

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE-DEPARTMENT OF MEDICINE
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**TOXICOLOGY &
FORENSIC CHEMISTRY
CENTER**

**ΜΟΝΑΔΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
& ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ**

Dr Aristidis M Tsatsakis, Tel +3081 394679, Fax +3081 542098, e-mail:aris@med.uoc.gr



**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΡΒΑΜΑΖΕΠΙΝΗΣ,
ΦΑΙΝΥΤΟΪΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΛΠΡΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
του
ΨΥΛΛΑΚΗ Κ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΥ

Επιβλέπων Καθηγητής: Dr. Α.Μ. Τσατσάκης

Ηράκλειο, 2000

Αφιερώνεται στους γονείς μου,
στη σύζυγο μου Μαρία και
στην κόρη μου Κατερίνα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Γ.Ν.Ρόδου κατά την περίοδο 1993 – 1999. Το θέμα της διατριβής ανατέθηκε από τον Επίκουρο Καθηγητή και Υπεύθυνο της Μονάδας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικών Επιστημών κ. Αριστείδη Τσατσάκη, τον οποίο ως επιβλέπων καθηγητή ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή παρακολούθηση, καθοδήγηση και ενθάρρυνση που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή της εργασίας.

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Μιχαλοδημητράκη Εμμανουήλ και κ. Σιατίτσα Ιωάννη για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και συμβουλές τους.

Επίσης, θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω το Γενικό Νοσοκομείο της Ρόδου, την Επιτροπή Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης, την Τοπική Αυτοδιοίκηση της Κρήτης και το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Ηρακλείου που μου παρείχαν την δυνατότητα πραγματοποίησης της εργασίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τους ιατρούς κ. Ιωάννη Δασκαλάκη, Αναστάσιο Στέφη, Ιωάννη Κλίαφα, Ελευθέριο Πάλλη, τη βιολόγο Ελένη Καλπαχίδου και το βιοχημικό Καλλιγά Γεώργιο για την βοήθεια στη συλλογή δειγμάτων και χρήσιμων πληροφοριών, καθώς και για το ενδιαφέρον τους στην πραγματοποίηση της εργασίας. Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Γ.Ν.Ρόδου για την υπομονή και την τεχνική βοήθεια στη συλλογή δειγμάτων. Ιδιαίτερος, ευχαριστώ θερμά το προσωπικό του Τοξικολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη χωρίς φειδώ βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης την Abbott Diagnostic Laboratories για την προσφορά μέρους των απαραίτητων αναλωσίμων υλικών και τη φιλόλογο κ. Βικτώρια Μαραθοκαμπίτου για τη συμβολή της στη διαμόρφωση του κειμένου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

- Όνοματεπώνυμο:** Ψυλλάκης Αθανάσιος του Κοκκιμίδη
- Ημερομηνία γέννησης:** 1 - 1 - 1964
- Επάγγελμα:** Χημικός
- Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος με ένα παιδί
- Σπουδές:** α) Το 1981 εισαγωγή στο Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και λήψη πτυχίου το 1985 με “Λίαν Καλώς”. Βαθμός πτυχίου 7 και 16 / 44.
β) Από το 1993 μέχρι σήμερα, εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- Στρατιωτική Υπηρεσία:** Από το 1985 έως το 1988 στρατιωτική θητεία ως έφεδρος αξιωματικός του πυροβολικού.
- Προϋπηρεσία:** Από 23-7-1988 έως και σήμερα ως χημικός στο Μικροβιολογικό - Βιοχημικό - Αιματολογικό Εργαστήριο του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Ρόδου.
- Ξένη γλώσσα:** Αγγλική.

II. Μέλος επιστημονικών

- Εταιρειών:**
1. Ένωση Ελλήνων Χημικών
 2. Περιφερειακό Τμήμα Νήσων Νοτίου Αιγαίου της Ε.Ε.Χ.
 3. Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας.
 4. Ελληνική Εταιρεία Τοξικολογίας.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1. Κατά τα ακαδημαϊκά έτη 1988 έως 1992 και 1996-97 (πέντε εκπαιδευτικά έτη) ως καθηγητής στα μαθήματα Βιοφυσικής και Βιοχημείας στη Μ.Τ.Ε.Ν.Σχολή του Ν.Γ.Ν.Ρόδου.
2. Κατά το ακαδημαϊκό έτος 1994-95 (ένα εκπαιδευτικό έτος) ως καθηγητής στο μάθημα της Μικροβιολογίας στην Μ.Τ.Ε.Ν.Σχολή του Ν.Γ.Ν.Ρόδου.
3. Διάλεξη στα πλαίσια της ενδονοσοκομειακής εκπαίδευσης ειδικευομένων ιατρών, με θέμα: " Οργάνωση Πειραματικού Χειρουργείου και Χώρου Εκτροφής Πειραματόζωων ". Σεπτέμβιος 1994.
4. Διάλεξη στα πλαίσια της ενδονοσοκομειακής εκπαίδευσης ειδικευομένων ιατρών, με θέμα: "Δείκτες καρκίνου. Εργαστηριακή Διερεύνηση και Κλινική Αξιολόγηση". Φεβρουάριος 1996.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ:

Συμμετοχή από το 1996 έως 1997 στο Ερευνητικό Πρόγραμμα "FRAX I.S" σε συνεργασία με την Καρδιολογική Κλινική του Ν.Γ.Ν.Ρόδου.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. Σεμινάριο με θέμα: " Αξιοπιστία Εργαστηριακών αποτελεσμάτων στην Κλινική Χημεία ". Αθήνα 25 και 26 Σεπτεμβρίου 1992.
2. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS. Ρόδος 29-31, Οκτωβρίου 1992.
3. Από 5/7/1993 έως 16/7/1993, εκπαίδευση στην εκτροφή και χειρισμό πειραματόζωων στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.
4. Σεμινάριο με θέμα: " Βασικές Αρχές Λειτουργίας του Ενδοκρινικού Συστήματος και Εργαστηριακή Διερεύνηση των Ορμονικών Διαταραχών ".Αθήνα, 5-6 Νοεμβρίου 1994
5. Σεμινάριο με θέμα: " Δείκτες καρκίνου: Εργαστηριακή διερεύνηση και κλινική αξιολόγηση ". Αθήνα 11 Φεβρουαρίου 1995.
6. Σεμινάριο με θέμα: " Φάρμακο: Φαρμακοκινητική, εργαστηριακή διερεύνηση και κλινική πράξη " Αθήνα, 27 Μαΐου 1995.

7. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS. Αθήνα, 3-5 Νοεμβρίου 1995.
8. 1ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο. Ρόδος, 1-3 Δεκεμβρίου 1995.
9. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας. Αθήνα, 5-8 Δεκεμβρίου 1995.
10. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας. Αθήνα-Βουλιαγμένη, 18-20 Οκτωβρίου 1996.
11. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS. Αθήνα, 14-16 Νοεμβρίου 1996.
12. 10^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Ρόδος, 28 – 31 Οκτωβρίου, 1999.
13. 3^ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο. Ρόδος, 10 – 12 Δεκεμβρίου, 1999.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

(σε ελληνικά και διεθνή περιοδικά)

1. Ψυλλάκης Θ., Ασηθιανάκης Π., Δασκαλάκης Ι., Τσατσάκης Α. Προσδιορισμός καρβαμαζεπίνης και βαλπροϊκού οξέος σε τρίχες κεφαλής. Δελτίο Νοσοκομειακής Φαρμακευτικής, 3 (95), 31-37, 1996.
2. Ψυλλάκης Θ., Ασηθιανάκης Π., Τσατσάκης Α. Μορφολογικοί, ανατομικοί, φυσικοχημικοί παράγοντες και μηχανισμοί απορρόφησης φαρμάκων από τις τρίχες. Δελτίο Νοσοκομειακής Φαρμακευτικής, 4 (96), 8 – 42, 1996
3. A.M. Tsatsakis, Th.K Psillakis, M. Tzatzarakis, H. Kourtopoulos, N. Paritsis. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: A preliminary study. Clin. Chem. Acta. 1997; 263: 187-195.
4. Th. Psillakis, A.M. Tsatsakis, P. Christodoulou, M. Michalodimitrakis, N. Paritsis and E. Helidonis. Carbamazepine Levels in Head Hair of Patients under Long-term Treatment: A Method to evaluate the History of Drug Use. J. Clin. Pharmacol. 1999; 39: 55-67.
5. A.M. Tsatsakis, Th. Psillakis, A. Stefis, P Assithianakis, I.G Vlahonikolakis, M.N. Michalodimitrakis, E. Helidonis. Determination of phenytoin in sections of head hair: a preliminary study to evaluate the history of drug use. Boll. Chim. Farmaceutico. 1998; 137: 459-466.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

(Προφορικές ή Posters)

1. Alegakis A.K., Koumantakis E., Michalodimitrakis E., Aguridakis P., Papavasiliou S., Dimopoulou M., Psilakis Th., Moulakakis A. and Tsatsakis A.M. Pesticide poisonings, The Cretan experience. In: abstracts book of 33rd International Congress on Forensic (TIAFT) & 1st on Environmental Toxicology, Thessaloniki, Greece, October 1995.
2. Ψυλλάκης Θ., Δασκαλάκης Ι., Τσατσάκης Α. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων καρβαμαζεπίνης και βαλπροϊκού οξέος σε τρίχες κεφαλής. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Αθήνα, 4-8 Δεκεμβρίου, 1995. Περιλήψεις, τόμος Β': 630-634
3. Psillakis Th., Alegakis Th., Tzatzarakis M., and Tsatsakis A.M. Determination of carbamazepine and valproic acid in human head hair. In: abstracts book of 34th Intern. Congress on Forensic Toxicology, Interaken, Switzerland, August 1996.
4. Θ. Ψυλλάκης, Ι. Δασκαλάκης, Ι. Κλιάφας, Ν. Αιβαλής, Σ. Πετρούτσου, Σ. Ζερβού, Α. Τσατσάκης. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων φαινυτοΐνης σε τρίχες κεφαλής ασθενών. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Αθήνα-Βουλιαγμένη, Οκτώβριος 18-20, 1996: 33.
5. Th. Psillakis, Ι. Daskalakis, G. Kliafas, Ν. Aivalis, S. Petrutsu, S. Zervu and Α. Tsatsakis. Determination of phenytoin in human head hair. In: 1st Panhellenic Congress of Clinical Chemistry, Athens-Vouliagmeni, Greece, October 18-20, 1996: 120
6. Psillakis Th. Tsatsakis AM, Daskalakis G, et al. Determination of phenytoin in human head hair. In: abstracts book of 35th International Congress of Forensic Toxicologists (TIAFT), Padova, Italy, August 24-28, 1997; 115.
7. Psillakis Th., Tsatsakis AM, Pallis EG, et al. Sectional analysis for determination of carbamazepine levels in head hair of patients under long-term treatment. In: BJCL, Ioannina, Greece: October 1997:4; 90.
8. Ψυλλάκης Α., Τσατσάκης Α., Στέφης Α., Πάλλης Ε., Καναβάκης Μ., Δασκαλάκης Ι., Μιχαλοδημητράκης Μ. Προσδιορισμός καρβαμαζεπίνης, φαινυτοΐνης και βαλπροϊκού οξέως σε τμήματα τριχών κεφαλής ασθενών με χρόνια χορήγηση. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας, Θεσσαλονίκη, 19-20 Σεπτεμβρίου, 1998, 194 – 198.

9. Αναστασάκης, Μ. Βολονάκη, Α. Ψυλλάκης, Χ. Κακάμπουρα, Ε. Γανωτάκη, Γ. Πετρωσιάτης, Ι. Δασκαλάκης, Π. Αλιβάνης. Συγκριτική μελέτη της συνεχούς φορητής περιτοναϊκής κάθαρσης με το σύστημα του μονού και του διπλού σάκου. 1^ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 1-3 Δεκεμβρίου, 1995. Τόμος περιλήψεων, σελ. 5.
10. Δασκαλάκης Ι., Ψυλλάκης Α., Καλλιγιάς Γ., Καλπαχίδου Ε., Στατήρη Ντ., Λαουδίκος Ν., Τσακίρη Α. Συμπεράσματα εργαστηριακού ελέγχου ομάδας πληθυσμού της νήσου Σύμης. 1ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 1-3 Δεκεμβρίου, 1995. Τόμος περιλήψεων, σελ. 16.
11. Δασκαλάκης Ι, Ψυλλάκης Α, Καλλιγιάς Γ, Στατήρη Ντ., Καλπαχίδου Ε. Η συμβολή των αυτόματων αναλυτών στην λειτουργία του Μικροβιολογικού-Βιοχημικού-Αιματολογικού εργαστηρίου του Γ.Ν.Ν.Ρόδου. 1ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 1-3 Δεκεμβρίου, 1995. Τόμος περιλήψεων, σελ. 51.
12. Μ. Χριστοφοράκη, Ν. Μόσχος, Π. Μπακίρης, Δ. Γεωργατζής, Α. Ζαχαράκη, Α. Ψυλλάκης, Ι. Δασκαλάκης. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της παροξυσμικής κολπικής μαρμαρυγής. 3ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 10 - 12 Δεκεμβρίου, 1999. Τόμος περιλήψεων, σελ. 3.
13. Ν. Μόσχος, Μ. Χριστοφοράκη, Ι. Δασκαλάκης, Α. Ψυλλάκης, Γ. Καλλιγιάς, Δ. Γεωργατζής, Ν. Παπανικήτας. Η χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη στη θεραπεία της ασταθούς στηθάγχης και των non-q οξέων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου. 3ο Πανδωδεκανησιακό Ιατρικό Συνέδριο, Ρόδος, 10 - 12 Δεκεμβρίου, 1999. Τόμος περιλήψεων, σελ. 98.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ιστορική αναδρομή στην ανάλυση τριχών.	1
2. Μορφολογικοί και ανατομικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες.	2
2.1 Ανατομία της τρίχας.	2
2.2. Φυσιολογία της τρίχας.	4
2.2.1. Κερατίνη.	4
2.2.2. Χρωματισμός.	5
2.3. Συγκριτική σχέση φυλετικών (εθνικών) τύπων τριχών κεφαλής.	7
2.3.1. Μορφολογία και δομή.	8
2.3.2. Βιοχημεία.	11
2.3.3. Χρωματισμός.	11
2.4. Περιοχές δέσμευσης των φαρμάκων στις τρίχες.	14
2.4.1. Κερατίνη.	14
2.4.2. Μελανίνη.	16
2.4.3. Λιπίδια.	17
2.5 Ο βιολογικός κύκλος της τρίχας.	18
3. Μοντέλα απορρόφησης των φαρμάκων στις τρίχες.	19
4. Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες.	22
4.1. Συγκέντρωση.	22
4.2. Χρόνος επώασης.	23
4.3. Συναγωνιστικά κατιόντα.	24
4.4. Το pH των διαλυμάτων και η ηλεκτρική κατάσταση των φαρμάκων.	25
4.5. Ιστορικό κατεργασίας των τριχών.	26
4.6. Φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων.	28
4.7. Χρωματισμός των τριχών.	29
4.8. Ανατομική περιοχή δειγματοληψίας των τριχών.	29
5. Μηχανισμός δέσμευσης φαρμάκων στις τρίχες.	30
6. Μέθοδοι προσδιορισμού των συγκεντρώσεων φαρμάκων στις τρίχες.	34
6.1. Προετοιμασία των δειγμάτων.	34
6.2. Εκχύλιση των φαρμάκων.	36
6.3. Ποσοτική μέτρηση των φαρμάκων.	36
7. Κλινικές εφαρμογές της ανάλυσης τριχών.	37

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.	39
2. Προσδιορισμός της καρβαμαζεπίνης στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν.	40
2.1. Εισαγωγή.	40
2.2. Υλικά και μέθοδοι.	41
2.2.1. Ασθενείς και δειγματοληψία τριχών.	41
2.2.2. Αντιδραστήρια και χρησιμοποιούμενα όργανα.	42

2.2.3.	Προετοιμασία των τριχών και ανάλυση FPIA.	42
2.2.4.	Ανάλυση με HPLC	43
2.2.5.	Στατιστικές μέθοδοι.	44
2.3.	Πειράματα ανάκτησης.	45
2.4.	Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης.	45
2.5.	Αποτελέσματα.	46
2.5.1.	Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης της CBZ.	46
2.5.2.	Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης της CBZ	46
2.5.3.	Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών ασθενών.	46
3.	Προσδιορισμός της φαινυτοΐνης στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν.	50
3.1.	Εισαγωγή.	50
3.2.	Υλικά και μέθοδοι.	51
3.2.1.	Ασθενείς και δειγματοληψία τριχών.	51
3.2.2.	Αντιδραστήρια και χρησιμοποιούμενα όργανα.	52
3.2.3.	Προετοιμασία των τριχών και ανάλυση FPIA.	52
3.2.4.	Ανάλυση με HPLC	53
3.2.5.	Στατιστικές μέθοδοι.	54
3.3.	Πειράματα ανάκτησης.	55
3.4.	Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης.	55
3.5.	Αποτελέσματα.	56
3.5.1.	Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης της PHT.	56
3.5.2.	Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης της PHT.	56
3.5.3.	Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών ασθενών.	56
4.	Προσδιορισμός του βαλπροϊκού οξέος στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτό.	60
4.1.	Εισαγωγή.	60
4.2.	Υλικά και μέθοδοι.	61
4.2.1.	Ασθενείς και δειγματοληψία τριχών.	61
4.2.2.	Αντιδραστήρια και χρησιμοποιούμενα όργανα.	62
4.2.3.	Προετοιμασία των τριχών και ανάλυση FPIA.	62
4.2.4.	Στατιστικές μέθοδοι.	63
4.3.	Πειράματα ανάκτησης.	64
4.4.	Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης.	64
4.5.	Αποτελέσματα.	65
4.5.1.	Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης του VPA.	65
4.5.2.	Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης του VPA.	65
4.5.3.	Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών ασθενών.	65

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1.	Καρβαμαζεπίνη.	69
2.	Φαινυτοΐνη.	71
3.	Βαλπροϊκό οξύ.	73
4.	Γενικά συμπεράσματα.	75

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ

A. Καρβαμαζεπίνης.	79
1. Πίνακες δημογραφικών, πειραματικών και στατιστικών δεδομένων.	79
2. Γραφικές παραστάσεις.	92
B. Φαινυτοΐνης.	98
1. Πίνακες δημογραφικών, πειραματικών και στατιστικών δεδομένων.	98
2. Γραφικές παραστάσεις.	111
Γ. Βαλπροϊκού οξέος.	117
1. Πίνακες δημογραφικών, πειραματικών και στατιστικών δεδομένων.	117
2. Γραφικές παραστάσεις.	127
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Καρβαμαζεπίνη (CBZ), φαινυτοΐνη (PHT) και βαλπροϊκό οξύ (VPA) ανιχνεύθηκαν, σε μετρήσιμες συγκεντρώσεις, σε τεμάχια τριχών κεφαλής, που προέρχονταν από 140 άτομα συνολικά (71 άνδρες και 69 γυναίκες) ηλικίας 2 ως 87 ετών και στα οποία χορηγούνταν συστηματικά τα μελετούμενα φάρμακα. Οι μέθοδοι κατεργασίας των τριχών, μετά τη δειγματοληψία από το τριχωτό της κεφαλής και τον τεμαχισμό τους μέχρι και πέντε τεμάχια μήκους 1 ή 2 cm, περιελάμβαναν διαλυτοποιήσεις και τεχνικές εκχυλίσεων υγρής φάσης. Στην ποσοτική μέτρηση των φαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν η υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η ανοσοφθορισμοπολωσιμετρία (FPIA).

Οι μέσες τιμές των φαρμάκων στις τρίχες, από το 1ο (το πλησιέστερο στη ρίζα των τριχών) ως το 5ο τεμάχιο με την τεχνική HPLC για τις γυναίκες και τους άνδρες αντιστοίχως, βρέθηκαν: α) για την CBZ ως 26.82, 19.18, 17.28, 15.09, 14.62 μg/g και 21.97, 17.30, 15.03, 13.02, 11.21 μg/g, και β) για την PHT ως 18.95, 15.24, 13.08, 11.57, 10.69 μg/g και 17.87, 15.01, 12.45, 12.07, 12.29 μg/g. Οι αντίστοιχες τιμές των φαρμάκων για γυναίκες και άνδρες με την τεχνική FPIA, βρέθηκαν: α) για την CBZ ως 30.53, 21.90, 19.83, 17.45, 16.99 μg/g και 25.98, 20.52, 17.15, 14.87, 12.31 μg/g., β) για την PHT ως 17.88, 15.21, 13.08, 11.89, 10.93 μg/g και 17.78, 14.90, 12.22, 11.91, 12.08 μg/g και γ) για το VPA ως 7.08, 8.35, 9.41, 9.65, 9.76 μg/g και 5.69, 6.68, 7.26, 7.84, 8.81 μg/g

Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των CBZ και PHT στις τρίχες είναι υψηλότερα των αντιστοίχων του VPA και ότι υπάρχει προοδευτική μείωση των επιπέδων από το 1ο (το πλησιέστερο στη ρίζα των τριχών) προς το 5ο τεμάχιο τριχών για τα CBZ και PHT σε αντίθεση με το VPA, του οποίου αυξάνονται ή μειώνονται ελαφρώς. Παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων των φαρμάκων στις τρίχες με τις χορηγούμενες δόσεις και την ηλικία. Δεν επιβεβαιώθηκε εξάρτηση των επιπέδων των φαρμάκων από το φύλο των ασθενών και τη διάρκεια χορήγησής τους. Η σχέση των επιπέδων με το χρώμα των τριχών δεν αποσαφηνίστηκε για την CBZ, ενώ τα επίπεδα των PHT και VPA στις τρίχες μαύρου ή καστανού χρώματος είναι αυξημένα σε σχέση με εκείνων στις ξανθού ή γκρίζου χρώματος τρίχες. Ομοίως, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση των επιπέδων των φαρμάκων στις τρίχες και το αίμα.

Γενικά, επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα χρήσης της τμηματικής ανάλυσης ως δείκτη του φαρμακευτικού ιστορικού και της συμμόρφωσης των ασθενών που βρίσκονται σε χρόνια και συστηματική θεραπεία με τα μελετούμενα φάρμακα.

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ), Phenytoin (PHT) and Valproic Acid (VPA) levels were determined in sections of head hair of a hundred forty subjects (seventy one males and sixty nine females), aged from two to eighty seven years old, who were regularly receiving the drugs. Hair sectional analysis included dissolution, liquid phase extraction procedures and high-pressure liquid chromatography (HPLC) or immunoassay (Abbott TDx) analytical techniques.

The CBZ mean values in the hair sections, from the 1st section (closest to the hair root) to the 5th section, by HPLC technique, were 26.82, 19.18, 17.28, 15.09, 14.62 $\mu\text{g/g}$ and 21.97, 17.30, 15.03, 13.02, 11.21 $\mu\text{g/g}$, for female and male subjects, respectively. The corresponding PHT mean values, for female and male subjects, were 18.95, 15.24, 13.08, 11.57, 10.69 $\mu\text{g/g}$ and 17.87, 15.01, 12.45, 12.07, 12.29 $\mu\text{g/g}$.

According to immunoassay technique, the CBZ mean values in the hair sections, from the 1st section (closest to the hair root) to the 5th section, were 30.53, 21.90, 19.83, 17.45, 16.99 $\mu\text{g/g}$ and 25.98, 20.52, 17.15, 14.87, 12.31 $\mu\text{g/g}$, for female and male subjects, respectively. The corresponding PHT or VPA mean values, for female and male subjects, were 17.88, 15.21, 13.08, 11.89, 10.93 $\mu\text{g/g}$ and 17.78, 14.90, 12.22, 11.91, 12.08 $\mu\text{g/g}$ or 7.08, 8.35, 9.41, 9.65, 9.76 $\mu\text{g/g}$ and 5.69, 6.68, 7.26, 7.84, 8.81 $\mu\text{g/g}$.

The CBZ and PHT hair mean values were showed highest from the similar VPA values, by comparable dosage. Reductions of CBZ and PHT concentrations in hair from the first to the subsequent segments were observed. The corresponding VPA values were increased or decreased slightly. Higher amounts of PHT or VPA were deposited in brown and black, than in blond and gray color type of hairs. There was not clear correlation by the color type of hairs for the CBZ hair values. Also, the drug concentrations in the hair sections were found to be dependent of the drug dosages and the subject ages. Was not found out any relation among the drugs hair levels and the gender or the duration of treatment by the studied drugs. Such, there was not relation for drug means values between the hairs and the blood.

Generally, our data indicate the possible use of hair sectional analysis as a marker of the dosage history and of the compliance of patients under long-term treatment with the studied drugs.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ιστορική αναδρομή στην ανάλυση τριχών

Στις δεκαετίες του '60 και '70 η αναλυτική τοξικολογία εμφάνισε την πρώτη αλματώδη ανάπτυξη. Εκείνη την εποχή αναπτύχθηκαν νέες πρωτοποριακές και σχετικά γρήγορες τεχνικές με εφαρμογές σε βιολογικά δείγματα. Αρκετά αυτοματοποιημένα συστήματα αναπτύχθηκαν αξιοποιώντας χρωματογραφικές και ανοσοχημικές μεθόδους, παρέχοντας τη δυνατότητα ανάλυσης οργανικών ουσιών, που παλαιότερα θεωρούνταν αδύνατον ή πολύ δύσκολο να ανιχνευθούν, πόσο μάλλον να προσδιοριστούν ποσοτικά. Παράλληλα έγινε δυνατή η χρήση μικροποσοτήτων βιολογικών δειγμάτων, ενώ αυξήθηκε η δυνατότητα μελέτης και χρήσης βιολογικών ιστών, που παραδοσιακά θεωρούνταν από τους τοξικολόγους ως μη ικανοί να δώσουν χρήσιμες και ενδιαφέρουσες πληροφορίες.

Μόλις πριν από λίγα χρόνια ξεκίνησαν να γίνονται ευρέως μορφολογικές και χημικές εξετάσεις των τριχών του ανθρώπου για ιατρικούς σκοπούς. Οι τρίχες αποτελούσαν μέχρι τη δεκαετία του '70 ένα παραμελημένο και χωρίς μεγάλο ενδιαφέρον υλικό. Παλαιότερα, είχε δημοσιευθεί μια μελέτη¹ σχετικά με την απορρόφηση βαρβιτουρικών στο δέρμα και στις τρίχες, το ενδιαφέρον όμως στη συνέχεια ήταν μειωμένο. Μέσα στη δεκαετία του '70 ερευνήθηκε με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης η απορρόφηση τοξικών μετάλλων και ιχνοστοιχείων στις τρίχες. Οι τρίχες τότε θεωρήθηκαν ότι είναι ένα περισσότερο αξιόπιστο δείγμα απ' ότι είναι το αίμα και τα ούρα, όσον αφορά τον προσδιορισμό περιβαλλοντικών ρύπων², γιατί μπορούν να απορροφήσουν και να κατακρατήσουν πολλά μεταλλικά ιχνοστοιχεία για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το αρσενικό, ο υδράργυρος και το κάδμιο ήταν από τα πρώτα στοιχεία που ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά στις τρίχες της κεφαλής. Αργότερα, η έρευνα επικεντρώθηκε στη μελέτη της ύπαρξης ή όχι σχέσης ανάμεσα στις συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων στις τρίχες και την ανθρώπινη ευφυΐα ή την ικανότητα μάθησης. Η έρευνα επεκτάθηκε σε διανοητικές ασθένειες και διανοητικές διαταραχές^{3,4}.

Με τη χρήση μεθόδων υψηλής ευαισθησίας, όπως οι ραδιοανοσοχημικές (RIA) ή η αέρια χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (GC/MS), έγινε δυνατή η ανάλυση οργανικών ουσιών που απορροφώνται στις τρίχες. Αξιοποιώντας την ήδη υπάρχουσα

εμπειρία από τη χρήση των παραπάνω τεχνικών στον προσδιορισμό διαφόρων φαρμάκων σε δείγματα αίματος και ούρων, εμφανίστηκαν πολλές μελέτες, όπως για τον προσδιορισμό της μορφίνης⁵ στις τρίχες. Ακολούθησαν μέχρι σήμερα πολλές ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις και επιστημονικές συζητήσεις σε διεθνή τοξικολογικά συνέδρια με θέμα την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ή μη τοξικών ουσιών στις τρίχες, τόσο για ιατροδικαστική όσο και για κλινική χρήση, στις περιπτώσεις ασθενών με χρόνια και συστηματική χορήγηση φαρμάκων.

2. Μορφολογικοί και ανατομικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες

2.1 Ανατομία της τρίχας

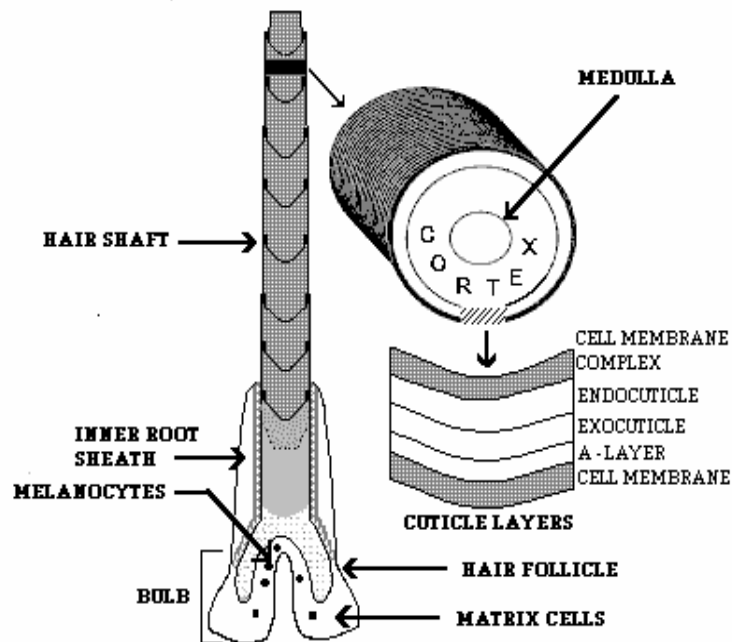
Η τρίχα είναι ένας σύνθετος ιστός, του οποίου η δομή και η βιολογία έχουν μερικώς μόνον κατανοηθεί και διευκρινισθεί. Έχει αποδειχθεί όμως ότι υπάρχουν μερικές βασικές δομικές ιδιότητες ανάμεσα σε όλους τους τύπους τριχών, που είναι ανεξάρτητες από το χρώμα ή την εθνική τους προέλευση.

Η τρίχα διακρίνεται στο *στελέχος* (shaft), το οποίο είναι το ορατό μέρος και το *ωοθυλάκιο* ή *ρίζα* (follicle ή root). Το ωοθυλάκιο της τρίχας καταδύεται στο δέρμα με κάποια κλίση καταλήγοντας στο *βολβό* (bulb), ο οποίος περιέχει *μητρικά* (matrix) κύτταρα, από τα οποία δημιουργούνται όλα τα στρώματα του στελέχους της τρίχας, όπως η επιδερμίδα (cuticle), ο φλοιός (cortex) και ο *μυελός* (medulla)^{6,7}. Η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό στρώμα της τρίχας, ενώ ο φλοιός το στρώμα ανάμεσα στην επιδερμίδα και το εσωτερικό στρώμα της τρίχας, το μυελό (βλέπε Σχήμα 1).

Στην επιδερμίδα της τρίχας διακρίνονται πέντε πολύ λεπτά στρώματα, τα οποία έχουν σκοπό να προστατεύουν το φλοιό από την καταστροφή. Τα επιδερμικά κύτταρα και η *εσωτερική ριζική θήκη* (inner root sheath) της τρίχας συγκλίνουν, δίνοντας στην επιδερμίδα την εμφάνιση των λεπτών επιστρώσεων. Η εσωτερική ριζική θήκη εκφυλίζεται καθώς η τρίχα αναδύεται από το ωοθυλάκιο. Η *κυτταρική μεμβράνη* (cell membrane) αποτελεί το εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας, ενώ ένα *σύμπλεγμα κυτταρικής μεμβράνης* (cell membrane complex) εμφανίζεται ανάμεσα σε υπερκαλυπτόμενα επιδερμικά κύτταρα, δημιουργώντας ένα δικτυωτό σύστημα καθ' όλη την έκταση του στελέχους της τρίχας, με το οποίο ξεχωρίζει η επιδερμίδα από τον

φλοιό. Η *άλφα (A) στοιβάδα* (A – layer) είναι τοποθετημένη ακριβώς κάτω από την *εξωεπιδερμική (exocuticle) στοιβάδα*, ενώ η *εξωεπιδερμική* βρίσκεται ανάμεσα στην A-στοιβάδα και την *ενδοεπιδερμική (endocuticle)) στοιβάδα*.

Ο φλοιός αποτελεί το κύριο μέρος του στελέχους της τρίχας και βρίσκεται ακριβώς κάτω από την επιδερμίδα. Ο μυελός αποτελεί την κεντρική περιοχή της τρίχας και αποτελείται από διασκορπισμένα κύτταρα και κενές περιοχές^{8,9}. Καταλαμβάνει πολύ μικρή περιοχή σε σχέση με το φλοιό, ενώ μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής ή και να απουσιάζει τελείως σε ορισμένα είδη τριχών ενηλίκων.



ΣΧΗΜΑ 1.

Ανατομία του ωοθυλακίου και του στελέχους της τρίχας

2.2. Φυσιολογία της τρίχας

Τα μητρικά κύτταρα στη βάση του ωοθυλακίου της τρίχας υφίστανται μορφολογικές και δομικές μεταβολές. Καθώς αναδύονται δημιουργούν τα διαφορετικά στρώματα του στελέχους της τρίχας. Μέσα σε αυτά τα κύτταρα συντίθενται πρωτεΐνες (η κερατίνη), οι οποίες τελικώς προσδιορίζουν την αντοχή και τη σκληρότητα του στελέχους της τρίχας.

Τα μητρικά κύτταρα μπορούν ακόμη να χρωματίζονται, καθώς διαφοροποιούνται στο σχηματισμό των διαφόρων στρωμάτων της τρίχας και η παρουσία του χρώματος αυτού να προσδιορίζει το χρώμα των τριχών. Τα επιμέρους στρώματα της τρίχας διακρίνονται από τις διαφορές τους στη μορφή και την ποσότητα των πρωτεϊνών, καθώς και στο χρώμα που περιέχουν. Οι διαφορές αυτές είναι πολύ σημαντικές καθ' όσον αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προσδιορίσουν, ποια δομικά συστατικά και στρώματα τις τρίχας είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση των φαρμάκων.

2.2.1. Κερατίνη

Η τρίχα αποτελείται από πρωτεΐνες σε περιεκτικότητα από 65 έως 95%, από λιπίδια (1 έως 9%) και από μικρές ποσότητες ιχνοστοιχείων, πολυσακχαριτών και νερού^{8,10,11}. Η κυριότερη πρωτεΐνη της τρίχας ονομάζεται κερατίνη και αναφέρεται σε ένα σύνολο πρωτεϊνών με χαμηλή ή υψηλή περιεκτικότητα σε θείο¹². Αυτές οι πρωτεΐνες συντίθενται στην κερατογενή ζώνη του ωοθυλακίου, καθώς τα μητρικά κύτταρα μετακινούνται προς το στέλεχος σχηματίζοντας τα νέα στρώματα της τρίχας. Η επιδερμίδα, ο φλοιός και ο μυελός αποτελούνται κυρίως από κερατίνη, η οποία όμως διαφέρει δομικά στο κάθε στρώμα^{13,14}.

Η κερατίνη της εξωεπιδερμίδας περιέχει κυρίως κυστεΐνη, που σχηματίζει διθειοφυλικούς δεσμούς, με τους οποίους συνδέεται η Α-στοιβάδα με την εξωεπιδερμίδα και δημιουργούν την επιδερμίδα, στρώμα σκληρό και με ελαστική δομή, για την προστασία του φλοιού της τρίχας από πιθανή καταστροφή^{10,11}. Η ενδοεπιδερμίδα περιέχει πολύ λιγότερη κυστεΐνη από την Α-στοιβάδα και δεν είναι τόσο σκληρή και ανθεκτική^{10,11}. Στην ενδοεπιδερμίδα εμφανίζονται επίσης βασικά και όξινα αμινοξέα, όπως η αργινίνη και το γλουταμινικό οξύ αντιστοίχως.

Η κερατίνη του φλοιού αποτελεί περίπου το 85% της μάζας του στελέχους της τρίχας. Αποτελείται από δύο τύπους δομικών πρωτεϊνών, τις μητρικές πρωτεΐνες και

τις ινώδεις πρωτεΐνες^{14,15,16,17}. Οι μητρικές πρωτεΐνες έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε θείο, περιέχουν πολυπεπτίδια με μοριακό βάρος 10 έως 28 KDa, έχουν μη ελικοειδή δομή και είναι πλήρως διαλυτές σε διάλυμα KCl 0.5 M με pH 4,5¹⁴. Οι ινώδεις πρωτεΐνες είναι ενσωματωμένες μέσα στις μητρικές πρωτεΐνες και χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο. Επίσης, εμφανίζουν μοριακό βάρος από 40 έως 58 KDa, έχουν ελικοειδή δομή και είναι αδιάλυτες στο προαναφερόμενο διάλυμα¹⁴.

Η δομή, η οργάνωση και η σχέση μητρικών και ινωδών πρωτεϊνών διαμορφώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κερατινοειδών ιστών^{18,19}. Για παράδειγμα μια πρωταρχική διαφορά ανάμεσα στην τρίχα και το νύχι είναι η διευθέτηση των ινωδών πρωτεϊνών και η συγκέντρωση μητρικών πρωτεϊνών. Στα κύτταρα που προορίζονται για το σχηματισμό του φλοιού της τρίχας, οι ινώδεις πρωτεΐνες συσσωματώνονται εμφανίζοντας λεπτότατους ινώδεις σχηματισμούς, οι οποίοι αθροιζόμενοι σχηματίζουν λεπτές πρωτεϊνικές ίνες. Στην κερατογενή ζώνη οι πρωτεϊνικές ίνες υφίστανται αργή συγχώνευση και τελικά δημιουργούν το φλοιό¹³.

Ο μυελός επίσης περιέχει κερατίνη, η οποία χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση ακανόνιστων ινωδών πρωτεϊνών. Οι ινώδεις αυτές πρωτεΐνες, που σχηματίζουν ένα δικτυωτό σχηματισμό, αποτελούν το 95% του μυελού και είναι λιγότερο ανθεκτικές στη χημική αποικοδόμηση από τις πρωτεΐνες του φλοιού.

Η κυτταρική μεμβράνη, η οποία κατευθύνεται κατά μήκος του στελέχους της τρίχας, αποτελείται από λιπίδια, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες^{10,11,20}. Η κυστεΐνη που περιέχεται στην κυτταρική μεμβράνη είναι πολύ λιγότερη σε σχέση με τα άλλα συστατικά από ότι στην επιδερμίδα, ενώ βασικά αμινοξέα όπως η λυσίνη και γλυκίνη, εμφανίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις απ' ό τι στην Α-στοιβάδα.

2.2.2. Χρωματισμός

Οι μελανίνες είναι οι περισσότερο διαδεδομένες χρωστικές στη φύση. Απαντώνται στον εξωτερικό χρωματισμό των χορδοτών, στο χρωματισμό της επιδερμίδας των εντόμων και στο χρώμα των τριχών. Τα μητρικά κύτταρα της τρίχας δεν παράγουν μελανίνη²¹. Η μελανίνη σχηματίζεται στα μελανοσώματα, διακριτά οργανίδια μέσα στα μελανοκύτταρα.²² Τα μελανοκύτταρα παράγονται από νευρικούς φλοιούς και βρίσκονται στην υψηλότερη περιοχή του βολβού της τρίχας. Τα

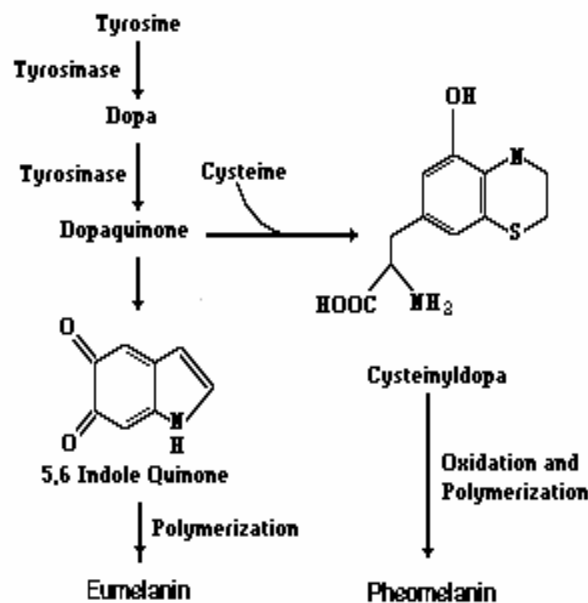
μελανοκύτταρα είναι τα μόνα ικανά κύτταρα να παράγουν μελανίνη στα θηλαστικά και να μεταφέρουν μελανοσώματα, τα οποία διαφοροποιούν τα κύτταρα του φλοιού και του μυελού κατά τη διάρκεια ωρίμανσης της τρίχας. Τα παραπάνω περιέχουν μελανοσώματα και μελανίνη σε αντίθεση με εκείνα της επιδερμίδας που περιέχουν ελάχιστη ή καθόλου μελανίνη.

Με την παρουσία ενζύμων στα μελανοσώματα σχηματίζονται δύο τύποι μελανίνης, η ευμελανίνη και η φαιομελανίνη^{21,22,23}. Η σύνθεση της ευμελανίνης απαιτεί την παρουσία τυροσινάσης, ενός ενζύμου που βρίσκεται μέσα στα μελανοσώματα (βλέπε Σχήμα 2). Η τυροσινάση καταλύει τη μετατροπή της τυροσίνης σε ντόπα, η οποία στην συνέχεια οξειδώνεται σε ντοπακινόνη. Διαμέσου μιας αλυσίδας ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων, η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε 5,6-ινδολο-κινόνη και στη συνέχεια με πολυμερισμό σχηματίζεται η ευμελανίνη. Αυτό το πολυμερές απαντάται πάντα συνδεδεμένο με πρωτεΐνες στους ιστούς θηλαστικών, χωρίς όμως να έχουν διευκρινιστεί ακόμη οι θέσεις σύνδεσης ανάμεσα στις πρωτεΐνες και το πολυμερές²². Η φαιομελανίνη σχηματίζεται επίσης μέσα στα μελανοσώματα. Τα στάδια σύνθεσής της είναι τα ίδια με τα στάδια της σύνθεσης ευμελανίνης, καθώς απαιτείται τυροσίνη και τυροσινάση για την παραγωγή ντοπακινόνης (βλέπε Σχήμα 2). Η ντοπακινόνη συνδέεται στη συνέχεια με κυστεΐνη για την παραγωγή κυστεΐνοντόπα, η οποία οξειδώνεται και πολυμερίζεται σε φαιομελανίνη. Η τελική μοριακή δομή της φαιομελανίνης δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί.

Οι δύο τύποι μελανίνης έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στις οποίες οφείλονται και οι διαφορετικές ιδιότητες των τριχών^{23,24}. Οι κόκκοι φαιομελανίνης είναι μικρότεροι και λιγότερο ανθεκτικοί στη χημική αποικοδόμηση απ' ό,τι οι κόκκοι ευμελανίνης. Η φαιομελανίνη είναι διαλυτή σε διαλύματα αλκαλίων σε αντίθεση με την ευμελανίνη, που είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες. Επίσης, η φαιομελανίνη περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε θείο (9 έως 12%) σε αντίθεση με την ευμελανίνη, που περιέχει μόνον 0 έως 1% θείο²⁴.

Το χρώμα της τρίχας προσδιορίζεται από την ποσότητα φαιομελανίνης και ευμελανίνης σε αυτήν^{21,23}. Οι μαύρες και οι καστανές τρίχες περιέχουν περισσότερη ευμελανίνη απ' ό,τι οι κόκκινες και οι ξανθές. Η κύρια διαφορά ανάμεσα στις μαύρες

και στις καστανές τρίχες είναι το ότι οι μαύρες περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ευμελανίνης^{24,25}. Τα μελανοσώματα στις μαύρες τρίχες είναι συνήθως μεγαλύτερα σε μέγεθος και αριθμό απ'ότι στις καστανού χρώματος τρίχες^{26,27}. Στις κόκκινου χρώματος τρίχες η συγκέντρωση της φαιομελανίνης είναι μεγαλύτερη της ευμελανίνης²⁸. Στις ξανθού χρώματος τρίχες περιέχεται ευμελανίνη και πιθανώς φαιομελανίνη, η συγκέντρωση όμως της ευμελανίνης είναι πολύ μικρότερη απ'ότι στις καστανού χρώματος τρίχες^{21,23,25}. Οι γκρίζου χρώματος τρίχες θεωρείται ότι είναι μια μεταβατική και ενδιάμεσου χρώματος κατάσταση στην πορεία ωρίμανσης των τριχών²¹. Οι βολβοί σ' αυτού του χρώματος τρίχες περιέχουν μελανοκύτταρα, αλλά η μελανογενετική δραστηριότητα είναι μικρή, όπως μικρός είναι και ο αριθμός των μελανοσωμάτων. Οι βολβοί των τριχών που δημιουργούν λευκού χρώματος τρίχες περιέχουν ελάχιστα μελανοκύτταρα και η δραστηριότητα της τυροσινάσης είναι μηδαμινή, με αποτέλεσμα την αναστολή σύνθεσης μελανίνης²¹.



ΣΧΗΜΑ 2.

Βιοσύνθεση της ευμελανίνης και φαιομελανίνης

2.3. Συγκριτική σχέση φυλετικών (εθνικών) τύπων τριχών κεφαλής

Φυσικές και χημικές διαφορές παρουσιάζονται ανάμεσα στους διάφορους φυλετικούς τύπους τριχών κεφαλής, όπως επίσης υπάρχουν και ενδοφυλετικές διακυμάνσεις. Οι διαφορές αναφέρονται τόσο στη μορφολογία και τη δομή των τριχών, όσο και στη βιοχημική σύνθεση και στο χρωματισμό τους. Απαιτείται εξαιρετική προσοχή σε τέτοιου είδους διαφορές όσον αφορά τη δέσμευση των φαρμάκων στις τρίχες.

2.3.1. Μορφολογία και δομή

Οι προσπάθειες πολλών ερευνητών ανθρωπολόγων στη μελέτη φυλετικών χαρακτηριστικών στις τρίχες του τριχωτού της κεφαλής ξεκινά από τις αρχές σχεδόν του 19ου αιώνα και συνεχίζονται μέχρι σήμερα.

Έχουν πραγματοποιηθεί ποσοτικές μελέτες στη μορφολογία τριχών ανάμεσα σε Αφρικανικής, Καυκάσιας και Μογγολικής καταγωγής πληθυσμούς²⁹, όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα I. Παράμετροι όπως η διάμετρος, το μήκος των κλιμακώσεων της επιδερμίδας, η καμπυλότητα, η συστροφή και η εξέλιξη της εμμέλωσης έχουν προσδιοριστεί ανάμεσα στους παραπάνω διαφορετικής φυλετικής προέλευσης τύπους τριχών. Η διάμετρος και η εξέλιξη της εμμέλωσης της τρίχας είναι στατιστικά μεγαλύτερη στους τύπους τριχών Μογγολικής προέλευσης, απ' ότι στους τύπους τριχών Αφρικανικής και Καυκάσιας προέλευσης ²⁹. Η συστροφή, το μήκος των κλιμακώσεων της επιδερμίδας και η καμπυλότητα είναι πολύ μεγαλύτερη στους τύπους τριχών που ανήκουν σε Αφρικανικής καταγωγής πληθυσμούς σε σχέση με τους υπόλοιπους μελετώμενους τύπους^{29,30}.

