>
Χρόνος 2 (από τον θάνατο ως την ανάλυση)	Άμεσα μετά τον θάνατο <input type="checkbox"/> ≤2 εβδομάδες από τον θάνατο <input type="checkbox"/> ≤3 μήνες από τον θάνατο <input type="checkbox"/> ≤1 έτος από τον θάνατο <input type="checkbox"/> >1 έτος από τον θάνατο <input type="checkbox"/>

Πίνακας 9 Το παραπάνω ερωτηματολόγιο προτείνεται ως ενδεικτικό για τη διάκριση των σημαντικών πληροφοριών σχετικά με το δείγμα σε κάθε περίπτωση πειραματικής μελέτης. Το περιεχόμενο αυτού προκύπτει από τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία και συντάχθηκε έπειτα από κριτική ανασκόπηση αυτής. Η συγγραφέας της παρούσας εργασίας παροτρύνει άλλους μελετητές του κλάδου για περαιτέρω προσθήκες ή τροποποιήσεις.

¹¹⁷ 1 δόση ή επαναλαμβανόμενες μικρές δόσεις μέσα στο 24ωρο

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Jerome CP, Burr DB, Van BT, Hock JM, Brommage R. Treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months increases cancellous bone volume and improves trabecular architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 2001; 28(2): 150-9.
- [2] Blebea JS, Houseni M, Torigian DA, Fan C, Mavi A, Zhuge Y et al. Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes. *Semin Nucl Med* 2007; 37(3): 185-94.
- [3] Griffith JF, Yeung DK, Antonio GE, Lee FK, Hong AW, Wong SY et al. Vertebral bone mineral density, marrow perfusion, and fat content in healthy men and men with osteoporosis: dynamic contrast-enhanced MR imaging and MR spectroscopy. *Radiology* 2005; 236(3): 945-51.
- [4] Wen D, Androjna C, VasANJI A, Belovich J, Midura RJ. Lipids and collagen matrix restrict the hydraulic permeability within the porous compartment of adult cortical bone. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(3): 558-69.
- [5] Wehrli FW, Fernandez-Seara MA. Nuclear magnetic resonance studies of bone water. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(1): 79-86.
- [6] Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 1989; 3(3): 953-60.
- [7] Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 2005; 19(9): 1093-104.
- [8] Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988; 183(1): 1-44.
- [9] Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an endocrine organ. *Endocr Pract* 2012; 18(5): 758-62.
- [10] Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 421746.
- [11] Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3632-8.

- [12] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2): 139-46.
- [13] de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, Everts V. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif Tissue Int* 2011; 88(1): 63-74.
- [14] Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1988; 122(4): 1373-82.
- [15] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2): 165-76.
- [16] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; 235(1): 176-90.
- [17] Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014; 94(1): 5-24.
- [18] Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999; 13 Suppl: S101-S112.
- [19] Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; 17(10): 1231-4.
- [20] Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11(1): E47-E51.
- [21] Wilson EE, Awonusi A, Morris MD, Kohn DH, Tecklenburg MM, Beck LW. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophys J* 2006; 90(10): 3722-31.
- [22] Fernandez-Seara MA, Wehrli SL, Wehrli FW. Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 2002; 82(1 Pt 1): 522-9.
- [23] Wehrli FW, Fernandez-Seara MA. Nuclear magnetic resonance studies of bone water. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(1): 79-86.
- [24] Wilson EE, Awonusi A, Morris MD, Kohn DH, Tecklenburg MM, Beck LW. Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance. *J Bone Miner Res* 2005; 20(4): 625-34.

- [25] Cowin SC, Cardoso L. Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue. *J Biomech* 2015; 48(5): 842-54.
- [26] Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(3): 446-50.
- [27] Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N et al. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999; 163(1): 434-42.
- [28] Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(4): 1566-71.
- [29] Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402(6759): 304-9.
- [30] Chagraoui H, Tulliez M, Smayra T, Komura E, Giraudier S, Yun T et al. Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. *Blood* 2003; 101(8): 2983-9.
- [31] Mohan S, Baylink DJ. Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption. *Horm Res* 1996; 45 Suppl 1: 59-62.
- [32] Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res* 2007; 22(4): 487-94.
- [33] Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 2006; 4(2): 111-21.
- [34] Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5(3): 222-6.
- [35] Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996; 45: 371-86.
- [36] Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech* 2003; 36(10): 1453-9.
- [37] Jane E. Buikstra. Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. 3rd ed. Academic Press. 2019.

