

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. Σακελλαρίδης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2008-09

Αριθμ.....

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ *IN VIVO* ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ P4501A2,
P4502A6 ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ Ν-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ-2 ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ
ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

ΗΛΙΑΣ ΜΠΕΓΑΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ασπροδίνη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Σακελλαρίδης Νικόλαος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Νταλέκος Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σακελλαρίδης Νικόλαος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Νταλέκος Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
4. Ασπροδίνη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. Πιτσίκας Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. Τσακάλωφ Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. Βασιλάκη Άννα, Λέκτορας Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα	Ηλίας
Επώνυμο	Μπέγας
Όνομα πατέρα	Νισήμ
Ημερομηνία γέννησης	1 Ιανουαρίου 1962
Τόπος γέννησης	Λάρισα
Διεύθυνση κατοικίας	Ζωοδόχου Πηγής 78-80, Λάρισα
Τηλέφωνο	2410-253537
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμος
Παρούσα απασχόληση	Μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από 20/12/2002

ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ

Δεκ.1984 - Σεπτ. 1986	Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας στο Σώμα Υλικού Πολέμου ως Τεχνικός Γραφέας - Σιτιστής.
-----------------------	--

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Σεπτ. 1973 - Ιουν. 1979	Μέση εκπαίδευση στο Αμερικανικό Κολλέγιο "ΑΝΑΤΟΛΙΑ" της Θεσσαλονίκης με πλήρη υποτροφία (δίδακτρα- τροφεία).
Σεπτέμβριος 1979	Εισαγωγή, κατόπιν εισαγωγικών εξετάσεων, στο τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Α.Π.Θ.
Ιούνιος 1980-Δεκ.1984	Εισαγωγή (πρώτος στην κατάταξη), κατόπιν εισαγωγικών εξετάσεων, και παρακολούθηση του Χημικού Τμήματος της Φυσικομαθηματικής Σχολής του Α.Π.Θ.
Σεπτ. 1998 -Ιουλ. 2002	Παρακολούθηση και αποφοίτηση από το Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής (Π.Σ.Ε.) "Ιατρική Βιοχημεία" της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

Απολυτήριο Λυκείου με βαθμό 18 και 3/12.
Πτυχίο του Π.Σ.Ε. «Ιατρική Βιοχημεία» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με βαθμό «Άριστα» (8,88).

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Καλή γνώση της Αγγλικής-Κρατικό Πτυχίο Γλωσσομάθειας επιπέδου B2.

ΓΝΩΣΗ ΧΡΗΣΗΣ Η/Υ

Κάτοχος Πιστοποιητικού Key-Cert (αναγνωρισμένου από το ΑΣΕΠ) στην γνώση χρήσης Επεξεργασίας κειμένου, Υπολογιστικών φύλλων και Υπηρεσιών Διαδικτύου.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ-ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Σεπτ. 1988-Δεκ. 1988	Παραδόσεις ιδιαίτερων μαθημάτων σε μαθητές Γυμνασίου.
Ιαν. 1989-Δεκ. 1992	Υπάλληλος λογιστικού γραφείου
Μαρ. 1993-Νοεμβρ. 1995	Υπάλληλος βιβλιοπωλείου.
Ιαν. 1996- Ιουλ. 1998	Υπάλληλος λογιστικού γραφείου.
Ιούλ.1998- Ιαν.1999	Εποχιακός λογιστικός υπάλληλος της Εθνικής Τράπεζας.
Φεβρ. 1999- Οκτ. 2000	Υπάλληλος λογιστικού γραφείου.
Νοεμβρ. 2000- Μαρτ.2001	Συμβασιούχος στο ερευνητικό πρόγραμμα της καλλιέργειας του φυτού <i>Artemisia Annua</i> της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως παρασκευαστής.
Απρ. 2001- Δεκ.2002	Υπάλληλος λογιστικού γραφείου.
Δεκ.2002-σήμερα	Μέλος Ε.Τ.ΕΠ. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Μάιος 2008-σήμερα	Τοποθέτηση στο Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- 1) **Μπέγας Η, Τσακάλωφ Α, Μπενάκης Α, Ασπροδίνη ΕΚ.** Εκτίμηση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2 με την χρήση της καφεΐνης: Προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ηράκλειο Κρήτης 2002, Τόμος Περιλήψεων, σελ. 43.
- 2) **Μπέγας Η, Τσακάλωφ Α, Μπενάκης Α, Ασπροδίνη ΕΚ.** Εκτίμηση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2 με την χρήση της καφεΐνης: Προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Γλυφάδα, 2002, Τόμος Περιλήψεων, σελ. 57.
- 3) **Μπέγας Η, Τσακάλωφ Α, Μπενάκης Α, Ασπροδίνη ΕΚ.** Ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα για τον προσδιορισμό της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2 με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής 2003, 21:30-31.
- 4) **Μπέγας Η, Νταλέκος ΓΝ, Ασπροδίνη ΕΚ.** Εκτίμηση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2 με την χρήση της καφεΐνης: Προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 2003, Τόμος Περιλήψεων, σελ. 66.