Η μορφολογία των τριχών αναφέρεται στο κατά τμήμα σχήμα καθώς και στην ολική εμφάνισή τους^{30,31}. Έτσι οι Αφρικανικής προέλευσης τρίχες είναι περισσότερο κατσαρές, οι Μογγολικής προέλευσης είναι ίσιες και οι Καυκάσιας προέλευσης είναι συνδυασμός κατσαρών και ίσιων τριχών. Τα ωοθυλάκια των τριχών Αφρικανικής προέλευσης εμφανίζονται με ελικοειδή και καμπυλωτή μορφή και από αυτά αναδύονται οι κατσαρές μορφής τρίχες. Τα Μογγολικής προέλευσης ωοθυλάκια τριχών καταδύονται ίσια μέσα στο δέρμα της κεφαλής και οι τρίχες που παράγουν είναι ίσιας μορφής. Τα Καυκάσιας προέλευσης εμφανίζουν μια ενδιάμεση κατάσταση ανάμεσα στα Αφρικανικής και Μογγολικής προέλευσης ωοθυλάκια τριχών.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Σύγκριση φυλετικών (εθνικών) τύπων τριχών κεφαλής *

Τρίχες	Εθνικότητα ^α		
	Καυκάσια	Αφρικανική	Μογγολική
<u>Δομή β</u>			
Κλιμακώσεις επιδερμίδας (mm)	15.07 ± 1.80	17.95 ± 2.04	15.47 ± 1.46
Διάμετρος (μm)	79.17 ± 11.27	76.10 ± 15.83	95.53 ± 10.35
Μυέλωση	0.33 ± 0.55	0.70 ± 0.657	1.23 ± 0.63
<u>Μορφή γ</u>			
Συστροφή	0	0.10 ± 0.31	0
Καμπυλότητα	0.19 ± 0.13	7.75 ± 1.78	0.07 ± 0.4
Κατσάρωμα	0.03 ± 0.06	0.95 ± 0.57	0
Εγκάρσια τομή	Ωοειδής ή στρογγυλή	Επίπεδη	Στρογγυλή
<u>Χρωματισμός</u>			
Χρώμα	Διάφορες αποχρώσεις ξανθού, καστανού, κόκκινου	Μαύρο	Καστανό, μαύρο
Μελανίνη δ	Ανάλογα με το χρώμα των τριχών : -ξανθό, ευμελανίνη(+) -καστανό, ευμελανίνη (++) -κόκκινο, φαιομελανίνη (++) και ευμελανίνη(+)	Ευμελανίνη (+++)	Ευμελανίνη (+++)
Μορφολογία μελανοσωμάτων	Ανάλογα με το χρώμα των τριχών : □- ξανθό, ελλειπτική □- καστανό, ελλειπτική □- κόκκινο, σφαιρική και □ελλειπτική	Ελλειπτική	Ελλειπτική
Κατανομή μελανοσωμάτων	Σύμπλοκα	Μονήρη	Μονήρη και □ σύμπλοκα
<u>Πρωτεΐνες □ (mg / 0.1 g τριχών)</u>			
Ινώδεις	9.2 ± 0.7	8.6 ± 0.8	14.3 ± 0.8
Μητρικές	31.9 ± 1.3	46.0 ± 2.7	32.9 ± 2.7
Ινώδεις/Μητρικές	0.29 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.45 ± 0.03
Μορφή ωοθυλακίων	Ελικοειδής, κυρτή ή ίσια	Ελικοειδής, κυρτή	Ίσια

- α Οι εθνικές ομάδες καθορίζονται ως : Μογγολικής καταγωγής κυρίως οι Ιαπωνικής καταγωγής, Καυκάσιας οι Ευρωπαϊκής καταγωγής και Αφρικανικής οι Αφρικανικής καταγωγής πληθυσμοί.
- β Δομή: Οι κλιμακώσεις της επιδερμίδας μετρούνται για μήκος πάνω από 0.52 mm. Η μυέλωση προσδιορίζεται ως εξής: 0 = μη μυέλωση, 1 = ασυνεχής μυέλωση, 2 = συνεχής μυέλωση.
- γ Μορφή: Η συστροφή αναφέρεται στη σύσφιξη του στελέχους της τρίχας και προσδιορίζεται ως εξής: 0 = μη συστροφή 1 = συστροφή. Η καμπυλότητα προσδιορίζεται με την τοποθέτηση των δειγμάτων τριχών ανάμεσα σε δύο γυάλινες επιφάνειες και απαριθμώντας κύκλους με γνωστές ακτίνες στον σχηματισμό των τριχών. Το κατσάρωμα αναφέρεται σε έναν αριθμό αλλαγών στη διεύθυνση του στελέχους της τρίχας ανά μονάδα μήκους.
- δ Η συγκέντρωση μελανίνης αναφέρεται ως εξής: (+++) = υψηλή, (++) = μέτρια, (+) = χαμηλή συγκέντρωση
- Ο Πίνακας αναπαράγεται από: Cone E.J. and Joseph R.E. The potential for bias in hair testing for drugs of abuse. In: Drug Testing in Hair, Kintz P., CRC Press, 1996, 75.

ΠΙΝΑΚΑΣ II

Αμινοξέα που περιέχονται σε διάφορους τύπους τριχών *

Αμινοξέα**	Εθνικότητα		
	Αφρικανική N = 3	Μογγολική N = 3	Καυκάσια N = 3
Κυστεϊκό οξύ	3.3	3.0	2.3
Ασπαρτικό οξύ	58.5	58.0	53.6
Θρεονίνη	68.5	67.2	67.6
Σερίνη	114.5	113.8	124.7
Προλίνη	74.6	72.0	76.2
Γλουταμινικό οξύ	120.4	117.2	115.3
Γλυκίνη	56.2	56.5	59.1
Αλανίνη	44.3	45.9	45.3
Κυστεΐνη	150.0	143.0	139.0
Βαλίνη	41.1	50.2	44.2
Μεθειονίνη	1.7	2.6	4.6
Ισολευκίνη	23.3	24.4	20.8
Λεύκινη	54.9	58.2	55.8
Τυροσίνη	19.1	18.9	19.1
Φαινυλαλανίνη	13.9	14.4	14.8
Λυσίνη	16.9	18.7	23.7
Ιστιδίνη	7.2	7.3	8.3
Αργινίνη	52.1	57.2	55.9

* Ο πίνακας αναπαράχθηκε από: Gold R.J.M. and Scriver C.R. Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 465.

** Τα δεδομένα αναφέρονται σε μM αμινοξέων / g τριχών.

2.3.2. Βιοχημεία

Τα αμινοξέα που περιέχονται στις τρίχες εμφανίζονται στον Πίνακα II, όπου φαίνονται και οι διαφορές στις πρωτεΐνες ανάμεσα στους τρεις κύριους φυλετικούς τύπους τριχών³¹. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ινωδών και μητρικών πρωτεϊνών στους τρεις παραπάνω τύπους³², όπως αναφέρονται στο Πίνακα I. Φαίνεται ότι η μέση συγκέντρωση ινωδών πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη στις Μογγολικής προέλευσης τρίχες απ' ότι στους άλλους δύο τύπους τριχών, ενώ η μέση συγκέντρωση μητρικών πρωτεϊνών είναι υψηλότερη στις Αφρικανικής προέλευσης τρίχες. Η σχέση ινωδών / μητρικών πρωτεϊνών διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους τρεις τύπους.

2.3.3. Χρωματισμός

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του 20ου αιώνα σχετικά με τις διαφορές στο χρωματισμό των τριχών πληθυσμών διαφορετικών εθνικοτήτων³³ δεν έδωσαν ακριβή στοιχεία. Πολλές μεταγενέστερες μελέτες με τη χρήση προηγμένης τεχνολογίας (πχ ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) επιβεβαιώνουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών τόσο στην οργάνωση όσο και στη δομή της μελανίνης σε διαφορετικής φυλετικής προέλευσης τρίχες^{23,25,26,27,34,35,36}.

α) Αφρικανικής προέλευσης τρίχες

Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται στην εξωτερική ριζική θήκη των ωοθυλακίων και στο βολβό των Αφρικανικής προέλευσης τριχών³⁷. Τα ελλειπτικά και ραβδόμορφα μελανοσώματα συνθέτουν ευμελανίνη και χρωματίζουν τις τρίχες μαύρες. Μεταφέρονται από τα μελανοκύτταρα και ενσωματώνονται στα κύτταρα του φλοιού και του μυελού μοναδιαία και όχι σε συσσωματώματα με άλλα μελανοσώματα²³. Τα μελανοσώματα στους βολβούς των Αφρικανικής προέλευσης τριχών είναι διπλάσια στο μέγεθος από αυτά που βρίσκονται στους βολβούς των Καυκάσιας προέλευσης τριχών²³. Έχουν αναφερθεί όμως και περιπτώσεις βολβών Καυκάσιας προέλευσης τριχών²⁷, που παράγουν τρίχες σκούρου καστανού χρώματος, στους οποίους εμφανίζονται μελανοσώματα ανάλογου ή και μεγαλύτερου μεγέθους από εκείνα των Αφρικανικής προέλευσης τριχών.

Έχουν μελετηθεί συγκριτικά κόκκοι μελανίνης ανάμεσα σε Καυκάσιας και Αφρικανικής προέλευσης τρίχες²⁷, οι οποίες είναι σκούρου καστανού και μαύρου χρώματος αντιστοίχως. Παρατηρήθηκε ότι οι κόκκοι μελανίνης στις Καυκάσιας καταγωγής τρίχες είναι περισσότερο απλοί στη μορφή και μικρότεροι στο μέγεθος, σε σχέση με αυτούς που εμφανίζονται στις Αφρικανικής προέλευσης τρίχες. Επίσης, αναφέρεται το μέγεθος των κόκκων ευμελανίνης στις Αφρικανικής προέλευσης τρίχες ως 0.83 μm σε μήκος και 0.34 μm σε πλάτος²⁷. Σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι παρατηρήθηκαν μελανοσώματα στους βολβούς Αφρικανικής προέλευσης τριχών, στα οποία υπήρχαν κόκκοι μελανίνης με υψηλή ηλεκτρονική πυκνότητα, που τους καθιστούσε αδιαφανείς και τελείως σκοτεινούς για να μελετηθεί η εσωτερική δομή τους και ως εκ τούτου η δομή των σχηματιζόμενων πολυμερών της μελανίνης²³.

β) Μογγολικής προέλευσης τρίχες

Τα μελανοσώματα αυτού του τύπου τριχών περιέχουν κυρίως ευμελανίνη, που δίνει τις χαρακτηριστικές μαύρες και καστανές αποχρώσεις των προαναφερόμενων εθνοτήτων. Υπάρχουν όμως λεπτές διαφορές ανάμεσα στα μελανοσώματα Μογγολικής και Αφρικανικής προέλευσης τριχών. Τα μελανοσώματα των Μογγολικής προέλευσης τριχών εμφανίζουν ηλεκτρονική πυκνότητα με μια ηλεκτρονικά λαμπρή περιοχή γύρω τους²³. Περιοχές με όμοια ηλεκτρονική λάμψη εμφανίζονται σε μερικά μελανοσώματα Αφρικανικής προέλευσης τριχών, με μεγαλύτερη όμως μελανινογένεση. Επίσης, τα μελανοσώματα μεταφέρονται μοναδιαίως ή και σε συσσωματώματα από το βολβό στο στέλεχος της τρίχας²³.

γ) Καυκάσιας προέλευσης τρίχες

ι) Κόκκινες και ξανθές

Οι βολβοί των Καυκάσιας προέλευσης τριχών κόκκινου χρώματος είναι γεμάτοι με προμελανοσώματα, μια πρόδρομη μορφή των μελανοσωμάτων, τα οποία δε συμμετέχουν στη σύνθεση μελανίνης²³. Όταν τα προμελανοσώματα ωριμάσουν μετατρέπονται ή σε ωοειδούς μορφής μελανοσώματα, στα οποία συντίθεται πρωταρχικώς φαιομελανίνη, ή σε ελλειπτικής μορφής μελανοσώματα στα οποία συντίθενται μικρές ποσότητες ευμελανίνης. Κύτταρα του φλοιού και του μυελού της τρίχας λαμβάνουν συσσωματώματα δύο ή τριών μελανοσωμάτων σχηματίζοντας σύμπλοκα, από τη συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται και η ένταση του χρώματος

στο στέλεχος της τρίχας^{21,23}. Οι ζωνηρού κόκκινου χρώματος τρίχες περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ανωτέρω συμπλόκων σε σύγκριση με τις σκούρου κόκκινου χρώματος τρίχες^{21,23}. Στις κόκκινες τρίχες οι κόκκοι μελανίνης είναι περισσότερο ραβδόμορφοι και λιγότεροι στον αριθμό από τους αντίστοιχους στις καστανές και μαύρες τρίχες²⁷. Επίσης, έχει υπολογιστεί κατά προσέγγιση το μέγεθος των κόκκων της μελανίνης στις κόκκινες τρίχες ως 0.54 μm σε μήκος και 0.24 μm σε πλάτος.

Οι ξανθού χρώματος τρίχες περιέχουν ελλειπτικά και ωσειδή μελανοσώματα. Οι κόκκοι στα μελανοσώματα είναι μικροί, λίγοι στον αριθμό και μοιάζουν με κόκκους ευμελανίνης, ενώ υπάρχουν και κόκκοι φαιομελανίνης^{21,23,25}. Η σύνθεση της μελανίνης είναι ποσοτικά πολύ μικρότερη απ' ό τι στις μαύρες ή καστανού χρώματος τρίχες. Επίσης, τα μελανοσώματα στις ξανθές τρίχες είναι λιγότερο σταθερά στην αποικοδόμηση απ' ό τι στις μαύρες τρίχες. Αναφέρεται ότι η πιθανή απουσία μελανοσωμάτων σε ξανθές τρίχες οφείλεται στην καταστροφή τους από λυσοσωμάτια²³.

ii) *Καστανές και μαύρες*

Οι βολβοί των Καυκάσιας προέλευσης τριχών, που παράγουν καστανές τρίχες, περιέχουν ελλειψοειδή μελανοσώματα, στα οποία παράγεται ευμελανίνη^{21,23}. Το μέγεθος των μελανοσωμάτων είναι γενικά μεγαλύτερο στις τρίχες σκούρου καστανού χρώματος απ' ό τι σ' εκείνες ανοικτού καστανού χρώματος. Επίσης, τα μελανοσώματα αυτά μεταφέρονται σε συσσωματώματα στα κύτταρα του φλοιού και του μυελού, σχηματίζουν σύμπλοκα και είναι λιγότερα στον αριθμό, μικρότερα σε μέγεθος και πολύ λιγότερο σταθερά από εκείνα των Αφρικανικής προέλευσης τριχών²⁷. Γενικά οι διαφορές στο μέγεθος, στη σταθερότητα και στη συγκέντρωση των μελανοσωμάτων μπορούν να διακρίνουν φυλετικούς τύπους τριχών, αλλά όμως υπάρχει πλατιά περιοχή ενδοφυλετικής διακύμανσης ως προς τη χρωματική δομή των τριχών.

Αν και δεν υπάρχουν ακριβείς μελέτες για τις μαύρες Καυκάσιας προέλευσης τρίχες, πιστεύεται ότι υπάρχουν ελάχιστες διαφορές τόσο στη δομή, όσο και στην οργάνωση της μελανίνης και των μελανοσωμάτων ανάμεσα στους διάφορους τύπους τριχών με ανάλογο χρώμα²⁷.

2.4. Περιοχές δέσμευσης των τριχών

Υπάρχουν αρκετές δυνατότητες δέσμευσης φαρμάκων στις τρίχες. Η κερατίνη και η μελανίνη περιέχουν πολλές πολικές ομάδες, πράγμα που ενισχύει σημαντικά τις δυνατότητες ύπαρξης σημείων σύνδεσης για τα φάρμακα, για διάφορες άλλες χημικές ουσίες και για τα μέταλλα. Οι διαφορές ανάμεσα στους διάφορους τύπους τριχών στη δομή, την οργάνωση και την συγκέντρωση της μελανίνης και κερατίνης επηρεάζουν τον βαθμό της σύνδεσης. Τα λιπίδια επίσης μπορεί να παίζουν ρόλο ως περιοχές σύνδεσης. Οι ακριβείς όμως θέσεις σύνδεσης δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη.

2.4.1. Κερατίνη

Η κερατίνη της τρίχας περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό όξινων και βασικών αμινοξέων, ο αριθμός όμως των πρώτων είναι ελαφρώς μικρότερος από τον αριθμό των δευτέρων⁹. Από τα όξινα αμινοξέα που περιέχονται στην κερατίνη κύρια είναι το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ, ενώ από τα βασικά κύρια είναι η αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη. Πολλές δραστικές ομάδες, όπως καρβοξυλομάδες, αμίδια, φαινολικά υδροξύλια, αλειφατικά υδροξύλια και σουλφιδριλικές ομάδες, περιέχονται στην κερατίνη. Η παρουσία επίσης πολλών δεσμών υδρογόνου δημιουργεί επιπλέον θέσεις σύνδεσης στην κερατίνη.

Η πολικότητα των χημικών ουσιών καθορίζει και την ικανότητα σύνδεσής τους στις διάφορες θέσεις της κερατίνης. Χημικές ενώσεις όπως το βενζόλιο συνδέονται σε μεγαλύτερη έκταση με τις τρίχες απ' ότι το κυκλοεξάνιο, το οποίο εμφανίζει μικρότερη πολικότητα από το βενζόλιο. Θέσεις στις οποίες μπορούν να συνδεθούν πολικά μόρια είναι οι πεπτιδικοί δεσμοί των αλυσίδων της κερατίνης. Από τη φύση τους οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι δραστικά διπολικά σημεία, στα οποία μπορούν να διαταχθούν σχετικά εύκολα διάφορα πολικά μόρια, δημιουργώντας έτσι ισχυρές αλληλεπιδράσεις της μορφής δίπολο – δίπολο³⁸. Έτσι εξηγείται και η εκτεταμένη σύνδεση του βενζολίου σε αντίθεση με άλλα μη πολικά μόρια. Μόρια νερού έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με τις τρίχες³⁸, που οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη ισχυρών δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε μόρια νερού και στις καρβόξυλο και άμινο ομάδες της κερατίνης.

Η κυστεΐνη, η οποία περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό, θεωρείται ως το πιο διαδεδομένο και δραστικό αμινοξύ της κερατίνης των τριχών³⁹. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στην κυστίνη μειώνονται από μερκαπτάνες και φωσφίνες, ενώ οξειδώνονται από υπερβορικά και βρωμικά άλατα, όπως και από άλλα λευκαντικά. Τα αποτελέσματα τέτοιων αντιδράσεων έχουν άμεσο αποτέλεσμα στη δομική οργάνωση της κερατίνης, άρα και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τριχών. Για παράδειγμα η λεύκανση των τριχών με υπεροξείδιο του υδρογόνου σε αλκαλικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υπεροξυανιόντων, τα οποία κυρίως αντιδρούν με την κυστεΐνη σχηματίζοντας προϊόντα κυστεϊκού οξέος. Η διαδικασία λεύκανσης έχει ως τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή περίπου του 15% των δεσμών της κυστεΐνης που εμφανίζονται αρχικά στην κερατίνη των τριχών, γεγονός που εξηγεί και την αύξηση της διαπερατότητας των λευκασμένων τριχών από τα διάφορα χημικά^{39,40}.

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αποτελούν ισχυρές θέσεις δέσμευσης για πολλά πυρηνόφιλα μόρια. Έχουν δημοσιευθεί μελέτες για τις δομικές αλλαγές που υφίσταται η κερατίνη των τριχών ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας με αλκαλικά υλικά⁴¹. Αναφέρεται ότι τα υδροξυλιόντα ξεκινούν μια β-απόσπασης αντίδραση με αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών της κυστίνης και τη δημιουργία δεϋδροαλανίνης, ως ενδιάμεσου προϊόντος. Κυστεΐνη και λυσίνη μπορούν να αντιδράσουν με τη δεϋδροαλανίνη για να σχηματίσουν νέες μακριές αλυσίδες στην κερατίνη. Πυρηνόφιλες αμίνες, όπως η αιθυλαμίνη και η n-πεντυλοαμίνη, μπορούν να αντιδράσουν με τη δεϋδροαλανίνη με αποτέλεσμα το σχηματισμό μακροαλυσίδων στην κερατίνη.

Δημοσιεύσεις σχετικές με την αλκαλική αποικοδόμηση της κυστεΐνης, που υπάρχει στην κερατίνη των τριχών⁴², αναφέρουν την επίδραση αλκυλο-αμιनों με την κυστίνη για το σχηματισμό β-αλκυλο-αμινοξέων και συγκεκριμένα των αιθυλο-, προπυλο-, βουτυλο- και αμυλο- αμιनों. Αναφέρεται ότι την υψηλότερη συγκέντρωση β-αλκυλο-αμινοξέων δημιουργεί η προσθήκη αμυλο-αμιनों στις τρίχες, ενώ τη χαμηλότερη η προσθήκη αιθυλο-αμιनों. Επειδή η κυστίνη της κερατίνης του μαλλιού είναι η περισσότερο συγγενής προς τις μακράς αλυσίδας αμίνες, συμπεραίνεται ότι οι αμίνες με μακριά αλειφατική αλυσίδα είναι περισσότερο ικανές στο σπάσιμο

υδρόφοβων δεσμών, όπως αυτών της κερατίνης και είναι περισσότερο δραστικές με την κυστίνη σε σύγκριση με τις αμίνες μικρής αλειφατικής αλυσίδας.

Τα φάρμακα με αλκαλικές ιδιότητες εμφανίζουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με την κερατίνη των τριχών απ' ότι εκείνα με όξινες ιδιότητες⁴³. Έτσι αλκαλικές ουσίες όπως η νικοτίνη, η κοκαΐνη και η μορφίνη απορροφούνται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις τρίχες, σε σύγκριση με όξινες ουσίες, όπως η ασπιρίνη και η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC).

2.4.2. Μελανίνη

Αν και δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως η δομή της φαιομελανίνης και ευμελανίνης, η μελανίνη θεωρείται ένας από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες δέσμευσης των φαρμάκων, των μετάλλων και διαφόρων άλλων χημικών ουσιών στις τρίχες. Επειδή η μελανίνη εμφανίζεται σε πολλούς ιστούς των θηλαστικών, όπως στις τρίχες, στον εγκέφαλο, στην ίριδα του οφθαλμού, στο δέρμα, στα επαγωγά αγγεία και στον κοχλία του αυτιού, οι διάφορες φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να δεσμεύονται σ' αυτούς τους ιστούς τόσο καλά όσο και στις τρίχες.

Μια από τις πρώτες δημοσιευμένες μελέτες σχετικές με την επίδραση της μελανίνης στην ικανότητα δέσμευσης των φαρμάκων από τις τρίχες, αναφέρεται στην μελέτη των μυδριατικών αποτελεσμάτων μετά την τοπική δράση διαλυμάτων εφεδρίνης (10%), ψευδοεφεδρίνης (10%), κοκαΐνης (4%) και ευθαλαμίνης (5%) στα μάτια ανθρώπων Καυκάσιας, Μογγολικής και Αφρικάνικης καταγωγής⁴⁴. Βρέθηκε ότι η διαστολή της κόρης των οφθαλμών των ανθρώπων Καυκάσιας καταγωγής είναι περισσότερο εμφανής. Αν και δε δόθηκαν ακριβείς εξηγήσεις του φαινομένου από τους συγγραφείς της παραπάνω εργασίας, μια λογική εξήγηση για το διαφορετικό μέγεθος της διαστολής της κόρης οφθαλμών ανθρώπων διαφορετικής καταγωγής είναι η υψηλή δέσμευση των τοποθετούμενων φαρμάκων στη χρωματισμένη ίριδα των οφθαλμών των ανθρώπων Αφρικάνικης και Μογγολικής καταγωγής, με αποτέλεσμα μικρή ποσότητα φαρμάκων να είναι διαθέσιμη για δέσμευση στους ανδρενεργικούς υποδοχείς, ώστε να προκληθεί η διαστολή της κόρης του οφθαλμού. Μεταγενέστερες μελέτες αναφέρουν την πολύ μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης φαρμάκων που έχουν χρωματισμένες ίριδες σε σχέση με μη χρωματισμένες ίριδες^{45,46}. Η δέσμευση φαρμάκων στην ίριδα του οφθαλμού εξαρτάται σημαντικά από την παρουσία των

λιπόφιλων συστατικών της ίριδας⁴⁷. Λιπόφιλες ουσίες, όπως η εφεδρίνη, διαπερνούν τη μεμβράνη της ίριδας και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης σε σχέση με λιγότερο ή μη λιπόφιλες ουσίες.

Η μελανίνη εμφανίζει ιδιότητες ασθενούς κατιονικού πολυμερούς και σχηματίζει ιονικούς δεσμούς με μέταλλα και χημικές ουσίες^{48,49,50}. Αυτό εξηγεί και τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης που εμφανίζουν κατιονικά φάρμακα όπως η κοκαΐνη, η φαινυλοκυκλιδίνη, οι αμφεταμίνες και τα οπιούχα σε σχέση με ανιονικά όπως η ασπιρίνη (A^-H^+) και η THC. Αναφέρεται επίσης ότι η συναγωνιστική δράση μεταλλικών ιόντων, όπως νατρίου, καλίου και ασβεστίου αναστέλλει τη σύνδεση χλωροπροζαμίνης στη μελανίνη⁴⁸. Η παρουσία ιόντων νατρίου μειώνει την απορρόφηση κοκαΐνης από Καυκάσιας και Μογγολικής προέλευσης τρίχες⁵¹. Θεωρώντας τις μελανίνες ως σύμπλοκα μεταφοράς φορτίου, αυτές μπορούν να συμμετέχουν στη δέσμευση μετάλλων και φαρμάκων με τη συνεισφορά ηλεκτρονίων^{48,49}. Επίσης, δυνάμεις μη ηλεκτροστατικής φύσης, όπως οι δυνάμεις Van der Waals, συμμετέχουν ως επιπλέον μηχανισμός δέσμευσης φαρμάκων από τη μελανίνη.

2.4.3. Λιπίδια

Τα λιπίδια, αν και αποτελούν ένα πολύ μικρό μέρος (1 έως 9%) των τριχών, είναι πιθανόν να συμμετέχουν στη δέσμευση των φαρμάκων. Για παράδειγμα η φωσφατιδιλοχολίνη, η οποία είναι ένα επαμφοτερίζον λιπαρό οξύ εμφανιζόμενο στις βιολογικές μεμβράνες, περιέχει αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες και θετικά φορτισμένες ομάδες χολίνης, οι οποίες είναι διαθέσιμες στη σύνδεση κατιονικών και ανιονικών φαρμάκων αντιστοίχως. Σε μελέτες για τη δέσμευση επαμφοτερίζοντων φαρμάκων σε λιποσώματα που περιέχουν φωσφατιδιλοχολίνη⁵², αναφέρεται ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη δέσμευση ανιονικών και κατιονικών μορφών των φαρμάκων, που εξαρτάται από τη διαφορετική ικανότητά τους να διαπερνούν τις υδρόφοβες περιοχές των μεμβρανών. Έτσι τα κατιονικά φάρμακα συνδέονται σε μεγαλύτερη έκταση με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται πλησιέστερα στις υδρόφοβες περιοχές των μεμβρανών, σε σύγκριση με τα ανιονικά που συνδέονται με τις ομάδες της χολίνης, οι οποίες όμως βρίσκονται μακρύτερα από τις υδρόφοβες περιοχές των λιπαρών μεμβρανών. Έτσι εξηγείται και η μεγαλύτερη απορροφητική

ικανότητα των τριχών στα κατιονικά φάρμακα, όπως η κοκαΐνη, σε αντίθεση με τα ανιονικά.

2.5 Ο βιολογικός κύκλος της τρίχας

Το ωοθυλάκιο της κάθε τρίχας παρουσιάζει περιοδική δραστηριότητα με μεσοδιαστήματα ανάπαυσης ανάλογα με τη θέση του, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται δύο βασικές περίοδοι στη διάρκεια ζωής της τρίχας: α) η περίοδος αύξησης και β) η περίοδος ανάπαυσης.

Στο τριχωτό της κεφαλής η περίοδος αύξησης των τριχών διαρκεί περίπου 30 μήνες, ειδικά στην κορυφή του κρανίου, όπου το 85% περίπου των τριχικών ωοθυλακίων βρίσκεται σε φάση αναγέννησης και ο ρυθμός αύξησής τους εμφανίζει μεγάλη μεταβλητότητα, που κυμαίνεται από 0.20 έως 1.12 mm/ημέρα⁵³. Κατά την περίοδο της ανάπαυσης, που διαρκεί 2.5 έως 3 μήνες κατά μέσον όρο⁵³, οι τρίχες πέφτουν, ενώ η αναγέννηση της νέας τρίχας μπορεί να αρχίσει και πριν ακόμη απολέσει την προηγούμενη. Φυσιολογικά πέφτουν καθημερινά 30 με 100 τρίχες. Οι τρίχες στην περιοχή αυτή είναι εκτεθειμένες τόσο στις εκκρίσεις του ιδρώτα και του σμήγματος, όσο και στον αέρα, το νερό και τη σκόνη. Υπόκεινται επίσης σε χημικές και φυσικοχημικές αλλαγές με τη χρήση διαφόρων καλλυντικών. Οι τρίχες της κεφαλής στο μεγαλύτερο μέρος τους επηρεάζονται από τις ανδρογενείς ορμόνες, δηλαδή προέρχονται από ανδρικού τύπου ωοθυλάκια τριχών⁵³.

Σε νεώτερες μελέτες χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες-φάρμακα ως χρονικοί δείκτες για τη μελέτη του κύκλου ανάπτυξη/ανάπαυση της τρίχας στο τριχωτό της κεφαλής. Αξιοσημείωτες είναι οι μελέτες που χρησιμοποιούν οφλοξασίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό^{54,55}. Προσδιορίστηκε η οφλοξασίνη σε ξεχωριστά στελέχη τρίχας, όταν χορηγήθηκε το φάρμακο σε ασθενή, με δόση 300 mg/ημέρα χωρισμένο σε τρεις ισόποσες δόσεις και για τρεις ημέρες⁵⁶. Τέσσερα ξεχωριστά τμήματα τριχών κόπηκαν 2,7 μήνες μετά την χορήγηση του φαρμάκου στον ασθενή και αναλύθηκαν ξεχωριστά. Οι τρίχες κόπηκαν σε τεμάχια μήκους 2 mm και διαλυτοποιήθηκαν σε NaOH 1M με θέρμανση στους 80 oC για 30 min. Στη συνέχεια

μετρήθηκε η ποσότητα της οφλοξασίνης στο καθένα από τα τμήματα με HPLC, με κατώτερο όριο ανίχνευσης 0.5 ng / τεμάχιο⁵⁵. Η οφλοξασίνη προσδιορίστηκε μόνο σε δύο ή τρία τεμάχια των 2 mm. Υπολογίστηκε το μήκος αύξησης της κάθε τρίχας με βάση την απόσταση της θέσης των τεμαχίων αυτών από τη ρίζα της τρίχας και τη χρονική διάρκεια από τη χορήγηση του φαρμάκου και την κοπή των τριχών. Για τα τρία διαφορετικά στελέχη τριχών υπολογίστηκε μηνιαία αύξηση μήκους : α) 0.89 (2.4/2.7), β) 1.22 (3.3/2.7) και γ) 1.22 (3.3/2.7). Τελικά η αύξηση του μήκους των τριχών κεφαλής ενηλίκων μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι 1.12 ± 0.11 cm μηνιαίως⁵⁶.

Οι τρίχες στην περιοχή του γενίου εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό αύξησης (περίπου 0.27 mm/ημέρα), η διάρκεια της περιόδου αύξησης είναι 14 έως 22 μήνες, ενώ η αντίστοιχη ανάπαυσης είναι 9 έως 12 μήνες. Ομοίως με τις τρίχες της κεφαλής και αυτές του γενίου επηρεάζονται από την περιβαλλοντική μόλυνση και την χρήση διαφόρων καλλυντικών. Επίσης, και αυτές προέρχονται από ωοθυλάκια ανδρικού τύπου⁵³.

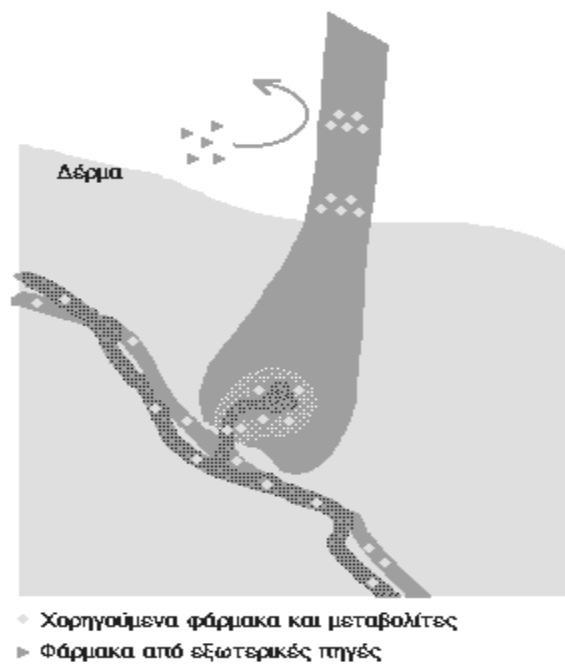
Οι τρίχες στην περιοχή της μασχάλης και της ήβης εμφανίζουν ρυθμό αύξησης περίπου 0.3 mm/ημέρα, περίοδο ανάπτυξης 11 έως 18 μήνες και ανάπαυσης 12 με 17 μήνες. Είναι εκτεθειμένες τόσο στην έκκριση ιδρώτα και σμήγματος, όσο και σε εκκρίσεις αποκρινών αδένων, που εμφανίζονται μόνο στην περιοχή της μασχάλης και της ήβης. Είναι λιγότερο εκτεθειμένες στην περιβαλλοντική μόλυνση, αλλά επηρεάζονται εξίσου με τους υπόλοιπους τύπους τριχών από τα καλλυντικά. Επιπρόσθετα οι τρίχες της ήβης μολύνονται με ούρα. Οι τρίχες και των δύο περιοχών προέρχονται από αμφισεξουαλικά ωοθυλάκια⁵³.

3. Μοντέλα απορρόφησης των φαρμάκων στις τρίχες

Είναι αποδεκτά δύο θεωρητικά μοντέλα που εξηγούν την απορρόφηση φαρμάκων, μετάλλων και άλλων χημικών ουσιών στις τρίχες. Το πρώτο είναι εκείνο της απορρόφησης των φαρμάκων μέσω του αιματικού κυκλοφορικού συστήματος, με εγκλωβισμό των φαρμάκων στην ρίζα των τριχών και για αυτό αναφέρεται ως “μοντέλο εγκλωβισμού”⁵⁷ ή ως “μοντέλο ενεργητικής απορρόφησης”. Σύμφωνα με αυτό οι λιπόφιλες ουσίες (πχ φάρμακα) στο αίμα διαπερνούν τα λεπτά αγγειακά τοιχώματα του βολβού και ενσωματώνονται στα νεοσχηματιζόμενα κύτταρα τριχών.

Όταν αυτά τα κύτταρα ωριμάσουν διαπερνούν την επιφάνεια του δέρματος, νεκρώνονται και κερατινοποιούνται σχηματίζοντας τα ινοειδούς μορφής υλικά των τριχών. Καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης της τρίχας τα φάρμακα και οι μεταβολίτες τους είναι τοπικά εγκλωβισμένα στην τρίχα, μετακινούνται καθ' όσον αυξάνεται αυτή και είναι γενικά προστατευμένα από μετακίνηση ή αλλαγή από το εξωτερικό περιβάλλον.

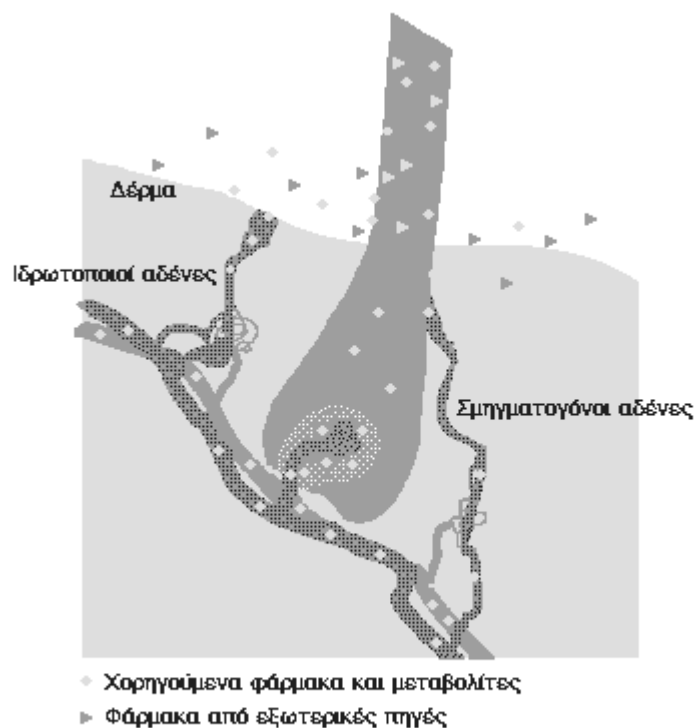
Το δεύτερο μοντέλο, που αναφέρεται ως “μοντέλο του ιδρώτα”⁵⁸, για να τονιστεί η μεγαλύτερη επίδραση του ιδρώτα ή ως “μοντέλο παθητικής απορρόφησης”, δέχεται μόνο μικρή απορρόφηση των φαρμάκων διαμέσου της αιματικής κυκλοφορίας στο στέλεχος της τρίχας, ενώ το μεγαλύτερο μέρος οφείλεται στην απορρόφησή τους διαμέσου των σμηγματογόνων, αποκρινών και εκκρινών ιδρωτοποιών αδένων κατά τη φάση σχηματισμού των τριχών ή από το εξωτερικό περιβάλλον μετά την ανάπτυξή τους.



ΣΧΗΜΑ 3

“Μοντέλο εγκλωβισμού” ή “μοντέλο ενεργητικής απορρόφησης” των φαρμάκων στις τρίχες.

Οι σμηγματογόνοι αδένες εκκρίνουν “σμήγμα”, ένα υλικό όμοιο με κερί, που σκοπό έχει τη λίπανση του στελέχους της τρίχας (λιπαντική και μαλακτική δράση στην κεράτινη στιβάδα) και τη συνεισφορά στην άμυνα του δέρματος ενάντια στις διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις. Οι ιδρωτοποιοί αδένες προκαλούν εφίδρωση και παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος. Ο ιδρώτας αποτελείται σχεδόν 99% από νερό, με κύρια διαλυμένη ουσία το χλωριούχο νάτριο, αλλά και άλλα οργανικά και ανόργανα συστατικά. Τα εκκρίματα όλων των παραπάνω αδένων περιλούουν τις τρίχες και επομένως φάρμακα ή μεταβολίτες τους διαλυτά σε ιδρώτα ή σμήγμα μπορεί να απορροφούνται από αυτές. Με ανάλογο τρόπο ουσίες του περιβάλλοντος σε στερεή κατάσταση (πχ χημικές ουσίες που βρίσκονται πάνω στα έπιπλα ή στα ρούχα) ή σε μορφή ατμού (πχ καπνός) είναι δυνατόν να ενσωματωθούν παθητικά πάνω στις τρίχες μέσω της διαλύσεως τους στον ιδρώτα ή άλλο υγρό μέσο.



ΣΧΗΜΑ 4

“Μοντέλο ιδρώτα” ή “μοντέλο παθητικής απορρόφησης” των φαρμάκων στις τρίχες.

Πολλοί ερευνητές αποδεικνύουν πειραματικά το μεγάλο ρόλο που έχει η περιβαλλοντική έκθεση των τριχών, όσον αφορά στην ενσωμάτωση βαρέων μετάλλων σ' αυτές. Σε δημοσιευμένες μελέτες περιγράφονται θεωρητικά μοντέλα που αφορούν την απορρόφηση μεταλλικών ιχνοστοιχείων στις τρίχες, όπως και τις μεθόδους προετοιμασίας τριχών που μειώνουν την εξωτερική μόλυνση από τα μεταλλικά ιχνοστοιχεία.⁵⁹ Γενικά σε όλες τις δοκιμασίες μέτρησης τριχών για μεταλλικά ιόντα απαιτείται μεγάλη προσοχή για τη μείωση της εξωτερικής μόλυνσης, ενώ μερικοί ερευνητές πιστεύουν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλικών ιόντων στις τρίχες προέρχεται αποκλειστικά και μόνον από εξωτερικές πηγές⁵⁹.

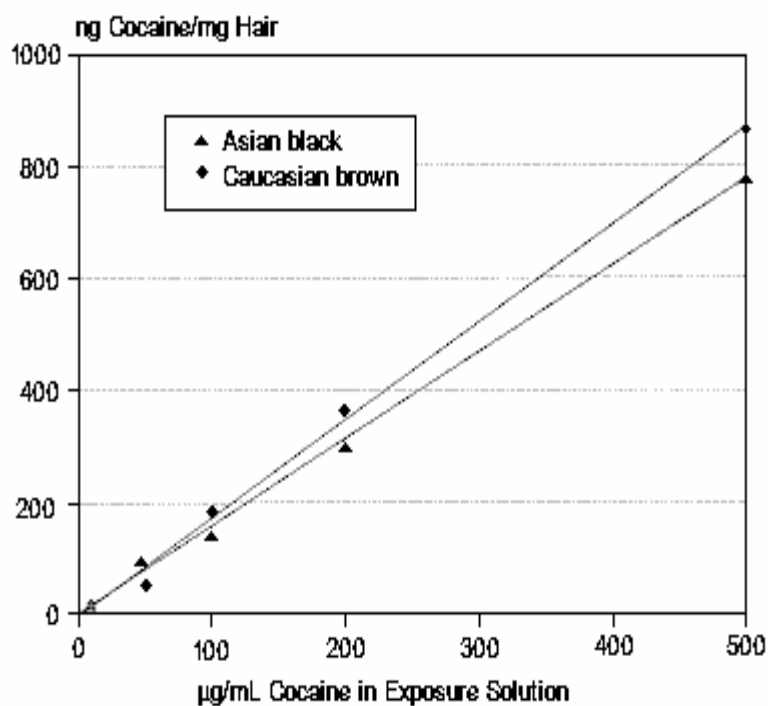
Απαιτείται πάντα ένα χρονικό διάστημα ανάμεσα στη χορήγηση του φαρμάκου και την ανάλυση των τριχών. Κατά την διάρκεια αυτού του χρόνου τα φάρμακα αποδεσμεύονται μερικώς από την επιφάνεια της τρίχας και απομακρύνονται τελικά από αυτήν με τη συνήθη υγιεινή των τριχών. Η απομάκρυνση με αυτόν τον τρόπο των φαρμάκων από τις τρίχες εξαρτάται πάρα πολύ από τα διάφορα διαλύματα - καλλυντικά, που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό ή την περιποίηση των τριχών. Σε τελευταία ανάλυση η απομάκρυνση με τις διάφορες πρακτικές υγιεινής περιποίησης των τριχών αποτελεί μια *in vivo* απομάκρυνση των φαρμάκων, που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν στις αναλύσεις των τριχών για ποσοτικό προσδιορισμό φαρμάκων.

4. Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες.

Η *in vitro* και η *in vivo* απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες εξαρτάται από ποικιλία φυσικοχημικών παραγόντων όπως: α) η συγκέντρωσή τους στα διαλύματα επώασης, β) ο χρόνος επώασης, γ) η παρουσία συναγωνιστικών κατιόντων, δ) ο συνδυασμός του pH των διαλυμάτων επώασης και της ηλεκτρικής κατάστασης των φαρμάκων, ε) το ιστορικό προηγούμενης κατεργασίας των τριχών, στ) οι φυσικοχημικές ιδιότητες των χορηγούμενων φαρμάκων, ζ) ο χρωματισμός των τριχών και η) η ανατομική περιοχή του σώματος, από την οποία έγινε η δειγματοληψία των τριχών.

4.1. Συγκέντρωση

Η συγκέντρωση των φαρμάκων στις τρίχες αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων στα οποία εκτίθενται. Μελέτες των Blank και Kidwell⁶¹, με τις οποίες μετρήθηκε κοκαΐνη σε δύο διαφορετικής προέλευσης τύπους τριχών, δείχνουν μια γραμμική σχέση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις ραδιοσημασμένης κοκαΐνης (από 1 $\mu\text{g/mL}$ έως 500 $\mu\text{g/mL}$) των διαλυμάτων επώασης (φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα) και στις ποσότητες κοκαΐνης που μετρήθηκαν στις τρίχες. Στο σχήμα 5 παρουσιάζονται τα δεδομένα από αρκετά πειράματα και η γραμμική συσχέτισή τους.



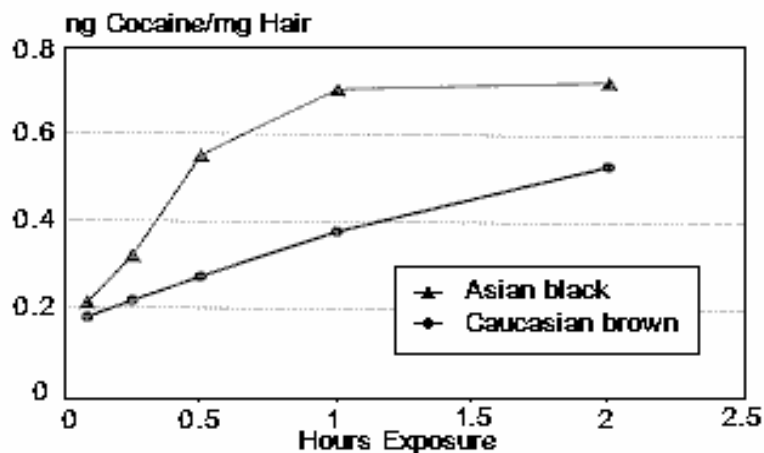
ΣΧΗΜΑ 5

Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των διαλυμάτων επώασης στην απορρόφηση της κοκαΐνης στις τρίχες. Δύο τύποι τριχών επώαστηκαν σε διαλύματα κοκαΐνης για 1 h και αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για χρονικό διάστημα ενός βραδιού πριν τη δειγματοληψία.

(Από: Blank, D.L. and Kidwell, D. A., *Forensic Sci. Int.*, 63, 145, 1993.)

4.2. Χρόνος επώασης

Η συγκέντρωση των φαρμάκων στις τρίχες αυξάνεται γενικά με το χρόνο έκθεσης (επώασης) των τριχών σε διαλύματα με τα αντίστοιχα φάρμακα. Η εργασία των Blank και Kidwell⁶¹ δείχνει τη συσχέτιση του χρόνου έκθεσης των τριχών σε διαλύματα κοκαΐνης και των συγκεντρώσεων κοκαΐνης που απορροφάται. Με την αύξηση της διάρκειας επώασης των τριχών σε διάλυμα κοκαΐνης 1 µg/mL παρατηρείται αύξηση στην απορρόφηση της κοκαΐνης από τις τρίχες, κυρίως για τις ασιατικής προέλευσης τρίχες (όμως δεν παρατηρείται γραμμική σχέση). Η παραπάνω μελέτη αναφέρεται και σε χρόνους μεγαλύτερους των 24h, αλλά η κοκαΐνη αποδομείται στα διαλύματα επώασης για χρόνους μεγαλύτερους των 24h και θερμοκρασία 37 οC, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση κοκαΐνης που υπάρχει στο διάλυμα να μειώνεται πάρα πολύ.



ΣΧΗΜΑ 6

Αποτελέσματα του χρόνου επώασης στην απορρόφηση της κοκαΐνης στις τρίχες. Τα δείγματα των τριχών επώαστηκαν σε διάλυμα 1 µg/mL ραδιοσημασμένης κοκαΐνης. (Από: Kidwell, D. A. and Blank, D.L., Drug Testing in Hair, Kintz, P., CRC Press, 1996, pp. 17-65.)

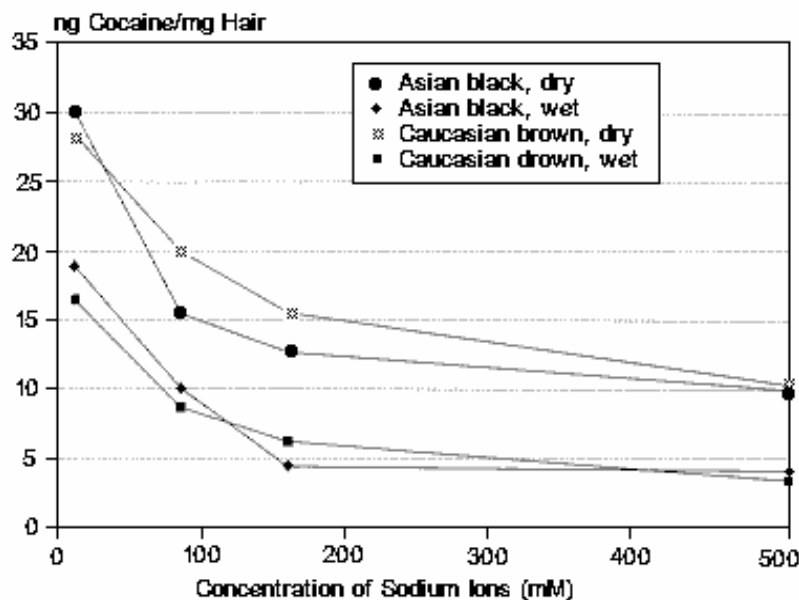
4.3. Συναγωνιστικά κατιόντα

Η συγκέντρωση των φαρμάκων στις τρίχες μειώνεται γενικά με την παρουσία συναγωνιστικών κατιόντων και κυρίως του νατρίου. Τα αποτελέσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων κατιόντων στα διαλύματα εξωτερικής απορρόφησης κοκαΐνης στη

δέσμευση της κοκαΐνης σε τρίχες διαφορετικού τύπου φαίνονται στο Σχήμα 7⁶¹. Με αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων νατρίου (από 0 έως 500 mM) στα διαλύματα επώασης, στα οποία έχει προστεθεί ποσότητα ραδιοσημασμένης κοκαΐνης (10 µg/mL), παρατηρείται μείωση της κοκαΐνης που απορροφάται. Αυτό δικαιολογείται από το ότι η δέσμευση των φαρμάκων γίνεται μέσω ιοντικών δεσμών και με την αύξηση των κατιόντων αυξάνεται ο συναγωνισμός για τις προσφερόμενες θέσεις πάνω στις τρίχες, με αποτέλεσμα τα μόρια των φαρμάκων που έχουν μεγαλύτερη μάζα να υστερούν σε σχέση με τα κατιόντα και να εμφανίζουν μικρότερη απορρόφηση από τις τρίχες.