- [38] Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev* 1986; 7(4): 379-408.
- [39] Parfitt AM. Misconceptions (2): turnover is always higher in cancellous than in cortical bone. *Bone* 2002; 30(6): 807-9.
- [40] Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11(4): 219-27.
- [41] Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Vaananen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res* 2006; 21(4): 616-25.
- [42] Rubin KM. The current state and future directions of skeletal toxicology: Forensic and humanitarian implications of a proposed model for the in vivo incorporation of drugs into the human skeleton. *Forensic Sci Int* 2018; 289: 419-28.
- [43] Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 1996; 11(9): 1302-11.
- [44] Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 1996; 11(9): 1302-11.
- [45] Albarede F, Telouk P, Lamboux A, Jaouen K, Balter V. Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 2011; 3(9): 926-33.
- [46] Martin JE, Vance D, Balter V. Natural variation of magnesium isotopes in mammal bones and teeth from two South African trophic chains. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2022; 12-20.
- [47] Bruno Reynard, Vincent Balter. Trace elements and their isotopes in bones and teeth: Diet, environments, diagenesis and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 2014; 4-16.
- [48] Yi H, Balan E, Gervais C, Segalen L, Fayon F, Roche D et al. A carbonate-fluoride defect model for carbonate-rich fluorapatite. *Mineral* 2013; 1066-9.

- [49] Coyte RM, Harkness JS, Darrah TH. The Abundance of Trace Elements in Human Bone Relative to Bone Type and Bone Pathology. *Geohealth* 2022; 6(6): e2021GH000556.
- [50] Hirabayashi H, Fujisaki J. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(15): 1319-30.
- [51] Myers HM. Structure-activity relationships (SAR) of hydroxyapatite-binding molecules. *Calcif Tissue Int* 1987; 40(6): 344-8.
- [52] Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res* 1989; 116: 1-28.
- [53] Tsushima N, Yabuki M, Harada H, Katsumata T, Kanamaru H, Nakatsuka I et al. Tissue distribution and pharmacological potential of SM-16896, a novel oestrogen-bisphosphonate hybrid compound. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52(1): 27-37.
- [54] van BE, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, Papapoulos S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9(12): 1875-82.
- [55] Beyer GJ, Offord R, Kunzi G, Aleksandrova Y, Ravn U, Jahn S et al. The influence of EDTMP-concentration on the biodistribution of radio-lanthanides and 225-Ac in tumor-bearing mice. The ISOLDE Collaboration. *Nucl Med Biol* 1997; 24(5): 367-72.
- [56] Murata N, Murata K, Gonzalez-Cuyar LF, Maravilla KR. Gadolinium tissue deposition in brain and bone. *Magn Reson Imaging* 2016; 34(10): 1359-65.
- [57] Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 1: 85-95.
- [58] Gulson B, Taylor A, Eisman J. Bone remodeling during pregnancy and post-partum assessed by metal lead levels and isotopic concentrations. *Bone* 2016; 89: 40-51.
- [59] Eguchi LA, Saltman P. The aerobic reduction of Fe(III) complexes by hemoglobin and myoglobin. *J Biol Chem* 1984; 259(23): 14337-8.
- [60] Gibby WA, Gibby KA, Gibby WA. Comparison of Gd DTPA-BMA (Omniscan) versus Gd HP-DO3A (ProHance) retention in human bone tissue by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Invest Radiol* 2004; 39(3): 138-42.
- [61] MILCH RA, RALL DP, TOBIE JE. Bone localization of the tetracyclines. *J Natl Cancer Inst* 1957; 19(1): 87-93.