- 5) **Μπέγας Η, Ασπροδίνη ΕΚ., Παπακώστα Σ, Μαγλαράς Λ, Μπενάκης Α, Νταλέκος ΓΝ.** Μεταβολισμός της καφεΐνης σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος. Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής 2005, 23:80-82.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. *In vivo* evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. Biomed Chromatogr 2007, 21:190-200.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι αναμφισβήτητο γεγονός ότι η συντελούμενη στις μέρες μας ιλιγγιώδης πρόοδος στην μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος επέτρεψε την ανακάλυψη γενετικών πολυμορφισμών βασικών ενζύμων του μεταβολισμού, τόσο των ενδογενών ενώσεων του οργανισμού όσο και εξωγενών ουσιών, των λεγομένων ξеноβιοτικών. Η ανακάλυψη αυτή βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση της ποικιλομορφίας στην απόκριση των διαφόρων ατόμων σε φάρμακα και περιβαλλοντικούς παράγοντες, δεν κατόρθωσε όμως να ερμηνεύσει πλήρως την παρατηρούμενη στον πληθυσμό ετερογένεια αυτή. Ως συνέπεια, η μελέτη των φαινοτύπων της έκφρασης πολλών γονιδίων των ενζύμων του μεταβολισμού παραμένει ένα σημαντικό εργαλείο για την εξακρίβωση του βαθμού της λειτουργικότητας των ενζύμων αυτών. Στην κατεύθυνση αυτή προσπάθησε να συμβάλει και η παρούσα εργασία μέσω της μελέτης της λειτουργικότητας τεσσάρων σημαντικών ενζύμων του μεταβολισμού, τόσο σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα υγιών εθελοντών όσο και σε έναν ικανό αριθμό ηπατοπαθών πασχόντων από ένα ευρύ φάσμα ηπατικών νοσημάτων. Πέραν τούτου, η εργασία αυτή προσπάθησε να συμβάλει και στην ανάδειξη μιάς, όσον το δυνατόν, ανώδυνης και ασφαλούς δυναμικής διαδικασίας για την διάγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηπατικής νόσου καθόσον οι συνήθεις βιοχημικές δοκιμασίες είναι αδρόι μόνον δείκτες της κατάστασης του οργάνου.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού αποφασιστική υπήρξε η συμβολή της επιβλέπουσας, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, κ. Ευτυχίας Ασπροδίνη την οποία και ευχαριστώ για τη βοήθειά της σε κάθε στάδιο της εργασίας.

Μεγάλη υπήρξε, επίσης, η συμβολή του Καθηγητού Παθολογίας κ. Γεωργίου Νταλέκου ο οποίος υπέδειξε και ομαδοποίησε το δείγμα των ηπατοπαθών που παρακολουθούνται στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας του οποίου ήταν υπεύθυνος. Ο ίδιος παρακολουθούσε στενά την πορεία της εργασίας και με την βαθεία του γνώση της ηπατικής δυσλειτουργίας, υπεδείκνυε την σημασία και βαρύτητα των εκάστοτε αποτελεσμάτων.