4.4. Το pH των διαλυμάτων και η ηλεκτρική κατάσταση των φαρμάκων

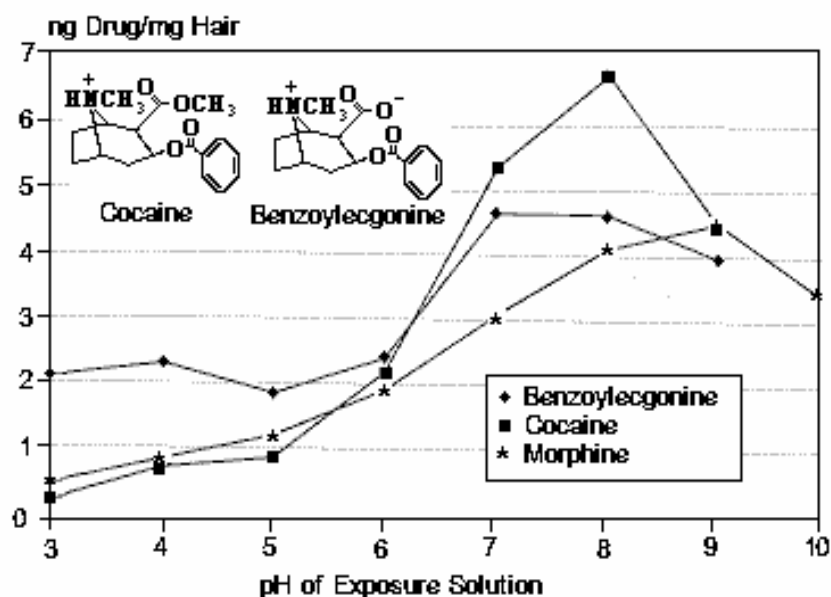
Μερικές μελέτες δείχνουν την επίδραση του pH των διαλυμάτων επώασης στην απορρόφηση φαρμάκων, όπως της κοκαΐνης και της βενζοϋλεγονίνης (benzoylecgonine, BZE) σε συγκέντρωση 5 µg/mL⁶², όπου παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης με αύξηση του pH των διαλυμάτων, αλλά με διαφορετικούς ρυθμούς για κάθε φάρμακο.



ΣΧΗΜΑ 7

Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των κατιόντων στην απορρόφηση της κοκαΐνης στις τρίχες. Οι τρίχες επώαστηκαν σε διαλύματα κοκαΐνης 10

μg/mL με συνεχώς αυξανόμενη τη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου.
(Από: Blank, D.L. and Kidwell, D. A., Forensic Sci. Int., 63, 145, 1993.)

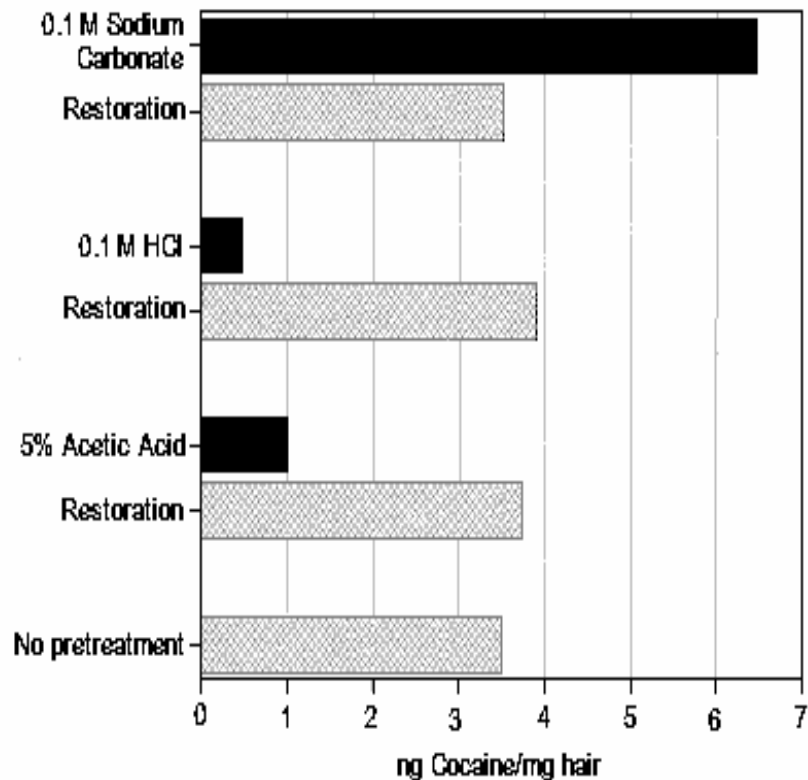


ΣΧΗΜΑ 8

Αποτελέσματα του pH στην απορρόφηση της κοκαΐνης, βενζοϋλογονίνης και μορφίνης στις τρίχες. Καυκασοειδείς καστανού χρώματος τρίχες επώαστηκαν σε διαλύματα των ραδιοσημασμένων ουσιών (5 μg/mL), με μεταβαλλόμενο pH για 1 h. (Από: Kidwell, D. A. and Blank, D.L., Drug Testing in Hair, Kintz, P., CRC Press, 1996, pp. 17-65.)

4.5. Ιστορικό κατεργασίας των τριχών

Μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης της κοκαΐνης σε τρίχες οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με όξινα και αλκαλικά διαλύματα⁶³. Η απορρόφηση κοκαΐνης στις τρίχες με προκατεργασία σε διάλυμα 0.1M ανθρακικού νατρίου (pH 12) είναι διπλάσια ή και περισσότερη από εκείνη στις τρίχες χωρίς προκατεργασία. Αντίθετα η απορρόφηση κοκαΐνης σε τρίχες με προκατεργασία σε διάλυμα 0.1M HCl είναι περίπου το ένα έκτο ή και μικρότερη από εκείνη σε τρίχες χωρίς προκατεργασία. Ανάλογο αποτέλεσμα βρίσκεται σε τρίχες με προκατεργασία σε διάλυμα 5% οξικό οξύ, αλλά σχεδόν διπλάσιο εκείνου με προκατεργασία σε υδροχλωρικό οξύ.



ΣΧΗΜΑ 9

Αποτελέσματα της όξινης / αλκαλικής κατεργασίας των τριχών στην απορρόφηση της κοκαΐνης σε καστανού χρώματος καυκάσιας προέλευσης τρίχες. (Από: Kidwell, D. A. and Blank, D.L., Drug Testing in Hair, Kintz, P., CRC Press, 1996, pp. 17-65.)

Στα προαναφερόμενα πειράματα επιχειρήθηκαν διαδικασίες αποκατάστασης των τριχών με επώασή τους για λίγες ώρες (περίπου 3 με 24 h) σε 10 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5.6), με τα οποία όμως δεν αποκαταστάθηκε η δεσμευτική ικανότητα των τριχών. Η αύξηση του χρόνου επώασης σε 5 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα οι τρίχες να αποκτήσουν ξανά την πραγματική τους δεσμευτική ικανότητα. Αποδεικνύεται έτσι, ότι η προκαλούμενη αλλαγή της δεσμευτικής ικανότητας των τριχών με κατεργασία με τα αναφερόμενα διαλύματα δεν είναι μόνιμη.

Επίσης, τα καρβοξυλικά οξέα στις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων στο στέλεχος της τρίχας μπορούν να υποστούν εστεροποίηση, με αποτέλεσμα να αποβάλλουν την

δυνατότητα δημιουργίας αρνητικού φορτίου και να μειώνουν την ικανότητα ανταλλαγής ιόντων. Με προκατεργασία των τριχών σε διάλυμα μεθανολικού HCl για 24h και θερμοκρασία 60 °C, λόγω της χρήσης οξέως, μειώνεται η δεσμευτική ικανότητα της κοκαΐνης στις τρίχες, ανεξάρτητα της εστεροποίησης ή όχι των καρβοξυλίων. Με επώαση των τριχών στη συνέχεια σε 10 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH 5.6) για 5 ημέρες, μόνον η μισή από την πραγματική δεσμευτική ικανότητα των τριχών αποκαθίσταται, γιατί η μεθανόλη έχει εστεροποιήσει μερικές από τις καρβοξυλικές ομάδες. Επίσης, επειδή υπάρχουν στις τρίχες θειικές ομάδες που προέρχονται από την οξείδωση της κυστίνης, δεν αποβάλλεται τελείως η δεσμευτική ικανότητα. Ακόμη η εστεροποίηση μπορεί να ολοκληρωθεί ή μερικοί εστέρες μπορούν να μετακινηθούν κατά τη διάρκεια επώασης στο ρυθμιστικό διάλυμα. Απόδειξη της αντιστρεπτότητας των αλλαγών που προκαλεί η κατεργασία των τριχών με μεθανολικό HCl είναι η αποκατάσταση των καρβοξυλικών λειτουργικοτήτων με υδρόλυση των εστέρων παρουσία κάποιου βασικού διαλύματος, με τελικό αποτέλεσμα την αποκατάσταση της πραγματικής δεσμευτικής ικανότητας των τριχών. Τα παραπάνω πειράματα εστεροποίησης των τριχών συνηγορούν στη θεωρία ότι η δέσμευση στις τρίχες γίνεται μέσω ανταλλαγής ιόντων με συμμετοχή καρβοξυλικών ομάδων.

4.6. Φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων

Η απορρόφηση του κύριου μεταβολίτη της αλοπεριδόλης στις τρίχες εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια παραμονής του στο αίμα και μπορεί να συσχετισθεί με αυτή της μητρικής ένωσης⁶⁴. Σε αρκετά όμως χορηγούμενα φάρμακα η συγκέντρωση των μεταβολιτών στις τρίχες είναι πολύ μικρότερη από τη μητρική ένωση ή και χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση του μεταβολίτη στο αίμα είναι μεγαλύτερη από εκείνη της μητρικής⁶⁵. Για παράδειγμα οι υδροξυλιομένοι μεταβολίτες της χλωροπρομαζίνης δεν έχουν προσδιοριστεί στις τρίχες. Το θειϊκό ινδοξύλιο, που είναι μια θεωρούμενη ουραιμική τοξίνη και υδρόφιλη ουσία, έχει δοκιμαστεί ως δείκτης νεφρικής ανεπάρκειας· δεν είναι φάρμακο, αλλά μία ενδογενής ουσία. Ελήφθησαν δείγματα τριχών τεσσάρων ανουραιμικών ασθενών, οι οποίοι ευρίσκονταν κυρίως σε θεραπεία αιμοκάθαρσης. Στις αναλύσεις αίματος από τους ασθενείς βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις του

θειϊκού ινδοξυλίου, μεγαλύτερες των 10 µg/mL, με όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου τα 10 ng/mL, ενώ στις τρίχες αυτών δεν προσδιορίστηκε το ινδοξύλιο⁶⁵. Συνεπώς οι υδρόφιλες ενώσεις μεταφέρονται δυσκολότερα από το αίμα στα μητρικά κύτταρα των τριχών σε σχέση με τις υδρόφοβες.

4.7. Χρωματισμός των τριχών

Οι συγκεντρώσεις της αλοπεριδόλης σε τρίχες ασθενών ιαπωνικής καταγωγής άσπρου - γκρίζου χρώματος είναι σαφώς μικρότερες από ότι στις μαύρου χρώματος τρίχες⁶⁶. Επίσης, η συγκέντρωση της αλοπεριδόλης στα νύχια ασθενών, έναν κεράτινο ιστό που περιέχει όμως πολύ λιγότερη μελανίνη από τις τρίχες, είναι συγκρίσιμη με αυτήν στις γκρίζου ή άσπρου χρώματος τρίχες⁶⁷. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στη μεταφορά της αλοπεριδόλης από το αίμα στα μητρικά κύτταρα και στην παρουσία μελανίνης. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε πειράματα απορρόφησης χλωροπρομαζίνης⁶⁸, φλουορογουινολινών⁶⁹ και νικοτίνης⁷⁰. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και στις συγκεντρώσεις διαφόρων φαρμάκων σε λευκούς και έγχρωμους αρουραίους^{66,69,70}.

Η σχέση συστατικών, όπως τα μελανοσώματα ή άλλες πρόδρομες ενώσεις της μελανίνης, δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

4.8. Ανατομική περιοχή δειγματοληψίας των τριχών

Συνήθως χρησιμοποιούνται τρίχες κεφαλής για το θεραπευτικό έλεγχο φαρμάκων των ασθενών κυρίως για κοινωνικοηθικούς λόγους, που αποτρέπουν σχεδόν τη δειγματοληψία από άλλες περιοχές του σώματος. Διάφορα φάρμακα και μεταβολίτες τους έχουν ανιχνευτεί σε όλα τα είδη τριχών ανεξάρτητα από την ανατομική περιοχή συλλογής τους.

Μελέτες προσδιορισμού της συγκέντρωσης οφλοξασίνης σε τρίχες κεφαλής έδωσαν θετικά αποτελέσματα για όλα τα στελέχη των τριχών, σε αντίθεση με τρίχες προερχόμενες από τη μασχάλη ή την ήβη, όπου μόνο σε ορισμένα στελέχη τριχών ανιχνεύθηκε η ουσία⁶⁰. Γενικά όμως μελέτες απορρόφησης φαρμάκων και μεταβολιτών τους σε όλους τους τύπους τριχών έδωσαν στατιστικώς σχετικά μεταξύ τους αποτελέσματα, με μερικές εξαιρέσεις ορισμένων φαρμάκων που εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση σε τρίχες της περιοχής της ήβης και χαμηλότερη σε εκείνες από την περιοχή της μασχάλης^{71,72,73,74,75}. Οι διαφορές οφείλονται κυρίως στο

διαφορετικό ρυθμό αύξησης και στη διαφορετική χρονική διάρκεια των περιόδων του κύκλου ζωής των αντίστοιχων τριχών. Επίσης, παράγοντες, όπως η μόλυνση με τα ούρα ή η δράση αποκρινών αδένων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση των φαρμάκων σε τρίχες της περιοχής της ήβης ή της μασχάλης.

5. Μηχανισμός δέσμευσης φαρμάκων στις τρίχες

Γενικά αναφέρεται ένα θεωρητικό μοντέλο απορρόφησης των φαρμάκων στις τρίχες, με το οποίο εξηγούνται τα αποτελέσματα της δράσης του pH και των συναγωνιζόμενων κατιόντων⁷⁶. Τρία κυρίως είναι τα αποτελέσματα από τις αλλαγές του pH στα διαλύματα στα οποία εκτίθενται οι τρίχες: α) η αλλαγή της ηλεκτρικής κατάστασης των τριχών, β) η αλλαγή της ηλεκτρικής κατάστασης των φαρμάκων και γ) η αλλαγή της υδροφοβικότητας των φαρμάκων και των τριχών συγχρόνως. Η αλληλεπίδραση των τριών αυτών μεταβλητών προσδιορίζει και τη σχετική πρόσληψη των φαρμάκων στις τρίχες.

Οι τρίχες εμφανίζουν τρία διαφορετικά λειτουργικά δομικά στοιχεία, τα οποία έχουν διαφορετική δράση ανάλογα με την τιμή του pH, δηλαδή τις πλευρικές αλυσίδες του ασπαρτικού και γλουταμικού οξέως καθώς και τις θειϊκές ομάδες, που προέρχονται από την οξειδωτική αποικοδόμηση του αμινοξέος κυστεΐνη. Οι θειϊκές ομάδες αναμένεται να επικρατούν μετά την καταστροφή ή τη χημική κατεργασία των τριχών.

Σε χαμηλό pH, κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο, το οποίο υπολογίζεται περίπου 4, οι τρίχες εμφανίζονται κυρίως σε ουδέτερη κατάσταση^{77,78}, λόγω της πρωτονίωσης των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλίων των αμινοξέων ασπαρτικού και γλουταμικού. Σε τέτοιες οξύτητες ($\text{pH} < 4$) τα φάρμακα δεσμεύονται διαμέσου ασθενών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Δηλαδή τα φάρμακα που δεσμεύονται περισσότερο στις τρίχες σε τόσο χαμηλό pH είναι εκείνα που έχουν όμοια ή παρόμοια υδροφοβικότητα και φορτίο με τις τρίχες. Φάρμακα τα οποία φορτίζονται θετικά σε χαμηλές τιμές του pH δεσμεύονται ασθενέστερα από εκείνα με ουδέτερο ή αρνητικό φορτίο. Όταν το pH γίνεται μεγαλύτερο από το ισοηλεκτρικό σημείο των τριχών, οι πλευρικές αλυσίδες των ασπαρτικών και γλουταμικών οξέων αποπρωτονιώνονται και φορτίζονται αρνητικά. Έτσι τα περισσότερο θετικά φορτισμένα από τα φάρμακα

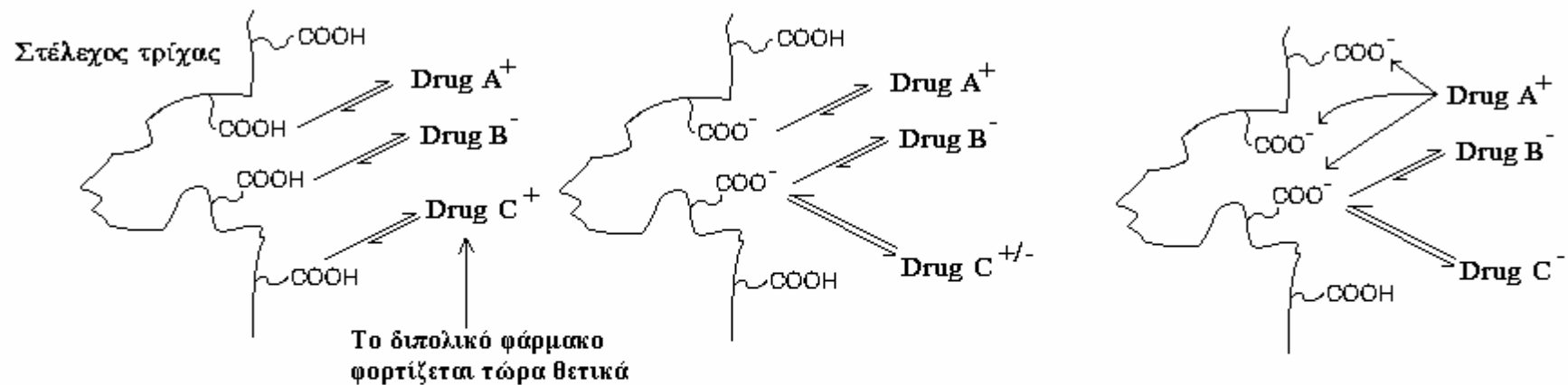
δεσμεύονται περισσότερο από τις τρίχες. Σε ακόμη μεγαλύτερες τιμές του pH περισσότερες καρβοξυλομάδες αποπρωτονιώνονται και αποδίδουν στις τρίχες περισσότερο αρνητικό φορτίο.

Η κοκαΐνη, που αντιπροσωπεύεται στο Σχήμα 10 με το Drug A, έχει pKb από 8.4 έως 8.69 και αναμένεται να είναι περισσότερο θετικά φορτισμένη για pH μικρότερο από 8.7⁷⁹. Η αλλαγή της ηλεκτρικής κατάστασης των φαρμάκων είναι περισσότερο ενδιαφέρουσα για τις επαμφοτερίζουσες ομάδες φαρμάκων, όπως εκείνων της βενζοϋλογονίνης (BZE, pKa=3, βλέπε Σχήμα 10 Drug C), γιατί η ηλεκτρική τους κατάσταση αλλάζει από θετική σε αρνητική όταν αυξάνεται η τιμή του pH. Με βάση αυτό το μηχανισμό δέσμευσης τα αρνητικώς φορτισμένα φάρμακα, όπως είναι η βιοτίνη (pKa=3.5) (βλέπε Σχήμα 10 Drug B), δεσμεύονται ελαφρώς από τις τρίχες και σε πολύ μικρότερες ποσότητες σε σχέση με τα θετικώς φορτισμένα, όπως είναι η κοκαΐνη. Για τον ίδιο ακριβώς λόγο τρίχες που προέρχονται από χρήστες μαριχουάνας περιέχουν ίχνη μόνον της αρνητικώς φορτισμένης 11-nor-9-καρβοξυ-Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC καρβοξυλικό οξύ)⁸⁰. Επίσης, η δέσμευση ασπιρίνης (pKa=3.49) στις τρίχες είναι πολύ ασθενέστερη⁸¹.

Η προαναφερόμενη διακύμανση της δέσμευσης των φαρμάκων στις τρίχες σε σχέση με το pH πρέπει να συνδέεται και με το pH του ιδρώτα. Το pH του ιδρώτα μεταβάλλεται από άτομο σε άτομο. Αναφέρεται μια μέση τιμή του pH ίση με 5.82⁸². Επίσης, έχουν αναφερθεί και τιμές pH του ιδρώτα από 6.1 έως 6.7⁸³. Η μέση σχέση κοκαΐνης / βενζοϋλογονίνης στον ιδρώτα, με μεγάλη όμως διακύμανση, είναι περίπου 4.4:1⁶¹. Η σχέση κοκαΐνης / βενζοϋλογονίνης στις τρίχες υπολογίζεται ως 6.7:1⁸⁴, ενώ από άλλους ως 7:1 πριν το πλύσιμο και ως 5.4:1 μετά το πλύσιμο⁸⁵. Όλες όμως οι τιμές της σχέσης εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση από άτομο σε άτομο. Θεωρώντας τη μέση τιμή του pH του ιδρώτα κοντά στο 5.8, υπολογίζεται ότι η σχέση κοκαΐνης / βενζοϋλογονίνης στις τρίχες (*in vitro* μελέτες όπου οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στον ιδρώτα είναι ισοδύναμες, στο Σχήμα 8), μπορούσε να είναι για το συγκεκριμένο pH περίπου 1:1. Η σχέση αυτή βέβαια εξαρτάται από τον τύπο των τριχών και την υπόθεση ότι ο ιδρώτας περιέχει ισοδύναμες συγκεντρώσεις κοκαΐνης και βενζοϋλογονίνης. Στην πράξη όμως ο ιδρώτας δεν περιέχει ισοδύναμες ποσότητες των δύο φαρμάκων και άρα η προαναφερόμενη σχέση στις τρίχες πρέπει να προσαρμοστεί

με βάση τη σχέση των φαρμάκων στον ιδρώτα. Αν θεωρηθεί ο ιδρώτας ως μέσο από το οποίο μεταφέρονται τα φάρμακα στις τρίχες, η σχέση των φαρμάκων στις τρίχες πρέπει να είναι περίπου 4.4:1. Επιπλέον η παραπάνω σχέση βρίσκεται πολύ κοντά στις προαναφερόμενες μετρούμενες σχέσεις των δύο φαρμάκων, δηλαδή 5.4 έως 7:1⁸⁵

Το μοντέλο της ιοντικής δέσμευσης των φαρμάκων στις τρίχες είναι πολύ σημαντικό στη σύγκριση της δέσμευσης φλουορεσκεΐνης (fluorescein) και ροδαμίνης (rhodamine), δύο δηλαδή μορίων με όμοια δομή, με ίδιο μέγεθος και ίδια αποδίδουσα ποσότητα φθορισμού. Η ροδαμίνη όμως, η οποία είναι θετικά φορτισμένη, είναι περισσότερο δραστική στη δέσμευση από τις τρίχες σε σύγκριση με την φλουορεσκεΐνη⁸⁶. Επίσης, ο μηχανισμός δέσμευσης διαφόρων ουσιών είναι πολύ καλά γνωστός και λαμβάνεται υπόψη στη βιομηχανία των καλλυντικών⁷⁸. Έχουν ήδη δημοσιευθεί μελέτες στις οποίες αναφέρονται ότι τα αρνητικά φορτισμένα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την καλλυντική περιποίηση τριχών δεσμεύονται λιγότερο σε σύγκριση με τα θετικώς φορτισμένα ⁸⁶.



α) pH < 4: Οι τρίχες εμφανίζονται με ουδέτερο φορτίο. Οι δεσμοί των φαρμάκων είναι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

β) pH 7: Οι τρίχες φορτίζονται αρνητικά. Μερικά φάρμακα μετατρέπονται σε διπολικά μόρια. Τα φάρμακα συνδέονται ή απωθούνται μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων.

γ) pH 9: Οι τρίχες είναι περισσότερο αρνητικά φορτισμένες. Μερικά φάρμακα αποκτούν θετικό φορτίο. Τα φάρμακα συνδέονται ή απωθούνται μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων.

ΣΧΗΜΑ 10

Μηχανισμός απορρόφησης φαρμάκων στις τρίχες. Η κοκαΐνη αντιπροσωπεύεται από το Drug A, η βιοτίνη από το Drug B και η βενζοϋλογονίνη από το επαμφοτερίζον Drug C, το οποίο μπορεί να εμφανίζεται με θετικό, αρνητικό ή διπολικό (+/-) φορτίο ανάλογα με το pH. (Από: Kidwell, D. A. and Blank, D. L., in *Hair Testing for Drugs of Abuse: International Workshop on Standards and Technology*, E.J. Cone, M.J. Welch and M.B. Grigson, Eds. N.I.H. Publication, No 95-3727, Superintendent of Documents, U.S., Washington, D.C., 1995, pp. 19-90.)

6. Μέθοδοι προσδιορισμού των συγκεντρώσεων φαρμάκων στις τρίχες

Τα δείγματα που λαμβάνονται για ανάλυση είναι μικρής ποσότητας και οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων σ' αυτά είναι χαμηλές. Γι' αυτό το λόγο οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φαρμάκων στις τρίχες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στην προετοιμασία των δειγμάτων, όσο και στην ποσοτική μέτρηση των ίδιων των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Δεν υπάρχουν προς το παρόν διεθνώς αποδεκτές και πλήρως εγκεκριμένες μέθοδοι για κάθε φάρμακο ξεχωριστά. Όλες οι μέθοδοι όμως λίγο πολύ διακρίνονται σε τρία κυρίως στάδια: α) την προετοιμασία των δειγμάτων, β) την εκχύλιση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους από το μείγμα του αρχικού σταδίου και γ) την ποσοτική μέτρηση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Τα δύο πρώτα από τα παραπάνω στάδια πολλές φορές ενσωματώνονται σε ένα.

6.1. Προετοιμασία των δειγμάτων.

Χρησιμοποιούνται κυρίως τέσσερις μέθοδοι προετοιμασίας των τριχών που διαφέρουν ως προς τις τεχνικές διαλυτοποίησης: α) όξινη υδρόλυση, β) αλκαλική υδρόλυση, γ) ενζυματική πέψη και δ) κατεργασία με ρυθμιστικά διαλύματα ή οργανικούς διαλύτες. Παράμετροι όπως η θέση δειγματοληψίας των τριχών (τριχωτό κεφαλή, μασχάλη, ηβαίο, στήθος, γένη προσώπου κλπ), το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος επεξεργασίας, η κοπή σε μικροτεμάχια (της τάξης του 1mm) και πολλές φορές η κατεργασία με υπερήχους παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία της απομόνωσης των φαρμάκων. Η μέθοδος που θα εφαρμοστεί εξαρτάται κυρίως από τη χημική σταθερότητα του προσδιοριζόμενου φαρμάκου στις συνθήκες της μεθόδου. Για παράδειγμα οι βενζοδιαζεπίνες είναι ασταθείς σε αλκαλικές συνθήκες, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα σε όξινες συνθήκες⁸⁷. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να εφαρμοστεί στον προσδιορισμό της κοκαΐνης^{88,89}, ενώ στην περίπτωση της μορφίνης ικανοποιητικά αποτελέσματα δίνει τόσο η όξινη όσο και η αλκαλική υδρόλυση⁸⁸.

α) Όξινη υδρόλυση

Με τη μέθοδο αυτή επωάζονται 50mg τριχών σε 1mL 0.1M HCl για 24h, στη συνέχεια γίνεται εξουδετέρωση με 0.1 mL 1M NaOH και ρύθμιση του pH σε 7.5 με φωσφορικό ρυθμιστικό, όπως π.χ. στον προσδιορισμό οπιούχων⁹⁰.

β) Αλκαλική υδρόλυση

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη διαλυτοποίηση των τριχών με NaOH 1N έως 2N, όπως στον προσδιορισμό της μορφίνης σε τρίχες ασθενών⁹¹.

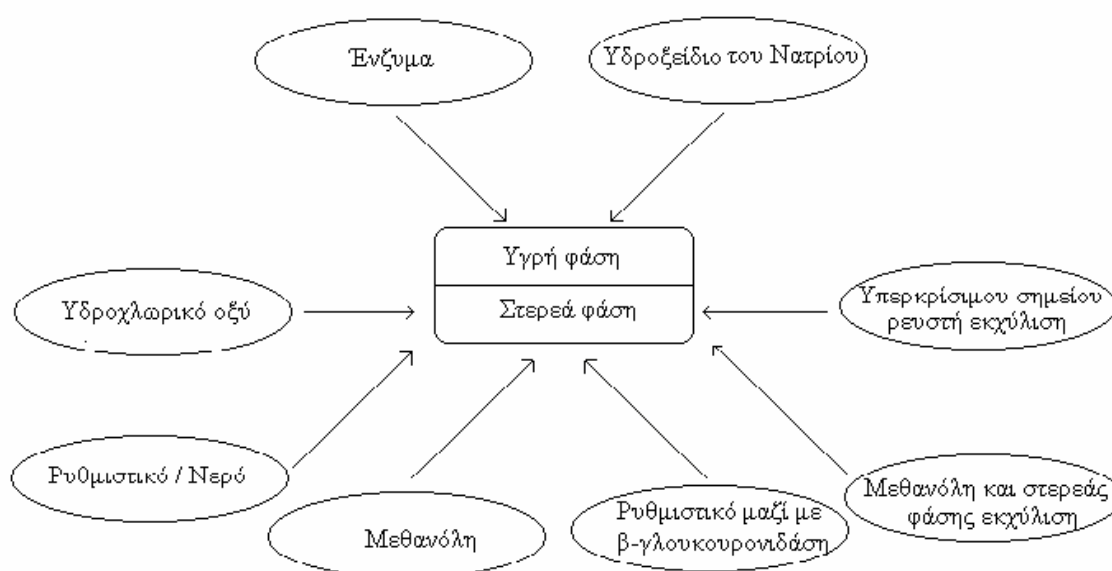
γ) Ενζυματική πέψη

Η διαλυτοποίηση των τριχών επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων, π.χ. της προνάσης (ένα μη εξειδικευμένο ένζυμο, που παράγεται από ένα είδος μυκήτων με την ονομασία *Streptomyces griseus*)⁹², της γλυκουρονιδάσης, της πεψίνης και πολλών άλλων.

δ) Κατεργασία με ρυθμιστικά διαλύματα ή οργανικούς διαλύτες

Περιλαμβάνει την εκχύλιση σε στερεά φάση των τριχών:

- με μεθανόλη, όπως 50 έως 200 mg κονιοποιημένων τριχών σε 5mL μεθανόλη μέσα σε υπερηχητική συσκευή⁹³, φυγοκέντριση, μεταφορά σε νέο σωληνάριο και εξάτμιση.
- με ρυθμιστικό διάλυμα, όπως 2 mL ρυθμιστικού Sorensen (pH 7.6) με σύγχρονη υπερηχητική επεξεργασία για 2 ώρες.
- με ρυθμιστικό διάλυμα και β-γλυκουρονιδάση (πχ 2 mL ρυθμιστικού Sorensen και 50 μL β-γλυκουρονιδάση)⁹⁴.



Σχήμα 11

Γενικές μέθοδοι εξαγωγής φαρμάκων από τις τρίχες

6.2. Εκχύλιση των φαρμάκων

Οι παραπάνω γενικές μέθοδοι καταλήγουν σε:

- α) πλήρη διαλυτοποίηση των τριχών και στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση υγρής φάσης με διάφορους οργανικούς διαλύτες (όπως διαιθυλαιθέρα και διχλωρομεθάνιο) ή στερεάς φάσης (solid-phase extraction, SPE) σε στήλες εκχύλισης με διάφορα πληρωτικά υλικά, όπως το C18 στη κατεργασία των τριχών με διάλυμα NaOH ή με χρήση διαφόρων ενζύμων.
- β) άμεση εκχύλιση των τριχών σε στερεά φάση από τα ρυθμιστικά διαλύματα ή οργανικούς διαλύτες μέσα στους οποίους επωάζονται για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Σε μερικές περιπτώσεις το παραγόμενο διάλυμα από την κατεργασία των τριχών χρησιμοποιείται άμεσα για τον προσδιορισμό των φαρμάκων, όπως σε ορισμένες ανοσοχημικές τεχνικές.

Επίσης, η νέα τεχνική, η υπερκρίσιμου σημείου ρευστή εκχύλιση (supercritical fluid extraction, SFE)^{95,96}, παρέχει πολλές δυνατότητες στον προσδιορισμό των φαρμάκων με ασταθή δομή.

6.3. Ποσοτική μέτρηση των φαρμάκων

Οι κύριες τεχνικές ποσοτικού προσδιορισμού είναι αυτές που βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας (GC/MS) και οι ανοσοχημικές. Παράλληλα δημοσιεύτηκαν και τεχνικές διαφορετικής τεχνολογίας από τις παραπάνω, όπως: α) η χρήση φασματογραφίας υπερύθρου φωτός⁹⁷ και β) η τριχοειδής (capillary) ηλεκτροφόρηση⁹⁸.

α) Χρωματογραφικές μέθοδοι.

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι οι περισσότερο διαδεδομένες στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμάκων στις τρίχες λόγω τόσο των καλών διαχωριστικών τους ικανοτήτων, όσο και της ευαισθησίας τους. Οι κυριότερες είναι:

- i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-Layer Chromatography ή High-Performance Thin-Layer Chromatography)^{99,100}.
- ii. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)¹⁰¹⁻¹⁰⁶.

- iii. Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)^{107,108}.
- iv. Αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC/MS)^{103,105,109-117}.

β) Ανοσοχημικές μέθοδοι

Οι ανοσοχημικές τεχνικές (ΙΑ) είναι γρήγορες, εύκολες στη χρήση και μπορούν να αυτοματοποιηθούν. Μειονεκτούν όμως στη μικρή τους διαχωριστική ικανότητα, γιατί συνήθως μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο ομάδες ουσιών, όπως και στο υψηλό κόστος των αντιδραστηρίων, κυρίως όταν πρόκειται για αυτοματοποιημένες μεθόδους. Χρησιμοποιούνται κυρίως στις αναλύσεις ούρων, ενώ η χρήση τους στις αναλύσεις τριχών ακόμη ερευνάται. Στην ανάλυση τριχών οι ανοσοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι ραδιοανοσοχημικές (RIA), η ανοσοφθορισμοπολωσιμετρία (Fluorescence Polarization Immunoassay ή FPIA) κλπ.

7. Κλινικές εφαρμογές της ανάλυσης τριχών

Μέχρι τώρα οι περισσότερες μελέτες στις τρίχες εστιάζονταν σε ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος θέματα. Η εφαρμογή όμως της ανάλυσης των τριχών ήδη άρχισε να εκτιμάται σοβαρά και να παίρνει εξέχουσα θέση σε κλινικές πλέον εφαρμογές. Αυτό οφείλεται στο ότι οι συνηθισμένες μέχρι σήμερα αναλύσεις δειγμάτων ορού ή πλάσματος αίματος και ούρων μπορούν να είναι αποτελεσματικές στην ανίχνευση φαρμάκων πολύ λίγες μόνον ημέρες μετά τη χρήση των φαρμάκων.

Η ανάλυση των τριχών μπορεί να είναι χρήσιμη ειδικά στις περιπτώσεις ασθενών, όπως στους ψυχιατρικούς ασθενείς, στους οποίους είναι δύσκολο ή αδύνατο να επιβεβαιωθεί η χρήση των φαρμάκων. Δημοσιευμένες έρευνες έχουν ερευνήσει τη δυνατότητα της τμηματικής ανάλυσης των τριχών στον προσδιορισμό του φαρμακευτικού ιστορικού ασθενών με διάφορες διανοητικές ασθένειες, που βρίσκονταν σε συστηματική θεραπεία με φαινοκυκλιδίνη (phencyclidine)¹¹⁸ ή με το αντικαταθλιπτικό αμινοτριπτυλίνη (amitriptyline)¹¹⁹.

Η ρύθμιση της αντιεπιληπτικής αγωγής γίνεται κυρίως με την κλινική εξέταση του ασθενούς και τις μετρούμενες συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων στον ορό ή το πλάσμα αίματος. Όπως ήδη έχει αναφερθεί η τελευταία παράμετρος είναι επισφαλής, λόγω του ότι εξαρτάται από τη χρήση του φαρμάκου όχι μόνον από

τις λίγες προηγούμενες ημέρες αλλά και ώρες. Έχουν δημοσιευθεί μελέτες τμηματικής ανάλυσης τριχών για την επιβεβαίωση της απορρόφησης των φαρμάκων στις τρίχες με την πάροδο του χρόνου, όπως με την φαινοβαρβιτάλη¹²⁰ ή την καρβαμαζεπίνη¹²¹.

Υπάρχουν δημοσιεύσεις που επιβεβαιώνουν τη χρήση της ανάλυσης των τριχών για κλινικούς διαγνωστικούς σκοπούς, όπως π.χ. δηλητηριάσεις από αμινεπτίνη (amineptine)¹²² ή δεξτρομοραμίδη (dextromoramide)¹²³, στις οποίες δεν αναφέρθηκαν για διάφορους λόγους τα φάρμακα ή οι χρησιμοποιούμενες δόσεις από τους ασθενείς, ενώ οι αναλύσεις αίματος και ούρων δεν έδειχναν το βαθμό της δηλητηρίασης.

Στα περισσότερα προγράμματα αποτοξίνωσης ο έλεγχος της αποχής από τις διάφορες απαγορευμένες τοξικές ουσίες γίνεται συνήθως με αναλύσεις ούρων ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ειδικά σε ορισμένα προγράμματα, όπως της απεξάρτησης ηρωινομανών με τη χορήγηση μεθαδόνης (methadone), οι συνθήκες ελέγχου είναι πολύ αυστηρές η ανάλυση ούρων, για το χρονικό διάστημα (2 ως 3 ημερών) μεταξύ δύο διαδοχικών ελέγχων, κρίνεται αναποτελεσματική και απαιτείται η τμηματική ανάλυση των τριχών, ως δείκτη της συμμόρφωσης των χρηστών κατά το προηγούμενο χρονικό διάστημα^{124,125}.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η ανάλυση του ορού είναι αποτελεσματική στον προσδιορισμό της χρήσης φαρμάκων μόνο για λίγες μέρες μετά τη λήψη του δείγματος. Η συστηματική χρήση φαρμάκων δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί σε άτομο, το οποίο απέχει της χρήσης του φαρμάκου λίγες μόνο ημέρες πριν τη δειγματοληψία¹²⁶. Η ανάλυση των τριχών αποτελεί εναλλακτική μέθοδο, γιατί μπορεί να υποδείξει τη συστηματική χρήση του φαρμάκου¹²⁷. Η τρίχα συγκρατεί τις δραστικές ουσίες των φαρμάκων για μεγάλα χρονικά διαστήματα (μήνες μέχρι και χρόνια), καθιστώντας την ανάλυση της ως αξιόπιστη πηγή πολύτιμων πληροφοριών για την ποσότητα και το είδος των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων¹²⁸, όπως η αλοπεριδόλη¹²⁹, η χλωροπρομαζίνη¹³⁰, η δεξτρομοραμίδη¹²³ και άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, όπως η φαινυτοΐνη^{131,132} και η καρβαμαζεπίνη¹³³. Πρόσφατες μελέτες^{133,134} έδειξαν ότι η τμηματική ανάλυση της τρίχας υποδεικνύει την ποσότητα και το είδος των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων στο παρελθόν, ακόμη και αν έχει παρέλθει σημαντικός χρόνος με πλήρη αποχή από την χρήση.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την απόθεση των φαρμάκων στις τρίχες έχουν εκτεταμένα ερευνηθεί¹³⁵. Για παράδειγμα, έχουν μελετηθεί παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, οι διαφορές στο ρυθμό ανάπτυξης, η ανατομική περιοχή που βρίσκονται οι τρίχες, η διάχυση του φαρμάκου κατά μήκος του στελέχους της τρίχας και η επίδραση από τον συνδυασμό μεταξύ των φαρμάκων. Πέρα από αυτά όμως απαιτείται περισσότερη διασαφήνιση του θέματος.

Στην παρούσα εργασία ερευνάται η δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική χορήγηση με ορισμένα φάρμακα, τα οποία εμφανίζουν ψυχοτρόπο ή / και νευροτρόπο δράση και συγκεκριμένα της καρβαμαζεπίνης (CBZ), της φαινυτοΐνης (PHT) και του βαλπροϊκού οξέως (VPA). Επίσης, μελετάται η επίδραση των προαναφερομένων παραμέτρων στην απορρόφηση των φαρμάκων στις τρίχες.

2. Προσδιορισμός της καρβαμαζεπίνης στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν.

2.1. Εισαγωγή

Η καρβαμαζεπίνη (CBZ) είναι ένα ιμινοστιλβένιο (Σχήμα Α.1.), το οποίο χρησιμοποιείται στην θεραπεία όλων των μορφών εστιακής επιληψίας, των γενικευμένων τονικοκλονικών κρίσεων, της νευραλγίας του τριδύμου καθώς και άλλων νευραλγιών^{136,137}. Η CBZ μπορεί να φανεί χρήσιμη σε οξείες και μακροχρόνιες θεραπείες ασθενών με διάφορες ψυχικές ασθένειες, κυρίως σχιζοφρενικού χαρακτήρα, όπως και ως βοηθητικό νευροληπτικό στις σχιζοφρενικές ψυχώσεις¹³⁸. Τελικά η χρόνια χορήγηση της CBZ έχει αποδειχθεί αποτελεσματική και στη θεραπεία των εμβοών της ακοής¹³⁹. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι γνωστός, η CBZ χωρίς να επηρεάζει τη φυσιολογική ηλεκτρική δραστηριότητα των νευρώνων, καταστέλλει την υπερδραστηριότητά τους, παρεμποδίζοντας έτσι την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων. Επίσης, το προαναφερόμενο φάρμακο έχει επιδείξει χαμηλό ρυθμό εμφάνισης οξείας και χρόνιας τοξικότητας.

Η χορήγηση του φαρμάκου από το στόμα εμφανίζει γρήγορη απορρόφηση, αλλά με μεγάλη διακύμανση. Επίσης, εμφανίζει υψηλό βαθμό δέσμευσης με πρωτεΐνες. Σε συγκεντρώσεις από 5 έως 30 $\mu\text{g/mL}$ του φαρμάκου στον ορό, περίπου το 75% είναι συνδεδεμένο στις πρωτεΐνες και κυρίως στην αλβουμίνη¹⁴⁰. Ο δραστικός μεταβολίτης της CBZ είναι το CBZ-10,11-εποξείδιο, το οποίο αποτελεί στον ορό το 22% έως το 45% της ολικής συγκέντρωσης της CBZ^{141,142}. Το ελεύθερο κλάσμα της CBZ στον ορό κυμαίνεται από 8% έως 35%. Συνεπώς για τη ρύθμιση της CBZ επιβάλλεται η μέτρηση των επιπέδων του ελεύθερου κλάσματος της CBZ. Επειδή ο μεταβολισμός του φαρμάκου γίνεται κυρίως μέσω του ηπατικού οξειδωτικού ενζυμικού συστήματος, φάρμακα που ενεργοποιούν αυτό το σύστημα (όπως φαινυτοΐνη και φαινοβαρβιτάλη) αυξάνουν την ταχύτητα κάθαρσης της CBZ¹⁴³.

Τα όρια των θεραπευτικών συγκεντρώσεων της CBZ είναι από 6 έως 12 $\mu\text{g/mL}$. Η τοξικότητα της CBZ εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις στον ορό $> 15 \mu\text{g/mL}$ και χαρακτηρίζεται από συμπτώματα όπως σκοτοδίνες, πάρεση, νυσταγμός, υπνηλία, αταξία και διπλωπία. Στις αντιδράσεις του οργανισμού που εξαρτώνται από την συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό περιλαμβάνεται και το κνησμώδες εξάνθημα,

το οποίο συνήθως υποχωρεί με τη διακοπή της λήψης του φαρμάκου και διάφορες αιματολογικές κρίσεις (λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία και απλαστική αναιμία)¹⁴⁴. Η σχέση μεταξύ θεραπευτικού αποτελέσματος και επιπέδων της ελεύθερης CBZ δεν έχει με ακρίβεια αποσαφηνιστεί. Τα επίπεδα της ελεύθερης CBZ έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται από 0.88 έως 3.80 µg/mL. Ο έλεγχος των επιπέδων της ελεύθερης CBZ είναι απαραίτητος στις περιπτώσεις ασθενών με μεταβαλλόμενη ικανότητα δέσμευσης του φαρμάκου στις πρωτεΐνες, που παρουσιάζουν χαμηλή βελτίωση στον έλεγχο παροξυσμικών κρίσεων.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται για πρώτη φορά εκτενώς το θέμα της τμηματικής ανάλυσης των τριχών για τον προσδιορισμό της απορροφούμενης ποσότητας CBZ σε τρίχες ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν. Η προκαταρκτική έρευνά μας¹⁴⁵ ισχυροποίησε την υπόθεση για τη δυνατότητα χρησιμοποίησης της ανάλυσης των τριχών ως “δείκτη” του ιστορικού χρήσης της CBZ. Η μελέτη αυτή έχει σκοπό να διασαφηνίσει, όσο είναι δυνατόν, τον τρόπο χρήσης του φαρμάκου από τους ασθενείς στο παρελθόν και περιλαμβάνει ανάλυση των δεδομένων, τα οποία αποκτήθηκαν από 40 ασθενείς σε συστηματική θεραπεία με CBZ. Τέτοιες πληροφορίες θα μπορούσαν να είναι πολύτιμες στους ιατρούς στην αξιολόγηση του ιστορικού φαρμακευτικής αγωγής, ειδικά όταν το ιστορικό χρήσης είναι δύσκολο ή αδύνατον να επιβεβαιωθεί, όπως σε περιπτώσεις ψυχιατρικών και γενικά περιθωριοποιημένων ασθενών. Επίσης, η ανάλυση των τριχών μπορεί να αποβεί χρήσιμη σε διάφορες άλλες ιατροδικαστικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στην πιστοποίηση της χρόνιας χορήγησης του φαρμάκου στο δικαστήριο¹⁴⁶.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Ασθενείς και δειγματοληψία των τριχών

Συνελέγησαν δείγματα τριχών από 40 ασθενείς (22 άνδρες και 18 γυναίκες) ηλικίας 5 έως 81 ετών και με κύρια πάθηση την επιληψία. Οι παραπάνω ασθενείς ελάμβαναν CBZ για μεγάλα χρονικά διαστήματα που κυμαίνονταν από 2 μήνες έως αρκετά χρόνια. Μερικοί από αυτούς βρίσκονταν σε θεραπεία σε συνδυασμό με φαινοτοΐνη ή φαινοβαρβιτάλη, αλλά κανένας από αυτούς δεν ελάμβανε αμινοτριπτιλίνη, χλωροπρομαζίνη ιμιπραμίνη ή νορτριπτιλίνη. Τα τελευταία τέσσερα

φάρμακα εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση (cross-reactivity) με την CBZ, με την χρησιμοποίηση της ανοσοχημικής μεθόδου της Abbott, επηρεάζοντας τα επίπεδα της CBZ στο ορό του αίματος και κατά συνέπεια τα επίπεδα στις τρίχες. Τα δείγματα των τριχών κόπηκαν από το τριχωτό της κεφαλής, όσο το δυνατόν κοντύτερα στο δέρμα, λίγο πίσω από την κορυφή της κεφαλής και σε ποσότητα 200 mg περίπου. Στη συνέχεια τα δείγματα των τριχών κόπηκαν σε 2 έως και 5 τμήματα μήκους 2 cm κατά μήκος του στελέχους των τριχών, με πρώτο το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας. Ταυτόχρονα, συνελέγησαν και δείγματα αίματος των ασθενών. Τρίχες υγιών ατόμων χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό δείγμα.

2.2.2 Αντιδραστήρια και χρησιμοποιούμενα όργανα

Το πρότυπο (standard) της CBZ το προμηθευτήκαμε από την Aldrich Chem. Co. Για την προκαταρκτική εξέταση (screening) χρησιμοποιήθηκε η ανοσοχημική μέθοδος FPIA της Abbott (Fluorescence Polarization Immunoassay ή Ανοσοφθορισμοπολωσιμετρία) σε αναλυτή TDx της Abbott. Διάλυμα της CBZ σε ακετονιτρίλιο (30.0 µg/mL) χρησιμοποιήθηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό της CBZ στα πειράματα ανάκτησης και στον προσδιορισμό της καμπύλης μέτρησης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Η μέθοδος HPLC εφαρμόστηκε σε ένα όργανο της Spectra-Physics (SP8810) σε συνδυασμό με ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS (SP8450) και ένα καταγραφικό της Hewlett-Packard (HP3396A). Τα διαλύματα και τα άλλα χημικά ήταν αναλυτικώς χημικής καθαρότητας. Τα δείγματα των ορών αίματος αναλύθηκαν με την μέθοδο FPIA της Abbott στον αναλυτή TDx και HPLC.