- [62] MILCH RA, RALL DP, TOBIE JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg Am* 1958; 40-A(4): 897-910.
- [63] Perrin DD. Binding of tetracyclines to bone. *Nature* 1965; 208(5012): 787-8.
- [64] Kerbleski GJ, Hampton TT, Cornejo A. Black bone disease of the foot: a case study and review of literature demonstrating a correlation of long-term minocycline therapy and bone hyperpigmentation. *J Foot Ankle Surg* 2013; 52(2): 239-41.
- [65] Wolfe ID, Reichmister J. Minocycline hyperpigmentation: skin, tooth, nail, and bone involvement. *Cutis* 1984; 33(5): 457-8.
- [66] Burt-Pichat B, Follet H, Toulemonde G, Arlot M, Delmas P, Chapurlat R. Methodological approach for the detection of both microdamage and fluorochrome labels in ewe bone and human trabecular bone. *J Bone Miner Metab* 2011; 29(6): 756-64.
- [67] Cheng W, Yue Y, Fan W, Hu Y, Wang X, Pan X et al. Effects of tetracyclines on bones: an ambiguous question needs to be clarified. *Pharmazie* 2012; 67(5): 457-9.
- [68] Boselli E, Allaouchiche B. [Diffusion in bone tissue of antibiotics]. *Presse Med* 1999; 28(40): 2265-76.
- [69] Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sorgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(2): 89-124.
- [70] Thabit AK, Fatani DF, Bamakhrama MS, Barnawi OA, Basudan LO, Alhejaili SF. Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review. *Int J Infect Dis* 2019; 81: 128-36.
- [71] Smilack JD, Flittie WH, Williams TW, Jr. Bone concentrations of antimicrobial agents after parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9(1): 169-71.
- [72] Summersgill JT, Schupp LG, Raff MJ. Comparative penetration of metronidazole, clindamycin, chloramphenicol, cefoxitin, ticarcillin, and moxalactam into bone. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21(4): 601-3.
- [73] Landersdorfer CB, Kinzig M, Bulitta JB, Hennig FF, Holzgrabe U, Sorgel F, Gusinde J. Bone penetration of amoxicillin and clavulanic acid evaluated by population pharmacokinetics and Monte Carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6): 2569-78.

- [74] Weismeier K, Adam D, Heilmann HD, Koeppe P. Penetration of amoxycillin/clavulanate into human bone. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 Suppl B: 93-100.
- [75] Grimer RJ, Karpinski MR, Andrews JM, Wise R. Penetration of amoxycillin and clavulanic acid into bone. *Chemotherapy* 1986; 32(3): 185-91.
- [76] Fracasso ME, Consolo V, Ferronato G, Leone R, Cuzzolin L, Benoni G. Aztreonam penetration of bone and soft tissue, after i.v. infusion and bolus injection. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23(3): 465-7.
- [77] Stahlmann R. Children as a special population at risk--quinolones as an example for xenobiotics exhibiting skeletal toxicity. *Arch Toxicol* 2003; 77(1): 7-11.
- [78] Lozano-Alonso S, Linares-Palomino JP, Vera-Arroyo B, Bravo-Molina A, Hernandez-Quero J, Ros-Die E. [Evaluation of the tissue diffusion capacity of antibiotics in lower limb ischaemia]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34(8): 477-83.
- [79] Rubin KM. The current state and future directions of skeletal toxicology: Forensic and humanitarian implications of a proposed model for the in vivo incorporation of drugs into the human skeleton. *Forensic Sci Int* 2018; 289: 419-28.
- [80] Compston JE, Vedi S, Stephen AB, Bord S, Lyons AR, Hodges SJ, Scammell BE. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. *Lancet* 1999; 354(9192): 1791-2.
- [81] Garg UK, Pal AK, Jha GJ, Jadhao SB. Pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides on bone health of broiler chicks. *Toxicol Pathol* 2004; 32(3): 364-9.
- [82] Rubin KM, Goldberger BA, Garrett TJ. Detection of Chemical Weapon Nerve Agents in Bone by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 2020; 44(4): 391-401.
- [83] Nowack B. Environmental chemistry of phosphonates. *Water Res* 2003; 37(11): 2533-46.
- [84] Grynpas M. Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcif Tissue Int* 1993; 53 Suppl 1: S57-S64.
- [85] Rotman SG, Grijpma DW, Richards RG, Moriarty TF, Eglin D, Guillaume O. Drug delivery systems functionalized with bone mineral seeking agents for bone targeted therapeutics. *J Control Release* 2018; 269: 88-99.
- [86] Kasugai S, Fujisawa R, Waki Y, Miyamoto K, Ohya K. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation. *J Bone Miner Res* 2000; 15(5): 936-43.