Ουσιαστική ήταν και η βοήθεια του Καθηγητού Φαρμακολογίας κ. Νικολάου Σακελλαρίδη ο οποίος, πέραν του ότι προμήθευσε ένα σημαντικό τμήμα της βιβλιογραφίας, με τις παρατηρήσεις και το αμέριστο και συνεχές ενδιαφέρον του για την πορεία της έρευνας έδωσε κρίσιμη ώθηση για την περάτωση της παρούσας

εργασίας. Όλους τους ανωτέρω, οι οποίοι αποτελούν τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους ευχαριστώ θερμά καθώς, εκτός από την επιστημονική τους κατάρτιση την οποία κατέθεσαν για να ολοκληρωθεί η διατριβή αυτή, ολόψυχη υπήρξε η ενθάρρυνση και ηθική στήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη την διάρκειά της.

Ευχαριστίες αρμόζουν και στον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Χημείας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ ο οποίος με την ευρεία του γνώση των αναλυτικών τεχνικών ήταν πάντοτε πρόθυμος να υποδείξει λύσεις σε όλα τα θεωρητικά και τεχνικά προβλήματα που ανέκυπταν κατά την διάρκεια της εργαστηριακής φάσης της έρευνας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την ιατρό κ. Στυλιανή Παπακώστα η οποία ήταν υπεύθυνη για την συλλογή των δειγμάτων των ασθενών και για την έρευνα του ιατρικού τους αρχείου και η οποία βοήθησε, επίσης, σε ένα σημαντικό τμήμα της εργαστηριακής διαδικασίας.

Ιδιαίτερες, τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω σε όλους τους εθελοντές που συμμετείχαν στην εργασία αυτή και στους ασθενείς ειδικότερα, οι οποίοι παρά την επιβαρημένη κατάσταση της υγείας τους επέδειξαν μεγάλη προθυμία στην πρόσκληση που τους απευθύνθηκε και αξιοσημείωτη συμμόρφωση στις κατευθύνσεις που τους δόθηκαν. Ελπίζουμε τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας να κομίσουν μία μικρή συνεισφορά στην βελτίωση της ποιότητας ζωής τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη	12
Abtsract	14
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.1. Γενικές πληροφορίες για τα ένζυμα P4501A2, P4502A6, οξειδάση της ξανθίνης και N-ακετυλοτρανφεράση-2	16
1.1.1. Γενικές πληροφορίες για το κυτόχρωμα P4501A2	16
1.1.2. Γενικές πληροφορίες για το κυτόχρωμα P4502A6	24
1.1.3. Γενικές πληροφορίες για την οξειδάση της ξανθίνης	25
1.1.4. Γενικές πληροφορίες για την N-ακετυλοτρανφεράση-2	26
1.2. Δυναμικές δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργίας	28
1.3. Καφεΐνη	32
1.3.1. Γενικές ιδιότητες-απορρόφηση –κατανομή	32
1.3.2. Μεταβολισμός και αποβολή	33
1.3.2.1 Σχηματισμός ουρακίλης: η αντίδραση ακετυλίωσης	34
1.3.2.2.Απέκκριση στα ούρα	34
1.4. <i>In vivo</i> προσδιορισμός της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση της καφεΐνης	37
1.4.1. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση καφεΐνης	38
1.4.1.1. Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης	38
1.4.1.2. Κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο	38
1.4.1.3. Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης	39
1.4.2. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με την χρήση της καφεΐνης	44
1.4.3. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με την χρήση της καφεΐνης	45
1.4.4. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της NAT-2 με την χρήση της καφεΐνης	46