2.2.3 Προετοιμασία των τριχών και FPIA ανάλυση

Διαλυτοποίηση των τριχών: Σε τμήματα των δειγμάτων τριχών μήκους 2 cm και ποσότητας από 30 έως 50 mg, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κωνικά σωληνάρια, προσετέθησαν 3 mL διαλύματος NaOH 1N, θερμάνθηκαν για 1 ώρα στους 100 °C, αναδεύτηκαν με vortex και ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκαν 5 mL διαιθυλαιθέρα σε κάθε σωληνάριο, αναδεύτηκαν με vortex για 3 min και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min σε 3000 στροφές / min. Στη συνέχεια η οργανική φάση (υπερκεείμενη) αποχωρίστηκε σε νέα σωληνάρια. Το διάλυμα εξατμίσθηκε, ενώ

το ίζημα που απέμεινε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 μL φυσιολογικού ορού (0.9 % NaCl). Η CBZ μετρήθηκε με την μέθοδο FPIA στον αναλυτή TDx της Abbott.

Η ανάλυση των δειγμάτων τριχών των ασθενών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο στην ίδια σειρά με “τυφλά” δείγματα τριχών, τα οποία είχαν φορτιστεί με συγκεκριμένες ποσότητες της CBZ (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 μg) από ένα πρότυπο διάλυμα αυτής (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Τα επίπεδα της CBZ στις τρίχες των ασθενών προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης, που προερχόταν από τα φορτισμένα “πρότυπα” δείγματα τριχών.

2.2.4 HPLC ανάλυση

Η ανάλυση των τριχών με τη μέθοδο HPLC πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση της περιγραφόμενης μεθόδου προετοιμασίας. Εν συντομία, μια νέα σειρά με δείγματα “καθαρών” τριχών φορτισμένα με πρότυπα διαλύματα της CBZ και δείγματα τριχών ασθενών υποβλήθηκαν σε κατεργασία όπως και παραπάνω. Εκχύλισμα του φαρμάκου από τις τρίχες σε φυσιολογικό ορό όγκου 50 μL εισήχθη σε ένα σύστημα της Spectra-Physics. Το μήκος κύματος ρυθμίστηκε στα 220 nm και η ταχύτητα ροής σε 2.0 mL/min (θερμοκρασία περιβάλλοντος: 25-28 $^{\circ}\text{C}$). Χρησιμοποιήθηκε μια στήλη S5 ODS2 (10 cm \pm 4.6 cm) της SPHERISORB. Η κινούμενη φάση ήταν ένα μείγμα ακετονιτριλίου (20%) και νερού (80%). Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα διάλυμα φλουνιτραζεπάμης σε ακετονιτρίλιο (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Κάτω από τις συνθήκες της HPLC, που περιγράφονται, επιτεύχθηκε ένας καλός διαχωρισμός μεταξύ καρβαμαζεπίνης και φλουνιτραζεπάμης σε ένα control ορού αίματος¹³³. Το Σχήμα A.1. δίνει περισσότερες πληροφορίες για την μέθοδο HPLC.

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς δημιουργήθηκαν ως εξής : σε δείγματα τριχών από άτομα που δε βρίσκονταν σε φαρμακευτική θεραπεία (“τυφλά δείγματα”) προστέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητες της CBZ (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 και 10.0 μg), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ένα διάλυμα της CBZ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε ακετονιτρίλιο και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα άγνωστα δείγματα. Τα επίπεδα της CBZ στις τρίχες των ασθενών προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς, που προερχόταν από τα έξι standards, τα οποία αναλύθηκαν σε ταυτόχρονη διαδικασία επεξεργασίας δείγματος και ανάλυσης.

2.2.5 Στατιστικές μέθοδοι

Τα δεδομένα από τα πειράματα ανάκτησης της CBZ και οι συγκεντρώσεις της από τις αναλύσεις τριχών και αίματος παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm την σταθερά απόκλισης (mean \pm SD), με τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις, όσον αφορά στις ανακτήσεις της CBZ και με δύο, όσον αφορά στις αναλύσεις των δειγμάτων τριχών.

Οι CBZ συγκεντρώσεις των τριχών του κάθε ασθενή για την εξαγωγή στατιστικών αποτελεσμάτων αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου σε όλα τα τεμάχια του αντίστοιχου δείγματος τριχών. Επίσης, οι χορηγούμενες δόσεις της CBZ αντιπροσωπεύονται από τις μέσες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στα τεμάχια όλων των ασθενών, στους οποίους χορηγούνταν οι αντίστοιχες δόσεις. Οι κατηγορίες χρώματος τριχών αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των αντίστοιχων χορηγούμενων δόσεων της CBZ ή από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της CBZ στα δείγματα τριχών των ασθενών, με το αντίστοιχο χρώμα τριχών και για τις δύο μεθόδους. Οι περιοχές των τιμών που αφορούν τη διάρκεια χορήγησης της CBZ ή την ηλικία των χρησιμοποιούμενων ασθενών αντιπροσωπεύονται από τις αντίστοιχες μέσες τιμές των χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου ή των συγκεντρώσεων του στα δείγματα τριχών των ασθενών, που αναφέρονται στο εύρος των περιοχών αυτών.

Η ανάλυση των διακυμάνσεων μιας παραμέτρου (One Way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση των διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων της CBZ, που προέρχονταν από τα δείγματα τριχών: α) μεταξύ ανδρών και γυναικών, β) μεταξύ των χρησιμοποιούμενων τεχνικών (FPIA και HPLC), γ) μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν σε θεραπεία μόνο με την CBZ και αυτών που βρίσκονταν σε συνδυαστική θεραπεία της CBZ με άλλα φάρμακα. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε στη συσχέτιση των αντίστοιχων διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στα δείγματα τριχών και αίματος, όπως και μεταξύ των χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου, του χρώματος των τριχών, της ηλικίας των ασθενών ή της διάρκειας χορήγησης και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων του φαρμάκου στα δείγματα τριχών των ασθενών. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το F-test για τη σύγκριση των διακυμάνσεων

μεταξύ προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων της CBZ στα πειράματα ανάκτησης. Η τιμή της πιθανότητας P για μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές ορίστηκε ως > 0.05 , ενώ η τιμή στατιστικής βεβαιότητας p ως ≤ 0.05 .

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (Limit of detection, L.o.d) για τις δύο τεχνικές όπως και οι άλλες στατιστικές παράμετροι και test της εργασίας υπολογίστηκαν με τη χρήση εξισώσεων από το βιβλίο των J.C. Miller et. al.¹⁴⁷ και το στατιστικό λογισμικό Excel 97 της Microsoft.

2.3. Πειράματα ανάκτησης της CBZ

Η απόδοση (% ανάκτηση) και το κατώτερο όριο ανίχνευσης (L.o.d.) της μεθόδου προετοιμασίας των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τα πειράματα ανάκτησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις φορές, με προσθήκη σταθερών ποσοτήτων της CBZ πριν τη διαλυτοποίηση των τριχών. Σε “τυφλά” δείγματα τριχών, βάρους 30 έως 50 mg, προστέθηκαν σταθερές ποσότητες (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, και 2.5 μg) της CBZ, από ένα πρότυπο διάλυμα της CBZ συγκέντρωσης 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Έπειτα η ανάκτηση του φαρμάκου προσδιορίστηκε με χρήση των μεθόδων που περιγράφηκαν (FPIA και HPLC).

2.4. Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σειρές των τεσσάρων “τυφλών” δειγμάτων καθαρών τριχών, βάρους 30 έως 50 mg, με προσθήκη ανά δείγμα 3 mL διαλύματος της CBZ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε φωσφορικό ρυθμιστικό ($\text{pH} = 5.6$). Ακολούθησε επώαση των τριχών σε θερμοκρασία δωματίου (25-28 $^{\circ}\text{C}$) και για χρονική διάρκεια 4 h ως 240 h (όπως φαίνεται στον Πίνακα A.2.). Στη συνέχεια τα επεξεργασμένα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και απομακρύνθηκε το ρυθμιστικό. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις των τριχών σε 3 mL μεθανόλης και τρεις φορές με 3mL νερού. Έπειτα έγινε ο προσδιορισμός των προσροφηθέντων ποσοτήτων της CBZ με τις μεθόδους διαλυτοποίησης και μέτρησης (FPIA, HPLC), που προαναφέρθηκαν.

2.5. Αποτελέσματα.

2.5.1 Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης της CBZ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης από τη χρήση των FPIA και HPLC μεθόδων παρουσιάζονται στον Πίνακα Α.1. (αναφέρονται μέσες τιμές από τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων απέδωσε σταθερές διακύμανσης (CV) χαμηλότερες από 9%. Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και οι ποσοστιαίες ανακτήσεις από τα πειράματα ήταν:

α) για την FPIA: $y = 0.767 x - 0.138$ ($r = 0.995$, $p < 0.001$) και ανάκτηση $64 \% \pm 8 \%$.

β) για την HPLC: $y = 0.798 x - 0.187$ ($r = 0.997$, $p < 0.001$) και ανάκτηση $64 \% \pm 10 \%$.

Οι διακυμάνσεις των προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων της CBZ δε διαφέρουν σημαντικά (F-test, FPIA: $F=1.685$, $df=4$, $P=0.313$ και HPLC: $F=1.560$, $df=4$, $P=0.338$). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (L.o.d.) για τις παραπάνω μεθόδους προσδιορίστηκε για την FPIA ως $0.50 \mu\text{g/g}$ και για την HPLC ως $0.51 \mu\text{g/g}$.

2.5.2 Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης της CBZ στις τρίχες

Τα πειραματικά δεδομένα της εξωτερικής απορρόφησης του φαρμάκου αναφέρονται στον Πίνακα Α.2. Η απορρόφηση του φαρμάκου άρχισε στις 8h επώασης και συνεχίστηκε μέχρι και στις 48h (Σχήμα Α.2.). Η μέγιστη μέση συγκέντρωση της CBZ που βρέθηκε στις τρίχες ήταν $3.67 \pm 0.32 \mu\text{g/g}$ και $3.96 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$, αντιστοίχως για τις δύο μεθόδους FPIA και HPLC. Οι σταθερές διακύμανσης (CV) βρέθηκαν μικρότερες του 9% και για τις δύο μεθόδους.

2.5.3. Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών ασθενών

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και τα επίπεδα της CBZ στο ορό του αίματος εμφανίζονται στους Πίνακες Α.3. και Α.4., αντιστοίχως για τις γυναίκες και τους άνδρες. Οι τιμές που αναφέρονται στον ορό του αίματος αποτελούν τις μέσες τιμές τεσσάρων διαφορετικών μετρήσεων και για τις δύο τεχνικές FPIA και HPLC. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των τριχών από τους ασθενείς με τις δύο τεχνικές εμφανίζονται στους Πίνακες Α.5. και Α.6. για τις γυναίκες και στους Πίνακες Α.8. και Α.9. για τους άνδρες (είναι οι μέσες τιμές από δύο διαφορετικές μετρήσεις μετά από επανάληψη όλης της διαδικασίας). Επίσης, στους παραπάνω πίνακες εμφανίζονται και οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της CBZ σε όλα τα τεμάχια τριχών ανά άτομο και μέθοδο.

Στον Πίνακα A.11. εμφανίζονται ορισμένες παράμετροι της στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών αποτελεσμάτων και με τις δύο μεθόδους. Οι μέσες τιμές των επιπέδων της CBZ στις τρίχες από το 1ο τεμάχιο (το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας) μέχρι και το 5ο τεμάχιο για τις γυναίκες ασθενείς ήταν αντιστοίχως 26.82, 19.18, 17.28, 15.09 και 14.62 $\mu\text{g/g}$. σύμφωνα με τις HPLC μετρήσεις. Η ανοσοχημική μέθοδος έδωσε ελαφρώς υψηλότερα αποτελέσματα. Οι μέσες τιμές των επιπέδων της CBZ στα τεμάχια των τριχών σύμφωνα με την ανοσοχημική τεχνική ήταν 30.53, 21.90, 19.83, 17.45 και 16.99 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως με το 1ο έως το 5ο τεμάχιο. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές για τους άνδρες ασθενείς με την HPLC και την ανοσοχημική τεχνική ήταν 21.97, 17.30, 15.03, 13.02, 11.21 $\mu\text{g/g}$ και 25.98, 20.52, 17.15, 14.87, 12.31 $\mu\text{g/g}$.

Οι μέσες τιμές των επιπέδων της CBZ στις τρίχες των ασθενών ως σύνολο από το 1ο τεμάχιο (το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας) μέχρι και το 5ο είναι 28.03, 21.14, 18.37, 16.51, 15.35 $\mu\text{g/g}$ και 24.15, 18.15, 16.05, 14.34, 13.43 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως με τις FPIA και HPLC τεχνικές (Πίνακας A.11.).

Στους Πίνακες A.7. και A.10 εμφανίζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων της CBZ μεταξύ 1ου και 2ου ή 1ου και 3ου τεμαχίου τριχών για γυναίκες και άνδρες αντιστοίχως. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές \pm SD των μεταβολών στις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που αντιστοιχούν στους προηγούμενους 2 έως 4 με 5 μήνες ή στους προηγούμενους 2 έως 6 με 7 μήνες, για το σύνολο των δειγμάτων είναι: α) για την FPIA τεχνική: 23.85% \pm 15.07% (n = 40) και 34.31% \pm 9.60% (n = 33) και β) για την HPLC τεχνική: 24.27% \pm 15.25% (n = 40) και 33.98% \pm 7.90% (n = 33). Στις περιπτώσεις των ασθενών με Νο 1, 10, 11 και 40, οι οποίοι είχαν μικρή χρονική διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου (2 ή 3 μήνες), οι αντίστοιχες μεταβολές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου μεταξύ του 1ου και 2ου τεμαχίου και για τις δύο τεχνικές κυμαίνονταν από 65.24% μέχρι 70.99%. Αναλυτικότερα στοιχεία εμφανίζονται στον Πίνακα A.11.

Οι συντελεστές συσχέτισης των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της CBZ στα δείγματα μεταξύ των δύο μεθόδων FPIA και HPLC είναι υψηλοί (γυναίκες: $r=0.973$, $p<0.001$ και άνδρες: $r=0.985$, $p<0.001$), όπως φαίνεται στο Σχήμα A.3. Οι αντίστοιχες διακυμάνσεις των παραπάνω μέσων τιμών ανάμεσα στις δύο μεθόδους

διαφέρουν σημαντικά τόσο για τις γυναίκες ($F=15.580$, $df=18$, $P<0.05$) όσο και για τους άνδρες ($F=14.606$, $df=21$, $P<0.05$).

Οι διαφορές των διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων CBZ των τεμαχίων τριχών από το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας μέχρι το μακρύτερο είναι σημαντικές και για τις δύο μεθόδους (για FPIA / γυναίκες: $F=8.780$, $df=4$, $P<0.05$, άνδρες: $F=7.734$, $df=4$, $P<0,05$ και για HPLC / γυναίκες: $F=8.522$, $df=4$, $P<0.05$, άνδρες: $F=7.740$, $df=4$, $P<0.05$).

Οι διαφορές των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων CBZ, που σχετίζονται με τις ημερήσιες δόσεις και των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων CBZ στις τρίχες των ατόμων που ελάμβαναν τις αντίστοιχες δόσεις του φαρμάκου (Πίνακας Α.12.) διαφέρουν σημαντικά (FPIA: $F=2.925$, $df=39$, $P<0.05$ και HPLC: $F=2.945$, $df=39$, $P<0.05$). Οι αντίστοιχες εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης υπολογίστηκαν για την FPIA ως $y = 0.018 x + 10.542$ ($r=0.889$, $p<0.01$) και για την HPLC ως $y = 0.015 x + 9.476$ ($r=0.879$, $p<0.01$), όπως φαίνονται γραφικά στο Σχήμα Α.4. Από την άλλη πλευρά όμως οι διακυμάνσεις, μεταξύ των μέσων τιμών των CBZ συγκεντρώσεων στις τρίχες των ατόμων με την ίδια χορηγούμενη ημερήσια δόση, δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, ενώ έδωσαν ακριβώς τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους, την FPIA και HPLC, όπως φαίνεται παρακάτω:

α) 200 mg/24h: $F=1.500$, $df=2$, $P=0.354$, β) 300 mg/24h: $F=2.000$, $df=1$, $P=0.293$,
γ) 400 mg/24h: $F=1.071$, $df=14$, $P=0.446$, δ) 500 mg/24h: $F=2.000$, $df=1$, $P=0.293$,
ε) 600 mg/24h: $F=1.100$, $df=10$, $P=0.436$, στ) 800 mg/24h: $F=1.333$, $df=3$, $P=0.381$
και ζ) 1000mg/24h: $F=1.500$, $df=2$, $P=0.354$.

Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες που να σχετίζονται με το φύλο (FPIA: $F=1.739$, $df=38$, $P=0.547$ και HPLC: $F=1.189$, $df=38$, $P=0.635$). Το ίδιο συμβαίνει με τις μέσες τιμές της CBZ στις τρίχες ανάμεσα στα άτομα που χορηγείται μόνο η CBZ και σε αυτά που ακολουθούν συνδυαστική θεραπεία και με άλλα φάρμακα (FPIA: $F=7.693$, $df=38$, $P=0.280$ και HPLC: $F=9.635$, $df=38$, $P=0.251$).

Στα Σχήματα Α.5. και Α.6. εμφανίζονται τα “προφίλ”, δηλαδή οι γραμμικές συσχετίσεις χρόνου και συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες μερικών γυναικών και ανδρών αντιστοίχως, στους οποίους χορηγούνταν συστηματικά το φάρμακο.

Στους Πίνακες A.13, A.14. και A.15. εμφανίζονται οι ποσοστιαίες συχνότητες, οι μέσες τιμές των χορηγούμενων ημερησίως δόσεων και οι μέσες τιμές της CBZ στις τρίχες αντίστοιχες του χρώματος των τριχών, της διάρκειας χορήγησης του φαρμάκου και της ηλικίας των ασθενών.

Οι διαφορές μεταξύ των τιμών των χορηγούμενων δόσεων που αντιστοιχούν σε χρώματα των τριχών είναι στατιστικώς σημαντικές ($F=2.030$, $df=39$, $P=0.014$). Η συσχέτιση των διακυμάνσεων των μέσων τιμών με FPIA και HPLC σε σχέση με το χρώμα των τριχών δεν έδωσε στατιστικώς σημαντικές διαφορές (FPIA: $F=1.618$, $df=39$, $P=0.067$ και HPLC : $F=1.348$, $df=39$, $P=0.176$). Στα σχήματα A.7. και A.8. εμφανίζονται οι γραφικές απεικονίσεις (box plot) των μέσων τιμών της CBZ στις τρίχες σε σχέση με το χρώμα των τριχών για τις μεθόδους FPIA και HPLC αντιστοίχως.

Οι διαφορές των μέσων τιμών και για τις δύο τεχνικές σε σχέση με τη διάρκεια χορήγησης δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (FPIA: $F=1.549$, $df=39$, $P=0,086$ και HPLC: $F=1.527$, $df=39$, $P= 0,093$). Οι αντίστοιχες μέσες τιμές της CBZ σε σχέση με την ηλικία διαφέρουν σημαντικά και για τις δύο μεθόδους (FPIA: $F=2.793$, $df=39$, $P<0.05$ και HPLC: $F=3.361$, $df=39$, $P<0.05$). Το ίδιο συμβαίνει με τις μέσες τιμές των χορηγούμενων δόσεων της CBZ σε σχέση με την ηλικία ($F=4.513$, $df=39$, $P<0.05$). Στα Σχήματα A.9. και A.10. εμφανίζονται οι γραφικές συσχετίσεις των μέσων τιμών της CBZ στις τρίχες και των μέσων ημερήσιων δόσεων της CBZ σε σχέση με την ηλικία των ατόμων που ελάμβαναν συστηματικά την CBZ με τις μεθόδους FPIA και HPLC αντιστοίχως.

Η συσχέτιση των μέσων τιμών της CBZ στις τρίχες και τα αντίστοιχα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα έδειξε σημαντικές διαφορές και με τις δύο μεθόδους (FPIA: $F=4.360$, $df=40$, $P<0.05$ και HPLC: $F=4.002$, $df=40$, $P<0.05$).

3. Προσδιορισμός της φαινοτοΐνης στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν.

3.1. Εισαγωγή

Η φαινοτοΐνη (PHT) αποτελεί ένα διφαινολικό παράγωγο της υδαντοΐνης (Σχήμα Β.1.) και είναι το σημαντικότερο αντιπαροξυσμικό φάρμακο στη θεραπεία της πρωτογενούς ή της δευτερογενούς γενικευμένης τονικοκλονικής επιληψίας. Η δράση της είναι σημαντική στη θεραπεία του στοιχειώδους εστιακού ή του σύνθετου εστιακού (ψυχοκινητικού ή ακουστικού πόρου) επιληπτικού παροξυσμού¹⁴⁸. Το φάρμακο δεν είναι αποτελεσματικό στην ελάσσονα (petit mal) επιληψία, ενώ ενδείκνυται για τον έλεγχο του status epilepticus της μείζονος επιληψίας¹⁴⁹. Επίσης, το φάρμακο έχει χρησιμοποιηθεί ως καρδιακό αντιαρρυθμικό.

Η κύρια περιοχή δράσης του φαρμάκου είναι ο κινητικός φλοιός, όπου αναστέλλεται η επέκταση του επιληπτικού παροξυσμού. Πιθανώς με την αύξηση της έκκλησης νατρίου από τους νευρώνες, η φαινοτοΐνη τείνει να σταθεροποιήσει ή να μπλοκάρει την υπερδιεγερσιμότητα, που προκαλείται από τη μείωση του νατρίου της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω υπερβολικού ερεθισμού ή από τοπικές διαταραχές. Η αύξηση του νατρίου συνεπάγεται μείωση δυναμικού στις συνάψεις, η οποία προφυλάσσει από την εμφάνιση εστιακών παροξυσμών του φλοιού, προερχόμενων από τη διέγερση παρακείμενων φλοιωδών περιοχών. Επίσης, η φαινοτοΐνη μειώνει τη μέγιστη δραστηριότητα των κέντρων του εγκεφαλικού στελέχους, που ευθύνονται για την τονική φάση των επιληπτικών παροξυσμών.

Κλινικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η καταλληλότερη θεραπευτική συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα για αποτελεσματικότερο έλεγχο των παροξυσμών είναι 10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁵⁰, ενώ εκείνη του ελεύθερου φαρμάκου είναι 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Το φάρμακο εμφανίζει υψηλή δεσμευτικότητα στις αλβουμίνες (90-95%) και μεταβολίζεται μέσω του ηπατικού οξειδωτικού ενζυμικού συστήματος. Ο κυριότερος μεταβολίτης είναι η 5-(p-υδροξυφαινυλο)-5-φαινυλο-υδαντοΐνη, γνωστή και ως HPPH, η οποία αποβάλλεται στα ούρα κυρίως ως εστέρας του γλυκουρονιδίου^{151,144}.

Η δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα του φαρμάκου επέρχεται με την υπέρβαση των συγκεντρώσεων του ορού αίματος πολύ πάνω από το όριο των 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Έχουν

αναφερθεί διάφορα συμπτώματα όπως νυσταγμός, αταξία, διπλωπία, δυσαρθρία, τρόμος, ζάλη, μειωμένος συντονισμός και σύγχυση. Επίσης, αναφέρθηκαν περιπτώσεις υπασβεστιαμίας, οστεομαλάκυνσης, εμφάνιση ερυθριματωδών εξανθημάτων, ανοσολογικές διαταραχές και σπανιότερα ηπατίτιδα^{151,152}.

Υπάρχει ένας αριθμός φαρμάκων που αλληλεπιδρά με τη διαθεσιμότητα της ΡΗΤ στο αίμα. Για παράδειγμα, το αλκοόλ, τα βαρβιτουρικά και η καρβαμαζεπίνη, αυξάνουν την δράση των οξειδωτικών ηπατικών ενζύμων¹⁴⁴. Αυτό έχει αποτέλεσμα την αύξηση του μεταβολισμού της ΡΗΤ, με συνέπεια την μείωση των συγκεντρώσεων τόσο της ολικής όσο και της ελεύθερης ΡΗΤ στο αίμα, άρα και τη μείωση της φαρμακολογικής δράσης της. Φάρμακα όπως η χλωραμφαινικόλη, η δισουλφιράμη, η ισονιαζίδη, η διαζεπάμη, τα κουμαρινικά αντιπηκτικά, η σιμετιδίνη, οι σουλφοναμίδες, τα σαλικυλικά και η φαίνυλοβουταζόνη ενισχύουν τη δράση της¹⁴⁴.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη δημοσίευση με θέμα την τμηματική ανάλυση των τριχών για τον προσδιορισμό της απορρόφησης της ΡΗΤ σε τρίχες ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτήν. Η προκαταρκτική δημοσίευσή μας¹⁵³, ισχυροποίησε τη δυνατότητα χρήσης της τμηματικής ανάλυσης των τριχών, ως “δείκτη” του ιστορικού χρήσης της ΡΗΤ. Η μελέτη αυτή έχει σκοπό να διασαφηνίσει όσο είναι δυνατόν τον τρόπο χρήσης του φαρμάκου στο παρελθόν, δηλαδή από μήνα σε μήνα και περιλαμβάνει ανάλυση των δεδομένων, τα οποία αποκτήθηκαν από 60 ασθενείς σε συστηματική θεραπεία με ΡΗΤ.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Ασθενείς και δειγματοληψία των τριχών

Τα δείγματα τριχών που συνελέγησαν αφορούν 60 ασθενείς (34 άνδρες και 26 γυναίκες) ηλικίας 5 έως 69 ετών και με κύρια πάθηση την επιληψία. Οι παραπάνω ασθενείς ελάμβαναν τη ΡΗΤ για μεγάλα χρονικά διαστήματα, που κυμαίνονταν από 2 μήνες έως αρκετά χρόνια. Μερικοί από αυτούς βρίσκονταν σε θεραπεία σε συνδυασμό με καρβαμαζεπίνη, φαινοβαρβιτάλη ή οξκαρβαμαζεπίνη. Τα δείγματα των τριχών ελήφθησαν από το τριχωτό της κεφαλής, όσο το δυνατόν κοντύτερα στο δέρμα, λίγο πίσω από την κορυφή της κεφαλής και σε ποσότητα 200 mg περίπου. Στη συνέχεια τα δείγματα των τριχών κόπηκαν σε 2 έως και 5 τμήματα μήκους 1 cm κατά μήκος του

στελέχους των τριχών με πρώτο το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας. Ταυτόχρονα, συνελέγησαν και δείγματα αίματος των ασθενών. Τρίχες υγιών ατόμων χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό δείγμα.

3.2.2 Αντιδραστήρια και χρήση οργάνων

Το πρότυπο (standard) της PHT προμηθευτήκαμε από τη SIGMA Chemical Company. Διάλυμα της PHT σε ακετονιτρίλιο (40.0 µg/mL) χρησιμοποιήθηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό της PHT στα πειράματα ανάκτησης και εξωτερικής απορρόφησης, καθώς και στον προσδιορισμό της καμπύλης μέτρησης στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε η ανοσοχημική μέθοδος FPIA της Abbott (Ανοσοφθορισμοπολωσιμετρία ή Fluorescence Polarization Immunoassay) σε αναλυτή TDx της Abbott. Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) εφαρμόστηκε σε ένα όργανο της Spectra-Physics (SP8810) σε συνδυασμό με ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS (SP8450) και ένα καταγραφικό της Hewlett-Packard (HP3396A). Τα διαλύματα και τα άλλα χημικά αγοράστηκαν από το εμπόριο. Τα δείγματα των ορών αίματος αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους FPIA και HPLC.

3.2.3 Προετοιμασία των τριχών και FPIA ανάλυση

Πλύσιμο των τριχών: Τα δείγματα των τριχών πλύθηκαν δύο φορές με 3mL φωσφορικού ρυθμιστικού (pH \cong 6) αναδεύτηκαν με vortex για 1min περίπου και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min. Το φωσφορικό ρυθμιστικό μεταγγίστηκε στη συνέχεια σε δύο νέα σωληνάρια και αναλύθηκε για πιθανή ύπαρξη σε αυτά ποσότητας της PHT με τη μέθοδο FPIA.. Δε σημειώθηκε ανιχνεύσιμη ποσότητα της PHT σε κανένα από τα παραπάνω διαλύματα.

Διαλυτοποίηση των τριχών: Σε τμήματα των δειγμάτων τριχών μήκους 1 cm και ποσότητας από 20 έως 50 mg τα οποία τοποθετήθηκαν σε κωνικά σωληνάρια, προστέθηκαν 3 mL διαλύματος NaOH 1N, θερμάνθηκαν για 1 ώρα στους 100 °C, αναδεύτηκαν με vortex και ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε ρύθμιση του pH \cong 9 με την προσθήκη διαλύματος HCl 6N. Έπειτα προστέθηκαν 5 mL διαιθυλαιθέρα σε κάθε σωληνάριο, αναδεύτηκαν με vortex για 3 min και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min με 3000 στροφές / min. Στη συνέχεια η οργανική φάση (υπερκεείμενη) μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια. Το διάλυμα εξατμίστηκε, ενώ το

ίζημα που απόμεινε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 μL φυσιολογικού ορού (0.9% NaCl). Η φαινοτοΐνη μετρήθηκε με τη μέθοδο FPIA στον αναλυτή TDx της Abbott¹⁵³.

Η ανάλυση των δειγμάτων τριχών των ασθενών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο στην ίδια σειρά με τυφλά (καθαρά) δείγματα τριχών, τα οποία είχαν εμποτιστεί με συγκεκριμένες ποσότητες της PHT (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 20.0 μg) χρησιμοποιώντας ως standard ένα διάλυμα της PHT 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα επίπεδα της PHT στις τρίχες των ασθενών προσδιορίστηκαν από μία καμπύλη αναφοράς, προερχόμενη από τα έξι standards στην ίδια σειρά.

3.2.4 HPLC ανάλυση

Η ανάλυση των τριχών με τη μέθοδο HPLC πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση της περιγραφόμενης μεθόδου προετοιμασίας. Εν συντομία, μια νέα σειρά με δείγματα “καθαρών” τριχών εμποτισμένα με standards της PHT και δείγματα τριχών ασθενών κατεργάστηκαν όπως και παραπάνω. Εκχύλισμα του φαρμάκου από τις τρίχες σε φυσιολογικό ορό όγκου 50 μL εισήχθη σε ένα σύστημα της Spectra-Physics. Το μήκος κύματος ρυθμίστηκε στα 220 nm και η ταχύτητα ροής σε 2.0 mL/min (θερμοκρασία περιβάλλοντος: 25-28 $^{\circ}\text{C}$). Χρησιμοποιήθηκε μια στήλη S50DS2 (10 cm \pm 4.6 cm) της SPHERISORB. Η κινούμενη φάση ήταν ένα μείγμα ακετονιτριλίου (20%) και νερού (80%). Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα διάλυμα φλουνιτραζεπάμης σε ακετονιτρίλιο (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες της HPLC επιτεύχθηκε ένας καλός διαχωρισμός μεταξύ φαινοτοΐνης και φλουνιτραζεπάμης σε ένα control ορού αίματος¹³³. Το Σχήμα Β.1. δίνει περισσότερες πληροφορίες για την HPLC μέθοδο.

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης δημιουργήθηκαν ως εξής : σε τυφλά δείγματα τριχών προστέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητες της PHT (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 και 20.0 μg), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ένα διάλυμα της PHT 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα άγνωστα δείγματα. Τα επίπεδα της PHT στις τρίχες των ασθενών προσδιορίστηκαν από μία καμπύλη βαθμονόμησης προερχόμενη από τα έξι standards στην ίδια σειρά.

3.2.5 Στατιστικές μέθοδοι

Οι τιμές των συγκεντρώσεων της PHT στις τρίχες του κάθε ασθενή αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου σε όλα τα τεμάχια του αντίστοιχου δείγματος τριχών. Ομοίως, οι κατηγορίες χρωμάτων τριχών αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των αντίστοιχων χορηγούμενων δόσεων της PHT ή από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της PHT στα δείγματα τριχών των ασθενών, με το αντίστοιχο χρώμα τριχών και για τις δύο μεθόδους. Οι χορηγούμενες δόσεις της PHT αντιπροσωπεύονται από τις μέσες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στα τεμάχια όλων των ασθενών, στους οποίους χορηγούνταν οι αντίστοιχες δόσεις. Επίσης, οι περιοχές των τιμών, που αφορούν την διάρκεια χορήγησης της PHT ή την ηλικία των ασθενών που τους χορηγήθηκε συστηματικά, αντιπροσωπεύονται από τις αντίστοιχες μέσες τιμές των χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου ή των συγκεντρώσεών του στα δείγματα τριχών των ασθενών που αναφέρονται στο εύρος των περιοχών αυτών. Τα δεδομένα από τα πειράματα ανάκτησης της PHT και οι συγκεντρώσεις της από τις αναλύσεις τριχών και αίματος παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm την σταθερά απόκλισης (mean \pm SD) με τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις, όσον αφορά τις ανακτήσεις της PHT και με δύο όσον αφορά τις αναλύσεις των δειγμάτων τριχών.

Η ανάλυση των διακυμάνσεων μιας παραμέτρου (One Way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση των διακυμάνσεων των δεδομένων: α) μεταξύ των πλησιέστερων έως και των ακραίων τεμαχίων τριχών που προέρχονταν από άνδρες και γυναίκες, β) μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν σε θεραπεία μόνο με την PHT και αυτών με ιστορικό πολυφαρμακίας και γ) μεταξύ της ανάλυσης των τριχών και της αντίστοιχης του αίματος. Ομοίως, η παραπάνω στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στη συσχέτιση των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών της PHT στις τρίχες σε σχέση με τις δύο τεχνικές (FPIA και HPLC) και με τις αντίστοιχες ημερήσιες δόσεις. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ανάμεσα στις μέσες τιμές της PHT στις τρίχες ή στις μέσες τιμές των ημερήσιων δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με το χρώμα των τριχών, τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου, το φύλο και την ηλικία των ασθενών. Χρησιμοποιήθηκε ακόμη το F-test για τη σύγκριση των διακυμάνσεων μεταξύ προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων της PHT στα πειράματα ανάκτησης. Η τιμή της πιθανότητας P, που χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω ανάλυση, για μη στατιστικώς

σημαντικές διαφορές (δηλ. $F \leq F_{\text{κριτ.}}$) ορίστηκε ως > 0.05 , ενώ η τιμή στατιστικής βεβαιότητας p ως ≤ 0.05 .

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (Limit of detection, L.o.d) για τις δύο τεχνικές, όπως και οι άλλες στατιστικές παράμετροι και test της εργασίας υπολογίστηκαν με τη χρησιμοποίηση εξισώσεων από το βιβλίο των J.C. Miller et. al.¹⁴⁷ και το στατιστικό λογισμικό Excel 97 της Microsoft.

3.3 Πειράματα ανάκτησης

Η απόδοση και το κατώτερο όριο προσδιορισμού (Limit of detection ή L.o.d.) της μεθόδου προετοιμασίας των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τα πειράματα ανάκτησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σειρές των τεσσάρων δειγμάτων, με την προσθήκη σταθερών ποσοτήτων της ΡΗΤ πριν την διαλυτοποίηση των τριχών. Σε καθαρές τρίχες βάρους 20 έως 50 mg προστέθηκαν σταθερές ποσότητες ανά σειρά δειγμάτων (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 μg) της ΡΗΤ από ένα πρότυπο διάλυμα της ΡΗΤ συγκέντρωσης 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Έπειτα προσδιορίστηκε η ανάκτηση του φαρμάκου με τη χρησιμοποίηση των παραπάνω μεθόδων.

3.4. Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σειρές των τεσσάρων δειγμάτων καθαρών τριχών στα οποία προστέθηκαν ανά δείγμα 3 mL διαλύματος της ΡΗΤ σε φωσφορικό ρυθμιστικό ($\text{pH} = 6$) συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ακολούθησε επώαση των τριχών σε θερμοκρασία δωματίου (25 - 28 $^{\circ}\text{C}$) και για χρονική διάρκεια 2 h ως και 10 ημερών ή 240 h (όπως φαίνεται στον Πίνακα II). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και απομακρύνθηκε το ρυθμιστικό. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις (ανάδευση, φυγοκέντριση και αποχωρισμός του υπερκείμενου) των τριχών σε 3 mL μεθανόλης και τρεις φορές με 3mL νερού, ώστε να απομακρυνθεί η πλεονάζουσα ποσότητα του φαρμάκου. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των προσροφούμενων ποσοτήτων της ΡΗΤ με την παραπάνω μέθοδο διαλυτοποίησης και τις δύο μεθόδους μέτρησης FPIA και HPLC.

3.5. Αποτελέσματα

3.5.1. Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης της ΡΗΤ.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανάκτησης, με τις FPIA και HPLC μεθόδους παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.1. (μέσες τιμές από τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις). Τα πειραματικά δεδομένα απέδωσαν σταθερές διακύμανσης (CV) χαμηλότερες από 9%. Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και οι ποσοστιαίες ανακτήσεις από τα πειράματα ήταν:

α) FPIA: $y = 0.612x + 0.002$ ($r = 0.983$, $p \leq 0.001$) και ανάκτηση $60.67\% \pm 8.14\%$.

β) HPLC: $y = 0.596x + 0.025$ ($r = 0.983$, $p \leq 0.001$) και ανάκτηση $60.91\% \pm 8.16\%$.

Οι διακυμάνσεις των προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων της ΡΗΤ δε διαφέρουν σημαντικά (F-test, FPIA: $F=0.388$, $df=4$, $P=0.190$ και HPLC: $F=0.368$, $df=4$, $P=0.178$). Το κατώτερο όριο προσδιορισμού (L.o.d.) για τις παραπάνω μεθόδους προσδιορίστηκε για την FPIA ως $0.63 \mu\text{g/g}$ και για την HPLC ως $0.68 \mu\text{g/g}$.

3.5.2. Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης της ΡΗΤ.

Τα πειραματικά δεδομένα της εξωτερικής απορρόφησης του φαρμάκου αναφέρονται στον Πίνακα Β.2. Η απορρόφηση του φαρμάκου άρχισε σχεδόν αμέσως, συνεχίστηκε με μεγάλο ρυθμό για 48 ώρες περίπου, όπου ο ρυθμός αύξησης μειώθηκε αισθητά τείνοντας να μηδενιστεί ως τις 10 ημέρες περίπου (Σχήμα Β.2.). Η μέγιστη μέση συγκέντρωση της ΡΗΤ, που καταγράφηκε στις τρίχες, ήταν $109.90 \pm 6.31 \mu\text{g/g}$ και $111.70 \pm 8.42 \mu\text{g/g}$ αντίστοιχα για τις δύο μεθόδους FPIA και HPLC. Οι σταθερές διακύμανσης (CV) βρέθηκαν μικρότερες του 10 % και για τις δύο μεθόδους.

3.5.3. Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών εμφανίζονται στους Πίνακες Β.3. και Β.4. Τα δεδομένα από την ανάλυση των τριχών και τα επίπεδα της φαινοτοΐνης στον ορό του αίματος των γυναικών ασθενών εμφανίζονται στους Πίνακες Β.5. και Β.6., αντιστοίχως για τις τεχνικές HPLC και FPIA. Τα αντίστοιχα δεδομένα των ανδρών ασθενών εμφανίζονται στους Πίνακες Β.8 και Β.9. Οι αναφερόμενες τιμές αποτελούν τις μέσες τιμές δύο διαφορετικών μετρήσεων μετά από επανάληψη της ίδιας διαδικασίας. Στους Πίνακες Β.7. και Β.10. εμφανίζονται τα δεδομένα από τις μεταβολές του φαρμάκου, αντιστοίχως για τις γυναίκες και τους άνδρες ασθενείς. Αρκετά στατιστικά από τα πειραματικά δεδομένα στο σύνολο των ασθενών εμφανίζονται στον Πίνακα Β.11.

Ο συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στις δύο τεχνικές βρέθηκε υψηλός (γυναίκες: $r = 0.996$, άνδρες: $r = 0.997$) και καμία στατιστική δοκιμασία δεν έδειξε σημαντικές διαφορές, όπως φαίνεται και στο Σχήμα Β.3. Οι διαφορές των μέσων τιμών των PHT συγκεντρώσεων μεταξύ των φύλων δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (με FPIA: $F = 13.403$, $df = 58$, $P = 0.214$ και με HPLC: $F = 35.096$, $df = 58$, $P = 0.133$).

Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της PHT στα τεμάχια των τριχών γυναικών ασθενών, από το 1^ο τεμάχιο (το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας) έως το 5^ο τεμάχιο ήταν 17.95, 15.24, 13.08, 11.57, 10.69 $\mu\text{g/g}$ και 17.88, 15.21, 13.08, 11.89, 10.93 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως με τις τεχνικές HPLC και FPIA. Οι μέσες τιμές για τους άνδρες ασθενείς και με τις δύο τεχνικές HPLC και FPIA ήταν 17.87, 15.01, 12.45, 12.07, 12.29 $\mu\text{g/g}$ και 17.78, 14.90, 12.22, 11.91, 12.08 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως. Οι διαφορές ανάμεσα στις διακυμάνσεις απ' τα πλησιέστερα στη ρίζα ως τα πιο απομακρυσμένα απ' την ρίζα τεμάχια τριχών που προέρχονται από άνδρες και γυναίκες και για καθεμιά απ' τις μεθόδους είναι σημαντικές. Για τις γυναίκες: α) με FPIA: $F = 4.223$, $df = 4$, $P = 0.003$ και β) με HPLC: $F = 4.708$, $df = 4$, $P = 0.001$. Για τους άνδρες: α) με FPIA: $F = 2.950$, $df = 4$, $P = 0.002$ και β) με HPLC: $F = 2.739$, $df = 4$, $P = 0.031$.

Οι μέσες τιμές των επιπέδων της PHT στις τρίχες των ασθενών ως σύνολο από το 1ο τεμάχιο (το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας) μέχρι και το 5ο ήταν 17.91, 15.11, 12.72, 11.84, 11.47 $\mu\text{g/g}$ και 17.82, 15.03, 12.59, 11.90, 11.49 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως με τις HPLC και FPIA τεχνικές.

Οι σχετικές μέσες τιμές \pm SD των μεταβολών των συγκεντρώσεων του φαρμάκου ανάμεσα στο 1ο - 2ο τεμάχιο τριχών, που αναφέρονται στους προηγούμενους 1 έως 2 ή 2.5 μήνες ανάπτυξης των τριχών, για καθεμιά απ' τις τεχνικές HPLC και FPIA ήταν 16.0 ± 4.1 % ($n=60$) και 16.4 ± 3.7 % ($n=60$) αντιστοίχως. Οι αντίστοιχες τιμές ανάμεσα στο 1ο - 3ο τεμάχιο τριχών, που αναφέρονται στους προηγούμενους 1 έως 3 ή 3.5 μήνες ανάπτυξης των τριχών, ήταν 30.8 ± 14.9 % ($n=60$) και 30.4 ± 14.7 % ($n = 60$). Στις περιπτώσεις ασθενών με μικρή διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου (2 μήνες), όπως οι ασθενείς No 16, 20, 36, 38, 46 και 53, οι σχετικές μεταβολές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου ανάμεσα στο 1ο έως το 3ο τεμάχιο και για τις δύο μεθόδους κυμάνθηκε από 59.1 % έως 79.8 %.

Υπήρχαν σαράντα τέσσερις (44) ασθενείς οι οποίοι ελάμβαναν μόνον την ΡΗΤ και δέκα έξι (16) οι οποίοι ελάμβαναν την ΡΗΤ σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Οι αντίστοιχες όμως διαφορές των διακυμάνσεων των μέσων τιμών των ΡΗΤ συγκεντρώσεων δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές (FPIA: $F = 7.742$, $df = 58$, $P = 0.279$ και HPLC: $F = 4.851$, $df = 58$, $P = 0.349$). Επίσης, οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών του φαρμάκου στις τρίχες των ασθενών σε σχέση με τις ημερήσιες δόσεις (Πίνακας Β.13.) βρέθηκαν να είναι σημαντικές (με FPIA: $F=18.360$, $df =59$, $P<0.05$ και με HPLC: $F=17.719$, $df =59$, $P<0.05$). Απ' την άλλη πλευρά, οι διαφορές μεταξύ των ημερήσιων δόσεων σε σχέση με τις μέσες τιμές του φαρμάκου στις τρίχες των ασθενών που ελάμβαναν συστηματικά την ίδια ημερήσια δόση δεν είναι σημαντικές. Η σχετική ανάλυση των διακυμάνσεων με τη μέθοδο FPIA έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα: α) 100 mg/24h: $F =1.215$, $df = 13$, $P= 0.365$, β) 200 mg/24h: $F = 1.067$, $df=15$, $P = 0.448$, γ) 300 mg/24h: $F = 1.053$, $df=19$, $P = 0.454$ και δ) 400 mg/24h: $F=1.111$, $df = 9$, $P=0.433$. Οι αντίστοιχες τιμές με την μέθοδο HPLC ήταν: α)100 mg/24h: $F = 1.077$, $df=13$, $P = 0.444$, β) 200 mg/24h: $F = 1.067$, $df =15$, $P=0.448$, γ)300 mg/24h: $F=1.053$, $df =19$, $P = 0.454$ και d) 400 mg/24h: $F = 1.111$, $df = 9$, $P=0.433$. Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης βρέθηκαν να είναι $y = 0.064 x - 1.618$ ($r = 0.987$, $p \leq 0.2$) και $y = 0.065 x - 1.783$ ($r = 0.988$, $p \leq 0.02$) με τις μεθόδους FPIA και HPLC αντιστοίχως. Στο Σχήμα Β.4. φαίνεται γραφικώς η συσχέτιση μεταξύ των ημερήσιων δόσεων και των μέσων τιμών της ΡΗΤ στις τρίχες και για τις δύο μεθόδους.

Στον Πίνακα Β.12. εμφανίζονται ο αριθμός των δειγμάτων, οι ημερήσιες δόσεις και οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της ΡΗΤ στις τρίχες με τις μεθόδους FPIA και HPLC σε σχέση με κάθε μία κατηγορία χρώματος τριχών. Οι γραμμές του προαναφερόμενου πίνακα κατατάχθηκαν με βάση την φθίνουσα σειρά για τις μέσες τιμές της ΡΗΤ στις τρίχες. Η συσχέτιση των μέσων τιμών του φαρμάκου για τις FPIA και HPLC τεχνικές σε σχέση με το χρώμα απέδωσε στατιστικώς σημαντικές διαφορές (FPIA: $F = 3.259$ $df = 5.9$, $P < 0.05$ και HPLC: $F = 3.243$, $df = 59$, $P<0.05$). Επίσης, οι διαφορές μεταξύ των δόσεων σε σχέση με το χρώμα βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές ($F = 1.968$, $df = 59$, $P = 0.005$). Στα Σχήματα Β.5. και Β.6. εμφανίζονται γραφικώς οι αντίστοιχες για το κάθε χρώμα τριχών μέσες τιμές της ΡΗΤ,

υποδεικνύοντας ταυτόχρονα το βαθμό διασποράς τους για την κάθε κατηγορία χρώματος, αντιστοίχως για τις μεθόδους FPIA και HPLC.

Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών PHT στις τρίχες και στον ορό αίματος βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές (FPIA: $F= 4.461$, $df = 59$, $P < 0.05$ και HPLC: $F=4.297$, $df = 59$, $P < 0.05$). Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης για τις δύο τεχνικές ήταν: α) FPIA: $y = 1.654 x - 9.889$ ($r = 0.805$, $p \leq 0.001$) και β) HPLC: $y = 1.744 x - 10.693$ ($r= 0.809$, $p \leq 0.001$).

Στα Σχήματα B.7. και B.8. εμφανίζονται τα προφίλ του φαρμάκου για μερικούς ασθενείς (γυναίκες και άνδρες). Τα προφίλ του φαρμάκου είναι γραφικές απεικονίσεις των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στα διαδοχικά τεμάχια των τριχών των ασθενών. Άρα είναι γραμμικές συσχετίσεις των συγκεντρώσεων της PHT στις τρίχες, σε σχέση με τον χρόνο (ανά μήνα).