- [87] Takatori T, Tomii S, Terazawa K, Nagao M, Kanamori M, Tomaru Y. A comparative study of diazepam levels in bone marrow versus serum, saliva and brain tissue. *Int J Legal Med* 1991; 104(4): 185-8.
- [88] Watterson JH, Botman JE. Detection of acute diazepam exposure in bone and marrow: influence of tissue type and the dose-death interval on sensitivity of detection by ELISA with liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmation. *J Forensic Sci* 2009; 54(3): 708-14.
- [89] McIntyre LM, King CV, Boratto M, Drummer OH. Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. *Ther Drug Monit* 2000; 22(1): 79-83.
- [90] Watterson J. Challenges in forensic toxicology of skeletonized human remains. *Analyst* 2006; 131(9): 961-5.
- [91] Wyman J, Bultman S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *J Anal Toxicol* 2004; 28(4): 260-3.
- [92] Wietecha-Posluszny R, Lendor S, Garnysz M, Zawadzki M, Koscielniak P. Human bone marrow as a tissue in post-mortem identification and determination of psychoactive Substances-Screening methodology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1061-1062: 459-67.
- [93] Winek CL, Costantino AG, Wahba WW, Collom WD. Blood versus bone marrow pentobarbital concentrations. *Forensic Sci Int* 1985; 27(1): 15-24.
- [94] Winek CL, Westwood SE, Wahba WW. Plasma versus bone marrow desipramine: a comparative study. *Forensic Sci Int* 1990; 48(1): 49-57.
- [95] Winek CL, Pluskota M, Wahba WW. Plasma versus bone marrow flurazepam concentration in rabbits. *Forensic Sci Int* 1982; 19(2): 155-63.
- [96] McGrath KK, Jenkins AJ. Detection of drugs of forensic importance in postmortem bone. *Am J Forensic Med Pathol* 2009; 30(1): 40-4.
- [97] Vandenbosch M, Somers T, Cuyppers E. Distribution of Methadone and Metabolites in Skeletal Tissue. *J Anal Toxicol* 2018; 42(6): 400-8.
- [98] Vardakou I, Athanaselis S, Pistos C, Papadodima S, Spiliopoulou C, Moraitis K. The clavicle bone as an alternative matrix in forensic toxicological analysis. *J Forensic Leg Med* 2014; 22: 7-9.
- [99] Franceschetti L, Di CD, Giordano G, Carabelli I, Vignali G, Cattaneo C. Drugs in bone: Detectability of substances of toxicological interest in different states of preservation. *J Forensic Sci* 2021; 66(2): 677-86.

- [100] Watterson JH, Cornthwaite HM. Discrimination between patterns of drug exposure by toxicological analysis of decomposed skeletal tissues. Part II: Amitriptyline and citalopram. *J Anal Toxicol* 2013; 37(8): 565-72.
- [101] Watterson JH, Donohue JP. Relative distribution of ketamine and norketamine in skeletal tissues following various periods of decomposition. *J Anal Toxicol* 2011; 35(7): 452-8.
- [102] Raikos N, Tsoukali H, Njau SN. Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow. *Forensic Sci Int* 2001; 123(2-3): 140-1.
- [103] Kojima T, Okamoto I, Miyazaki T, Chikasue F, Yashiki M, Nakamura K. Detection of methamphetamine and amphetamine in a skeletonized body buried for 5 years. *Forensic Sci Int* 1986; 31(2): 93-102.
- [104] Kudo K, Sugie H, Syoui N, Kurihara K, Jitsufuchi N, Imamura T, Ikeda N. Detection of triazolam in skeletal remains buried for 4 years. *Int J Legal Med* 1997; 110(5): 281-3.
- [105] Ορφανίδης Αμβρόσιος. Ανάλυση ψυχοτρόπων ουσιών και φαρμάκων σε μη συμβατικά βιολογικά υλικά και μελέτη της σταθερότητας αυτών σε μονιμοποιημένους ιστούς. 2018. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
- [106] Watterson JH, Desrosiers NA. Examination of the effect of dose-death interval on detection of meperidine exposure in decomposed skeletal tissues using microwave-assisted extraction. *Forensic Sci Int* 2011; 207(1-3): 40-5.
- [107] Watterson JH, Vandenboer TC. Effects of tissue type and the dose-death interval on the detection of acute ketamine exposure in bone and marrow with solid-phase extraction and ELISA with liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmation. *J Anal Toxicol* 2008; 32(8): 631-8.
- [108] Watterson JH, Donohue JP, Betit CC. Comparison of relative distribution of ketamine and norketamine in decomposed skeletal tissues following single and repeated exposures. *J Anal Toxicol* 2012; 36(6): 429-33.
- [109] Lafreniere NM, Watterson JH. Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues. *Forensic Sci Int* 2009; 185(1-3): 100-6.
- [110] Watterson JH, Desrosiers NA, Betit CC, Dean D, Wyman JF. Relative distribution of drugs in decomposed skeletal tissue. *J Anal Toxicol* 2010; 34(8): 510-5.