1.5.	Ηπατική νόσος και δραστικότητα των ηπατικών ενζύμων	47
1.6.	Η ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	50
1.7.	Σκοποί της εργασίας	52
2.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.1.1.	Χημικές ουσίες	53
2.1.2.	Συσκευές χρωματογραφίας και χρωματογραφικές συνθήκες	53
2.1.3.	Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων	55
2.1.4.	Επεξεργασία των δειγμάτων των ούρων	57
2.1.5.	Πιστοποίηση της μεθόδου	57
2.1.5.1.	Εξειδίκευση	57
2.1.5.2.	Ανάκτηση	58
2.1.5.3.	Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης	58
2.1.5.4.	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου	58
2.1.5.5.	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (LOD)	59
2.1.6.	Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο	59
2.1.7.	Αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας .	61
2.1.8.	Στατιστική επεξεργασία	62
2.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
2.2.1.	Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης	67
2.2.2.	Αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας	73
2.2.3.	Κατανομή των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στους υγιείς και ασθενείς	75
2.2.4.	Συσχέτιση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης και των συμβατικών λειτουργικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας στους ασθενείς (LFTs)	76
2.2.5.	Επίδραση της ηλικίας, του φύλου, του καπνίσματος και του δείκτη σωματικής μάζας (BMI) στην δραστικότητα των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2	81
2.2.6.	Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα των ενζύμων	83

2.2.6.1. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα του CYP1A2	83
2.2.6.2. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα του CYP2A6	88
2.2.6.3. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα της ΧΟ	88
2.2.6.4. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα της NAT-2	90
2.2.7. Εξειδίκευση και ευαισθησία των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U	93
2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	102
2.3.1. Χαρακτηριστικά της μεθόδου	102
2.3.2. Διακύμανση της δραστικότητας των CYP1A2, CYP2A6, ΧΟ και NAT-2 σε σχέση με τον χρόνο	103
2.3.3. Η κατανομή των τιμών των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης	107
2.3.3.1. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U	107
2.3.3.2. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X)	115
2.3.3.3. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου 1U/(1U+1X)	116
2.3.3.4. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1U+1X)	119
2.3.4. Ο ρόλος του φύλου στην δραστικότητα των ενζύμων	126
2.3.4.1. Ένζυμα της οικογενείας CYP και φύλο	127
2.3.4.2. ΧΟ, NAT-2 και φύλο	133
2.3.5. Ο ρόλος της ηλικίας στην δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων	136
2.3.6. Ο ρόλος του καπνίσματος στην δραστικότητα των ενζύμων	140
2.3.7. Ο ρόλος της σωματικής διάπλασης στην δραστικότητα των ενζύμων	143

2.3.8. Η επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα των ηπατικών ενζύμων και στον μεταβολισμό των φαρμάκων	144
2.3.8.1. CYP1A2 και ηπατική νόσος	150
2.3.8.2. CYP2A6 και ηπατική νόσος	157
2.3.8.3. XO και ηπατική νόσος	159
2.3.8.4. NAT-2 και ηπατική νόσος	162
2.3.9. Η χρήση της καφεΐνης ως διαγνωστικού δείκτη- σύγκριση μεθόδων	165
2.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	176
2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	177
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-Συντομογραφίες	193