Οι διαφορές ανάμεσα στις μέσες τιμές της PHT στις τρίχες σε σχέση με την διάρκεια της χορήγησης του φαρμάκου (Πίνακας B.14.) δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (FPIA: $F = 1.181$, $df = 59$, $P = 0.261$ και HPLC: $F = 1.193$, $df = 59$, $P = 0.249$). Από την άλλη πλευρά οι αντίστοιχες διαφορές σε σχέση με την ηλικία των ασθενών (Πίνακας B.15.) βρέθηκαν να είναι σημαντικές (FPIA: $F = 3.295$, $df = 59$, $P < 0.05$ και HPLC: $F = 3.163$, $df = 59$, $P < 0.05$). Οι υψηλότερες μέσες τιμές της PHT βρέθηκαν σε ασθενείς ηλικίας 30 έως 40 ετών και ήταν 18.4 ± 8.0 $\mu\text{g/g}$ και 18.5 ± 8.0 $\mu\text{g/g}$ αντιστοίχως για τις δύο τεχνικές FPIA και HPLC. Η μέγιστη ημερήσια δόση βρέθηκε ως 288.9 ± 78.2 $\text{mg}/24\text{h}$. Η συσχέτιση ανάμεσα στις μέσες τιμές της PHT στις τρίχες, στις ημερήσιες δόσεις και την ηλικία των ασθενών εμφανίζεται γραφικά στα Σχήματα B.9. και B.10.

4. Προσδιορισμός του βαλπροϊκού οξέος στις τρίχες κεφαλής ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτό.

4.1. Εισαγωγή

Το βαλπροϊκό οξύ (2-n-προπυλο-πεντανοϊκό οξύ ή VPA) είναι ένα διακλαδιζόμενο λιπαρό οξύ, γενικού φάσματος αντιεπιληπτικό φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται μόνο ή σε συνδυασμό με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα στη θεραπεία των παροξυσμικών τυπικών αφαιρέσεων^{155,156}. Συναντάται και με την μορφή αλατός του με νάτριο. Είναι αποτελεσματικό στη διευθέτηση γενικευμένων τονικοκλονικών και μυοκλονικών παροξυσμικών (επιληπτικών) κρίσεων καθώς και σε μη τυπικές αφαιρέσεις, απλές και σύνθετες εστιακές, σε μείζονες (grand mal) και ελάσσονες (petit mal) παροξυσμικές κρίσεις^{155,157,158}. Επίσης, έχει εμφανίσει αντικαταθλιπτική, αντιημικρανιακή και αντιδιεγερτική δράση. Χορηγείται σε πολλές ασθένειες με παθολογικές ψυχιατρικές καταστάσεις (σχιζοφρένεια, μανία κλπ) σε συνδυασμό με λίθιο και καρβαμαζεπίνη¹⁵⁹. Ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου επιτυγχάνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στον εγκέφαλο, αναστέλλοντας την καταβολική δράση της GABA-τρανσφεράσης. Το GABA είναι ένας αποτελεσματικός αναστολέας των προ- και μετα-συναπτικών ηλεκτρικών διεγέρσεων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)¹⁵⁹.

Ο κυριότερος μεταβολίτης του VPA είναι το 2-n-προπυλο-κετοπεντανοϊκό οξύ και εμφανίζει συγκρίσιμη δραστικότητα με το VPA. Ωστόσο, ο προαναφερόμενος μεταβολίτης δεν συγκεντρώνεται στο πλάσμα. Το VPA εμφανίζει υψηλή δεσμευτικότητα στις πρωτεΐνες (93%). Στις περιπτώσεις εκείνες όπου ο συναγωνισμός για δέσμευση στις πρωτεΐνες αυξάνει, όπως στην ουραιμία, στην κίρρωση ή σε παράλληλη φαρμακευτική αγωγή, το ποσοστιαίο κλάσμα του ελεύθερου VPA αυξάνει. Τα όρια για αποτελεσματικότερη θεραπευτική αγωγή κυμαίνονται από 50 µg/mL έως 100 µg/mL. Συγκεντρώσεις του VPA πολύ πάνω από τα 100 µg/mL έχουν συνδυαστεί με ηπατοτοξικότητα και οξεία τοξική εγκεφαλοπάθεια. Έχει επίσης παρατηρηθεί συγκέντρωση γλυκίνης σε ασθενείς σε συστηματική θεραπεία με VPA.

Το VPA επηρεάζει την δράση ορισμένων από τα σε συνδυασμό χορηγούμενα αντιεπιληπτικά φάρμακα. Η κατασταλτική του δράση στη μη νεφρική κάθαρση της

φαινοβαρβιτάλης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων φαινοβαρβιτάλης στο αίμα. Επίσης, συναγωνίζεται τη φαινυτοΐνη ως προς τις θέσεις δέσμευσης στις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της ελεύθερης φαινυτοΐνης να παραμένουν σχεδόν σταθερά, αλλά η ολική φαινυτοΐνη να μειώνεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση του φαρμακευτικού αποτελέσματος της φαινυτοΐνης. Άλλα όμως αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η καρβαμαζεπίνη, η πριμιδώνη, η φαινυτοΐνη και η φαινοβαρβιτάλη, τα οποία επιδρούν επί των ηπατικών οξειδωτικών ενζύμων, αυξάνουν την κάθαρση του VPA. Ο αυξημένος αυτός ρυθμός κάθαρσης απαιτεί και υψηλότερες χορηγούμενες δόσεις του VPA για αποτελεσματικότερα θεραπευτικά όρια του φαρμάκου στο αίμα.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί πρώτη δημοσίευση με θέμα την τμηματική ανάλυση των τριχών για τον προσδιορισμό της απορρόφησης του VPA σε ασθενείς με συστηματική θεραπεία. Η προκαταρκτική ανακοίνωσή¹⁶⁰ μας ισχυροποίησε τη δυνατότητα χρήσης της τμηματικής ανάλυσης των τριχών, ως “δείκτη” του ιστορικού χρήσης του VPA. Η μελέτη αυτή έχει σκοπό να διασαφηνίσει τον τρόπο χρήσης του φαρμάκου στο παρελθόν (δηλ. από μήνα σε μήνα) και περιλαμβάνει ανάλυση των δεδομένων, τα οποία αποκτήθηκαν από 40 ασθενείς σε συστηματική θεραπεία με VPA. Τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να αποβούν πολύτιμα στους κλινικούς ιατρούς για την αξιολόγηση του ιστορικού της φαρμακευτικής αγωγής των ασθενών, με στόχο την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αγωγή.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Ασθενείς και δειγματοληψία των τριχών

Συνελέγησαν δείγματα τριχών από 40 ασθενείς (15 άνδρες και 25 γυναίκες) ηλικίας 2 έως 87 ετών και με κύρια πάθηση την επιληψία. Οι παραπάνω ασθενείς ελάμβαναν την VPA για μεγάλα χρονικά διαστήματα, που κυμαίνονταν από 2 μήνες έως αρκετά χρόνια. Μερικοί από αυτούς βρίσκονταν σε θεραπεία σε συνδυασμό με καρβαμαζεπίνη, φαινοβαρβιτάλη, λίθιο και οξκαρβαμαζεπίνη. Τα δείγματα των τριχών κόπηκαν από το τριχωτό της κεφαλής, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο δέρμα, λίγο πίσω από την κορυφή της κεφαλής και σε ποσότητα 200 mg περίπου. Στη συνέχεια τα δείγματα των τριχών κόπηκαν σε 2 έως και 5 τμήματα. μήκους 1 cm κατά μήκος του

στελέχους των τριχών, με πρώτο το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας. Ταυτόχρονα, συνελέγησαν και δείγματα αίματος των ασθενών. Τρίχες υγιών ατόμων χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό δείγμα.

4.2.2 Αντιδραστήρια και χρήση οργάνων

Το πρότυπο του VPA το προμηθευτήκαμε από την SIGMA Chemical Company. Διάλυμα του VPA σε ακετονιτρίλιο, συγκέντρωσης 80.0 $\mu\text{g/mL}$, χρησιμοποιήθηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό του VPA στα πειράματα ανάκτησης και εξωτερικής απορρόφησης. Χρησιμοποιήθηκε η ανοσοχημική μέθοδος FPIA της Abbott (Ανοσοφθορισμοπολωσιμετρία ή Fluorescence Polarization Immunoassay) σε αναλυτή TDx της Abbott. Τα διαλύματα και τα άλλα χημικά αγοράστηκαν από το εμπόριο. Τα δείγματα των ορών αίματος αναλύθηκαν και με την μέθοδο FPIA.

4.2.3 Προετοιμασία των τριχών και FPIA ανάλυση

Πλύσιμο των τριχών: Τα δείγματα των τριχών πλύθηκαν δύο φορές με 3mL φωσφορικού ρυθμιστικού ($\text{pH} = 6$), αναδεύτηκαν σε vortex για 1min περίπου και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min. Το φωσφορικό ρυθμιστικό μεταφέρθηκε σε δύο νέα σωληνάρια και αναλύθηκε για πιθανή ύπαρξη σε αυτά ποσότητας του VPA με την μέθοδο FPIA. Δεν σημειώθηκε ανιχνεύσιμη ποσότητα του VPA σε κανένα από τα παραπάνω διαλύματα.

Διαλυτοποίηση των τριχών: Σε τμήματα των δειγμάτων τριχών μήκους 1 cm και ποσότητας από 20 έως 50 mg, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κωνικά σωληνάρια, προστέθηκαν 3 mL διαλύματος NaOH 1N, θερμάνθηκαν για 1ώρα στους 100 °C, αναδεύτηκαν με vortex και ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια έγινε ρύθμιση του $\text{pH} \cong 2$ με προσθήκη διαλύματος HCl 6N. Έπειτα προστέθηκαν 5 mL διαιθυλαιθέρα σε κάθε σωληνάριο, αναδεύτηκαν σε vortex για 3 min και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min με 3000 στροφές / min. Στη συνέχεια η οργανική φάση (υπερκείμενη) αποχωρίστηκε σε νέα σωληνάρια. Το διάλυμα εξατμίσθηκε, ενώ το ίζημα που απόμεινε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 μL φυσιολογικού ορού (0.9% NaCl). Το βαλπροϊκό οξύ μετρήθηκε με τη μέθοδο FPIA στον αναλυτή TDx της Abbott.

Η ανάλυση των δειγμάτων τριχών των ασθενών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο στην ίδια σειρά με τυφλά (καθαρά) δείγματα τριχών, τα

οποία είχαν εμποτιστεί με συγκεκριμένες ποσότητες του VPA (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 και 20.0 μg), χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ένα διάλυμα του VPA σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα επίπεδα του φαρμάκου στις τρίχες των ασθενών προσδιορίστηκαν από μία καμπύλη βαθμονόμησης προερχόμενη από τα έξι standards στην ίδια σειρά.

4.2.4 Στατιστικές μέθοδοι

Τα δεδομένα από τα πειράματα ανάκτησης του VPA και οι συγκεντρώσεις του από τις αναλύσεις τριχών και αίματος παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm την σταθερά απόκλισης (mean \pm SD) με τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις, όσον αφορά τις ανακτήσεις του VPA και με δύο, όσον αφορά τις αναλύσεις των δειγμάτων τριχών.

Οι VPA συγκεντρώσεις των τριχών του κάθε ασθενή αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου σε όλα τα τεμάχια του αντίστοιχου δείγματος τριχών. Επίσης, οι χορηγούμενες δόσεις του VPA αντιπροσωπεύονται, από τις μέσες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στα τεμάχια όλων των ασθενών, στους οποίους χορηγήθηκαν οι αντίστοιχες δόσεις. Οι κατηγορίες χρώματος τριχών αντιπροσωπεύονται από τις μέσες τιμές των αντίστοιχων χορηγούμενων δόσεων του VPA ή από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του VPA στα δείγματα τριχών των ασθενών με το αντίστοιχο χρώμα τριχών. Οι περιοχές των τιμών που αφορούν τη διάρκεια χορήγησης του VPA ή την ηλικία των ασθενών που τους χορηγήθηκε, αντιπροσωπεύονται από τις αντίστοιχες μέσες τιμές των χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου ή των συγκεντρώσεων του στα δείγματα τριχών των ασθενών, που αναφέρονται στο εύρος των περιοχών αυτών.

Η μέθοδος της ανάλυσης των διακυμάνσεων μιας παραμέτρου (One Way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση των διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων του VPA, τα οποία προέρχονταν από τα δείγματα τριχών: α) μεταξύ ανδρών και γυναικών, γ) μεταξύ των ασθενών που βρίσκονταν σε θεραπεία μόνο με το VPA και αυτών που βρίσκονταν σε συνδυαστική θεραπεία του VPA με άλλα φάρμακα. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση των αντίστοιχων διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στα δείγματα τριχών και αίματος, όπως και μεταξύ των χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου, του χρώματος των τριχών, της ηλικίας των ασθενών ή της διάρκειας χορήγησης και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων του

φαρμάκου στα δείγματα τριχών των ασθενών. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το F-test για την σύγκριση των διακυμάνσεων μεταξύ προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων του VPA στα πειράματα ανάκτησης. Η τιμή της πιθανότητας P για μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές ορίστηκε ως > 0.05 , ενώ η τιμή στατιστικής βεβαιότητας p ως ≤ 0.05 .

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (Limit of detection, L.o.d), όπως και άλλα στατιστικά δεδομένα και στατιστικές δοκιμασίες της εργασίας, υπολογίστηκε με εξισώσεις από το βιβλίο των J.C. Miller et. al.¹⁴⁷ και το στατιστικό λογισμικό Excel 97 της Microsoft.

4.3. Πειράματα ανάκτησης

Η απόδοση και το κατώτερο όριο προσδιορισμού (Limit of detection ή L.o.d.) της μεθόδου προσδιορίστηκε με τα πειράματα ανάκτησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις φορές, με την προσθήκη σταθερών ποσοτήτων του VPA, πριν από την διαλυτοποίηση των τριχών. Σε καθαρές τρίχες βάρους 20 έως 50 mg, προστέθηκαν ανά σειρά τεσσάρων δειγμάτων σταθερές ποσότητες (15.0, 30.0, 45.0 και 60.0 μg) του VPA από ένα πρότυπο διάλυμα VPA σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Έπειτα, η ανάκτηση του φαρμάκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο ανάλυσης.

4.4. Πειράματα εξωτερικής απορρόφησης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σειρές των τεσσάρων δειγμάτων καθαρών τριχών, στα οποία προστέθηκαν ανά δείγμα 3 mL διαλύματος VPA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε φωσφορικό ρυθμιστικό ($\text{pH} = 6$). Ακολούθησε επώαση των τριχών σε θερμοκρασία δωματίου (25 - 28 $^{\circ}\text{C}$) για χρονική διάρκεια 2 h ως και 10 ημερών ή 240 h (όπως φαίνεται στον Πίνακα Γ.2.). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και απομακρύνθηκε το ρυθμιστικό. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις (ανάδευση, φυγοκέντριση και αποχωρισμός του υπερκείμενου) των τριχών σε 3 mL μεθανόλης και τρεις φορές με 3 mL νερού, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του φαρμάκου. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των προσροφούμενων ποσοτήτων του VPA με την παραπάνω μέθοδο διαλυτοποίησης και μέτρηση με FPIA.

4.5. Αποτελέσματα

4.5.1 Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης του VPA

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανάκτησης παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.1. (μέσες τιμές από τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις δειγμάτων). Τα πειραματικά δεδομένα απέδωσαν σταθερές διακύμανσης (CV) χαμηλότερες από 7%. Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και οι ποσοστιαίες ανακτήσεις από τα πειράματα με την ανοσοχημική μέθοδο FPIA ήταν: $y = 0.738 x + 0.107$ ($r = 1.000$, $p \leq 0.001$) και μέση ανάκτηση $74.17 \% \pm 0.43 \%$.

Οι διακυμάνσεις των προστιθέμενων και ανακτούμενων ποσοτήτων του VPA δε διαφέρουν σημαντικά (F-test: $F=0.545$, $df=3$, $P=0.315$). Το κατώτερο όριο προσδιορισμού (L.o.d.) στις τρίχες προσδιορίστηκε ως $0.72 \mu\text{g/g}$.

4.5.2. Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης του VPA στις τρίχες

Τα πειραματικά δεδομένα της εξωτερικής απορρόφησης του φαρμάκου αναφέρονται στον Πίνακα Γ.2. Η απορρόφηση του φαρμάκου άρχισε σχεδόν αμέσως, συνεχίστηκε με μεγάλο ρυθμό για 16 ώρες περίπου, όπου ο ρυθμός μειώθηκε αισθητά, τείνοντας να μηδενιστεί ως τις 10 ημέρες περίπου (Σχήμα Γ.1.). Η μέγιστη μέση συγκέντρωση του VPA που καταγράφηκε στις τρίχες ήταν $27.60 \pm 2.46 \mu\text{g/g}$. Οι σταθερές διακύμανσης (CV) βρέθηκαν μικρότερες του 10 %.

4.5.3 Στατιστικά και αποτελέσματα ανάλυσης τριχών ασθενών

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών εμφανίζονται στους Πίνακες Γ.3. και Γ.4. Τα δεδομένα από την ανάλυση των τριχών και τα επίπεδα του βαλπροϊκού οξέος στον ορό του αίματος εμφανίζονται στους Πίνακες Γ.5 και Γ.6., αντιστοίχως για τις γυναίκες και τους άνδρες ασθενείς. Οι αναφερόμενες τιμές αποτελούν τις μέσες τιμές δύο διαφορετικών μετρήσεων μετά από επανάληψη της ίδιας διαδικασίας. Στον Πίνακα Γ.8. παρουσιάζονται ορισμένες στατιστικές παράμετροι από τα πειραματικά δεδομένα στο σύνολο των ασθενών.

Οι διακυμάνσεις των μέσων τιμών του VPA στις τρίχες μεταξύ των δύο φύλων δε διαφέρουν σημαντικά ($F = 3.186$, $df = 38$, $P = 0.082$). Επίσης, οι διαφορές των διακυμάνσεων μεταξύ των συγκεντρώσεων στα τεμάχια των τριχών, από το πλησιέστερο στη ρίζα μέχρι και το πιο απομακρυσμένο, δεν είναι στατιστικός

σημαντικές (για τις γυναίκες: $F = 2.411$, $df = 4$, $P = 0.053$ και για τους άνδρες: $F = 1.707$, $df = 4$, $P = 0.160$).

Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του VPA στα τεμάχια των τριχών από το 1ο (το πλησιέστερο στη ρίζα της τρίχας) έως το 5ο είναι 7.08, 8.35, 9.41, 9.65, 9.76 $\mu\text{g/g}$ και 5.69, 6.68, 7.26, 7.84, 8.81 $\mu\text{g/g}$ για τις γυναίκες και τους άνδρες ασθενείς αντιστοίχως. Στο σύνολο των ασθενών βρέθηκαν ως 6.56, 7.72, 8.61, 8.99 και 9.41 $\mu\text{g/g}$. Οι σχετικές μέσες τιμές \pm SD των αυξητικών μεταβολών των συγκεντρώσεων του φαρμάκου (Πίνακας Γ.7.), ανάμεσα στο 1ο και 2ο από τα τεμάχια των τριχών που αναφέρονται στους προηγούμενους 1 έως 2 ή 2.5 μήνες ανάπτυξης των τριχών, όπως και ανάμεσα στο 1ο και 3ο που αναφέρονται στους προηγούμενους 1 έως 3 ή 3.5 μήνες ανάπτυξης των τριχών, βρέθηκαν ως 17.54 ± 3.95 % ($n=40$) και 32.75 ± 17.21 % ($n=40$) αντιστοίχως.

Από τους ασθενείς που συμμετείχαν στην εργασία, οι είκοσι οκτώ (28) ελάμβαναν μόνον το VPA, ενώ δώδεκα (12) ελάμβαναν το VPA σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Οι αντίστοιχες διαφορές των διακυμάνσεων των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων του VPA βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές ($F = 5.433$, $df = 38$, $P = 0.025$). Επίσης, οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών του φαρμάκου στις τρίχες των ασθενών σε σχέση με τις ημερήσιες δόσεις (Πίνακας Γ.9.) βρέθηκαν να είναι σημαντικές ($F = 10.497$, $df = 39$, $P < 0.05$). Από την άλλη πλευρά, οι διαφορές μεταξύ των ημερήσιων δόσεων σε σχέση με τις μέσες τιμές του φαρμάκου στις τρίχες των ασθενών, που ελάμβαναν συστηματικά την ίδια ημερήσια δόση, δεν είναι σημαντικές. Οι σχετική ανάλυση των διακυμάνσεων έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα: α) 300 mg/24h: $F = 1.200$, $df=5$, $P = 0.409$, β) 400 mg/24h: $F = 1.250$, $df = 4$, $P = 0.400$, γ) 500 mg/24h: $F = 1.500$, $df = 2$, $P = 0.354$, δ) 600 mg/24h: $F = 1.167$, $df = 6$, $P=0.417$, ε) 800 mg/24h: $F = 2.000$, $df = 1$, $P = 0.293$, στ) 1000 mg/24h: $F = 1.250$, $df = 4$, $P = 0.398$ και η) 1500 mg/24h: $F = 1.143$, $df = 7$, $P = 0.423$. Η αντίστοιχη εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης ήταν $y = 0.003 x + 5.833$. Στο Σχήμα Γ.2. φαίνεται γραφικώς η συσχέτιση μεταξύ των ημερήσιων δόσεων και των μέσων τιμών του VPA στις τρίχες.

Στον Πίνακα Γ.10. εμφανίζονται ο αριθμός των δειγμάτων, οι ημερήσιες δόσεις και οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του VPA, σε σχέση με καθεμία κατηγορία

χρώματος τριχών. Οι γραμμές του προαναφερόμενου Πίνακα κατατάχθηκαν με βάση την φθίνουσα σειρά για τις μέσες τιμές του VPA στις τρίχες. Η συσχέτιση των μέσων τιμών του φαρμάκου σε σχέση με το χρώμα απέδωσε στατιστικώς σημαντικές διαφορές (FPIA: $F = 3.259$ $df = 5.9$, $P < 0.05$ και HPLC: $F = 3.243$, $df = 59$, $P < 0.05$). Επίσης, οι διαφορές μεταξύ των δόσεων σε σχέση με το χρώμα βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές ($F = 1.968$, $df = 59$, $P = 0.005$). Στο Σχήμα Γ.5. εμφανίζονται γραφικώς οι αντίστοιχες για το κάθε χρώμα τριχών μέσες τιμές του VPA, υποδεικνύοντας ταυτόχρονα τον βαθμό διασποράς τους για την κάθε κατηγορία χρώματος.

Στα Σχήματα Γ.3. και Γ.4. εμφανίζονται τα προφίλ του φαρμάκου για μερικούς ασθενείς, γυναίκες και άνδρες αντιστοίχως. Τα προφίλ του φαρμάκου είναι γραφικές απεικονίσεις της σχέσης των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στις τρίχες με τον χρόνο (ανά μήνα).

Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών του VPA στις τρίχες και στον ορό αίματος βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές ($F = 6.916$, $df = 38$, $P < 0.05$). Η αντίστοιχη εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης (Σχήμα Γ.6.) υπολογίστηκε ως $y = 0.787 x + 54.333$ ($r = 0.128$, $p > 0.05$).

Οι διαφορές ανάμεσα στις μέσες τιμές του VPA στις τρίχες σε σχέση με τη διάρκεια της χορήγησης του φαρμάκου (Πίνακας Γ.11.) είναι στατιστικώς σημαντικές ($F = 2.146$, $df = 38$, $P = 0.009$). Ομοίως, οι αντίστοιχες διαφορές σε σχέση με την ηλικία των ασθενών (Πίνακας Γ.12.) βρέθηκαν να είναι σημαντικές ($F = 2.663$, $df = 39$, $P = 0.001$). Οι υψηλότερες μέσες τιμές του VPA βρέθηκαν σε ασθενείς ηλικίας 41 έως 50 ετών και ήταν 10.5 ± 1.6 $\mu\text{g/g}$. Επίσης, οι διαφορές των διακυμάνσεων μεταξύ των μέσων τιμών των δόσεων που αντιστοιχούν στην ηλικία και στις ημερήσιες δόσεις του φαρμάκου είναι σημαντικές ($F = 1.969$, $df = 39$, $P = 0.018$). Η μέγιστη μέση ημερήσια δόση βρέθηκε σε ασθενείς ηλικίας 31 έως 40 ετών και ήταν 1200 ± 520 $\text{mg}/24\text{h}$. Η συσχέτιση ανάμεσα στις μέσες τιμές του VPA στις τρίχες, στις ημερήσιες δόσεις και στην ηλικία των ασθενών εμφανίζεται γραφικά στο Σχήμα Γ.7.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Καρβαμαζεπίνη.

Η ανάλυση τριχών αποτελεί αντικείμενο με συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον τόσο στο πεδίο της ιατροδικαστικής επιστήμης όσο και της κλινικής φαρμακολογίας. Προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες έδειξαν ότι κλινικώς εφαρμοσμένα αντιψυχωτικά φάρμακα, όπως η αλοπεριδόλη και η χλωροπρομαζίνη^{129,130,65} και αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η φαινυτοΐνη¹³¹⁻¹³³, απορροφώνται στις τρίχες ανάλογα με τις λαμβανόμενες δόσεις. Η πολυθεραπεία φαίνεται να επηρεάζει τη θέση δέσμευσης όλων γενικά των φαρμάκων στο στέλεχος της τρίχας, αλλά μόνον ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν γι' αυτό^{127-129,131,134}. Επιπλέον, η τμηματική ανάλυση κατά μήκος του στελέχους των τριχών για τα φάρμακα απεικονίζει το φαρμακευτικό μηνιαίο ιστορικό, δεδομένου ότι η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης των τριχών είναι περίπου 1cm ανά μήνα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση του φαρμάκου στις τρίχες φαίνεται να είναι το χρώμα των τριχών, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και η ανατομική θέση δειγματοληψίας των τριχών. Προβλήματα αναφέρθηκαν σχετικά με το ευμετάβλητο του ρυθμού ανάπτυξης, καθώς και με τη φάση του κύκλου ανάπτυξης των τριχών, στην περίπτωση της ρύθμισης των επιπέδων της οφλοξασίνης⁶⁵. Παρόλ' αυτά, η συμβολή της ποσοτικής ανάλυσης των φαρμάκων στις τρίχες για το θεραπευτικό έλεγχο μπορεί να είναι εξίσου σημαντική με τις ήδη ενδεδειγμένες σε χρήση μεθόδους.

Σύμφωνα με τις μελέτες ανάκτησης από σταθερά διαλύματα της CBZ, υπάρχουν ικανοποιητικές εκατοστιαίες ανακτήσεις και για τις δύο τεχνικές. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τα θετικά αποτελέσματα των πειραμάτων που περιλάμβαναν τρίχες ασθενών (Πίνακες A.5., A.6., A.8. και A.10.), αποδεικνύει ότι οι προαναφερόμενες, υπό δοκιμή, μέθοδοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά ως μέθοδοι προσδιορισμού για την CBZ στις τρίχες.

Η CBZ είναι μια λιπόφιλη ουσία και ως εκ τούτου τα υψηλά επίπεδά της στις τρίχες θα μπορούσαν να οφείλονται στη σχετικά εύκολη μεταφορά της από το αίμα στα κύτταρα του βολβού της ρίζας των τριχών. Τα επίπεδα της CBZ στις τρίχες με την ανοσοχημική μέθοδο (FPIA) ήταν ελαφρώς υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα με την HPLC μέθοδο, λόγω των ποσοτήτων του μεταβολίτη 10,11-εποξειδίου της CBZ,

που επηρεάζουν μόνο την μέτρηση με τη FPIA μέθοδο. Τα πειραματικά δεδομένα παρουσίασαν μια προοδευτική μείωση του φαρμάκου από το 1ο προς τα υπόλοιπα τεμάχια των τριχών. Αυτό οφείλεται στην αποδόμηση του φαρμάκου με το χρόνο ή στην απομάκρυνση του φαρμάκου από τις τρίχες κατά την καθημερινή υγιεινή των τριχών, με τη χρήση διαφόρων καλλυντικών πλυσίματος και περιποίησης, τα οποία ως γνωστόν περιέχουν υλικά με αλκαλικές ιδιότητες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική απομάκρυνση και αντικατάσταση των μορίων του φαρμάκου από τις θέσεις δέσμευσής τους καθ' όλο το μήκος του στελέχους των τριχών. Σημαντικό ρόλο σ' αυτό έχει η βαφή ή η λεύκανση των τριχών. Το φαινόμενο της μείωσης της CBZ στις τρίχες με το πλύσιμο δεν είναι νέο, εφόσον πανομοιότυπο φαινόμενο έχει εμφανιστεί και δημοσιευτεί ήδη για την φαινοτοΐνη¹³¹⁻¹³³.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα προσδιοριζόμενα “προφίλ της CBZ” στις τρίχες από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων στα τμήματα των τριχών εμφανίζονται μέσα στην περιοχή που ορίζει η σταθερά απόκλισης. Για παράδειγμα, οι περιπτώσεις των ασθενών Νο 2, 3, 4, 12 και 16 (Σχήμα Α.5.) και οι ασθενείς Νο 26 και 29 (Σχήμα Α.6.) εμφανίζουν καλή συμμόρφωση στη θεραπεία με το φάρμακο, γιατί αυτοί εμφάνισαν “φυσιολογικά προφίλ της CBZ” στις τρίχες. Από την άλλη όμως άλλες περιπτώσεις, όπως οι ασθενείς Νο 7 και 15 (Σχήμα Α.5.) και οι ασθενείς Νο 27, 32 και 37 (Σχήμα Α.6.), εμφάνισαν “μη φυσιολογικά προφίλ του φαρμάκου” στις τρίχες, οφειλόμενα στην πολυθεραπεία (μερικές φορές με πάνω από τέσσερα φάρμακα) και την έλλειψη μιας σταθερής φαρμακευτικής αγωγής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι προαναφερόμενοι ασθενείς είχαν παραλείψει πολυάριθμες δόσεις κατά τους προηγούμενους 2 μέχρι και 6 μήνες. Αυτό αρχικά αποτέλεσε μια υπόθεση, αλλά στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε από τον ασθενή Νο 32. Είναι γνωστό από την κλινική εμπειρία ότι μερικοί ασθενείς προσπαθούν να μεταβάλουν τη φαρμακευτική αγωγή που τους χορηγήθηκε από το θεράποντα ιατρό(μειώνουν ή συχνά σταματούν τη λήψη των φαρμάκων). Έτσι διακινδυνεύουν όλη τη θεραπεία και ορισμένες φορές οδηγούνται σε μη ικανοποιητικό έλεγχο των κρίσεων.

Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στις τρίχες σε σχέση με το φύλο των ασθενών. Ομοίως, παρατηρήθηκε ότι το χρώμα των τριχών δεν επηρεάζει σημαντικά τη

δέσμευση του φαρμάκου στις τρίχες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στις ισχυρές αλκαλικές ιδιότητες της CBZ ως αμίνης, που επιτρέπει την εύκολη δέσμευσή της, δημιουργώντας ηλεκτροστατικής φύσης δεσμούς με τις καρβοξυλομάδες των πρωτεϊνών της τρίχας, ενώ η μελανίνη δεν πρέπει να έχει πρωτεύοντα ρόλο στην παραπάνω δέσμευση.

Επίσης, είναι φανερό ότι η διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου ελάχιστα ή καθόλου επηρεάζει τα επίπεδά του στις τρίχες. Από την άλλη, τα επίπεδα του φαρμάκου στις τρίχες βρέθηκαν στατιστικώς ότι εξαρτώνται από τη χορηγούμενη δόση του φαρμάκου (Σχήμα Α.4.). Υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου στις τρίχες ευρέθησαν στους ασθενείς, όταν χορηγήθηκαν αυξημένες δόσεις της CBZ.

Η στατιστική ανάλυση απέδωσε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της CBZ στον ορό και στις μέσες τιμές της CBZ στις αντίστοιχες τρίχες. Αυτό εξηγείται από το ότι τα επίπεδα του φαρμάκου στον ορό δεν εξαρτώνται μόνον από τη χορηγούμενη δόση, αλλά και από άλλες παραμέτρους, όπως τη συγκέντρωση της αλβουμίνης, το βάρος των ασθενών ή το χρονικό διάστημα ανάμεσα στη χορήγηση του φαρμάκου και στη δειγματοληψία του δείγματος αίματος.

2. Φαινοτοΐνη

Σύμφωνα με τις μελέτες ανάκτησης από σταθερά διαλύματα της ΡΗΤ υπάρχουν ικανοποιητικές εκατοστιαίες ανακτήσεις και για τις δύο τεχνικές. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με τα θετικά αποτελέσματα των πειραμάτων που περιλάμβαναν τρίχες ασθενών (Πίνακες Β.5., Β.6., Β.8. και Β.10.), αποδεικνύει ότι οι μέθοδοι που προτείνονται στη μελέτη αυτή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά ως μέθοδοι ελέγχου της χρόνιας και συστηματικής χρήσης της ΡΗΤ.

Η μεταφορά της ΡΗΤ από το αίμα στα κύτταρα του βολβού της ρίζας των τριχών θα μπορούσε να οφείλεται στο λιπόφιλο χαρακτήρα της. Επίσης, τα πειραματικά δεδομένα παρουσίασαν μια προοδευτική μείωση του φαρμάκου από το Ιο (το πλησιέστερο στη ρίζα των τριχών) προς τα υπόλοιπα τεμάχια τριχών. Αυτό οφείλεται στην αποδόμηση του φαρμάκου με την πάροδο του χρόνου ή στην απομάκρυνσή του με την υγιεινή περιποίηση των τριχών με διάφορα καλλυντικά. Το φαινόμενο της

μείωσης των επιπέδων της PHT στις τρίχες με το χρόνο δεν είναι άγνωστο, εφόσον πανομοιότυπο φαινόμενο έχει ήδη καταγραφεί και για την καρβαμαζεπίνη^{133,154}.

Παρατηρήθηκε ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα προσδιοριζόμενα προφίλ των χρόνο – συγκεντρώσεων της PHT στις τρίχες εμφανίζονται μέσα στην περιοχή, που ορίζει η μέση τιμή \pm SD του φαρμάκου για κάθε τεμάχιο τριχών. Για παράδειγμα, οι περιπτώσεις των ασθενών με Νο 1, 4, 8, 10, 11, 13, 17, 18, 19 (Σχήμα B.7) και με Νο 39, 40, 44, 45, 48, 50, 52 (Σχήμα B.8.) φαίνεται να παρουσιάζουν καλή συμμόρφωση στη θεραπεία με το φάρμακο και εμφάνισαν “φυσιολογικά” προφίλ της PHT στις τρίχες. Από την άλλη όμως πλευρά, άλλες περιπτώσεις ασθενών, όπως εκείνων με Νο 2, 23, 24, 26 (Σχήμα B.7.) και με Νο 27, 28, 29, 55, 56, 58, 60 (Σχήμα B.8.), εμφάνισαν “μη φυσιολογικά” προφίλ του φαρμάκου στις τρίχες, που πιθανώς να οφείλονται στην πολυθεραπεία (πχ ο ασθενής με Νο 46) και στην έλλειψη μιας σταθερής φαρμακευτικής αγωγής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον μη ικανοποιητικό έλεγχο των παροξυσμικών κρίσεων.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα δε βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της PHT στις τρίχες, οι οποίες να οφείλονται στο φύλο των ασθενών. Αντίθετα, η ηλικία των ασθενών επιδρά σημαντικά στην απορρόφηση του φαρμάκου στις τρίχες (Σχήματα B.9 και B.10.). Οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν σε ασθενείς τριάντα έως σαράντα ετών. Αυτό ασφαλώς οφείλεται στη χορήγηση υψηλότερων δόσεων της PHT σε αυτούς τους ασθενείς, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους μικρότερης ή μεγαλύτερης ηλικίας, στους οποίους το φάρμακο χορηγούνταν σε χαμηλότερες δόσεις.

Η συσχέτιση των μέσων τιμών της PHT στις τρίχες και στον ορό του αίματος παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα επίπεδα του φαρμάκου στον ορό του αίματος εξαρτώνται από ορισμένους αστάθμητους παράγοντες, όπως το χρονικό διάστημα μεταξύ της δειγματοληψίας του αίματος και της τελευταίας χορήγηση του φαρμάκου ή την πιθανή πολυφαρμακία, που δεν αναφέρθηκε ή στη συμμόρφωση του ασθενούς σε σταθερή και συστηματική χορήγηση του φαρμάκου.

Επίσης, τεκμηριώθηκε η εξάρτηση των επιπέδων της PHT από τις χορηγούμενες δόσεις (Σχήμα B.3.). Υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου στις τρίχες

ανιχνεύτηκαν, όταν χορηγούνταν υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου στους ασθενείς. Ομοίως, επιβεβαιώθηκαν οι σημαντικά χαμηλότερες τιμές της ΡΗΤ σε τρίχες γκριζού και ξανθού χρώματος σε σχέση με τις καστανού και μαύρου χρώματος τρίχες (Πίνακας Β.12.).

3. Βαλπροϊκό οξύ

Από τα πειραματικά δεδομένα ανάκτησης του φαρμάκου με χρήση σταθερών διαλυμάτων του VPA συνάγονται ικανοποιητικές εκατοστιαίες ανακτήσεις (Πίνακας Γ.1.). Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με τα θετικά αποτελέσματα των πειραμάτων που περιελάμβαναν τρίχες ασθενών (Πίνακες Γ.5. και Γ.6.), όπως και με τα δεδομένα των πειραμάτων εξωτερικής απορρόφησης (Πίνακας Γ.2. και Σχήμα Γ.1.), αποδεικνύει ότι η προτεινόμενη μέθοδος στη μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά ως μέθοδος ελέγχου της συστηματικής χρήσης του VPA.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ένα φαινόμενο, το οποίο δεν έγινε εμφανές στις προαναφερόμενες δύο μελέτες φαρμάκων, δηλαδή η αυξητική τάση των επιπέδων του VPA, από το 1ο τεμάχιο (το πλησιέστερο στη ρίζα) προς τα υπόλοιπα τεμάχια τριχών, κυρίως σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μηχανισμό παθητικής απορρόφησης του βαλπροϊκού οξέος στις τρίχες, μέσω της εμβάπτισής τους στον ιδρώτα. Αυτό συνηγορούν και τα αποτελέσματα των πειραμάτων εξωτερικής απορρόφησης του φαρμάκου στις τρίχες. Ο ιδρώτας είναι ένα βιολογικό δείγμα με υδάτινο και όξινο χαρακτήρα περιβάλλον, το οποίο ευνοεί την έκκριση σ' αυτό του βαλπροϊκού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πολύ γρήγορη δέσμευση των μορίων του φαρμάκου (αναφέρεται ως “μοντέλο του ιδρώτα” ή παθητική απορρόφηση), υπό μορφή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, σε ολόκληρο σχεδόν το κερατινοποιημένο στέλεχος της τρίχας (ασθενής Νο 5). Ταυτόχρονα, το VPA ως λιπαρό οξύ απορροφάται και μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στα κύτταρα του βολβού της ρίζας των τριχών. Το φαινόμενο όμως της παθητικής απορρόφησης του φαρμάκου προκαλεί μεγάλες δυσχέρειες στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και στην σωστή αξιολόγηση των επιπέδων του φαρμάκου στις τρίχες. Παρόλ' αυτά, η συμβολή της τμηματικής ανάλυσης του φαρμάκου στις τρίχες στο θεραπευτικό

έλεγχο, μπορεί να είναι εξίσου σημαντική με τις ήδη χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανάλυσης στον ορό ή στο πλάσμα του αίματος.

Σε αρκετές περιπτώσεις τα προσδιοριζόμενα προφίλ χρόνου – συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες εμφανίζονται μέσα στην περιοχή, που ορίζεται από την μέση τιμή \pm τη σταθερά απόκλισης. Για παράδειγμα, οι περιπτώσεις των ασθενών με Νο 1, 2, 12 και 19 (Σχήμα Γ.3.) και των ασθενών Νο 28, 31, 33, 38, 39 (Σχήμα Γ.4.) παρουσίασαν καλή συμμόρφωση στη θεραπεία με το φάρμακο, εμφανίζοντας “φυσιολογικά” προφίλ του VPA στις τρίχες. Από την άλλη όμως άλλες περιπτώσεις, όπως οι ασθενείς Νο 5, 8, 15, 17 (Σχήμα Γ.3.) και οι ασθενείς Νο 27, 32, 40 (Σχήμα Γ.4.), εμφάνισαν “μη φυσιολογικά” προφίλ του φαρμάκου στις τρίχες, οφειλόμενα στην πολυθεραπεία και στην έλλειψη μιας σταθερής φαρμακευτικής αγωγής.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα δε βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις του VPA στις τρίχες σε σχέση με το φύλο των ασθενών. Η διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου δε φαίνεται να επιδρά στην απορρόφηση του φαρμάκου στις τρίχες. Αντίθετα όμως, η ηλικία των ασθενών επιδρά σημαντικά στην απορρόφηση του φαρμάκου (Σχήμα Γ.7.). Τα υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου προσδιορίστηκαν σε ασθενείς ηλικίας σαράντα έως πενήντα ετών. Αυτό βεβαίως σχετίζεται με τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων του VPA σε αυτούς τους ασθενείς, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους μικρότερης ή μεγαλύτερης ηλικίας, στους οποίους το φάρμακο χορηγήθηκε συστηματικά σε χαμηλότερες δόσεις.

Η συσχέτιση των μέσων τιμών του VPA στις τρίχες και στον ορό του αίματος παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Αυτό οφείλεται στο ότι τα επίπεδα του φαρμάκου στον ορό του αίματος εξαρτώνται από ορισμένους αστάθμητους παράγοντες, όπως το χρονικό διάστημα μεταξύ της δειγματοληψίας του αίματος και τελευταίας χορήγησης του φαρμάκου ή την πιθανή πολυφαρμακία, που δεν αναφέρθηκε ή στη μη συμμόρφωση του ασθενούς σε σταθερή και συστηματική χορήγηση του φαρμάκου.

Επίσης, τεκμηριώθηκε η εξάρτηση των επιπέδων του VPA από τις χορηγούμενες δόσεις (Σχήμα Γ.3.). Βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου στις τρίχες με την αύξηση των δόσεων του φαρμάκου στους ασθενείς. Παρατηρήθηκαν και γραφικά χαμηλότερες τιμές του VPA σε τρίχες γκριζου και ξανθού χρώματος σε

σχέση με τις μαύρου και καστανού χρώματος τρίχες (.Πίνακας Γ.9. και Σχήμα Γ.5.). Η στατιστική ανάλυση των επιπέδων του VPA στις τρίχες σε σχέση με το χρώμα δεν έδωσε όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Άρα, απαιτείται περαιτέρω έλεγχος με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

4. Γενικά συμπεράσματα

Γενικά, από την παρούσα εργασία εξήχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- I. Διαπιστώθηκε ότι τα φάρμακα καρβαμαζεπίνη (CBZ), φαινυτοΐνη (PHT) και βαλπροϊκό οξύ (VPA), μετά από συστηματική και χρόνια χορήγηση σε άτομα, εναποτίθενται στις τρίχες των ατόμων αυτών σε μετρήσιμες συγκεντρώσεις.
- II. Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των CBZ και PHT στις τρίχες είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες του VPA για συγκρίσιμες δοσολογικές χορηγήσεις.
- III. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των φαρμάκων στις τρίχες δεν εξαρτώνται από το φύλο των ατόμων, που τους χορηγήθηκαν συστηματικά.
- IV. Παρατηρήθηκε, ότι οι συγκεντρώσεις των CBZ και PHT στις τρίχες εμφανίζουν προοδευτική μείωση από το 1ο προς το 5ο τεμάχιο τριχών, δηλαδή όσο απομακρύνεται το τμήμα από τη ρίζα των τριχών. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις του VPA στις τρίχες, γενικά παρουσιάζουν αύξηση ή έστω μικρή μείωση με την απομάκρυνση των τμημάτων τριχών από τη ρίζα της τρίχας.
- V. Παρατηρήθηκε συσχέτιση των δόσεων των φαρμάκων με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των φαρμάκων στις τρίχες. Όταν αυξάνονταν οι χορηγούμενες δόσεις των φαρμάκων στους ασθενείς, είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερες συγκεντρώσεις των αντίστοιχων φαρμάκων στις τρίχες αυτών των ασθενών.
- VI. Η διάρκεια χορήγησης των φαρμάκων με συστηματική και σταθερή δόση δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των φαρμάκων στις τρίχες.
- VII. Δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικώς σαφής σχέση ανάμεσα στο χρώμα των τριχών και την συγκέντρωση των φαρμάκων σ' αυτές. Παρατηρήθηκαν όμως (και γραφικώς) χαμηλότερες τιμές των PHT και VPA σε τρίχες γκριζού και ξανθού χρώματος σε σχέση με τις καστανού και μαύρου χρώματος τρίχες.

- VIII. Παρατηρήθηκε σημαντική εξάρτηση των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στις τρίχες με την ηλικία των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη.
- IX. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στις τρίχες και στα δείγματα αίματος των ατόμων, που βρίσκονταν σε συστηματική χορήγηση με αυτά.
- X. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδωσαν σαφή συσχέτιση των επιπέδων των απορροφούμενων φαρμάκων στις τρίχες μεταξύ των ατόμων που βρίσκονταν σε θεραπεία μόνον με ένα από αυτά και εκείνων που βρίσκονταν σε συνδυαστική θεραπεία και με άλλα φάρμακα.

Ειδικότερα:

- I. Ο μηχανισμός απορρόφησης των μελετούμενων φαρμάκων στις τρίχες είναι συνδυασμός και των δύο μοντέλων απορρόφησης, δηλαδή του εγκλωβισμού κυρίως μέσω της αιματικής κυκλοφορίας (μοντέλο εγκλωβισμού) και της απορρόφησης μέσω κυρίως του ιδρώτα και σμήγματος (μοντέλο του ιδρώτα). Το δεύτερο είναι περισσότερο εμφανές στην περίπτωση απορρόφησης του VPA.
- II. Η απορρόφηση των φαρμάκων επιβεβαιώθηκε *in vivo* με την ανάλυση τριχών ασθενών σε συστηματική θεραπεία με αυτά και *in vitro* με τα πειράματα εξωτερικής απορρόφησης των φαρμάκων σε τρίχες ατόμων, τα οποία δεν ελάμβαναν κανένα από τα μελετούμενα φάρμακα.
- III. Η προοδευτική μείωση των συγκεντρώσεων των CBZ και PHT κατά μήκος του στελέχους των τριχών οφείλεται στην απομάκρυνση και αντικατάσταση τους στις θέσεις δέσμευσης πάνω στις τρίχες, με ουσίες περισσότερο αλκαλικές από αυτά και οι οποίες περιέχονται σε όλα τα καλλυντικά υγιεινής περιποίησης τριχών ή πιθανόν και στην αποδόμηση των φαρμάκων.
- IV. Η αύξηση ή η πολύ μικρή μείωση των συγκεντρώσεων του VPA κατά μήκος του στελέχους των τριχών οφείλεται κυρίως στο ότι το φάρμακο, εκτός της απορρόφησης του μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, απορροφάται στις τρίχες και σύμφωνα με το μοντέλο του ιδρώτα. Στο όξινο περιβάλλον του ιδρώτα οι δεσμοί είναι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι ουσίες που δεσμεύονται στις τρίχες περισσότερο είναι εκείνες με όμοιες υδροφοβικότητες με τις τρίχες, γεγονός που πιθανόν ισχύει και με το VPA.

- V. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των CBZ και PHT σε σχέση με εκείνες του VPA, με συγκρίσιμες χορηγούμενες δόσεις, μπορεί να οφείλονται στην ισχυρότερη και ποσοτικά υψηλότερη απορρόφηση των αλκαλικών ουσιών σε σχέση με εκείνων, που παρουσιάζουν όξινες ιδιότητες.
- VI. Η εξάρτηση των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στις τρίχες από την ηλικία οφείλεται κατά κύριο λόγο στις χορηγούμενες δόσεις των φαρμάκων στις αντίστοιχες ηλικίες.

Τελικά, η δυνατότητα προσδιορισμού των μελετούμενων φαρμάκων στις τρίχες παρέχει μια αξιόπιστη και χρόνια καταγραφή της θεραπείας με αυτά και μπορεί να αντικαταστήσει την καθημερινή μέτρηση των επιπέδων τους στο αίμα. Τα αντίστοιχα “προφίλ” των CBZ, PHT, και VPA στις τρίχες, επέχουν θέση “καταγραφικής ταινίας”, στην οποία αποθηκεύονται όλα τα δεδομένα του ατομικού ιστορικού χρήσης των μελετούμενων φαρμάκων.

Χωρίς αμφιβολία όμως υπάρχουν ακόμη πολλά θέματα σχετικά με τον προσδιορισμό των προαναφερομένων φαρμάκων στις τρίχες, τα οποία πρέπει να μελετηθούν. Έχουν όμως ήδη συναχθεί πολύτιμες και αξιόπιστες πληροφορίες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στην ιατρική κλινική πράξη, όσο και στην ιατροδικαστική επιστήμη.

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ

A. ΚΑΡΒΑΜΑΖΕΠΙΝΗ

1. Πίνακες δημογραφικών στοιχείων, πειραματικών και στατιστικών δεδομένων.

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.1.