- [111] Gorczynski LY, Melbye FJ. Detection of benzodiazepines in different tissues, including bone, using a quantitative ELISA assay. *J Forensic Sci* 2001; 46(4): 916-8.
- [112] Guillot E, de MP, Durigon M, Alvarez JC. Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. *Forensic Sci Int* 2007; 166(2-3): 139-44.
- [113] Cengiz S, Ulukan O, Ates I, Tugcu H. Determination of morphine in postmortem rabbit bone marrow and comparison with blood morphine concentrations. *Forensic Sci Int* 2006; 156(2-3): 91-4.
- [114] Desrosiers NA, Watterson JH. The effects of burial on drug detection in skeletal tissues. *Drug Test Anal* 2010; 2(7): 346-56.
- [115] Sharanowski BJ, Walker EG, Anderson GS. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Sci Int* 2008; 179(2-3): 219-40.
- [116] Heaton V, Lagden A, Moffatt C, Simmons T. Predicting the postmortem submersion interval for human remains recovered from U.K. waterways. *J Forensic Sci* 2010; 55(2): 302-7.
- [117] Delabarde T, Keyser C, Tracqui A, Charabidze D, Ludes B. The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment. *Forensic Sci Int* 2013; 228(1-3): e1-e5.
- [118] Nagata T, Kimura K, Hara K, Kudo K. Methamphetamine and amphetamine concentrations in postmortem rabbit tissues. *Forensic Sci Int* 1990; 48(1): 39-47.
- [119] Cornthwaite HM, Watterson JH. The influence of body position and microclimate on ketamine and metabolite distribution in decomposed skeletal remains. *J Anal Toxicol* 2014; 38(8): 548-54.
- [120] Berglund M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. Metal-bone interactions. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 219-25.
- [121] Winek CL, Janssen JK. Blood versus bone marrow isopropanol concentrations in rabbits. *Forensic Sci Int* 1982; 20(1): 11-20.
- [122] Winek CL, Zaveri NR, Wahba WW. The study of tricyclic antidepressants in formalin-fixed human liver and formalin solutions. *Forensic Sci Int* 1993; 61(2-3): 175-83.
- [123] Wiart JF, Hakim F, Andry A, Eiden C, Drevin G, Lelievre B et al. Pitfalls of toxicological investigations in hair, bones, and nails in extensively decomposed bodies: illustration with two cases. *Int J Legal Med* 2020; 134(4): 1339-44.

- [124] Jaouen K, Herrscher E, Balter V. Copper and zinc isotope ratios in human bone and enamel. *Am J Phys Anthropol* 2017; 162(3): 491-500.
- [125] Cattaneo C, Gigli F, Lodi F, Grandi M. The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains. *J Forensic Odontostomatol* 2003; 21(1): 1-5.
- [126] Cippitelli M, Mirtella D, Ottaviani G, Tassoni G, Frolidi R, Cingolani M. Toxicological Analysis of Opiates from Alternative Matrices Collected from an Exhumed Body. *J Forensic Sci* 2018; 63(2): 640-3.
- [127] Hwang S, Panicek DM. Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 1. *Skeletal Radiol* 2007; 36(10): 913-20.
- [128] Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Sci Int* 2006; 156(2-3): 213-8.
- [129] Snamina M, Wietecha-Posluszny R, Zawadzki M. Postmortem analysis of human bone marrow aspirate - Quantitative determination of SSRI and SNRI drugs. *Talanta* 2019; 204: 607-12.
- [130] Tattoli L, Tsokos M, Sautter J, Anagnostopoulos J, Maselli E, Ingravallo G et al. Postmortem bone marrow analysis in forensic science: study of 73 cases and review of the literature. *Forensic Sci Int* 2014; 234: 72-8.
- [131] Grellner W, Glenewinkel F. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the postmortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature. *Forensic Sci Int* 1997; 90(1-2): 139-59.
- [132] Cartiser N, Bevalot F, Fanton L, Gaillard Y, Guitton J. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review. *Int J Legal Med* 2011; 125(2): 181-98.
- [133] Wietecha-Posluszny R, Lendor S, Garnysz M, Zawadzki M, Koscielniak P. Human bone marrow as a tissue in post-mortem identification and determination of psychoactive Substances-Screening methodology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1061-1062: 459-67.
- [134] Iskierka M, Zawadzki M, Szpot P, Jurek T. Detection of Drugs in Postmortem Specimens of Blood, Vitreous Humor and Bone Marrow Aspirate. *J Anal Toxicol* 2021; 45(4): 348-55.