2.5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) μεταβολίζεται, κυρίως, μέσω των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, οξειδάση της ξανθίνης (XO), N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2). Οι κυριώτεροι μεταβολίτες στα ούρα είναι το 1-μεθυλουρικό οξύ, η 5-ακετυλάμινο-6-φορμυλάμινο-3-μεθυλουρακίλη (AFMU), η 1-μεθυλοξανθίνη (1X), το 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (17U) και η 1,7 διμεθυλο ξανθίνη (17X). Η δραστηριότητα των ανωτέρω ενζύμων προσδιορίζεται με τους μεταβολικούς λόγους (AFMU+1U+1X)/17U, 17U/(17U+17X), 1U/(1U+1X) και AFMU/(AFMU+1U+1X). Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για την ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και ο προσδιορισμός των ανωτέρω μεταβολικών λόγων σε 125 υγιείς και 342 ηπατοπαθείς. Μετά από αποχή από μεθυλοξανθίνες και φάρμακα οι εθελοντές έλαβαν 200mg καφεΐνης και 6 ώρες αργότερα συλλέχτηκε δείγμα ούρων. Οι μεταβολίτες και το εσωτερικό πρότυπο απομονώθηκαν με χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη (85/15, v/v), διαχωρίστηκαν σε στήλη C18 μεταβαίνοντας από τον διαλύτη A (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 92/4/5, v/v) στον διαλύτη B (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη, 60/40, v/v) και ανιχνεύτηκαν στα 280nm. Ο διαχωρισμός ήταν επαρκής, η ακρίβεια 94,1–106,3%, η εντός σειράς και μεταξύ σειρών επαναληψιμότητα μικρότερη του 8,02% και 8,78%, αντίστοιχα. Το φύλο και η ηλικία δεν επέδρασαν στην δραστηριότητα των ενζύμων ενώ το κάπνισμα είχε επαγωγική δράση στο CYP1A2 και ανασταλτική στο CYP2A6. Η NAT-2 παρουσίασε δικόρυφη κατανομή και 59,2% των υγιών και 57,0% των ασθενών χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές. Τα CYP1A2 και CYP2A6 ανεστάλησαν κατά την ηπατοπάθεια και εμφανέστερα κατά την κίρρωση. Δείχθηκε ότι το CYP1A2 αναστέλλεται στην ιογενή ηπατίτιδα, στην αυτοάνοση ηπατίτιδα, στην μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, στην αλκοολική ηπατοπάθεια και στα αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα. Το κάπνισμα επικάλυψε την αναστολή του CYP1A2, με εξαίρεση αυτούς με αλκοολική νόσο και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Το κάπνισμα δεν επικάλυψε την αναστολή του CYP1A2 στο σύνολο των κίρρωτικών, λόγω της σοβαρής ανεπάρκειας του ενζύμου στην μή αντιρροπούμενη κίρρωση, ενώ στην αντιρροπούμενη κίρρωση το κάπνισμα επεσκίασε την αναστολή του ενζύμου. Δείχθηκε ότι η XO επάγεται κατά την ηπατοπάθεια και ιδιαίτερα στην ιογενή ηπατίτιδα. Δείχθηκε, τέλος, ότι μόνον η ταχεία ακετυλίωση υποχωρεί στους ηπατοπαθείς. Ο λογάριθμος του λόγου (AFMU+1U+1X)/17U παρουσίασε εξειδίκευση 70,7-85,4% και ευαισθησία 60,1-91,7% στην διάγνωση των

σταδίων της ηπατικής νόσου, στους μη καπνιστές, ενώ στους καπνιστές παρουσίασε εξειδίκευση 72,1-86,0% και ευαισθησία 31,5-83,3%. Στις πλείστες των περιπτώσεων ο ανωτέρω λογάριθμος είχε μεγαλύτερη ευαισθησία από τις συνήθεις δοκιμασίες, ενώ ο συνδυασμός του με αυτές βελτίωσε την ευαισθησία στην διάγνωση της ηπατοπάθειας με ποσοστά από 69,6-100,0% και 51,7-83,3% στους μη καπνιστές και καπνιστές, αντίστοιχα. Η μέθοδος των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα συνιστά μη επεμβατική, αβλαβή, ανώδυνη και αξιόπιστη διαδικασία για την εκτίμηση της δραστηριότητας των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2. Ο λογάριθμος του λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$, σε συνδυασμό με τις συνήθεις δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργίας, βελτιώνει σημαντικά την διάγνωση της ηπατικής νόσου.