Πειραματικά δεδομένα από την ανάκτηση της καρβαμαζεπίνης με τις μεθόδους FPIA και HPLC

Προστιθέμενη Ποσότητα CBZ (μg)	FPIA μέθοδος			HPLC μέθοδος		
	Ανάκτηση ^{α,β} (μg)	CV (%)	Εκατοστιαία ανάκτηση (%)	Ανάκτηση ^{α,β} (μg)	CV (%)	Εκατοστιαία ανάκτηση (%)
0.0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
0.5	0.27 ± 0.02	7.41	54	0.26 ± 0.02	7.66	52
1.0	0.60 ± 0.04	6.70	60	0.55 ± 0.03	5.48	55
1.5	0.96 ± 0.06	6.34	64	0.99 ± 0.08	8.12	66
2.0	1.49 ± 0.09	5.70	75	1.46 ± 0.12	8.22	72
2.5	1.74 ± 0.10	5.75	70	1.80 ± 0.15	8.33	72

ΔΑ: Δεν Ανιχνεύτηκε, CV: σταθερά διακύμανσης, ^α Μέση τιμή ± SD, ^β Αριθμός δειγμάτων = 4

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.2.

Πειραματικά αποτελέσματα από την εξωτερική απορρόφηση της CBZ σε πρότυπες τρίχες.

No Δείγματος	Διάρκεια Επώασης (h)	Μέθοδος FPIA		Μέθοδος HPLC	
		Απορρόφηση ^{α,β} (μg/g)	CV (%)	Απορρόφηση ^{α,β} (μg/g)	CV (%)
1	4	ΔΑ		ΔΑ	
2	8	ΔΑ		ΔΑ	
3	12	1.35 ± 0.12	8.89	1.10 ± 0.09	8.18
4	16	1.92 ± 0.16	8.33	1.68 ± 0.15	8.93
5	20	2.21 ± 0.19	8.59	2.40 ± 0.17	7.08
6	24	2.61 ± 0.12	4.59	2.80 ± 0.25	8.93
7	48	3.29 ± 0.13	3.95	3.15 ± 0.28	8.89
8	96	3.51 ± 0.29	8.26	3.33 ± 0.25	7.51
9	144	3.48 ± 0.31	8.91	3.60 ± 0.31	8.61
10	192	3.15 ± 0.25	7.94	2.95 ± 0.22	7.46
11	240	3.67 ± 0.32	8.72	3.96 ± 0.30	7.58

CV: σταθερά διακύμανσης

α Μέση τιμή ± SD

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.3.

Δημογραφικά δεδομένα, ιστορικά δοσολογίας και συγκεντρώσεις της CBZ στον ορό αίματος γυναικών σε συστηματική θεραπεία με CBZ.

No Ασθενούς	Ηλικία(έτη)	Δόση CBZ (mg/24h)	Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία
1	6	400	2	Μαύρο	
2	18	400	>24	Μαύρο	
3	19	800	>24	Καστανό	Li
4	19	400	>24	Μαύρο	
5	19	400	>24	Μαύρο	
6	20	400	>24	Μαύρο	
7	22	800	6	Μαύρο	Διαζεπάμη
8	25	600	>24	Μαύρο	PHT+PHB
9	28	400	>24	Καστανό	
10	30	600	3	Μαύρο	
11	35	600	2	Μαύρο	
12	40	600	24	Μαύρο	PHT
13	50	600	>24	Βαμμένο	
14	52	1000	>24	Μαύρο	
15	55	1000	>24	Βαμμένο	PHT+PHB
16	60	800	>24	Καστανό	
17	63	1000	>24	Βαμμένο	
18	74	300	>24	Γκρίζο	Θεραπεία για Parkinson

PHT: φαινυτοΐνη, PHB: φαινοβαρβιτάλη, Li: λίθιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.4.**Δημογραφικά στοιχεία, ιστορικά δοσολογίας και συγκεντρώσεις της CBZ****στον ορό αίματος ανδρών σε συστηματική θεραπεία με CBZ.**

No Ασθενούς	Ηλικία(έτη)	Δόση CBZ (mg/24h)	Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία
19	5	400	5	Καστανό	
20	7	400	>24	Καστανό	
21	7	300	10	Μαύρο	
22	8	400	18	Καστανό	
23	9	600	18	Ξανθό	
24	10	400	>24	Καστανό	
25	13	200	6	Καστανό	
26	15	400	>24	Καστανό	
27	19	200	12	Καστανό	
28	20	600	12	Μαύρο	
29	23	600	>24	Μαύρο	
30	25	400	18	Καστανό	
31	25	500	4	Καστανό	
32	28	600	>24	Μαύρο	
33	31	800	7	Ξανθό	
34	35	200	7	Βαμμένο	
35	36	600	>24	Ξανθό	
36	40	400	18	Καστανό	
37	42	400	6	Καστανό	
38	50	600	18	Καστανό	Li
39	61	400	>24	Γκρίζο	
40	64	500	2	Γκρίζο	

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.5.

Συγκεντρώσεις καρβαμαζεπίνης σε τρίχες γυναικών σε συστηματική θεραπεία με το φάρμακο, με την μέθοδο FRIA.

No Ασθενούς	Συγκεντρώσεις της CBZ σε τεμάχια τριχών (μήκους 2cm) από την ρίζα της τρίχας (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Επίπεδα CBZ στον ορό (μg/ml)
	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο		
	1	44.29	14.53				
2	18.68	14.76	12.55	11.88	10.45	13.66	6.85
3	32.83	27.97	25.15	22.55	20.80	25.86	6.46
4	24.96	19.17	16.25	14.06	13.68	17.62	6.78
5	23.79	20.05	17.22	15.35	14.75	18.23	6.48
6	23.56	17.94	17.62	15.36	14.52	17.80	7.96
7	9.89	7.42	6.29	5.33		7.23	4.90
8	29.40	24.88	20.56	17.95	16.12	21.78	5.69
9	39.40	30.35	22.57			30.77	6.60
10	29.20	9.56				19.38	8.80
11	31.27	10.87				21.07	7.50
12	32.11	26.27	22.67	19.95	18.27	23.85	6.10
13	33.71	28.59	23.25	20.52	18.92	25.00	6.78
14	48.74	39.53	33.34	30.5	28.12	36.05	7.55
15	44.12	35.18	27.06	24.32	22.62	30.66	7.33
16	28.94	22.85	18.55	15.64	14.04	20.00	11.16
17	30.78	24.62	18.77	14.91	14.1	20.64	8.22
18	23.87	19.71	15.55	15.95	14.53	17.92	10.30

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.6.

Συγκεντρώσεις καρβαμαζεπίνης σε τρίχες γυναικών σε συστηματική θεραπεία με το φάρμακο, με την μέθοδο HPLC.

No Ασθενούς	Συγκεντρώσεις της CBZ σε τεμάχια τριχών (μήκους 2cm) από την ρίζα της τρίχας (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Επίπεδα CBZ στον ορό (μg/ml)
	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο		
	1	36.31	11.33				
2	14.94	12.10	9.79	8.05	7.34	10.44	6.21
3	27.81	22.71	19.74	17.04	15.52	20.56	6.23
4	19.5	15.1	12.82	11.25	10.96	13.93	6.92
5	19.94	16.35	14.1	13.25	12.2	15.17	5.98
6	18.85	15.98	14.12	12.45	11.62	14.60	7.57
7	8.11	6.46	5.38	4.62		6.14	5.1
8	28.48	23.56	19.01	17.2	16.23	20.90	5.52
9	35.96	29.07	21.56			28.86	6.15
10	25.70	7.45				16.57	8.61
11	25.64	8.48				17.06	7.1
12	27.69	22.34	18.44	16.47	15.12	20.01	6.82
13	31.58	24.45	20.58	18.27	16.99	22.37	6.9
14	41.15	33.34	28.95	25.15	23.67	30.45	6.98
15	40.86	30.90	25.99	21.72	19.95	27.88	6.52
16	28.50	22.20	18.12	16.18	14.23	19.85	10.05
17	29.16	24.52	16.32	14.55	12.62	19.43	8.05
18	22.66	18.88	14.30	15.05	13.62	16.90	9.95

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.7.**Μειώσεις της συγκέντρωσης της καρβαμαζεπίνης ανάμεσα στα τεμάχια τριχών γυναικών.**

No Ασθενούς	Μέθοδος FPIA (%)		Μέθοδος HPLC	
	1 ^ο στο 2 ^ο *	1 ^ο στο 3 ^ο *	1 ^ο στο 2 ^ο *	1 ^ο στο 3 ^ο *
	(%)	(%)	(%)	(%)
1	67.19		68.80	
2	20.99	32.82	19.03	34.49
3	14.80	23.39	18.34	29.02
4	23.20	34.90	22.56	34.26
5	15.72	27.62	18.00	29.29
6	23.85	25.21	15.23	25.09
7	24.97	36.40	20.33	33.65
8	15.37	30.07	17.28	33.25
9	22.97	42.72	19.16	40.04
10	67.26		70.99	
11	65.24		66.94	
12	18.19	29.40	19.32	33.41
13	15.19	31.03	22.58	34.83
14	18.90	31.60	18.98	29.65
15	20.26	38.67	24.38	36.39
16	21.04	35.90	22.11	36.42
17	20.01	39.02	15.91	44.03
18	17.43	34.86	16.68	36.89

* 1^ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.8.**Συγκεντρώσεις καρβαμαζεπίνης σε τρίχες ανδρών σε συστηματική θεραπεία με το φάρμακο, με την μέθοδο FRIA.**

No Ασθενούς	Συγκεντρώσεις της CBZ σε τεμάχια τριχών (μήκους 2cm) από την ρίζα της τρίχας (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Επίπεδα CBZ στον ορό (μg/ml)
	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο		
19	46.00	37.86	18.13			34.00	7.00
20	25.87	19.72	15.67			20.42	5.91
21	21.80	18.21	17.13	14.62	14.01	17.15	7.42
22	23.25	19.62	16.96			19.94	6.99
23	32.60	31.53				32.07	6.55
24	24.68	18.55	16.75			19.99	6.95
25	13.92	11.36				12.64	5.84
26	23.24	19.25	15.35	11.05	10.52	15.88	6.94
27	15.09	11.91	8.55	6.58	5.22	9.47	9.15
28	25.75	21.55	16.18	13.34	12.1	17.78	10.32
29	29.25	22.50	18.58	16.47	14.92	20.34	10.00
30	15.32	12.1	10.55			12.66	6.12
31	26.95	20.07	9.78			18.93	8.98
32	38.42	26.57	29.05			31.35	10.26
33	41.21	32.95	25.25			33.14	8.07
34	12.89	10.72	8.62			10.74	8.32
35	29.17	23.88	18.00	16.23	15.35	20.53	6.70
36	27.85	23.53	18.15	15.31	14.05	19.78	6.15
37	30.02	25.83	26.15	25.33		26.83	7.52
38	28.43	23.02	19.91			23.79	9.65
39	14.73	12.33				13.53	6.70
40	25.16	8.45				16.81	9.17

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.9.**Συγκεντρώσεις καρβαμαζεπίνης σε τρίχες ανδρών σε συστηματική θεραπεία με το φάρμακο, με την μέθοδο HPLC.**

No Ασθενούς	Συγκεντρώσεις της CBZ σε τεμάχια τριχών (μήκους 2cm) από την ρίζα της τρίχας (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Επίπεδα CBZ στον ορό (μg/ml)
	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο		
	19	35.36	28.42	22.38			
20	21.21	15.87	14.11			17.06	6.12
21	21.63	17.67	15.45	14.15	13.87	16.55	6.83
22	19.95	17.22	15.63			17.60	6.58
23	27.86	25.86				26.86	6.47
24	22.15	16.55	15.36			18.02	6.05
25	12.85	9.79				11.32	6.05
26	19.98	15.38	12.05	10.88	10.13	13.68	6.18
27	11.98	9.85	6.63	5.22	4.96	7.73	9.38
28	20.56	17.62	14.35	11.93	10.25	14.94	9.72
29	25.40	19.67	17.23	15.11	14.22	18.33	9.51
30	15.35	12.78	10.92			13.02	6.26
31	24.56	18.56	9.25			17.46	9.22
32	30.73	23.79	20.34			24.95	9.85
33	35.72	28.31	22.05			28.69	7.53
34	12.23	9.87	8.52			10.21	8.72
35	23.51	19.09	15.65	13.97	13.42	17.13	6.95
36	22.56	18.32	13.9	11.75	11.65	15.64	5.82
37	24.74	21.18	21.56	21.11		22.15	7.04
38	23.15	18.97	15.12			19.08	9.88
39	11.78	8.96				10.37	6.32
40	20.05	6.88				13.47	8.59

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.10.**Μειώσεις της συγκέντρωσης της καρβαμαζεπίνης ανάμεσα στα τεμάχια τριχών ανδρών ασθενών.**

Νο Ασθενούς	Μέθοδος FPIA (%)		Μέθοδος HPLC	
	1 ^ο στο 2 ^ο * (%)	1 ^ο στο 3 ^ο * (%)	1 ^ο στο 2 ^ο * (%)	1 ^ο στο 3 ^ο * (%)
19	17.70	60.59	19.63	36.71
20	23.77	39.43	25.18	33.48
21	16.47	21.42	18.31	28.57
22	15.61	27.05	13.68	21.65
23	3.28		7.18	
24	24.84	32.13	25.28	30.65
25	18.39		23.81	
26	17.17	33.95	23.04	39.70
27	21.07	43.34	17.78	44.66
28	16.31	37.17	14.30	30.20
29	23.08	36.48	22.56	32.17
30	21.02	31.14	16.74	28.86
31	25.53	63.71	24.43	62.34
32	30.84	24.39	22.59	33.83
33	20.04	38.73	20.74	38.27
34	16.83	33.13	19.30	30.34
35	18.14	38.29	18.78	33.43
36	15.51	34.83	18.79	38.39
37	13.96	12.89	14.39	12.85
38	19.03	29.97	18.06	34.69
39	16.29		23.94	
40	66.41		65.69	

* 1^ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.12.

Ποσοστιαίες συχνότητες και μέσες τιμές της καρβαμαζεπίνης στις τρίχες αντίστοιχες των ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων της καρβαμαζεπίνης

Ημερήσια Δόση (mg/24h)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές τριχών με FPIA (μg/g)	Μέσες τιμές τριχών με HPLC (μg/g)
200	3	7.5	10.95	9.75
300	2	5.0	17.54	16.73
400	15	37.5	20.70	17.54
500	2	5.0	17.87	15.46
600	11	27.5	23.36	19.84
800	4	10.0	21.56	18.81
1000	3	7.5	29.11	25.92
Σύνολο	40	100		

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.13.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της καρβαμαζεπίνης στις τρίχες, αντίστοιχες του χρώματος των τριχών.

Χρώμα Τριχών	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές Δόσεων (mg/24/h)	Μέσες τιμές τριχών με FPIA (μg/g)	Μέσες τιμές τριχών με HPLC (μg/g)
Ξανθό	3	7.5	666.7	28.58	24.23
Βαμμένο	4	10.0	700.0	21.76	19.97
Μαύρο	15	37.5	553.3	20.85	17.59
Καστανό	15	37.5	446.7	20.73	18.05
Γκρίζο	3	7.5	400.0	16.09	13.58
Σύνολο	40	100			

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.14

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της καρβαμαζεπίνης στις τρίχες, αντίστοιχες της διάρκειας χορήγησης της.

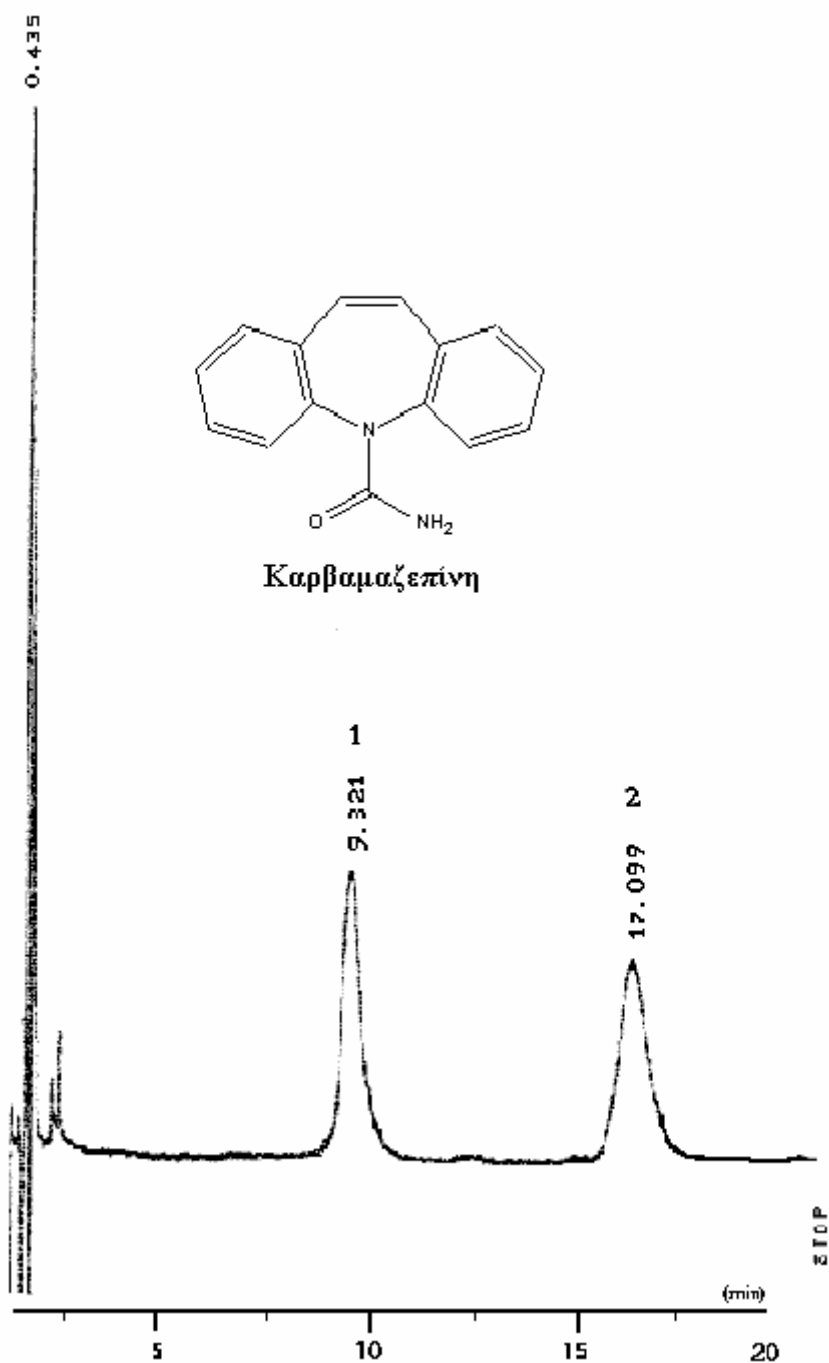
Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	FPIA Μέση Τιμή (μg/g)	HPLC Μέση Τιμή (μg/g)
≤6	6	15	500.0	23.27	19.52
6-12	6	15	450.0	17.96	15.84
12-18	2	5	400.0	13.63	11.34
18-24	6	15	500.0	22.01	18.70
>24	20	50	575.0	21.90	19.05
Σύνολο:	40	100			

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.15.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες, αντίστοιχες της ηλικίας των ασθενών.

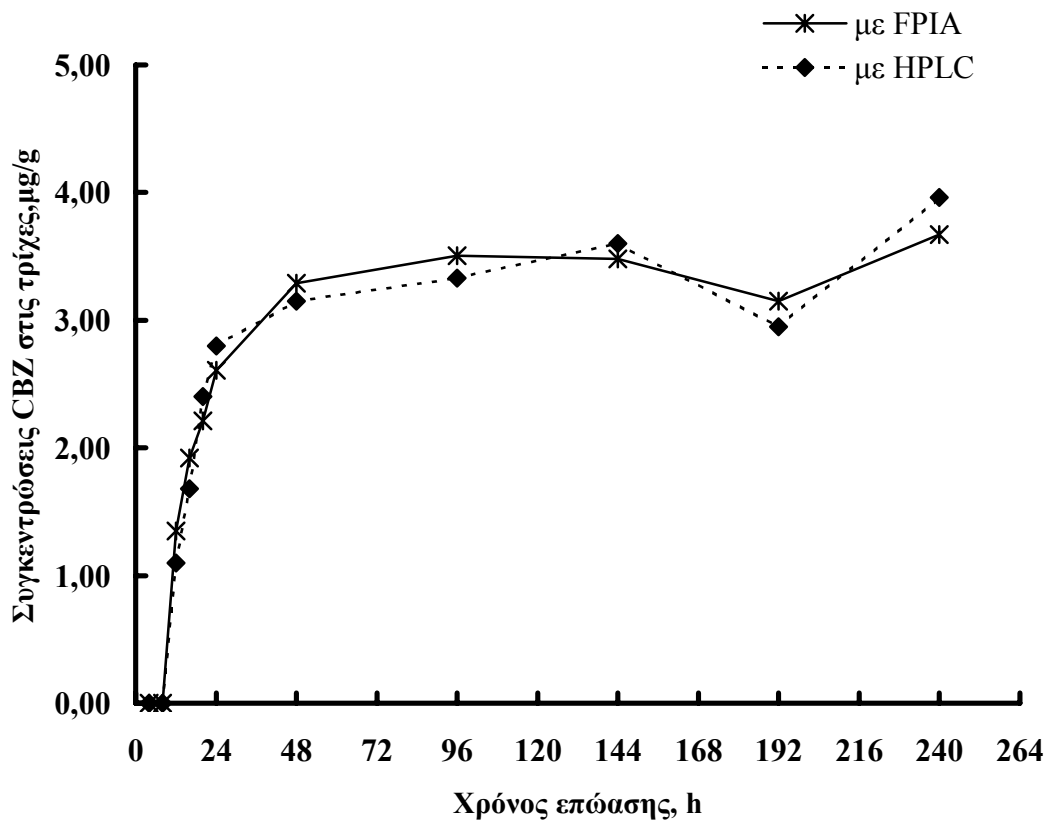
Ηλικία (έτη)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	FPIA Μέση Τιμή (μg/g)	HPLC Μέση Τιμή (μg/g)
≤10	7	18	414.3	24.71	21.23
10 - 20	9	23	422.2	16.55	13.60
20 - 30	8	20	562.5	20.31	18.28
30 - 40	6	15	533.3	21.52	18.12
40 - 50	3	8	533.3	25.21	21.20
50 - 60	3	8	933.3	28.90	26.06
60 - 70	3	8	633.3	16.99	14.42
>70	1	3	300.0	17.92	16.90
Σύνολο:	40	100			

2. Γραφικές παραστάσεις



Σχήμα Α.1.

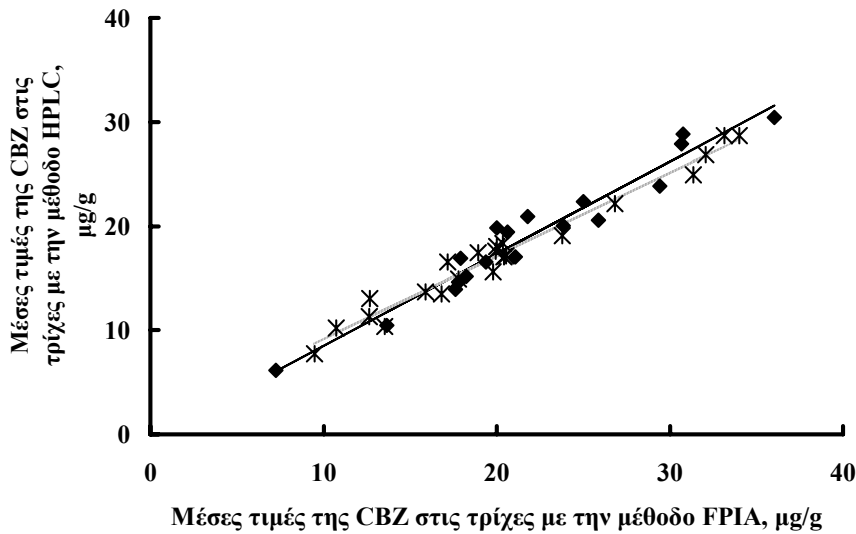
Χρωματογράφημα HPLC εκχυλίσματος από δείγμα τριχών ασθενούς σε συστηματική θεραπεία με CBZ. Η κορυφή 1 ($R_t = 9.3$) αντιστοιχεί στην CBZ και η κορυφή 2 ($R_t = 17.1$) αντιστοιχεί στο I.S. (εσωτερικό standard).



Σχήμα Α.2.

Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες σε σχέση με την διάρκεια επώασης των τριχών σε 3 mL διαλύματος της CBZ (5 μg/mL) σε φωσφορικό ρυθμιστικό (pH = 6).

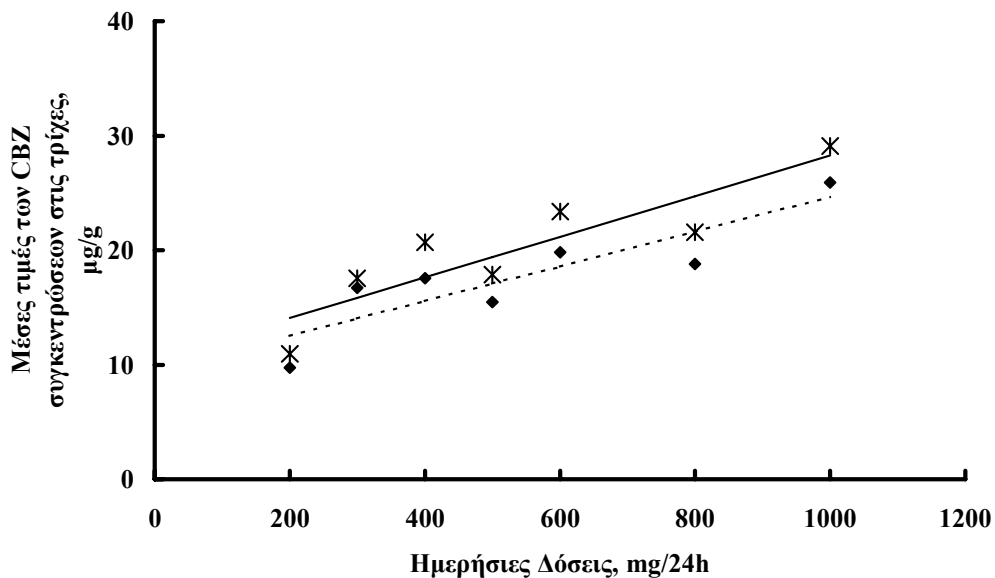
$y = 0.885x - 0.352$ ($r=0.973$, $p<0.001$) ◆ μέσες τιμές — γυναικών
 $y = 0.801x + 1.113$ ($r=0.985$, $p<0.001$) ✱ μέσες τιμές - - - ανδρών



Σχήμα Α.3.

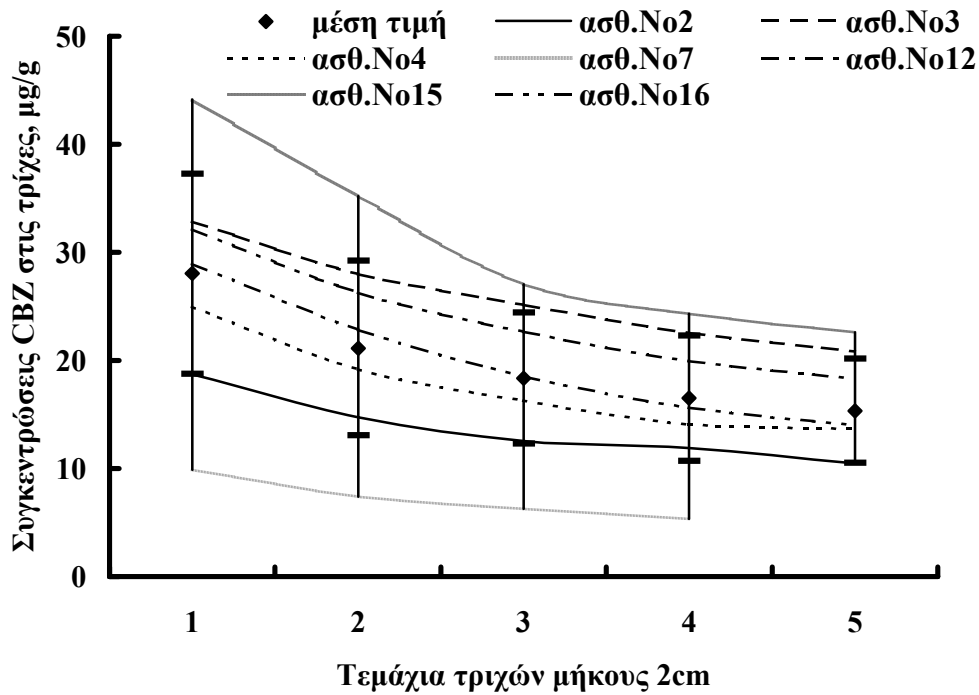
Συσχέτιση των μεθόδων FPIA και HPLC στην μέτρηση των μέσων συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες ανδρών και γυναικών σε συστηματική θεραπεία με CBZ.

$y = 0.018x + 10.542$ ($r=0.889$, $p<0.01$) ✱ μέσες τιμές — με FPIA
 $y = 0.015x + 9.476$ ($r=0.879$, $p<0.01$) ◆ μέσες τιμές - - - με HPLC



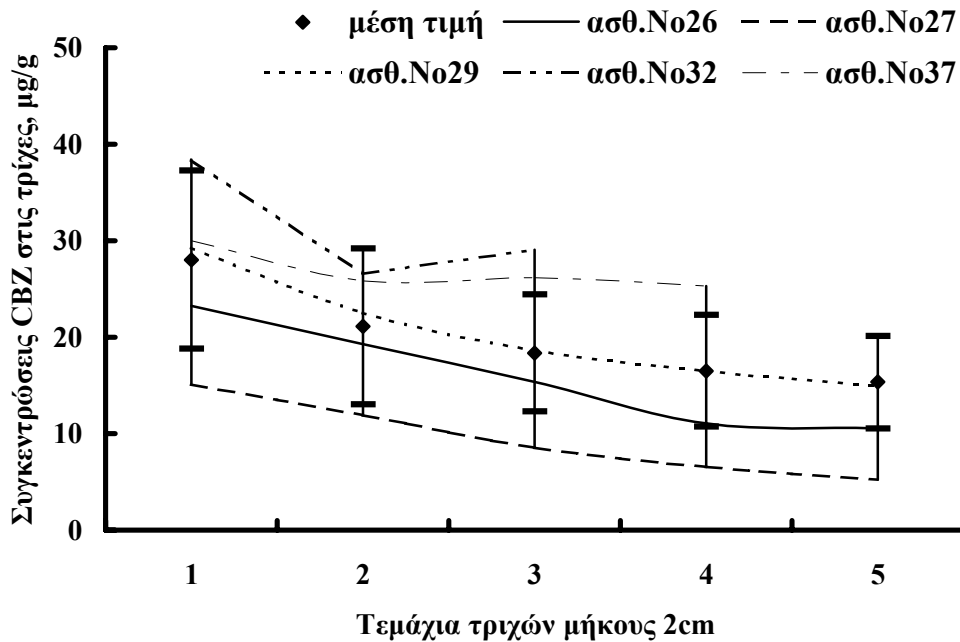
Σχήμα Α.4.

Συσχέτιση ανάμεσα στις ημερήσιες δόσεις και στις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της CBZ στα εκχυλίσματα ασθενών με την ίδια χορηγούμενη δόση CBZ και με τις δύο μεθόδους FPIA και HPLC.



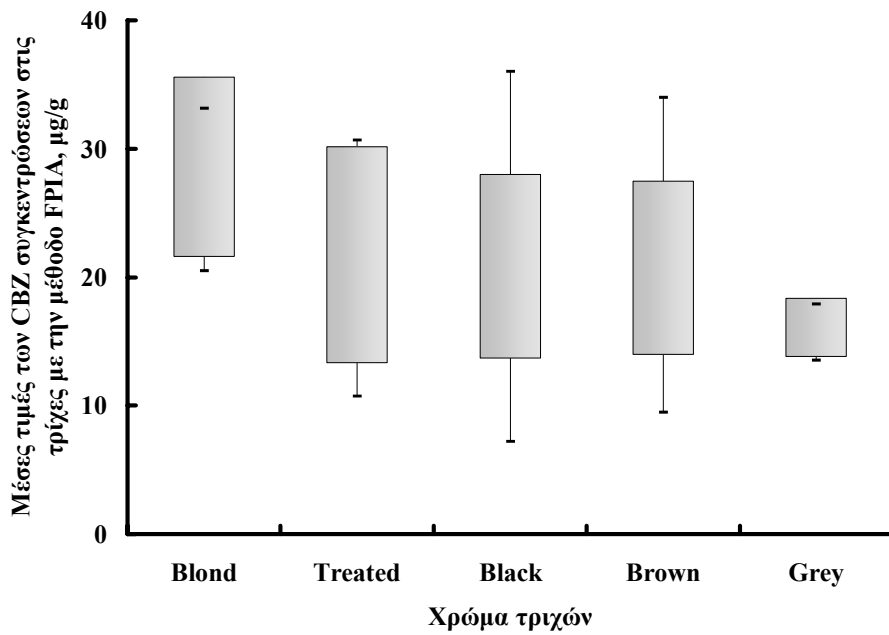
Σχήμα Α.5.

Μερικά “προφίλ” της CBZ στις τρίχες γυναικών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων της στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών με την HPLC μέθοδο.



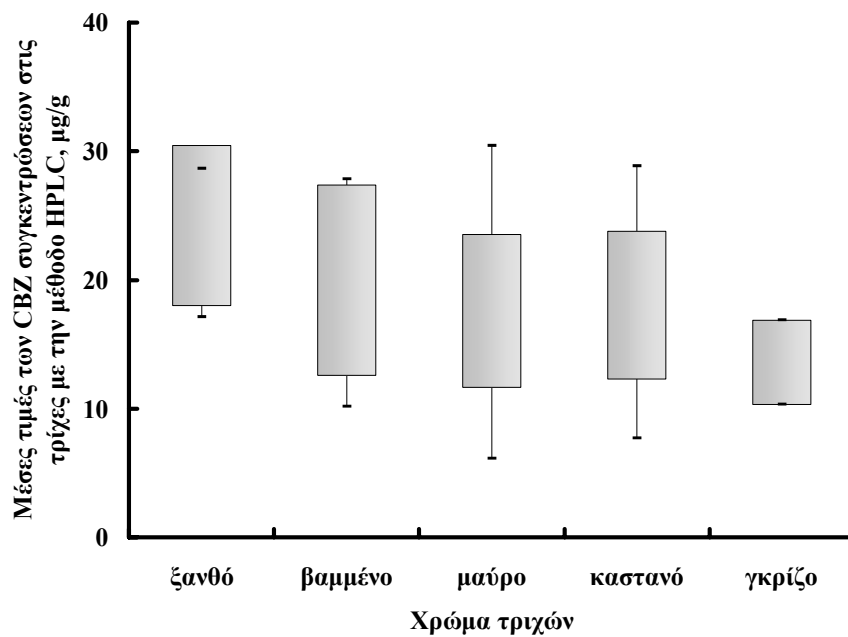
Σχήμα Α.6.

Μερικά “προφίλ” της CBZ στις τρίχες ανδρών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων της στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών με την HPLC μέθοδο.



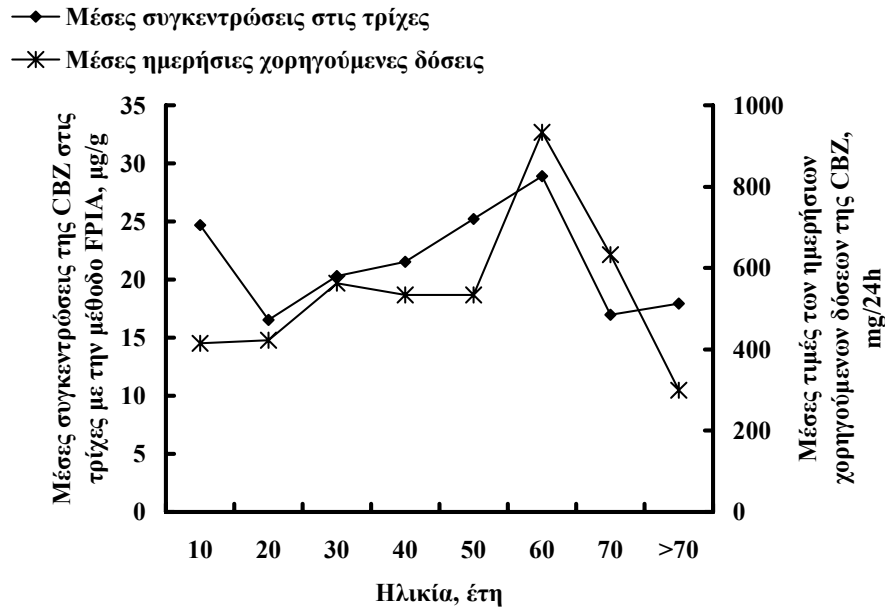
Σχήμα Α.7.

Γραφική απεικόνιση (box plot) των μέσων τιμών CBZ στις τρίχες για το κάθε χρώμα τριχών, εμφανίζοντας τον βαθμό διασποράς τους, με την μέθοδο FPIA.



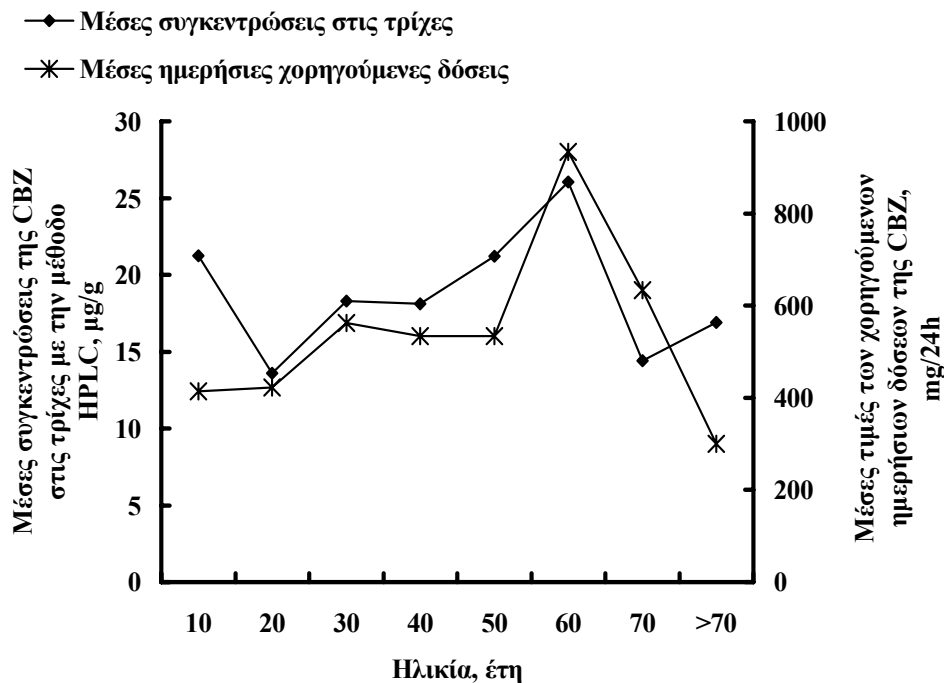
Σχήμα Α.8.

Γραφική απεικόνιση (box plot) των μέσων τιμών CBZ στις τρίχες για το κάθε χρώμα τριχών, εμφανίζοντας τον βαθμό διασποράς τους, με την μέθοδο HPLC.



Σχήμα Α.9.

Γραφική συσχέτιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες με την μέθοδο FRIA και των μέσων ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με την ηλικία των ατόμων. που ελάμβαναν συστηματικά CBZ.



Σχήμα Α.10.

Γραφική συσχέτιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της CBZ στις τρίχες με την μέθοδο HPLC και των μέσων ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με την ηλικία των ατόμων. που ελάμβαναν συστηματικά CBZ.

B. ΦΑΙΝΥΤΟΪΝΗ

1. Πίνακες Δημογραφικών Στοιχείων, Πειραματικών και Στατιστικών Δεδομένων της Φαινυτοΐνης.

Πίνακας Β.1

Πειραματικά αποτελέσματα από τις ανακτήσεις της φαινυτοΐνης με τις μεθόδους FPIA και HPLC.

Προστιθέμενη ποσότητα ΡΗΤ (μg)	Μέθοδος FPIA			Μέθοδος HPLC		
	Ανάκτηση ^{α,β} (μg)	CV (%)	Εκατοστιαία Ανάκτηση (%)	Ανάκτηση ^{α,β} (μg)	CV (%)	Εκατοστιαία Ανάκτηση (%)
0.0	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
0.5	0.253 ± 0.031	8.24	50.5	0.254 ± 0.046	7.33	50.8
1.0	0.714 ± 0.027	4.77	71.4	0.717 ± 0.057	6.15	71.7
1.5	0.944 ± 0.047	7.35	63.0	0.972 ± 0.047	8.65	64.8
2.0	1.099 ± 0.022	6.13	54.9	1.106 ± 0.088	5.52	55.3
2.5	1.643 ± 0.075	7.51	65.7	1.550 ± 0.052	8.51	62.0

ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε, CV: σταθερά διακύμανσης,..^α Μέση τιμή ± SD, ^β Αριθμός δειγμάτων = 4

Πίνακας Β.2.

Πειραματικά αποτελέσματα από την εξωτερική απορρόφηση της φαινυτοΐνης σε καθαρές τρίχες.

No Δείγματος	Διάρκεια Επώασης (h)	Μέθοδος FPIA		Μέθοδος HPLC	
		Απορρόφηση ^{α,β} (μg/g)	CV (%)	Απορρόφηση ^{α,β} (μg/g)	CV (%)
1	2	6.54 ± 1.01	5.18	4.15 ± 1.56	4.32
2	4	11.78 ± 3.14	6.55	14.22 ± 2.72	6.28
3	8	23.69 ± 3.99	5.32	26.45 ± 4.55	7.76
4	12	31.62 ± 2.37	4.00	35.12 ± 3.89	5.51
5	16	44.27 ± 7.91	6.25	43.44 ± 9.43	5.78
6	24	52.53 ± 9.37	9.75	60.80 ± 7.18	9.84
7	48	84.00 ± 5.38	8.22	86.69 ± 6.54	8.99
8	96	93.30 ± 10.77	9.89	95.11 ± 8.96	9.13
9	144	102.19 ± 8.72	9.05	101.35 ± 10.65	9.72
10	192	107.61 ± 10.50	8.90	104.83 ± 10.93	9.35
11	240	109.90 ± 6.31	6.92	111.70 ± 8.42	8.92

CV: σταθερά διακύμανσης

α Μέση τιμή ± SD

β Αριθμός δειγμάτων = 4

Πίνακας Β.3.

Δημογραφικά δεδομένα και ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής των γυναικών ασθενών σε συστηματική θεραπεία με την φαινοτόϊνη.

No Δείγματος	Ηλικία (έτη)	Δοσολογία PHT (mg/24h)	Διάρκεια αγωγής (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία *
1	30	100	>24	Καστανό	
2	60	100	>24	Γκρίζο	
3	48	100	18	Μαύρο	
4	50	100	>24	Μαύρο	
5	67	100	>24	Γκρίζο	
6	40	100	>24	Ξανθό	
7	60	100	>24	Γκρίζο	
8	63	200	>24	Μαύρο	CBZ
9	20	200	>24	Μαύρο	VPA+PHB
10	50	200	5	Μαύρο	
11	38	200	18	Καστανό	Li
12	12	200	12	Καστανό	
13	15	200	3	Ξανθό	VPA
14	50	200	6	Μαύρο	PHB
15	41	200	12	Καστανό	
16	25	300	2	Καστανό	
17	20	300	6	Μαύρο	
18	23	300	>24	Ξανθό	
19	55	300	>24	Γκρίζο	Li
20	22	300	2	Μαύρο	
21	19	300	7	Μαύρο	
22	23	300	>24	ξανθό	
23	39	400	>24	καστανό	
24	45	400	>24	μαύρο	
25	35	400	18	μαύρο	Li
26	39	400	>24	καστανό	

* CBZ: καρβαμαζεπίνη, VPA: βαλπροϊκό οξύ, PHB: Φαινοβαρβιτάλη, Li: Λίθιο

Πίνακας Β.4.

Δημογραφικά δεδομένα και ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής των ανδρών ασθενών σε συστηματική θεραπεία με την φαινοτοΐνη.

No Δείγματος	Ηλικία (έτη)	Δοσολογία PHB (mg/24h)	Διάρκεια αγωγής (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία *
27	69	100	18	Καστανό	
28	37	100	>24	Μαύρο	CBZ
29	57	100	>24	Γκρίζο	
30	35	100	18	Ξανθό	
31	60	100	>24	Γκρίζο	
32	55	100	>24	Μαύρο	
33	62	100	>24	Γκρίζο	
34	60	200	>24	Γκρίζο	VPA
35	60	200	>24	Γκρίζο	Li
36	5	200	2	Ξανθό	
37	10	200	12	Καστανό	
38	9	200	2	Ξανθό	
39	12	200	18	Καστανό	
40	17	200	3	Ξανθό	
41	40	200	12	Καστανό	Li
42	36	300	>24	Καστανό	Χλωροπρομαζίνη
43	30	300	3	Καστανό	
44	32	300	>24	Μαύρο	
45	32	300	>24	Μαύρο	
46	50	300	2	Γκρίζο	CBZ + Diazepam
47	18	300	12	Μαύρο	VPA
48	20	300	3	Καστανό	
49	35	300	>24	Μαύρο	
50	30	300	>24	Μαύρο	
51	25	300	2	Μαύρο	
52	20	300	12	Μαύρο	
53	20	300	2	Μαύρο	
54	16	300	7	Μαύρο	
55	35	400	10	Καστανό	
56	43	400	>24	Καστανό	
57	38	400	>24	Μαύρο	
58	48	400	>24	Καστανό	Li
59	35	400	>24	Μαύρο	
60	30	400	>24	Καστανό	

* CBZ: καρβαμαζεπίνη, VPA: βαλπροϊκό οξύ, PHB: Φαινοβαρβιτάλη, Li: Λίθιο

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.5.

Συγκεντρώσεις φαιτυοΐνης στις τρίχες και στον ορό αίματος γυναικών ασθενών με την μέθοδο HPLC.

No Δείγματος	Συγκεντρώσεις PHT στα τεμάχια τριχών *					Μέση Τιμή (μg/g)	Συγκεντρώσεις PHT στον ορό (μg/mL)
	1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο		
1	8.95	7.82	6.72	5.15	5.00	6.73	10.98
2	5.55	4.38	3.68	3.60	3.18	4.08	8.12
3	9.12	7.91	7.25	6.02	4.68	7.00	10.82
4	9.95	7.82	7.92	5.99	6.15	7.57	9.22
5	5.45	4.58	3.95	3.81	3.38	4.23	9.35
6	9.01	7.51	6.33	5.74	4.68	6.65	9.82
7	8.95	7.82	6.72	5.15	5.00	6.73	10.98
8	21.75	17.80	15.32	14.34	12.15	16.27	13.55
9	13.58	10.91	9.39	8.92	8.10	10.18	13.02
10	21.12	18.30	17.12	14.62	11.72	16.58	16.25
11	22.33	16.13	16.50	13.68	12.12	16.15	16.93
12	14.85	12.62	11.10	9.23	7.78	11.12	16.03
13	13.51	11.12	9.95	4.22		9.70	9.82
14	20.95	18.05	16.92	14.12	12.02	16.41	15.32
15	19.82	16.78	16.50	13.68	13.08	15.97	16.93
16	24.72	20.56	10.10			18.46	11.85
17	21.12	18.50	16.32	14.05	11.72	16.34	16.11
18	17.56	14.32	13.75	11.05	9.38	13.21	17.05
19	24.50	21.34	18.56	18.06	15.32	19.56	17.15
20	22.72	19.36	7.55			16.54	11.85
21	19.96	18.05	16.32	13.55	11.72	15.92	17.95
22	10.04	9.25	7.98	6.10	5.99	7.87	14.92
23	31.76	28.02	24.91	23.80	22.40	26.18	18.73
24	28.23	24.02	21.90	19.35	18.45	22.39	17.78
25	31.10	27.15	23.91	21.53	21.85	25.11	17.05
26	30.21	26.02	23.36	21.80	19.90	24.26	18.73

* Το 1^ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.6.

Συγκεντρώσεις φαιτυοΐνης στις τρίχες και στον ορό αίματος γυναικών ασθενών με την μέθοδο FPIA.