- [135] Tominaga M, Michiue T, Ishikawa T, Kawamoto O, Oritani S, Ikeda K et al. Postmortem analyses of drugs in pericardial fluid and bone marrow aspirate. *J Anal Toxicol* 2013; 37(7): 423-9.
- [136] de Souza SE, Spinelli E, Vieira AA, Rodrigues SV. Postmortem analysis of famprofazone and its metabolites, methamphetamine and amphetamine, in porcine bone marrow. *Talanta* 2019; 191: 545-52.
- [137] Winek CL, Esposito FM. Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Sci Int* 1981; 17(1): 27-36.
- [138] Tominaga M, Ishikawa T, Michiue T, Oritani S, Koide I, Kuramoto Y et al. Postmortem analyses of gaseous and volatile substances in pericardial fluid and bone marrow aspirate. *J Anal Toxicol* 2013; 37(3): 147-51.
- [139] Guillot E, de MP, Durigon M, Alvarez JC. Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. *Forensic Sci Int* 2007; 166(2-3): 139-44.
- [140] Stolle LB, Arpi M, Holmberg-Jorgensen P, Riegels-Nielsen P, Keller J. Application of microdialysis to cancellous bone tissue for measurement of gentamicin levels. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1): 263-5.
- [141] Tottrup M, Hardlei TF, Bendtsen M, Bue M, Brock B, Fuursted K et al. Pharmacokinetics of cefuroxime in porcine cortical and cancellous bone determined by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(6): 3200-5.
- [142] Desrosiers NA, Betit CC, Watterson JH. Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Sci Int* 2009; 188(1-3): 23-30.
- [143] Watterson JH, Imfeld AB, Cornthwaite HC. Determination of colchicine and O-demethylated metabolites in decomposed skeletal tissues by microwave assisted extraction, microplate solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography (MAE-MPSPE-UHPLC). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 960: 145-50.
- [144] Orfanidis A, Gika H, Mastrogianni O, Krokos A, Theodoridis G, Zaggelidou E, Raikos N. Determination of drugs of abuse and pharmaceuticals in skeletal tissue by UHPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 2018; 290: 137-45.

- [145] Mancini R, Fernandez-Lopez L, Falcon M, Pellegrini M, Luna A, Rotolo M. Postmortem Analysis of Benzodiazepines in Human Bone by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 2021; 44(9): 985-92.
- [146] Fernandez-Lopez L, Pellegrini M, Rotolo MC, Luna MA, Falcon M, Mancini R. Development and validation of a method for analysing of duloxetine, venlafaxine and amitriptyline in human bone. *Forensic Sci Int* 2019; 299: 154-60.
- [147] Thompson S, Budzinski H, LeMenach K, Letellier M, Garrigues P. Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372(1): 196-204.
- [148] Franke M, Winek CL, Kingston HM. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci Int* 1996; 81(1): 51-9.
- [149] Rodda LN, Volk JA, Moffat E, Williams CM, Lynch KL, Wu AHB. Evaluation of Intraosseous Fluid as an Alternative Biological Specimen in Postmortem Toxicology. *J Anal Toxicol* 2018; 42(3): 163-9.
- [150] Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified "QuEChERS" procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS(β - HT^+). *Forensic Sci Int* 2014; 243: 99-106.
- [151] Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitseva K, Shima N, Kamata T et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci Int* 2013; 232(1-3): 40-5.
- [152] Alves V, Conceicao C, Goncalves J, Teixeira HM, Camara JS. Improved Analytical Approach Based on QuEChERS/UHPLC-PDA for Quantification of Fluoxetine, Clomipramine and their Active Metabolites in Human Urine Samples. *J Anal Toxicol* 2017; 41(1): 45-53.
- [153] Lafreniere NM, Watterson JH. Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues part II: the effect of dose-death interval. *Forensic Sci Int* 2010; 194(1-3): 60-6.
- [154] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 2013; 37(7): 452-74.
- [155] Fernandez-Lopez L, Pellegrini M, Rotolo MC, Luna A, Falcon M, Mancini R. Development and Validation of a Method for the Analysis of Bisoprolol and Atenolol in Human Bone. *Molecules* 2019; 24(13).