No Δείγματος	Συγκεντρώσεις PHT στα τεμάχια τριχών *					Μέση Τιμή (μg/g)	Συγκεντρώσεις PHT στον ορό (μg/mL)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο		
1	9.65	7.75	6.86	5.35	5.03	6.93	10.34
2	4.90	3.80	3.40	3.40	3.00	3.70	7.21
3	8.95	7.63	7.18	6.25	5.02	7.01	11.78
4	10.25	8.75	7.58	6.32	6.58	7.90	9.78
5	5.90	4.80	4.45	4.31	3.75	4.64	9.21
6	8.65	7.60	6.99	6.15	5.68	7.01	10.26
7	9.36	7.55	6.42	5.35	4.37	6.61	11.34
8	20.27	16.73	15.12	15.05	12.48	15.93	14.16
9	11.88	9.88	10.39	10.90	8.09	10.23	12.25
10	20.35	17.55	15.20	14.32	12.23	15.93	16.92
11	22.13	17.02	17.56	14.25	13.30	16.85	17.55
12	15.32	13.21	11.95	10.50	8.75	11.95	15.85
13	12.22	10.75	9.12	3.95		9.01	9.22
14	21.35	18.72	16.80	14.28	12.86	16.80	16.92
15	20.93	17.52	17.85	14.25	13.90	16.89	17.55
16	22.51	19.88	9.00			17.13	12.38
17	20.35	17.25	15.62	13.71	11.00	15.59	16.91
18	18.74	15.51	14.90	12.32	9.98	14.29	16.35
19	23.12	20.20	17.25	17.57	14.95	18.62	17.83
20	23.65	19.92	8.12			17.23	13.28
21	19.56	17.32	15.88	13.11	11.50	15.47	17.65
22	10.74	9.51	8.18	6.32	6.55	8.26	15.22
23	32.83	28.82	25.35	24.12	22.36	26.70	19.05
24	28.55	24.32	21.68	19.57	18.01	22.43	18.10
25	31.76	26.90	24.05	21.98	21.81	25.30	17.45
26	30.83	26.62	23.25	22.05	20.16	24.58	18.98

* Το 1ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.7.

Μεταβολές των συγκεντρώσεων φαινυτοΐνης μεταξύ των τεμαχίων τριχών από γυναίκες ασθενείς.

No Δείγματος	Μέθοδος HPLC (%)		Μέθοδος FPIA. (%)	
	1ο – 2ο	1ο – 3ο	1ο – 2ο	1ο – 3ο
1	12.63	24.92	19.69	28.91
2	21.08	33.69	22.45	30.61
3	13.27	20.50	14.75	19.78
4	21.41	20.40	14.63	26.05
5	15.96	27.52	18.64	24.58
6	16.65	29.74	12.14	19.19
7	12.63	24.92	19.34	31.41
8	18.16	29.56	17.46	25.41
9	19.66	30.85	16.88	12.54
10	13.35	18.94	13.76	25.31
11	27.77	26.11	23.09	20.65
12	15.02	25.25	13.77	22.00
13	17.69	26.35	12.03	25.37
14	13.84	19.24	12.32	21.31
15	15.34	16.75	16.29	14.72
16	16.83	59.14	11.68	60.02
17	12.41	22.73	15.23	23.24
18	18.45	21.70	17.24	20.49
19	12.90	24.24	12.63	25.39
20	14.79	66.77	15.77	65.67
21	9.57	18.24	11.45	18.81
22	7.87	20.52	11.45	23.84
23	11.78	21.57	12.21	22.78
24	14.91	22.42	14.82	24.06
25	12.70	23.12	15.30	24.28
26	13.87	22.67	13.66	24.59

* Το 1ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στη ρίζα..

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.8.

Συγκεντρώσεις φαιτυοΐνης στις τρίχες και στον ορό αίματος ανδρών ασθενών με την μέθοδο HPLC.

No Δείγματος	Συγκεντρώσεις PHT στα τεμάχια τριχών *					Μέση Τιμή (μg/g)	Συγκεντρώσεις PHT στον ορό (μg/mL)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο		
27	5.05	4.15	3.20			4.13	9.22
28	7.10	5.72	4.95	4.00	3.02	4.96	10.32
29	3.55	3.45	2.60	2.32		2.98	8.13
30	4.15	3.45	2.80	2.55		3.24	8.13
31	4.18	3.45	2.52	2.23		3.10	9.22
32	8.55	6.52	5.88	5.09	4.45	6.10	9.22
33	8.45	7.58	6.95	5.81	4.28	6.61	9.35
34	8.12	6.52	4.72	4.50	2.98	5.37	10.33
35	9.15	7.22	5.00	4.35	2.82	5.71	12.12
36	8.75	7.10	2.80			6.22	15.20
37	8.78	7.02	5.00	4.52	4.26	5.92	16.10
38	10.75	8.53	2.50			7.26	15.20
39	14.85	12.26	11.41	10.02	9.52	11.61	16.10
40	12.51	11.12	8.95	3.72		9.08	9.82
41	18.82	15.78	15.51	13.68	11.08	14.97	16.93
42	27.75	23.52	18.66	15.99	15.20	20.22	18.15
43	15.50	13.15	10.22	4.62		10.87	12.93
44	23.86	19.90	17.56	15.20	16.12	18.53	14.90
45	25.58	21.12	19.31	20.50	16.96	20.69	16.00
46	10.20	7.86	3.21			7.09	10.91
47	25.90	20.65	18.15	17.63	15.58	19.58	13.95
48	15.65	13.31	11.22	4.82		11.25	12.34
49	23.56	19.61	17.06	14.95	14.48	17.93	16.82
50	24.35	19.83	17.31	15.52	13.52	18.11	15.21
51	22.72	18.56	8.21			16.50	12.15
52	20.12	17.53	15.35	13.26	10.61	15.37	16.11
53	23.82	19.36	8.55			17.24	13.75
54	19.91	17.15	15.65	13.16	11.81	15.54	16.95
55	34.85	29.10	27.32	23.60	18.61	26.70	18.12
56	31.98	27.53	23.92	22.10	18.13	24.73	16.05
57	29.96	25.12	25.98	24.89	21.50	25.49	18.96
58	31.98	27.83	26.05	23.21	18.73	25.56	17.05
59	30.55	26.75	26.68	24.99	21.42	26.08	18.56
60	36.51	32.52	27.94	20.75	15.21	26.59	19.11

* Το 1ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.9.

Συγκεντρώσεις φαιτυοΐνης στις τρίχες και στον ορό αίματος ανδρών ασθενών με την μέθοδο FPIA.

No Δείγματος	Συγκεντρώσεις PHT στα τεμάχια τριχών *					Μέση Τιμή (μg/g)	Συγκεντρώσεις PHT στον ορό (μg/mL)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο		
27	5.25	4.32	3.85			4.47	8.85
28	6.28	5.12	4.35	3.52	3.10	4.47	10.02
29	3.76	3.05	2.84	2.65		3.08	9.60
30	4.75	3.82	2.95	2.31		3.46	7.56
31	4.35	3.52	2.81	2.12		3.20	10.52
32	8.25	6.75	5.58	4.32	4.58	5.90	9.78
33	8.90	7.80	6.45	5.35	4.96	6.69	9.21
34	7.74	6.30	4.57	4.25	3.22	5.22	10.65
35	8.55	6.92	5.25	4.90	3.93	5.91	11.38
36	9.60	7.30	3.25			6.72	16.00
37	8.55	6.12	5.85	4.91	4.38	5.96	16.72
38	10.50	8.22	2.12			6.95	17.50
39	15.35	12.82	12.10	10.32	9.12	11.94	17.12
40	12.25	10.96	8.85	3.89		8.99	10.25
41	18.23	15.92	14.90	13.02	10.11	14.44	16.32
42	27.91	23.48	18.12	16.16	15.85	20.30	18.95
43	14.90	12.15	11.10	5.55		10.93	12.26
44	24.73	20.10	17.35	15.12	15.55	18.57	15.15
45	26.18	21.56	19.52	17.35	15.25	19.97	16.34
46	10.20	7.86	3.85			7.30	11.10
47	22.75	18.32	16.23	17.18	14.20	17.74	14.52
48	15.80	13.25	12.18	5.62		11.71	11.56
49	23.73	19.50	16.29	15.20	15.08	17.96	16.23
50	24.18	19.56	17.52	15.35	13.25	17.97	15.30
51	22.45	18.72	8.15			16.44	12.68
52	20.35	17.25	15.60	13.75	10.95	15.58	15.86
53	23.75	19.52	8.63			17.30	13.92
54	19.75	16.98	15.78	12.95	9.68	15.03	16.59
55	34.86	28.98	27.89	23.13	17.59	26.49	17.75
56	30.12	25.95	24.16	21.25	16.72	23.64	16.38
57	31.32	27.32	16.15	24.88	21.74	24.28	19.22
58	32.12	27.91	26.18	23.12	18.90	25.65	17.42
59	30.25	26.82	26.95	25.15	21.83	26.20	18.81
60	36.84	32.28	28.12	20.23	15.78	26.65	19.25

* Το 1ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.10.

Μεταβολές των συγκεντρώσεων φαινυτοΐνης μεταξύ των τεμαχίων τριγών από άνδρες ασθενείς.

No Δείγματος	Μέθοδος HPLC (%)		Μέθοδος FPIA. (%)	
	1ο – 2ο	1ο – 3ο	1ο – 2ο	1ο – 3ο
27	17.82	36.63	17.71	26.67
28	19.44	30.28	18.47	30.73
29	2.82	26.76	18.88	24.47
30	16.87	32.53	19.58	37.89
31	17.46	39.71	19.08	35.40
32	23.74	31.23	18.18	32.36
33	10.30	17.75	12.36	27.53
34	19.70	41.87	18.57	40.99
35	21.09	45.36	19.06	38.60
36	18.86	68.00	23.96	66.15
37	20.05	43.05	28.42	31.58
38	20.65	76.74	21.71	79.81
39	17.44	23.16	16.48	21.17
40	11.11	28.46	10.53	27.76
41	16.15	17.59	12.67	18.27
42	15.24	32.76	15.87	35.08
43	15.16	34.06	18.46	25.50
44	16.60	26.40	18.72	29.84
45	17.44	24.51	17.65	25.44
46	22.94	68.53	22.94	62.25
47	20.27	29.92	19.47	28.66
48	14.95	28.31	16.14	22.91
49	16.77	27.59	17.83	31.35
50	18.56	28.91	19.11	27.54
51	18.31	63.86	16.61	63.70
52	12.87	23.71	15.23	23.34
53	18.72	64.11	17.81	63.66
54	13.86	21.40	14.03	20.10
55	16.50	21.61	16.87	19.99
56	13.91	25.20	13.84	19.79
57	16.15	13.28	12.77	48.44
58	12.98	18.54	13.11	18.49
59	12.44	12.67	11.34	10.91
60	10.93	23.47	12.38	23.67

* Το 1ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στη ρίζα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.11.

Στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων της φαινοτοΐνης στις τρίχες των ασθενών ως σύνολο με τις μεθόδους HPLC και FPIA

	Μέθοδοι	Παράμετροι	Συγκεντρώσεις ΡΗΤ στα τεμάχια Των τριχών * (μg/g)					Μειώσεις των συγκεντρώσεων ΡΗΤ ανάμεσα στα τεμάχια τριχών (%)		Επίπεδα της ΡΗΤ στον ορό (μg/mL)
			1ο	2ο	3ο	4ο	5ο	1ο στο 2ο	1ο στο 3ο	
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	HPLC	M.T.	17.95	15.24	13.08	11.57	10.69	15.40	26.84	14.09
		SD	8.02	6.97	6.33	6.25	5.84	4.11	11.44	3.40
		N	26	26	26	24	23	26	26	26
		Min.	5.45	4.38	3.68	3.60	3.18	7.87	16.75	8.12
		Max.	31.76	28.02	24.91	23.80	22.40	27.77	66.77	18.73
	FPIA	M.T.	17.88	15.21	13.08	11.89	10.93	15.33	26.19	14.37
		SD	8.10	7.03	6.30	6.23	5.76	3.27	11.60	3.58
		N	26	26	26	24	23	26	26	26
		Min.	4.90	3.80	3.40	3.40	3.00	11.45	12.54	7.21
		Max.	32.83	28.82	25.35	24.12	22.36	23.09	65.67	19.05
ΑΝΔΡΕΣ	HPLC	Mean	17.87	15.01	12.45	12.07	12.29	16.42	33.76	13.92
		SD	9.96	8.59	8.50	7.95	6.24	4.07	16.55	3.44
		N	34	34	34	28	22	34	34	34
		Min.	3.55	3.45	2.50	2.23	2.82	2.82	12.67	8.13
		Max.	36.51	32.52	27.94	24.99	21.50	23.74	76.74	19.11
	FPIA	Mean	17.78	14.90	12.22	11.91	12.08	17.23	33.53	14.14
		SD	9.92	8.61	8.14	7.73	6.03	3.77	16.13	3.50
		N	34	34	34	28	22	34	34	34
		Min.	3.76	3.05	2.12	2.12	3.10	10.53	10.91	7.56
		Max.	36.84	32.28	28.12	25.15	21.83	28.42	79.81	19.25

* 1^ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας
M.T. : μέση τιμή, Min: μικρότερη τιμή
SD : σταθερά απόκλισης, Max: μέγιστη τιμή
N : αριθμός ασθενών

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.12

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της φαινυτοΐνης στις τρίχες, αντίστοιχες του χρώματος των τριχών.

Χρώμα Τριχών	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές Δόσεων (mg/24/h)	Μέσες τιμές τριχών με FPIA (μg/g)	Μέσες τιμές τριχών με HPLC (μg/g)
Καστανό	18	30	277.8	16.84	16.75
Μαύρο	24	40	266.7	16.13	16.35
Ξανθό	8	13	200.0	8.09	7.90
Γκρίζο	10	17	160.0	6.50	6.55
Σύνολο	60	100			

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.13.

Ποσοστιαίες συχνότητες και μέσες τιμές της φαινυτοΐνης στις τρίχες, αντίστοιχες των ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων φαινυτοΐνης.

Ημερήσια Δόση (mg/24h)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές τριχών με FPIA (μg/g)	Μέσες τιμές Τριχών με HPLC (μg/g)
100	14	23	5.36	5.29
200	16	27	11.23	11.16
300	20	33	15.67	15.84
400	10	17	25.19	25.31
Σύνολο	60	100		

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.14.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της φαινοτοΐνης στις τρίχες αντίστοιχες της χρονικής διάρκειας χορήγησης της.

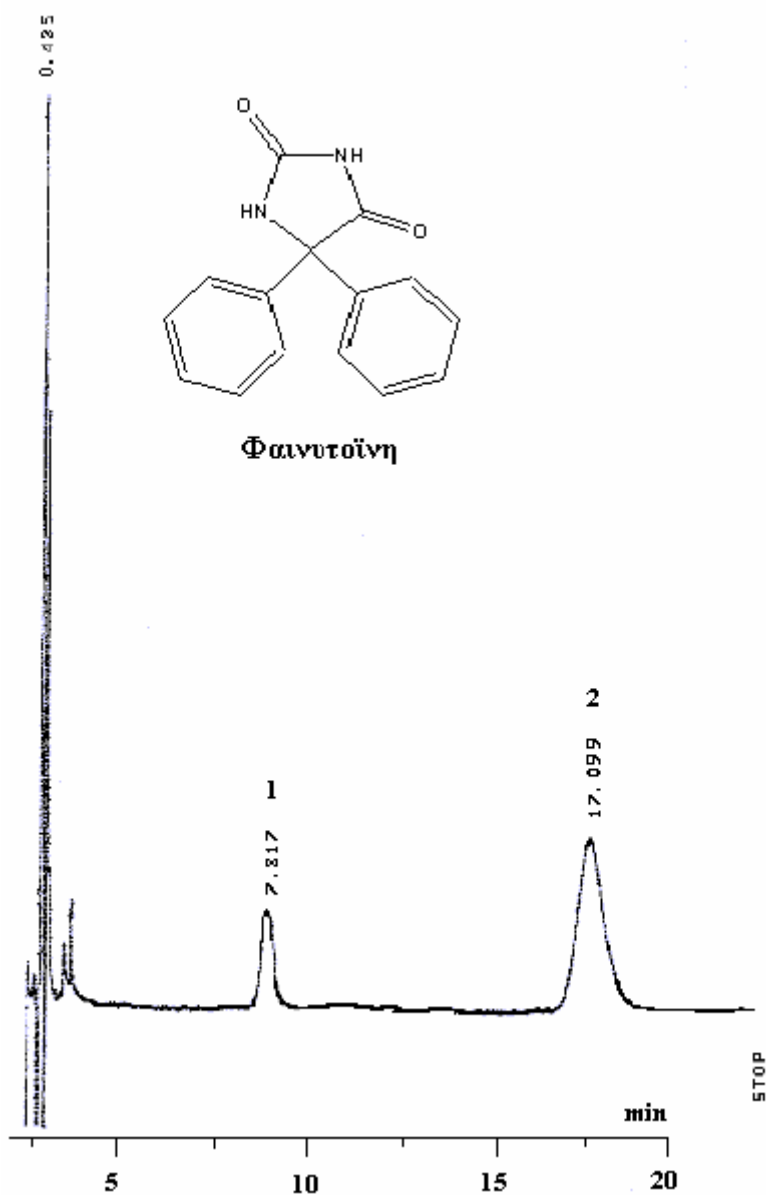
Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	FPIA Μέση Τιμή (μg/g)	HPLC Μέση Τιμή (μg/g)
≤6	12	20	258.3	12.14	12.23
6-12	6	10	283.3	16.89	17.09
12-18	6	10	233.3	13.76	13.82
18-24	5	8	180.0	11.42	11.13
>24	31	52	241.9	13.98	14.02
Σύνολο:	60	100			

ΠΙΝΑΚΑΣ Β.15.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων της φαινοτοΐνης στις τρίχες, αντίστοιχες της ηλικίας των ασθενών.

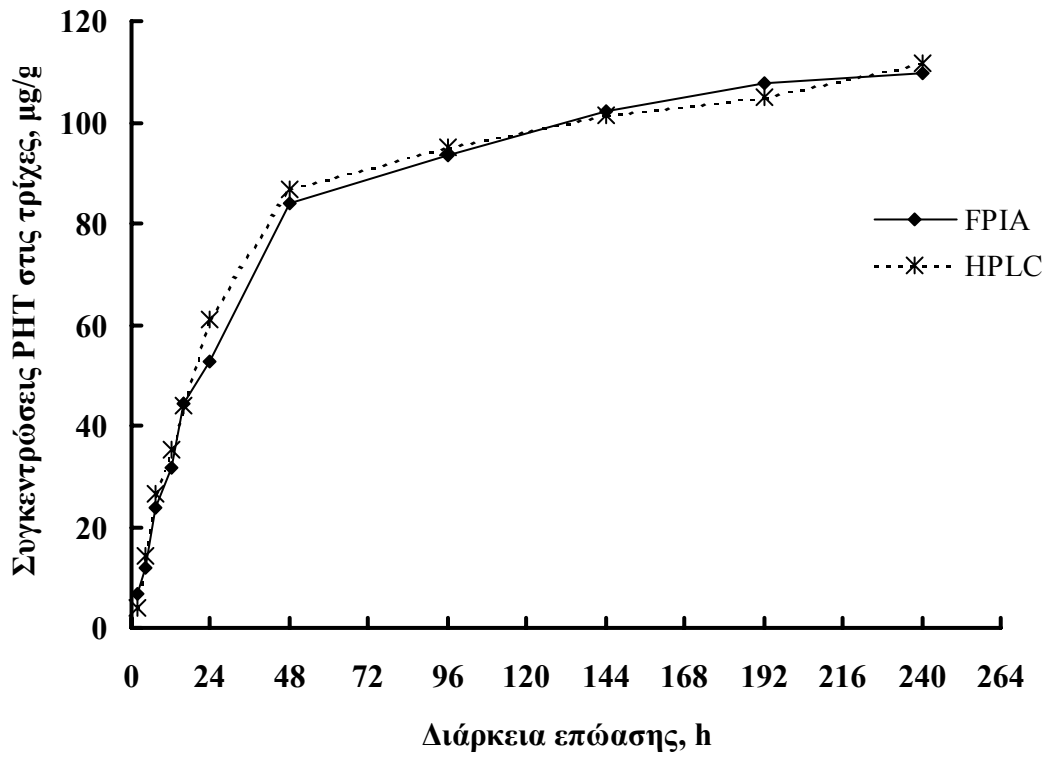
Ηλικία (έτη)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	FPIA Μέση Τιμή (μg/g)	HPLC Μέση Τιμή (μg/g)
5-10	3	5	200.0	6.50	6.50
10-20	12	20	258.3	13.40	13.60
20-30	9	15	288.9	15.10	15.00
30-40	15	25	286.7	18.40	18.50
40-50	9	15	255.7	15.90	15.90
50-60	8	13	150.0	6.50	6.70
60-70	4	7	125.0	7.90	7.80
Σύνολο:	60	100			

2. Γραφικές Παραστάσεις της Φαινυτοΐνης



Σχήμα Β.1

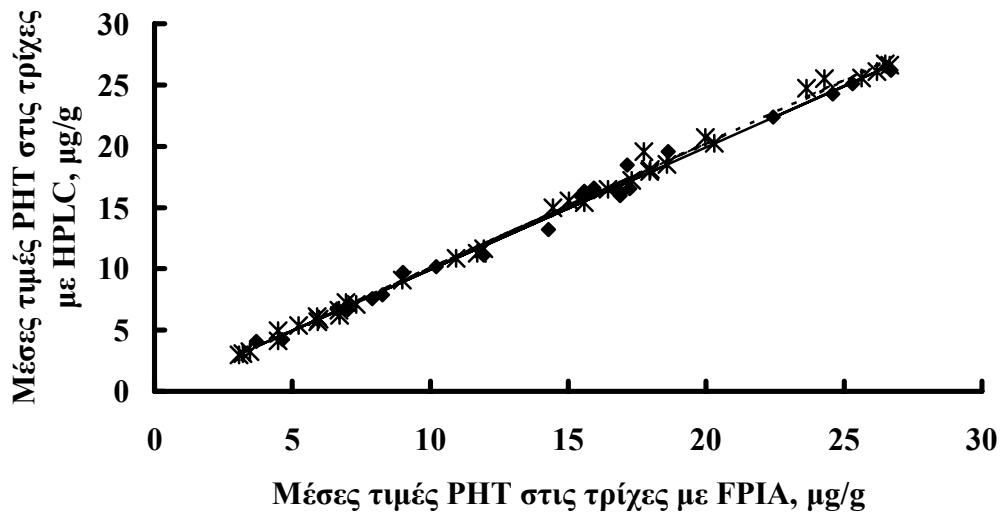
Χρωματογράφημα HPLC εκχυλίσματος από δείγμα τριχών ασθενούς σε συστηματική θεραπεία με ΡΗΤ. Η κορυφή 1 ($R_t = 7.3$) αντιστοιχεί στην ΡΗΤ και η κορυφή 2 ($R_t = 17.1$) αντιστοιχεί στο I.S. (εσωτερικό standard).



Σχήμα Β.2

Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της ΡΗΤ στις τρίχες σε σχέση με την διάρκεια επώασης των τριχών σε 3 mL διαλύματος της ΡΗΤ (5 μg/mL) σε φωσφορικό ρυθμιστικό (pH = 5.6).

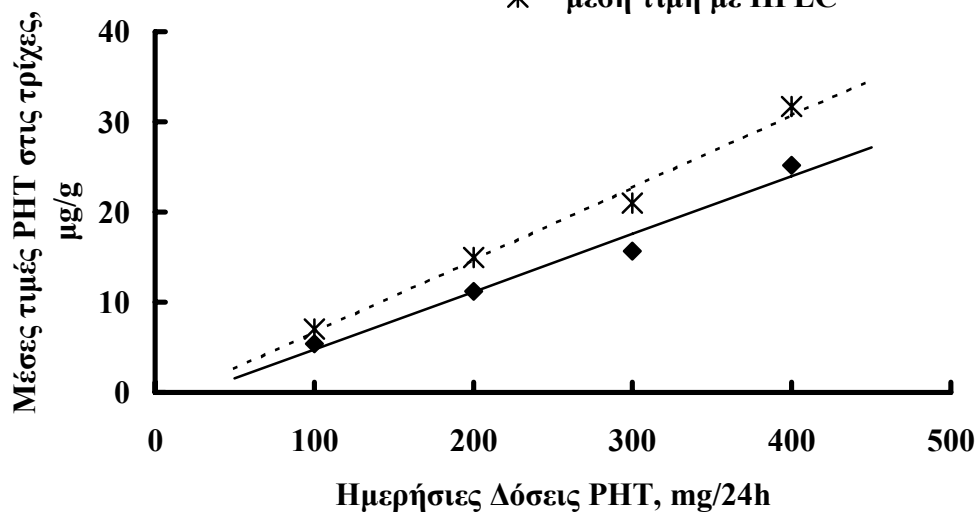
$y = 0.997 x - 0.031$ ($r = 0.996, p < 0.001$) ♣ γυναίκα ———
 $y = 1.021 x - 0.165$ ($r = 0.998, p < 0.001$) ✕ άνδρας - - - - -



Σχήμα Β.3.

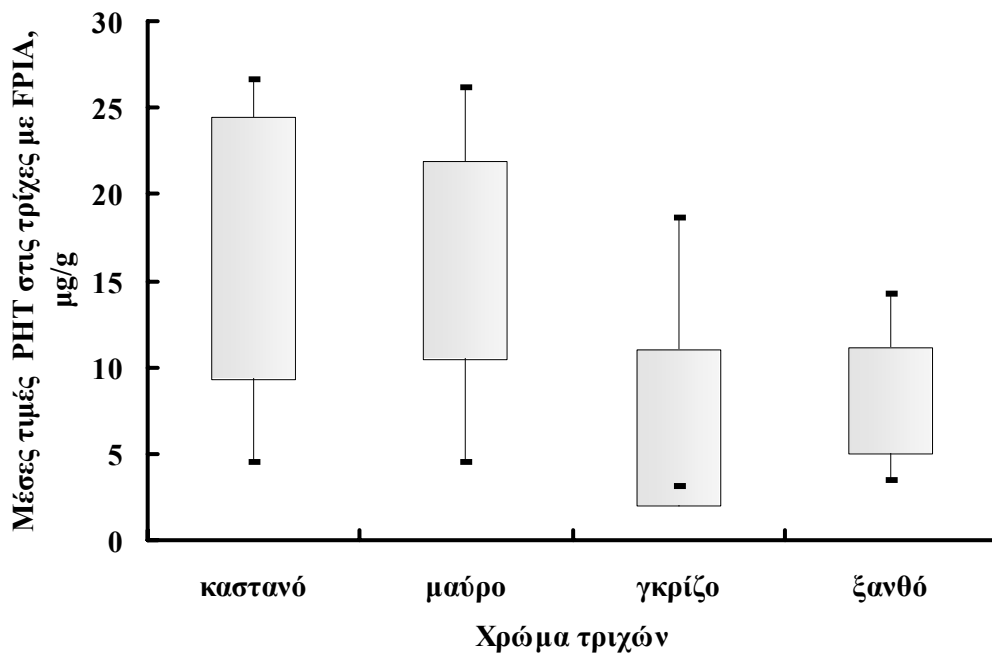
Συσχέτιση των μεθόδων FIA και HPLC στην μέτρηση των μέσων τιμών των PHT συγκεντρώσεων στις τρίχες ανδρών και γυναικών.

$y = 0.064 x - 1.618$ ($r = 0.987, p < 0.02$) ——— με FIA
 $y = 0.065 x - 1.783$ ($r = 0.988, p < 0.02$) - - - - - με HPLC
 ◆ μέση τιμή με FIA
 ✕ μέση τιμή με HPLC



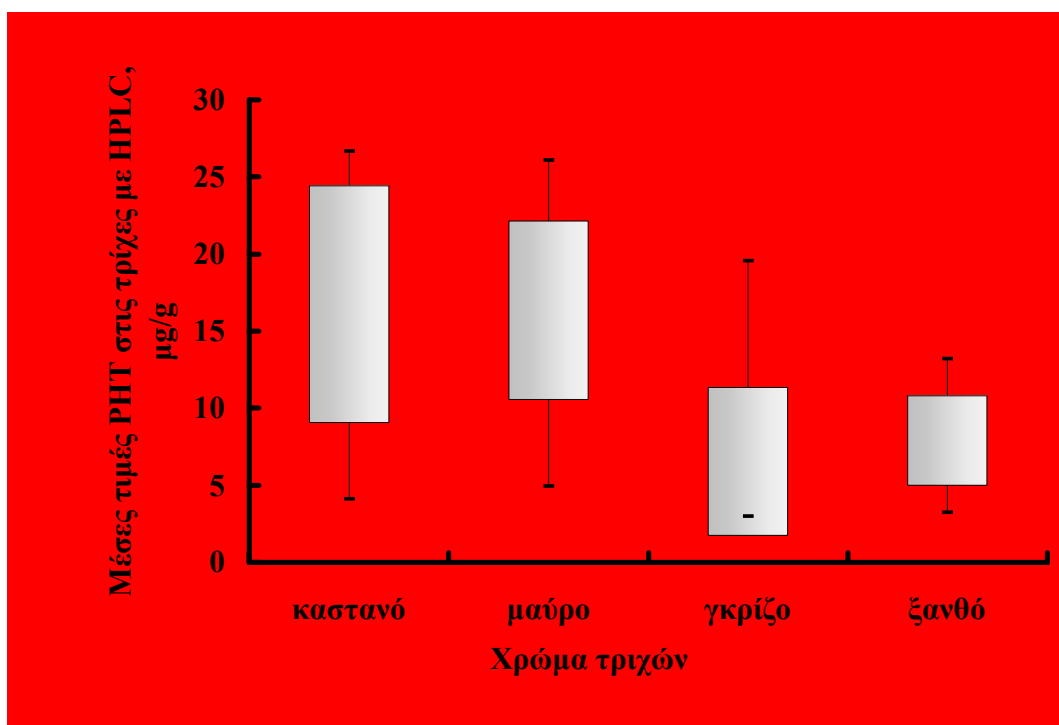
Σχήμα Β.4.

Συσχέτιση ανάμεσα στις ημερήσιες PHT δόσεις και των μέσων τιμών των PHT συγκεντρώσεων στις τρίχες με τις δύο μεθόδους FIA και HPLC.



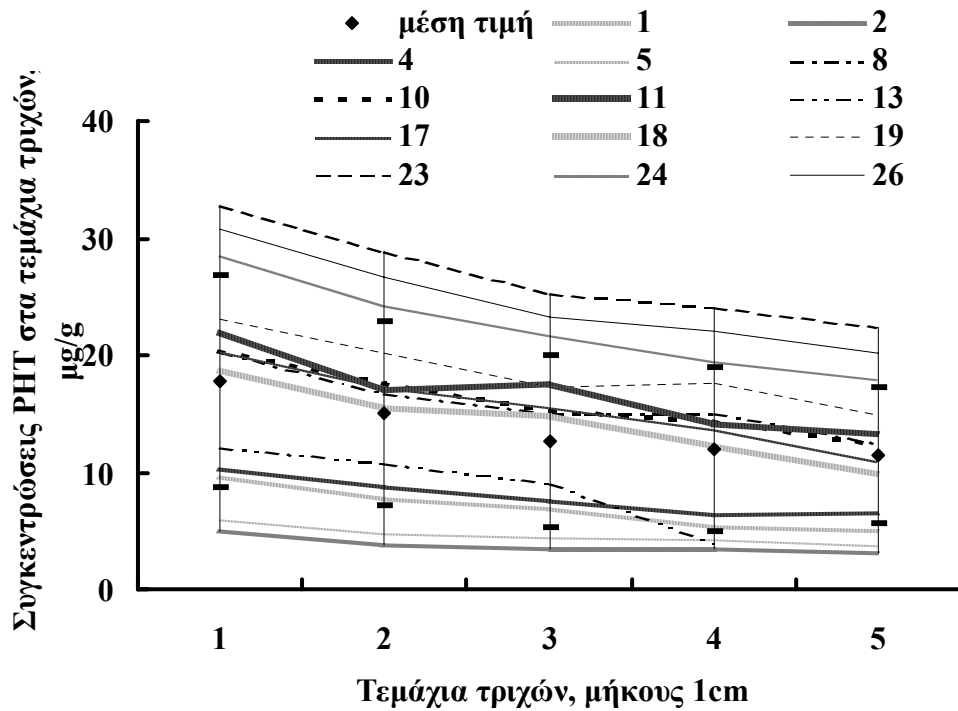
Σχήμα Β.5.

Γραφική απεικόνιση (box plot) των μέσων τιμών ΡΗΤ στις τρίχες για το κάθε χρώμα τριχών, εμφανίζοντας τον βαθμό διασποράς τους, με την μέθοδο FPIA.



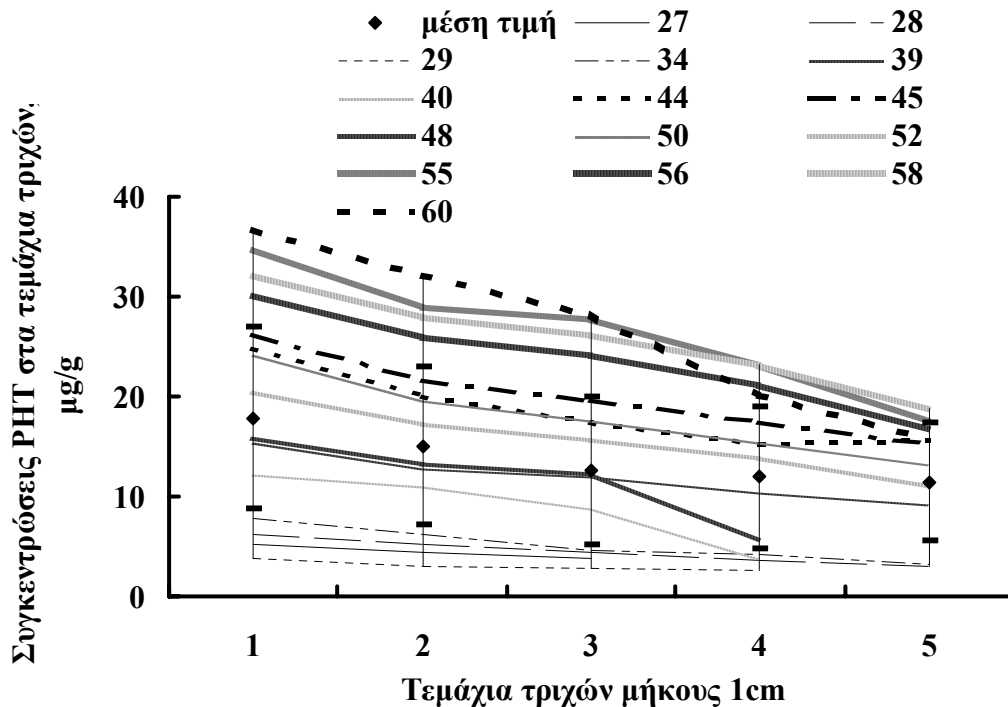
Σχήμα Β.6.

Γραφική απεικόνιση (box plot) των μέσων τιμών ΡΗΤ στις τρίχες για το κάθε χρώμα τριχών, εμφανίζοντας τον βαθμό διασποράς τους, με την μέθοδο HPLC.



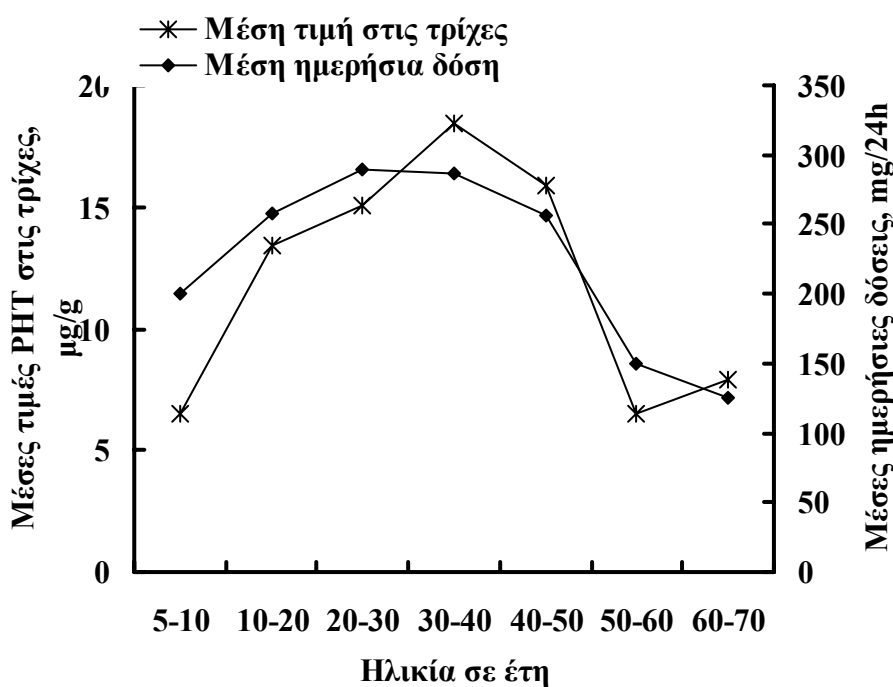
Σχήμα Β.7.

Μερικά “προφίλ της φαινοτοΐνης” στις τρίχες γυναικών ασθενών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων της στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών με την FPIA μέθοδο.



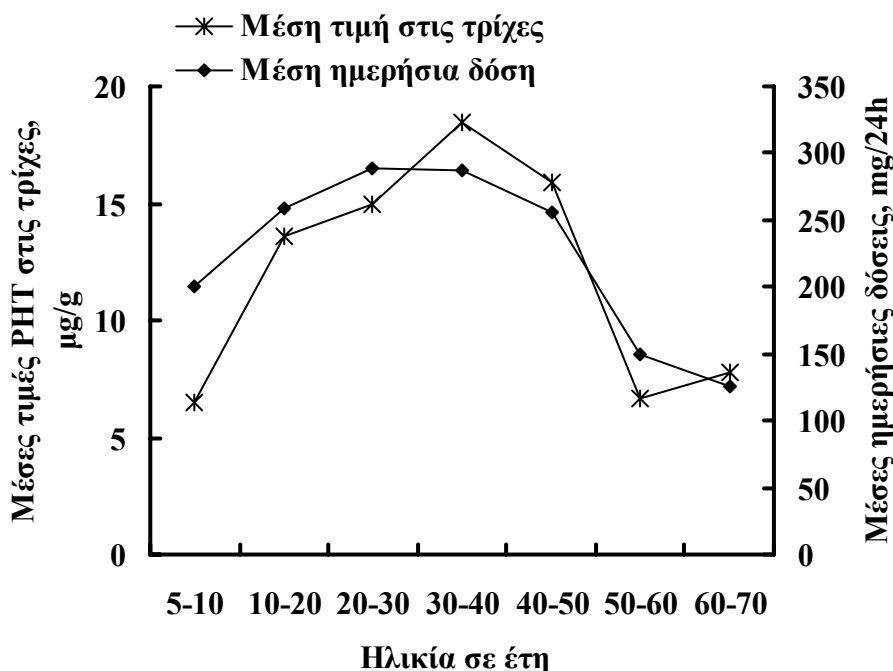
Σχήμα Β.8.

Μερικά “προφίλ της φαινοτοΐνης” στις τρίχες ανδρών ασθενών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων της στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών με την FPIA μέθοδο



Σχήμα Β.9.

Γραφική συσχέτιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της ΡΗΤ στις τρίχες με την μέθοδο FPIA και των μέσων ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με την ηλικία των ατόμων, που ελάμβαναν συστηματικά ΡΗΤ.



Σχήμα Β.10.

Γραφική συσχέτιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της ΡΗΤ στις τρίχες με την μέθοδο HPLC και των μέσων ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με την ηλικία των ατόμων, που ελάμβαναν συστηματικά ΡΗΤ.

Γ. ΒΑΛΠΡΟΪΚΟ ΟΞΥ

1. Πίνακες δημογραφικών στοιχείων, πειραματικών και στατιστικών δεδομένων του βαλπροϊκού οξέος

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.1

Πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης του βαλπροϊκού οξέος.

Προστιθέμενη ποσότητα (μg)	Ανακτούμενο VPA* (μg)	CV** (%)	Ποσοστιαία ανάκτηση (%)
15.0	11.16 ± 0.98	8.78	74.43
30.0	22.36 ± 1.90	8.50	75.54
45.0	33.12 ± 2.63	7.95	73.59
60.0	44.48 ± 3,25	7.32	74.13

* μέση τιμή ± SD για τέσσερις διαφορετικές σειρές δειγμάτων.

** Σταθερά διακύμανσης

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.2.

Πειραματικά αποτελέσματα εξωτερικής απορρόφησης^α του VPA σε τρίχες κεφαλής ανθρώπων που δεν ελάμβαναν το φάρμακο.

No Δείγματος	Διάρκεια Επώασης (h)	Απορρόφηση ^{β,γ} VPA (μg/g)	CV (%)
1	2	6.15 ± 1.22	6.78
2	4	13.74 ± 1.84	7.52
3	8	23.30 ± 2.01	6.72
4	12	21.74 ± 2.86	4.35
5	16	26.90 ± 6.06	8.22
6	20	24.00 ± 2.56	9.95
7	24	26.10 ± 4.24	8.32
8	48	27.60 ± 2.46	9.18
9	96	24.91 ± 3.37	8.75
10	144	26.99 ± 3.83	9.86
11	192	26.30 ± 1.68	7.36
12	240	26.30 ± 3.51	8.99

CV: σταθερά διακύμανσης

α Διάλυμα επώασης VPA 80 μg/mL σε φωσφορικό ρυθμιστικό (pH = 6).

β Μέση τιμή ± SD

γ Ο αριθμός δειγμάτων ανά σειρά είναι 4.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.3.

Δημογραφικά και ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής των γυναικών ασθενών σε συστηματική θεραπεία με βαλπροϊκό οξύ.

No ασθενούς	Ηλικία (έτη)	Δοσολογία (mg/24h)	Διάρκεια αγωγής (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία *
1	87	300	12	γκρίζα	
2	13	300	>24	μαύρα	
3	14	300	12	μαύρα	
4	14	300	18	μαύρα	
5	7	400	7 ημέρες	μαύρα	
6	21	500	12	μαύρα	
7	5	600	>24	καστανό	CBZ
8	6	600	>24	καστανό	
9	16	600	>24	μαύρο	Li
10	13	600	>24	μαύρο	
11	31	600	2	ξανθό	
12	25	700	>24	καστανό	Li
13	13	800	16	ξανθό	
14	23	800	>24	ξανθό	
15	41	900	>24	καστανό	
16	45	1000	10	καστανό	
17	20	1000	>24	καστανό	
18	47	1000	12	καστανό	
19	20	1000	>24	μαύρο	
20	17	1500	>24	μαύρο	PHB
21	17	1500	>24	μαύρο	PHB
22	36	1500	12	μαύρο	Diazepam
23	31	1500	12	μαύρο	
24	30	1500	2	μαύρο	
25	51	3000	>24	καστανό	Li + PHB

* CBZ: καρβαμαζεπίνη. PHB: Φαινοβαρβιτάλη. Li: Λίθιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.4.

Δημογραφικά και ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής των ανδρών ασθενών σε συστηματική θεραπεία με βαλπροϊκό οξύ.

No Ασθενούς	Ηλικία (έτη)	Δοσολογία (mg/24h)	Διάρκεια αγωγής (μήνες)	Χρώμα τριχών	Πολυθεραπεία *
26	4	200	1	καστανό	CBZ
27	10	300	7	καστανό	
28	12	300	11	καστανό	
29	80	400	>24	γκρίζο	PHB
30	1	400	4	καστανό	
31	25	400	>24	καστανό	Li
32	12	400	3	καστανό	
33	9	500	>24	μαύρο	
34	2	500	18	μαύρο	
35	11	600	1	καστανό	
36	8	600	18	μαύρο	
37	49	1000	8	γκρίζο	Alprazolam
38	20	1500	>24	μαύρο	Li
39	19	1500	>24	καστανό	
40	25	1500	>24	μαύρο	

* CBZ: καρβαμαζεπίνη, PHB: Φαινοβαρβιτάλη, Li: Λίθιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.5.**Συγκεντρώσεις VPA στις τρίχες και στον ορό αίματος γυναικών ασθενών.**

No ασθενών	Συγκεντρώσεις του VPA στα τεμάχια των τριχών ^a (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Συγκεντρώσεις VPA στον ορό (μg/mL)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο		
1	4.36	5.08	5.52	6.10	6.45	5.50	57.00
2	5.57	6.47	7.36	8.02	8.80	7.24	40.45
3	4.17	4.72	5.64	6.38	7.06	5.59	41.85
4	5.00	6.10	7.16	7.90	8.24	6.88	37.50
5	3.36	3.72	4.02	4.30	4.92	4.06	27.93
6	7.38	8.62	8.88	9.25		8.53	84.73
7	3.55	4.15	4.85	5.02	5.25	4.56	82.83
8	2.10	2.48	4.80	3.53	4.65	3.51	71.88
9	9.65	10.93	13.21	14.18	15.05	12.60	64.51
10	5.04	6.00	6.55	7.04	7.57	6.44	79.24
11	3.71	4.35	4.50	5.00	5.81	4.67	40.00
12	7.44	8.58	9.62	10.02	10.70	9.27	66.60
13	4.31	5.12	5.98	6.37		5.45	36.71
14	5.60	6.58	7.46	8.10	8.88	7.32	38.10
15	9.73	11.65	12.90	13.25	14.22	12.35	41.60
16	8.91	10.08	12.13	12.89		11.00	39.74
17	9.50	11.88	12.38	13.12		11.72	99.70
18	7.82	8.97	10.10	11.53	12.33	10.15	12.30
19	9.12	10.18	11.22	12.65	13.02	11.24	71.01
20	11.87	14.92	15.25	16.13	17.05	15.04	39.30
21	10.24	12.13	14.22	15.35	15.90	13.57	62.10
22	8.78	10.05	11.92	12.80		10.89	69.07
23	9.55	11.62	12.86			11.34	109.20
24	8.88	10.69	12.10	13.00		11.17	92.03
25	11.28	13.60	14.71			13.20	45.51

^a Το 1ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.6.**Συγκεντρώσεις VPA στις τρίχες και στον ορό αίματος ανδρών ασθενών.**

No Ασθενώ ν	Συγκεντρώσεις του VPA στα τεμάχια των τριχών ^α (μg/g)					Μέσες Τιμές (μg/g)	Συγκεντρώσεις VPA στον ορό (μg/mL)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο		
	26	6.91	7.82	8.10			
27	3.50	3.95	4.18	4.72	5.10	4.29	63.52
28	4.05	4.78	5.02	5.36		4.80	72.06
29	3.33	3.99	4.29	4.78	5.15	4.31	58.40
30	3.28	4.05	4.22	4.80	5.12	4.29	54.94
31	7.75	8.82	9.68	10.15	10.91	9.46	52.38
32	3.06	3.78	4.10	4.48	4.75	4.03	77.05
33	4.9	5.54	7.62	6.9	8.22	6.64	52.35
34	5.2	6.25	6.5	7.02		6.24	63.22
35	4.20	5.10	5.60			4.97	48.80
36	5.07	5.70	6.30	6.78		5.96	70.70
37	7.12	8.30	8.52	8.95	9.23	8.42	63.44
38	8.75	10.83	11.35	12.20	13.05	11.24	55.62
39	6.38	7.25	8.33	8.90	9.51	8.07	83.36
40	11.78	14.00	15.05	16.82	17.10	14.95	88.90

^α Το 1ο τεμάχιο τριχών είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.7.

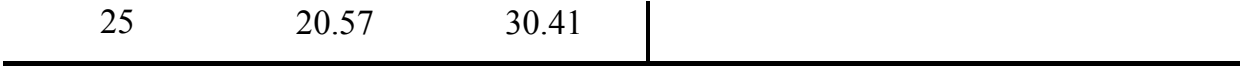
Αυξητικές μεταβολές των συγκεντρώσεων VPA στα τεμάχια των τριχών.

Γυναίκες			Άνδρες		
No Ασθενών	Μεταβολές των συγκ/σεων VPA στα τεμάχια (%)		No Ασθενών	Μεταβολές των συγκ/σεων VPA στα τεμάχια (%)	
	2ο - 1ο	3ο - 1ο		2ο - 1ο	3ο - 1ο
1	16.51	26.61	26	13.17	17.22
2	16.16	32.14	27	12.86	19.43
3	13.08	35.13	28	18.02	23.95
4	22.00	43.20	29	19.82	28.83
5	10.71	19.64	30	23.48	28.66
6	16.80	20.33	31	13.81	24.90
7	16.90	36.62	32	23.53	33.99
8	18.10	128.57	33	13.06	55.51
9	13.30	36.98	34	20.19	25.00
10	19.01	29.92	35	21.43	33.33
11	17.12	21.15	36	12.43	24.26
12	15.36	29.34	37	16.57	19.66
13	18.79	38.75	38	23.77	29.71
14	17.50	33.21	39	13.64	30.56
15	19.73	32.58	40	18.87	27.78
16	13.13	36.14			
17	25.05	30.32			
18	14.71	29.16			
19	11.62	23.03			
20	25.73	28.51			
21	18.40	38.80			
22	14.48	35.76			
23	21.68	34.66			
24	20.38	36.26			

25

20.57

30.41



ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.8.

Στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες των ασθενών ως σύνολο.

ΦΥΛΟ	Παράμετροι	Συγκεντρώσεις VPA στα τεμάχια των τριχών * (μg/g)					Αυξήσεις των συγκεντρώσεων VPA ανάμεσα στα τεμάχια τριχών (%)		Επίπεδα του VPA στον ορό (μg/mL)
		1 ^ο	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	5 ^ο	1 ^ο στο 2 ^ο	1 ^ο στο 3 ^ο	
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	M.T.	7.08	8.35	9.41	9.65	9.76	17.47	35.49	58.04
	SD	2.81	3.43	3.62	3.83	4.10	3.83	20.32	24.31
	N	25	25	25	23	17	25	25	25
	Min.	2.10	2.48	4.02	3.53	4.65	10.71	19.64	12.30
	Max.	11.87	14.92	15.25	16.13	17.05	25.73	128.57	109.20
ΑΝΔΡΕΣ	M.T.	5.69	6.68	7.26	7.84	8.81	17.64	28.19	65.40
	SD	2.45	2.91	3.09	3.60	4.07	4.28	9.02	12.20
	N	15	15	15	13	10	15	15	15
	Min.	3.06	3.78	4.10	4.48	4.75	12.43	17.22	48.80
	Max.	11.78	14.00	15.05	16.82	17.10	23.77	55.51	88.90

* 1^ο τεμάχιο είναι το πλησιέστερο στην ρίζα της τρίχας

M.T. : μέση τιμή, Min: μικρότερη τιμή

S.D. : σταθερά απόκλισης, Max: μέγιστη τιμή

N : αριθμός ασθενών

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.9.

Ποσοστιαίες συχνότητες και μέσες τιμές του VPA στις τρίχες, αντίστοιχες των ημερήσιων χορηγούμενων δόσεων VPA.

Ημερήσια Δόση (mg/24h)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές τριχών (μg/g)
200	1	2.5	7.61
300	6	15.0	5.72
400	5	12.5	5.23
500	3	7.5	7.14
600	7	17.5	6.10
700	1	2.5	9.27
800	2	5.0	6.38
900	1	2.5	12.35
1000	5	12.5	6.38
1500	8	20.0	12.03
3000	1	2.5	13.20
Σύνολο	40	100	

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.10.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες, αντίστοιχες του χρώματος των τριχών.

Χρώμα Τριχών	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέσες τιμές Δόσεων (mg/24/h)	Μέσες τιμές τριχών (μg/g)
Black	18	45.0	894	9.42
Brown	16	40.0	806	7.71
Grey	3	7.5	733	5.81
Blond	3	7.5	567	6.08
Σύνολο	40	100		

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.11.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες αντίστοιχες της χρονικής διάρκειας χορήγησης του.

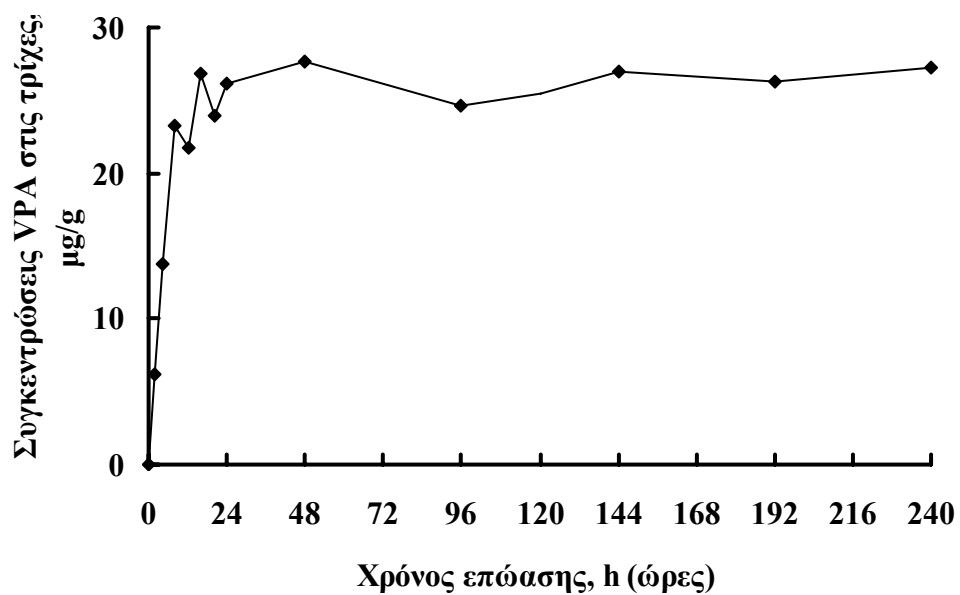
Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	Μέση Τιμή Τριχών (μg/g)
≤6	7	17.5	586	5.84
>6 – 12	10	25.0	770	8.05
>12 – 18	4	10.0	550	6.13
>24	19	47.5	995	9.62
Σύνολο:	40	100		

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ.12.

Ποσοστιαίες συχνότητες, μέσες τιμές δόσεων και μέσες τιμές συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες αντίστοιχες της ηλικίας των ασθενών.

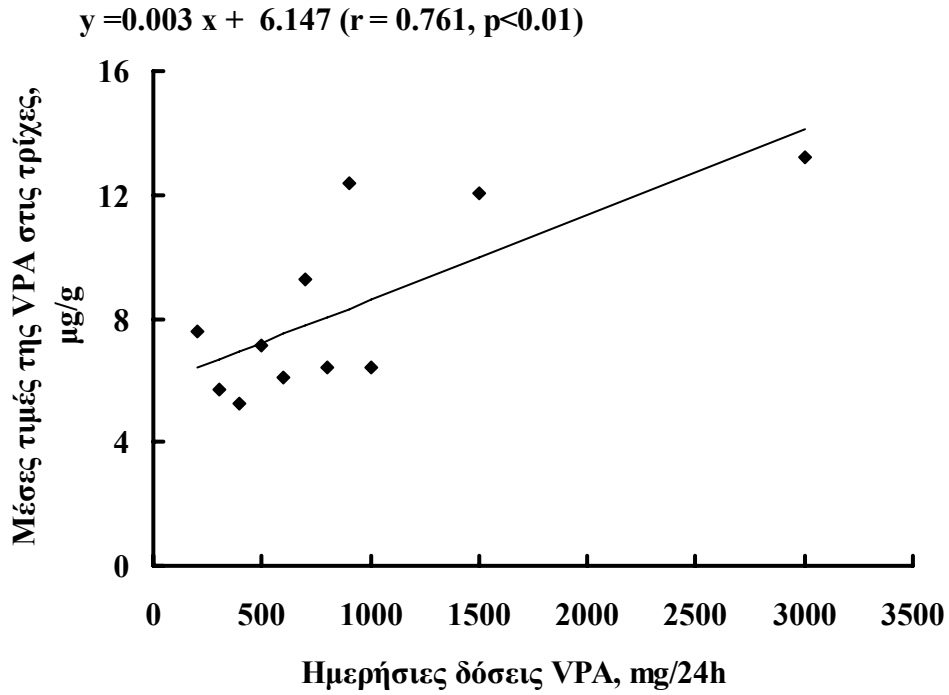
Ηλικία (έτη)	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα (%)	Μέση Τιμή Δόσης (mg/24h)	Μέση Τιμή Τριχών (μg/g)
>10	9	22,5	456	5.24
11 – 20	15	37,5	813	8.59
21 – 30	6	15	900	10.12
31 – 40	3	7,5	1200	8.97
41 – 50	4	10	975	10.48
51 – 87	3	7,5	1233	7.67
Σύνολο	40	100		

3. Γραφικές Παραστάσεις του Βαλπροϊκού Οξέος



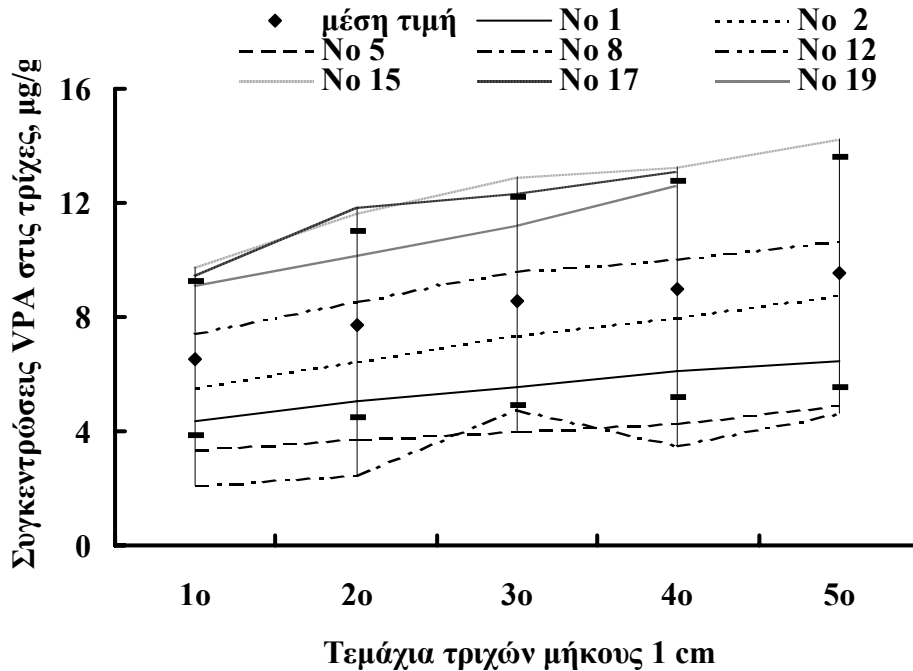
Σχήμα Γ.1.

Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες σε σχέση με την διάρκεια επώασης των τριχών σε 3 mL διαλύματος του VPA (5 μg/mL) σε φωσφορικό ρυθμιστικό (pH = 6).



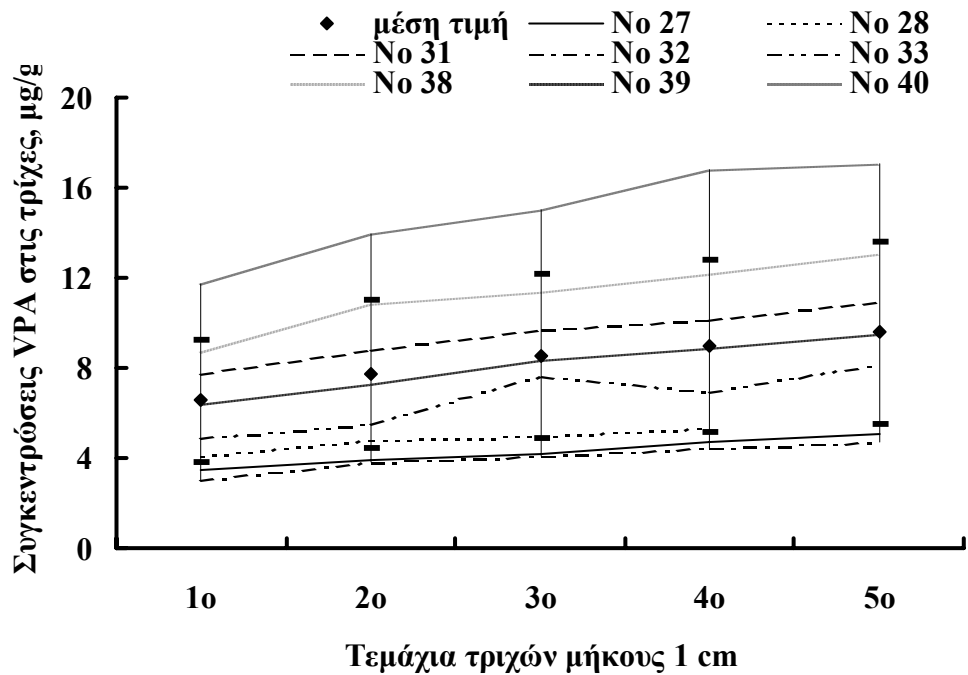
Σχήμα Γ.2.

Συσχέτιση ανάμεσα στις ημερήσιες δόσεις του VPA και τις μέσες τιμές του φαρμάκου στις τρίχες.



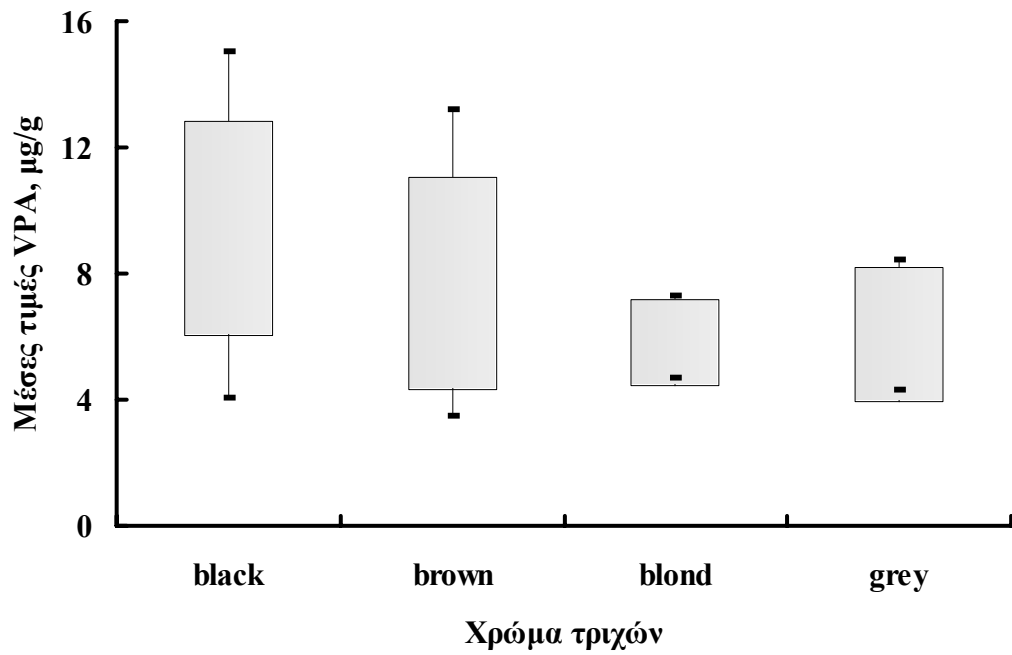
Σχήμα Γ.3.

Μερικά προφίλ βαλπροϊκού οξέος στις τρίχες γυναικών ασθενών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων του στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών.



Σχήμα Γ.4.

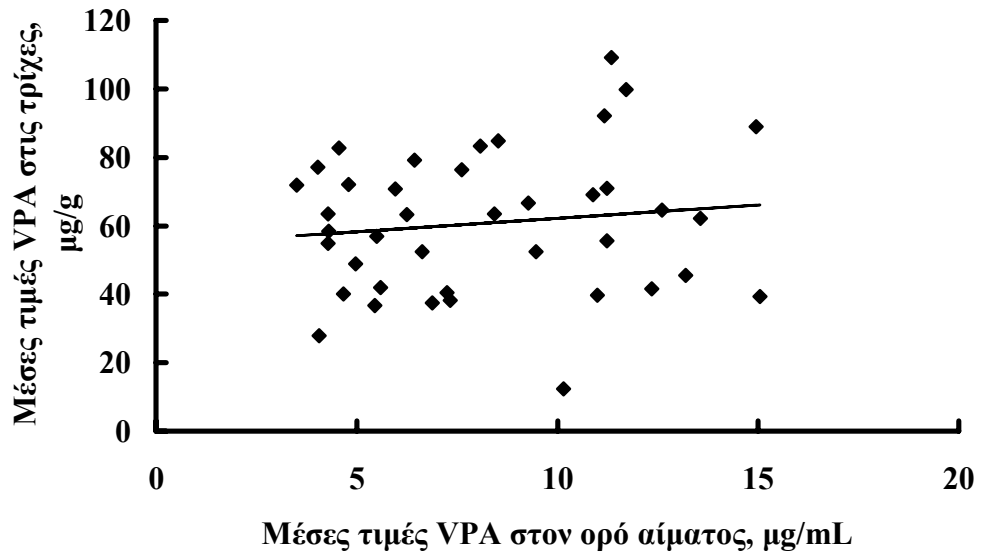
Μερικά προφίλ βαλπροϊκού οξέος στις τρίχες ανδρών ασθενών σε σχέση με τις περιοχές εύρους των μέσων τιμών \pm SD των συγκεντρώσεων του στα αντίστοιχα τεμάχια των τριχών.



Σχήμα Γ.5.

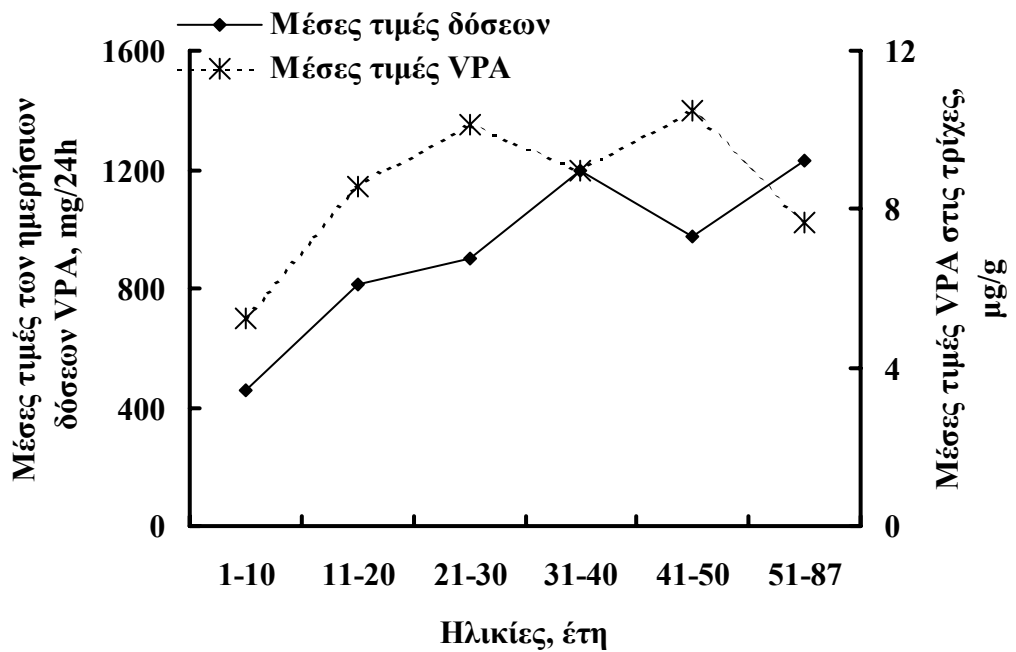
Γραφική απεικόνιση (box plot) των μέσων τιμών VPA στις τρίχες για το κάθε χρώμα τριχών, εμφανίζοντας τον βαθμό διασποράς τους, με την μέθοδο FPIA.

$$y = 0.787 x + 54.333 \quad (r = 0.128, p > 0.05)$$



Σχήμα Γ.6.

Συσχέτιση ανάμεσα στις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων του VPA στον ορό του αίματος και στις τρίχες.



Σχήμα Γ.7.

Γραφική συσχέτιση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων του VPA στις τρίχες με την μέθοδο FPIA και των μέσων ημερήσιων χορηγούμενων

δόσεων του φαρμάκου σε σχέση με την ηλικία των ατόμων, που
ελάμβαναν συστηματικά VPA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goldblum R.W., Goldbaum L.R. and Piper W.N. Barbiturate concentrations in the skin and hair of guinea pigs. *J. Invest. Derm.*, 22, 121-128, 1954.
2. Chatt A. et al. Scalp hair as a monitor of community exposure to environmental pollutants. *Hair Trace Elements & Human Illness*. A.C. Brown and R. Crouse. Eds., Praeger Publishers, New York, 1980, pp. 46-73.
3. Pehl R.O. and Parkes M. Hair analysis on learning and behavior problems. *Hair, Trace Elements & Human Illness*. A.C. Brown and R. Crouse, Eds., Praeger Publishers, New York, 1980, pp. 128-143.
4. Barlow P.J. and Kepel M. Metal and sulfur content of hair in relation to certain mental status. *Hair, Trace Elements & Human Illness*. A.C. Brown and R. Crouse, Eds., Praeger Publishers, New York, 1980, pp. 105-127.
5. Baumgartner A.M., Jones P.F., Baumgartner W.A. and Black C.T. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J. Nucl. Med.*, 20, 582-586, 1979.
6. Parakkal P. F. The fine structure of anagen hair follicle of the mouse. In *Advances in Biology of Skin: Hair Growth*, IX. Montagna W. and Dobson R. L., Eds., Pergamon Press, Braunschweig, Germany, 1969, 441.
7. Montagna W. and Van Scott E. J. The anatomy of the hair follicle. In *The Biology of Hair Growth*. Montagna W. and Ellis R. A., Eds., Academic Press, New York, 1958, 39.
8. Harkey M. R. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.*, 63, 9, 1993.
9. Ward W. H. and Lundgren H. P.. The formation, composition, and properties of the keratins. In *Advances in Protein Chemistry*. Anson M. L., Bailey. K. and Edsall. J. T., Eds. Academic Press, New York, 1954, 243.
10. Swift J. A. and Bews. B.. The chemistry of human hair cuticle. II. The isolation and amino acid analysis of the membranes and A-layer. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 25, 355, 1974.
11. Swift J. A. and Bews. B.. The chemistry of human hair cuticle. III. The isolation and amino acid analysis of various subfractions of the cuticle obtained by pronase and trypsin digestion. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 27, 289, 1976.

12. Matoltsy A. G. What is Keratin? In *Advances in Biology of Skin: Hair Growth*, IX. Montagna W. and Dobson. R. L., Eds. Pergamon Press, Braunschweig, Germany, 1967, 559.
13. Matoltsy A. G.. The chemistry of keratinization. In *The Biology of Hair Growth*, Montagna W. and Ellis R. A., Eds. Academic Press, New York, 1958, 135.
14. Baden H. P. Hair keratin. in *Hair and Hair Diseases*. Orfanos C. E. and Happle. R., Eds. Springer-Varlag, Berlin, 1989, 45.
15. Baden H. P. Characterization of hair keratins. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos C. E., Montagna. W., and Stuttgen. G., Eds. Springer-Varlag, Berlin, 1981, 73.
16. Gillespie J. M. and Marshall R. C. The proteins of normal and aberrant hair keratns. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos C. E., Montagna W., and Stuttgen G., Eds. Springer-Varlag, Berlin, 1981, 76.
17. Mercer, E. H. The electron microscopy of keratinized tissue. In *The Biology of Hair Growth*. Montagna W. and Ellis R. A., Eds. Academic Press, New York, 1958, 91.
18. Baden H. P., McGilvray N., Lee L. D., Baden. L. and Kubilus J. Comparison of stratum corneum and hair fibrous protein. *J. Invest. Dermatol.*, 75: 311, 1980.
19. Baden H. P., Goldsmith L. A. and Fleming B. A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues. *Bioch. Biophys. Acta.*, 322, 269, 1973.
20. Swift J. A. The hair surface. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos, C. E., Montagna W. and Stuttgen G., Eds. Springer-Varlag, Berlin, 1981, 65.
21. Ortonne J. P. and Prota G. Hair melanins and hair color: ultrastructural and biochemical aspects. *J. Invest. Dermatol.*, 101, 825, 1993.
22. Fitzpatrick T. B., Brunet P. and Kukita A. The nature of hair pigment. In *The Biology of Hair Growth*. Montagna, W. and Ellis R. A., Eds. Academic Press, New York, 1958 255.
23. Cesarini J. P. Hair melanin and hair color. In *Hair and Hair Diseases*. Orfanos C. E. and Happle R., Eds. Springer-Varlag, Berlin, 1990, 165.

24. Ito S. and Fujita K. Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 144, 527, 1985.
25. Thody A. J., Higgins E. M., Wakamatsu K., Ito S., Burchill S. A. and Marks J. M.. Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 97, 340, 1991.
26. Birbeck M. S. C. and Barnicot. N. A. Electron microscope studies on pigment formation in human hair follicles. In *Pigment Cell Biology*. Gordon M., Ed. Academic Press, New York, 1959, 549.
27. Barnicot N. A., Birbeck. S. C. and Cuckow. F. W. The electron microscopy of human hair pigments. *Ann. Hum. Genet.*, 19, 231, 1955.
28. Jimbow K., Ishida O., Ito S., Hori Y., Witkop C. J. and King R. A. Combined chemical and electron microscopic studies of pheomelanosomes in human red hair. *J. Invest. Dermatol.*, 81, 506, 1983.
29. Hrdy D. Quantitative hair form variation in seven populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 39, 7, 1973.
30. Lindelof B., Forslind B., Hedblad M. A. and Kaveus. U. Human hair form. *Arch. Dermatol.*, 124, 1359, 1988.
31. Gold R. J. M. and Scriver. C. R. The amino acid composition of hair from different racial origins. *Clin. Chim. Acta.*, 33, 465, 1971
32. Dekio S. and Jidoi J. Amounts of fibrous proteins and matrix substances in hairs of different races. *J. Dermatol.*, 17, 62, 1990.
33. Hausman L. A. A comparative racial study of the structural elements of human head-hair. *Am. Nat.*, 59, 529, 1925.
34. Barnicot N. A. and Birbeck M. S. C. The electron microscopy of human melanocytes and melanin granules. In: *The Biology of Hair Growth*. Montagna W. and Ellis R. A., Eds. Academic Press, New York, 1958, 239.
35. Jimbow K. and Kukita. A. Fine structure of pigment granules in the human hair bulb: ultrastructure of pigment granules. In *Biology of Normal and Abnormal Melanocytes*. Kawamura T., Fitzpatrick T. B. and Seiji. M., Eds. University Park Press, Baltimore, 1971, 171.

36. Kinebuchi S., Kobori T. and Hori Y. Behavior of melanosomes in melanocytes and keratinocytes of Japanese skin and black hair. In *Biology of Normal and Abnormal Melanocytes*. University Park Press, Baltimore, 1971, 195.
37. Montagna W., Protta G. and Kenney J. A. Jr. *Black Skin: Structure and Function*. Academic Press, San Diego, 1993. 21.
38. Breuer M. M. The binding of small molecules and polymers to keratin and their effects on the physicochemical and surface properties of hair fibers. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos C. E., Montagna W. and Stuttgen G., Eds. Springer-Verlag, Berlin, 1981, 96.
39. Wolfram L. J. The reactivity of human hair. A review. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos C. E., Montagna W. and Stuttgen G., Eds. Springer-Verlag, Berlin, 1981, 479.
40. Robbins C. R. and Kelly C. Amino acid analysis of cosmetically altered hair. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 20, 555, 1969.
41. Tolgyesi E. and Fag. F. Action of nucleophilic reagents on hair keratin. In *Hair Research: Status and Futures Aspects*. Orfanos C. E., Montagna W. and Stuttgen G., Eds. Springer-Verlag, Berlin, 1981, 116.
42. Asquith R. S. and Carthew P. An investigation of the mechanism of alkaline degradation of cystine in intact protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 278, 8, 1972.
43. Kidwell D. A. and Blank D. L. Hair analysis: techniques and potential problems. In: *Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. Sunshine I., Ed. Marcel Dekker, New York, 1992, 555.
44. Chen K. K. and Poth E. J. Racial differences as illustrated by the mydriatic action of cocaine, euphthalmine and ephedrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 36, 429, 1929.
45. Patil P. N. Cocaine-binding by the pigmented and the nonpigmented iris and its relevance to the mydriatic effect. *Invest. Ophthalmol.*, 11, 739, 1972.
46. Patil P. N., Shimada K., Feller D. R. and Malspeis L. Accumulation of (-)14C-ephedrine by the pigmented and the non pigmented iris. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188, 342, 1974.
47. Shimada K., Bawaja R., Sokoloski. T. and Patil P. N. Binding characteristics of drugs to synthetic levodopa melamine. *J. Pharm. Sci.*, 65, 1057, 1976.

48. Larsson B. and Tjalve H. Studies on the mechanism of drug-binding to melamin. *Biochem. Pharmacol.*, 28, 1181, 1979.
49. Larsson B. and Tjalve H. Studies on the melamin-affinity of metal ions. *Acta Physiol. Scand.*, 104, 479, 1978.
50. Montagna W., Protta G. and Kenney J. A. Jr.. *Black Skin: Structure and Function*. Academic Press, San Diego, 1993, 85.
51. Kidwell D. A. and Blank D. L. Mechanisms of incorporations of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In *NIDA Research Monograph*. Cone E. J. and Welch M., Eds. 1994.
52. Mohr K. and Struve M. Differential influence of anionic and cationic charge on the ability of amphiphilic drugs to interact with DPPC-liposomes. *Biochem. Pharmacol.*, 41, 961, 1991.
53. Mangin P. Drug Analyses in Nonhead Hair. In *Drug Testing in Hair*. Kintz P. CRC Press, 1996, 280.
54. Uematsu T., Miyazawa N. and Nakashima M. The measurement of ofloxacin in hair as an index of exposure. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 40, 581-584, 1991.
55. Miyazawa N., Uematsu T., Mizuno A., Nagashima S. and Nagashima M. Ofloxacin in human hair determined by high performance liquid chromatography. *Forensic Sci. Int.*, 51(1), 65-77, 1991.
56. Miyazawa N., Uematsu T. Analysis of ofloxacin in hair as a measure of hair growth and as a time marker for hair analysis. *Ther. Drug Monit.*, 14, 525-528, 1992.
57. Baumgartner W. A., Hill V. A. and Blahd W. H. Hair analysis for drugs of abuse. *J. Forensic Sci.*, 34, 1433, 1989.
58. Kidwell D. A. and Blank D. L.. Mechanisms of incorporations of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In: *Hair Testing for Drugs of Abuse*. International Workshop on Standards and Technology. E. J. Cone, M. J. Welch and M.B. Grigson Babecki, eds. N.I.H Publication, No 95-3727, Washington D. C., 1995, pp. 19-90.

59. Chatt A. and Katz S. A. Hair Analysis: Applications in the Biomedical and Environmental Sciences. VCH. Publishes, New York, 1988, pp. 14-16 and pp. 77-81.
60. Hopps H. C. The biologic basis for using hair and nail for analysis of trace elements. *Sci. Total Environ.*, 7, 71, 1977.
61. Blank D. L. and Kidwell D. A. External contamination of hair by drugs of abuse- an issue in forensic interpretation. *Forensic Sci. Int.*, 63, 145, 1993.
62. Kidwell D. A. and Blank D. L. Environmental Exposure - The Stumbling Block of Hair Testing. In *Drug Testing in Hair*. Kintz. P., ed. CRC Press, 1996, pp. 32.
63. Kidwell D. A. and Blank D. L.. Environmental Exposure - The Stumbling Block of Hair Testing. in *Drug Testing in Hair*. Kintz. P., ed. CRC Press, 1996, pp. 33-35.
64. Uematsu T., Matsuno H., Sato H., Hirayama H., Hasegawa K. and Nakashima M. Steady-state pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in schizophrenic patients: Analysis of factors determining their concentrations in hair. *J. Pharm. Sci.*, 81, 1008-1011, 1993.
65. Uematsu T., Mizuno A. and Kosuge K. Human scalp hair as biopsy material suitable for quantitative analysis in therapeutic drug monitoring. In: *Hair Testing for Drugs of Abuse. International Research on Standards and Technology*. E. J. Cone, M. J. Welch. and M.B. Grigson Babecki, eds. N.I.H Publication, No 95-3727, Washington D. C., 1995, pp. 333-343.
66. Uematsu T., Sato R., Fujimori O., Nakashima M. Human scalp hair as evidence of individual dose history of haloperidol: A possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. *Arch Dermatol. Res.*, 282, 120-125, 1990
67. Uematsu T., Sato R., Suzuki K., Yamaguchi S. and Nakashima M. Human scalp hair as evidence of individual dose history of haloperidol: Method and retrospective study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 37, 239-244, 1989.
68. Sato H., Uematsu T., Yamada K. and Nakashima M. Chlorpromazine in human scalp hair as an index of dosage history: Comparison with simultaneously measured haloperidol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 44(5), 439-444, 1993.

69. Uematsu T. and Nakashima M. pharmacokinetics aspects of newer quinolones. In *Progress in Drug Research*, Mitsuhashi S., ed. Basel: Birkhauser - Verlag, 1992, 38.
70. Mizuno A., Uematsu T. and Nakashima M. Simultaneous determination of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in human hair by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 653(2), 187-193, 1994.
71. Balabanova S. and Wolf H. U. Bestimmungen von Cocain, Morphin, Phenobarbital and Methadon. im Kopf. Achsel. und Schamhaar. *Lab. Med.*, 13, 46-47, 1989.
72. Balabanova S. and Wolf H. U. Methadone concentrations in human hair of the head. axillary and pubic hair. *Z. Rechtsmed*, 102, 293-296, 1989.
73. Balabanova S., Arnold P. J., Luckow V., Brunner H. and Wolf H. U. Tetrahydrocannabinole im Haar von Haschischrauchern. *Z. Rechtsmed*, 102, 503-508, 1989.
74. Cone E. J., Darwin W. D. and Wang W. L. The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci. Int.*, 63, 55-68, 1993.
75. Nakahara Y., Takahashi K. and Konuma K. Hair analysis for drugs of abuse. VI. The excretion of methoxyphenamine and methamphetamine into beards of human subjects. *Forensic Sci. Int.*, 63, 109-119, 1993.
76. Kidwell D. A. and Blank D. L. Environmental Exposure - The Stumbling Block of Hair Testing. In *Drug Testing in Hair*, Kintz P., ed. CRC Press, 1996, pp. 35-38.
77. Pohl S., Hnatchenko M. and Feinland R. Hair conditioning compounds and method for use. U. S. patent 4, 507, 280.
78. Corbett J. F. The chemistry of hair-care products. *J. S. D. C.*, 285, Aug. 1976,
79. Polasek M., Gas B., Hirokawa T. and Vaclik J. Determination of limiting ionic mobilities and dissociation constants of some local anesthetics. *J. Chrom.*, 596, 265, 1992.

80. Hayes G., Scholtz H., Donahue T. and Baumgartner W. In an abstract of the 39th meeting of the American Society for Mass Spectrometry and Allied Topics. Nashville, May 1991, 19-24.
81. Harrison W. H., Gray R. M. and Solomon L. M. Incorporation of d-amphetamine into pigmented guinea-pig hair. *Br. J. Dermatol.*, 91, 415, 1974.
82. Lentner C., ed. *Geigy Scientific Tables, Volume 1*, Medical Education Division Ciba- Geigy Corporation, West Caldwell, NJ, 1981, 108.
83. Doran D., Tierney J., Varano M. and Ware S. A study of the pH of perspiration from male and female subjects exercising in the gymnasium. *J. Chem. Ed.*, 70, 412, 1993.
84. Cone E. J., Yousefnejad D., Darwin W. D. and Maquire T. Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.*, 15, 250, 1991.
85. Henderson G. L., Karkey M. R. and Zhou C. Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers. *J. Anal. Toxicol.*, 16, 199, 1992.
86. Goddard E. D. Substantivity through cationic substitution. *Cosmetics Toiletries*, 102, 71, 1987.
87. Couper F.G., McIntyre I.M. and Drummer O.H. Extraction of Psychotropic Drugs from Human Scalp Hair. *J. Forensic Sci.*, 40, 83, 1995.
88. Chiarotti M. Overview on Extraction Procedures. *Forensic Sci. Int.*, 63, 161, 1993.
89. Sachs H. and Raff., I. Comparison of Quantitative Results of Drugs in Human hair by GC/MS. *Forensic Sci. Int.*, 63, 207, 1993.
90. Raff I. Nachweis von illegalen Betaubungsmitteln im menschlichen Haar nach enzymatischer Auflosung. Dissertation, University of Ulm, Germany, 1994
91. Sachs H and Arnold W. Results of comparative determination of morphine in human hair using RIA and GC/MS. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 27, 873-877, 1989.

92. Raff I. and Sachs H. Enzymatische Aufbereitung von Haaren zum nachweis eines Betaubungsmittelkonsums. *Z Rechtsmed*, 34, 424, 1990.
93. Kauert G., Meyer LV and Herrle I. Drogen- und Medikamentennachweis im Kopfhair. ohne Extraktion des Haaraufschlusses. mittels GC/MS. *Z Rechtsmed*, 28, 33, 1992.
94. Moeller MR and Fey P. Detection of drugs in hair by GC/MS. *Bull. Soc. Sci. Med. Grand Duche Luxemb*, 172, 460-465, 1990.
95. Sachs H and Raff I. Comparison of Qualitative Results of Drugs in Human Hair by GC/MS. *Forensic Sci. Int.*, 63, 207, 1993.
96. Staub C. Analytical Procedures for Determination of Opiates in Hair: A review. *Forensic Sci. Int.*, 70, 111, 1995.
97. Klasinsky K.S., Magluilo J., Schaafer T. Hair Analysis by Infrared Microscopy for Drugs of Abuse. *Forensic Sci. Int.*, 63, 253, 1993.
98. Tagliaro F., Poiesi C., Aiello R., Dorizzi R., Glielmi S., Marigo M. Capillary Electroforesis for the Investigation of Illicit Drugs in Hair: Determination of Cocaine and Morfine. *J. Chromatogr.*, 638, 303, 1993.
99. Klug E. Determination of Morphine in Human Hair. *Z. Rechtsmed.*, 84, 189, 1980.
100. Jeger A,N., Raas R.E., Hamberg C., Briellmann T. Morphine Determination in Human Hair dy Instrumental HPTLC. *Camac. Bibliogr. Serv.*, 68, 7, 1992.
101. Marigo M., Tagliaro F., Poiesi C., Lafisca S., Neri C. Determination of Morphine In the Hair of Heroin Addicts by High Performance Liquid Chromatography with Fluometric Detection. *J. Anal. Toxicol.*, 10, 158, 1986.
102. Nagai T., Takahashi M., Saito K., Kamiyama S., Nagai T. A New Analytical method for Methamphetamine Optical Isomers and Its Habitual User' Hair by HPLC. *Igaku To Seibutsugaku*, 115, 147, 1987.
103. Nagai T., Kamiyama S., Nagai T. Forensic Toxicologic Analysis of Methamphetamine Optical Isomers by High Performance Liquid Chromatography. *Z Rechtsmed.*, 101, 151, 1998.

104. Matsuno H., Uematsu T., Nakashima M., The Measurement of Haloperidol and Reduced Haloperidol in Hair as an Index of Dosage History. *J. Clin. Pharmacol.*, 19, 187, 1990.
105. Couper F.J., McIntyre M., Drummer OH. Detection of Antidepressant and Antipsychotic Drugs in Post-Mortem Human Scalp Hair. *J. Forensic. Sci.*, 40, 87, 1995.
106. Mizuni A., Uematsu T., Nakashima M. Simultaneous Detection of Ofloxacin, Norfloxacin and Ciprofloxacin in Human Hair by High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr.*, 653, 187, 1994.
107. Takahashi K. Determination of Methamphetamine and Amphetamine in Biological Fluids and Hair by Gas Chromatography. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 38, 319, 1984.
108. Ishiyama I., Nagai T., Toshida S. Detection of basic Drugs (Methamphetamine, Antidepressants and Nicotine) from Human Hair. *J. Forensic. Sci.*, 28, 380, 1983.
109. Kindz P., Ludes B., Mangin P. Detection of Drugs in Human Hair Using Abbott ADx. with Confirmation by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS). *J. Forensic. Sci.*, 37, 328, 1992.
110. Suzuki S., Inoue T., Yasuda T. Analysis of Methamphetamine in Hair, Nail, Saliva and Sweat by Mass Fragmentography. In TIAFT Proceedings of the 21st International Meeting, Brighton, Dunnett N., Kimber KJ., Eds. McMillan, New York, 1984, 95.
111. Kaferstein H., Sticht G. Comments on: "Detection of Methadone in Human Hair by Gas Chromatography/Mass Spectrometry" and "Tetrahydrocannabinols on the Hair of Hashish Smokers". *Int. J. Leg. Med.*, 103, 393, 1990.
112. Bogusz M. Comments on: "Tetrahydrocannabinols on the Hair of Hashish Smokers". S. Balabanova et. Al. And on the response by Dr. Balabanova to comments by H. Kaefestein and G. Sticht. *Int. J. Leg. Med.*, 103, 393, 1990.
113. Nagai T., Nagai T. Detection of Codeine from Animal Hair and the Lapse of Time of Its Accumulation. *Igaku To Seibutsugaku*, 109, 145, 1984.

114. Pelli B., Traldi P., Tagliaro F., Lubli G., Marigo M. Collisional Spectroscopy for Unequivocal and Rapid Determination of Morphine at ppb Level in the Hair of Heroin Addicts. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 14, 63, 1987.
115. Moeller M.R., Fey P. Screening Procedure for Drugs in Hair. 43rd Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, Anaheim, CA. Feb. 18-23 (1991). Abstracts, K 45 482.
116. Moeller M.R., Fey P., Wennig R. Simultaneous Determination of Drugs of Abuse (Opiates, Cocaine and amphetamine) in Human Hair by GC/MS and Its Application to a Methadone Treatment Program. *Forensic. Sci. Int.*, 63, 185, 1993.
117. Martz R.M. The Identification of Cocaine in Hair by GC/MS and MS/MS. *Crime Lab. Dig.*, 15, 67, 1988.
118. Sramer J.J., Baumgartner W.A., Tallos J.A., Ahrens T.N., Heiser J.F. and Bland W.H. Hair analysis for detection of phencyclidine in newly admitted psychiatric patients. *Am. J. Psychiatry*, 142, 950, 1985.
119. Tracqui A., Kressig P., Kintz P., Pouliquen A. and Mangin P. Determination of amitriptyline in the hair of psychiatric patients. *Hum. Exp. Toxicol.*, 11, 363, 1992.
120. Gouille J.P., Noyon J., Layet A., Rapoport N.F., Vaschalde Y., Pignier Y., Bouige D. and Jouen F. Phenobarbital in hair and drug monitoring. *Forensic Sci. Int.*, 70, 191, 1995.
121. Kintz P., Marescaux C and Mangin P. Testing human hair for carbamazepine in epileptic patients: is hair investigation suitable for drug monitoring. *Hum. Exp. Toxicol.*, 14, 812, 1995.
122. Kintz P. Amineptine abuse detected by hair analysis. *Toxichem + Krimtech.*, 61, 70, 1994.
123. Kintz P., Cirimele V., Edel Y., Tracqui A. and Mangin P. Characterization of dextromoramide (Palfium) abuse by hair analysis. *Int. J. Leg. Med.*, 107, 269, 1995.

124. Moeller M.R., Fey P. and Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.*, 63, 185, 1993.
125. Goldberger B.A., Darraj A.G., Caplan Y.H. and Cone E.J. Detection of methadone, methadone metabolites and other illicit drugs of abuse in hair of methadone treatment subjects. Presented at the 2nd international meeting on clinical and forensic aspects of hair analysis, Genova, June 6 - 8, 1994.
126. Tsatsakis A.M. Laboratory testing for drugs of abuse. Recent applications and tendencies. Presented at the 9th Panhellenic Congress of Society for Social Pediatrics and Promotion of Health, Youth and Narcotics. Iraklion, Crete, May 1997.
127. Cone E.J., Welch J.M., Babecki M.B.G. ,eds. Hair testing for drugs of abuse. N.I.H. publication, No. 95-3727, 1995.
128. Kintz P., ed. Drug testing in Hair. Boca Raton. Florida, CRC Press, 1996.
129. Sato R., Uematsu T., Yamaguchi S. and Nakashima M. Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: prospective study. *Ther. Drug Monit.*, 11, 686, 1989.
130. Matsuno H., Uematsu T., Yamada K. and Nakashima M. Chlompromazine in human scalp hair as an index of dosage history: comparison with simultaneously measured haloperidol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 44, 439, 1993.
131. Psillakis Th., Tsatsakis A.M., Daskalakis G. Determination of phenytoin in human head hair. Presented at the 35th International Congress of Forensic Toxicologists (TIAFT). Padova, Italy, August 24-28, 1997.
132. Psillakis Th., Tsatsakis A.M., Daskalakis G. Determination of phenytoin in human head hair. Presented at the 1st Panhellenic Congress of Clinical Chemistry. Athens, Vouliagmeni, Greece, October 18-20, 1996.
133. Psillakis Th., Tsatsakis A.M. and Pallis El. Sectional analysis for determination of CBZ levels in head hair of patients under long-term treatment. Presented at the 5th meeting of B.C.L.F., Ioannina, Greece, 9 - 12 October, 1997. In *Balkan J. Clin. Lab. (BJCL)*, 1997, 90.

134. Tsatsakis A.M. Hair Testing and pubic hair testing for legal purpose in Crete. Presented at the 35th International Congress of Forensic Toxicologists (TIAFT), Padova, Italy, August, 1997.
135. Psillakis Th., Assithianakis P., Tsatsakis A.M. Morphological, anatomical and physicochemical factors influencing the processes of drug incorporation into hair. *Hospital Pharmacy Bulletin*, 3, 8-42, 1996
136. Blom J. Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticorulsant drug (9-32833). *Lancet*, 1, 839, 1962.
137. Cereghino J.J. Serum CBZ concentration and clinical control. Complex partial seizures and their treatment. In Penry J.K., Daley D.D. ,eds. *Advances in Neurology*, N.Y, Raven Press, 11, 309-330, 1975
138. Dose M., Apeli S., Emrich H. CBZ as adjunct of antipsychotic therapy. *Psychiatry Res.*, 22, 303-310, 1987.
139. Emmet J.R., Shea J.J. Medical treatment of tinnitus: proceeding of the II International Tinnitus Seminar. *J. Laryng Otol.*, 9, 264-270, 1984.
140. Bertilsson L. Clinical pharmacokinetics of CBZ. *Clin Pharmacokinetics*, 3, 128-143, 1978.
141. Bertilsson L., Tomson T. Clinical pharmacokinetics and pharmacological effects of CBZ and CBZ-10,11-epoxide. *Clin Pharmacokinetics*, 11, 177-198, 1986.
142. Faigle J.W. and Feldmann K.F. Carbamazepine biotransformation. In Levy R. Mattson R., Meldrum B., Penry J.K. and Dreifuss F.E., eds. *Antiepileptic Drugs*. 3rd ed, New York, Raven Press. Ltd., 1989, 491-504.
143. Christiansen J. and Dam M. Influence of phenobarbital and diphenylhydantoin on serum CBZ levels in-patients with epilepsy. *Acta Neurologia Scandinavica*, 49, 543-546, 1973.
144. Moyer T.P., Pippenger C.E., Blanke R.V. and Bloyin R.A. Therapeutic Drug Monitoring - Antiepileptic Drugs. In: *Clinical Chemistry*. Tietz W., Norbert., ed. By W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, 17, 1632-1638.
145. Tsatsakis A.M., Psillakis Th.K., Tzatzarakis M., Kourtopoylos Ch., Parisis N.K. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: A preliminary study. *Clin. Chem. Acta.*, 263, 187-195, 1997.

146. Tsatsakis A.M. Judicial application of sectional hair testing in Crete: Hair testing of heavy heroin abusers. *J. Clin. Forens. Med.*, 1998.
147. Miller J.C. and Miller J.N., eds. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd ed, Chichester, Ellis Horwood, 1994.
148. Buchthal F., Lennox-Buchthal M.A. Diphenylhydantoin: relation of anticonvulsant effect to concentration in serum. In: Woodbury D.M., Penry J.K., eds. *Antiepileptic Drugs*, New York, Raven Press, 1972, 193-209.
149. Wilder B.J., Ramsay R.E., Willmore L.J., et al. Efficacy of intravenous phenytoin in the treatment of status epilepticus: Kinetics of central nervous system penetration. *Ann Neurol.*, 1, 511-518, 1977.
150. Chadwick D., Vydelingum L., Galbraith A. and Renolds E.H. The value of serum phenytoin levels in new referrals with epilepsy. One drug in the treatment of epilepsy. In: *Antiepileptic Drug Monitoring*. Gardner-Thorpe C., et al., eds, 1977, 187-196.
151. Kutt H., Winters W., Kokenge R. and McDowell F. Diphenylhydantoin metabolism, blood levels and toxicity. *Arch Neurol.*, 11, 642-648, 1964.
152. Buchthal F., Svensmark O. and Schiller P.J. Clinical and electroencephalographic correlation with serum levels of diphenylhydantoin. *Arch Neurol*, Chicago, 2, 624-630, 1960.
153. A. Psillakis, I. Daskalakis, G. Kliafas, N. Aivalis, S. Petrutsu, S. Zervu and A. Tsatsakis, Determination of phenytoin in human head hair. In: 1st Panhellenic Congress of Clinical Chemistry, Athens-Vouliagmeni, Greece. October 18-20, 1996, 120.
154. Th. Psillakis, A.M. Tsatsakis, et.al. CBZ levels in head hair of patients under long-term treatment: A method to evaluate the history of drug use. *J. Clin. Pharmacol.*, 39, 1-13, 1999.
155. Pinder R.M., Brogden R.N., Speight T.M., et al. Sodium valproate: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs*, 13, 81-123, 1977.

156. Simon D., Penry J.K. Sodium di-n-propylacetate (DPA) in the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 16, 549-573, 1975.
157. Bruni J., Wilder B.J. Valproic acid. Review of a new antiepileptic drug. *Arch Neurol.*, 36, 393-398, 1979.
158. Browne T.R. Valproic acid. *N. Engl. J Med.*, 302, 661-666, 1980.
159. Balfour J.A., Bryson H.M. Valproic acid. Review of its pharmacology and therapeutic potential indication other than epilepsy. *CNS Drugs*, 2 (2), 144-173, 1994.
160. Ψυλλάκης Θ., Δασκαλάκης Ι., Τσατσάκης Α. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων καρβαμαζεπίνης και βαλπροϊκού οξέος σε τρίχες κεφαλής. Παρουσιάστηκε στο 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Αθήνα, 4-8 Δεκεμβρίου, 1995, τόμος Β', 630-634.