- [156] Paul Kebarle, Liang Tan. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1993; 65(22): 972A-86A.
- [157] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(13): 3019-30.
- [158] Davies E, Muller KH, Wong WC, Pickard CJ, Reid DG, Skepper JN, Duer MJ. Citrate bridges between mineral platelets in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(14): E1354-E1363.
- [159] Costello LC, Chellaiah M, Zou J, Franklin RB, Reynolds MA. The status of citrate in the hydroxyapatite/collagen complex of bone; and Its role in bone formation. *J Regen Med Tissue Eng* 2014; 3: 4.
- [160] Vandenbosch M, Nauta SP, Svirikova A, Poeze M, Heeren RMA, Siegel TP et al. Sample preparation of bone tissue for MALDI-MSI for forensic and (pre)clinical applications. *Anal Bioanal Chem* 2021; 413(10): 2683-94.
- [161] Karlsson O, Hanrieder J. Imaging mass spectrometry in drug development and toxicology. *Arch Toxicol* 2017; 91(6): 2283-94.
- [162] Schaepe K, Bhandari DR, Werner J, Henss A, Pirkel A, Kleine-Boymann M et al. Imaging of Lipids in Native Human Bone Sections Using TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry, Atmospheric Pressure Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Orbitrap Mass Spectrometry, and Orbitrap-Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2018; 90(15): 8856-64.
- [163] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937): 337-42.
- [164] Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(14): 9445-9.
- [165] Liney GP, Bernard CP, Manton DJ, Turnbull LW, Langton CM. Age, gender, and skeletal variation in bone marrow composition: a preliminary study at 3.0 Tesla. *J Magn Reson Imaging* 2007; 26(3): 787-93.
- [166] Fan C, Hernandez-Pampaloni M, Houseni M, Chamroonrat W, Basu S, Kumar R et al. Age-related changes in the metabolic activity and distribution of the red marrow as demonstrated by 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose-positron emission tomography. *Mol Imaging Biol* 2007; 9(5): 300-7.

- [167] Caroline Maes, Maarten te Molder, Wout Luyten, Geert Herremans, Naomi Winckelmans, Roos Peeters et al. Determination of the nitrogen gas transmission rate (N₂GTR) of ethylene vinyl alcohol copolymer, using a newly developed permeation measurement system. *Polymer Testing* 2021; 93.
- [168] Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol* 2020; 11: 757.
- [169] Chappard D, Bizot P, Mabilieu G, Hubert L. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al(3+) deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie* 2016; 100(329): 95-105.
- [170] Almazin SM, Dziak R, Andreana S, Ciancio SG. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro. *J Periodontol* 2009; 80(6): 999-1005.
- [171] Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(9): 1809-19.
- [172] Saikali Z, Singh G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. *Anticancer Drugs* 2003; 14(10): 773-8.
- [173] Sasaki T, Kaneko H, Ramamurthy NS, Golub LM. Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experimental diabetes. *Anat Rec* 1991; 231(1): 25-34.
- [174] Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ, Grabowski PS. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone* 2004; 35(2): 471-8.
- [175] Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(1): 54-63.
- [176] Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002; 73(7): 726-34.
- [177] Black RM, Read RW. Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch Toxicol* 2013; 87(3): 421-37.

- [178] Robert J.Flanagan, Eva Cuypers, Hans H.Maurer, Robin Whelpton. Fundamentals of Analytical Toxicology. 2nd ed. Wiley. 2022.