2.6. ABSTRACT

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is primarily metabolized by CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase and N-acetyltransferase-2 and its major urinary metabolites are 1-methyluric acid (1U), 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU), 1-methylxanthine (1X), 1,7-dimethyluric acid (17U) and 1,7-dimethylxanthine (17X). CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT-2 activities can be estimated from the metabolic ratios $(AFMU+1U+1X)/17U$, $17U/(17U+17X)$, $1U/(1X+1U)$ and $AFMU/(AFMU+1U+1X)$, respectively. The aim of the study was the development of a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the quantification of caffeine metabolites in urine and the evaluation of the above ratios in 125 healthy and 342 liver disease patients. After a 30-hour xanthine- and medication-free period 200mg caffeine were administered and a 6-hour spot urine sample was collected. Caffeine metabolites and the Internal Standard were extracted with chloroform/isopropanol (85:15, v/v) and separated with a C18 column using solvent A (0.1% acetic acid–methanol–acetonitrile, 92:4:5, v/v) and solvent B (0.1% acetic acid–methanol, 60:40, v/v), and detected at 280nm. Adequate metabolite separation, accuracy (94.1–106.3%), intraday (8.02%) and interday (8.78%) precision were achieved. Age and gender had no effect on enzymes activity whereas smoking induced CYP1A2 and inhibited CYP2A6 activities. NAT-2 exhibited bimodal distribution with 59.2% of the healthy and 57.0% of the patients being slow acetylators. CYP1A2 and CYP2A6 were suppressed in patients and inhibition was more pronounced in cirrhotics. It was demonstrated, that CYP1A2 was inhibited in autoimmune hepatitis, in non-alcoholic steatohepatitis, in HBV and HCV infection, in alcoholic liver disease and in autoimmune cholestatic liver diseases. The inducing effect of smoking masked the inhibitory effect of disease on CYP1A2 activity, in most patient subgroups, with the exception of those with alcoholic liver disease and non alcoholic steatohepatitis. Smoking did not mask CYP1A2 inhibition by cirrhosis due to the pronounced enzyme failure in decompensated patients while no such effect was observed in compensated cirrhotics. XO activity was elevated in patients, especially in virus infected patients. Finally, it was demonstrated that NAT-2 activity was reduced in fast acetylators. The logarithm of the ratio $(AFMU+1U+1X)/17U$ exhibited 70.7-85.4% specificity and 60.1-91.7%, sensitivity in the diagnosis of different stages of liver disease, in the non-smokers group. In the smokers group sensitivity was 31.5-83.3% while specificity was 72.1-86.0%. In most cases, the CYP1A2 index was more sensitive than routine tests

while the combined use of this ratio and conventional liver function tests significantly improved the detection of liver disease with 69.6-100.0% sensitivity, in non-smokers, and 51.7-83.3% sensitivity in smokers. Caffeine metabolic ratios assessment in spot urine samples is a non-invasive, innocuous and valid procedure for the determination of CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT-2 activities while the logarithm of the ratio $(AFMU+1U+1X)/17U$ along with conventional liver function tests contributes towards a significant improvement in the diagnosis of liver disease.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Γενικές πληροφορίες για τα ένζυμα P4501A2, P4502A6, οξειδάση της ξανθίνης και N-ακετυλοτρανφεράση-2

1.1 1. Γενικές πληροφορίες για το κυτόχρωμα P4501A2

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν, σε διάφορα μεμβρανώδη συστατικά, συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων που εξυπηρετούν διάφορους σκοπούς. Έτσι, στα μιτοχόνδρια των επινεφριδίων και στις μικροσωματικές μεμβράνες, δηλαδή στο Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Λ.Ε.Δ.), εντοπίζεται το κυτόχρωμα P450 (CYP), μία υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών, η οποία αποτελεί το τελευταίο συστατικό μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων τα οποία προέρχονται από το NADPH. Η υπεροικογένεια αυτή των ενζύμων είναι υπεύθυνη για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού ενός μεγάλου φάσματος δομικής διαφορετικών υποστρωμάτων και για την κατάλυση πολλών σημαντικών ενδογενών βιοχημικών διεργασιών στα θηλαστικά [1, 2]. Η ονομασία του P450 προέρχεται από το γεγονός ότι είναι κυτταρικό χρωμοφόρο και το σύμπλοκο της ανηγμένης μορφής της χρώσης (pigment, P) με CO απορροφά ισχυρά στα 450 nm [3, 4]. Τα υποστρώματα του P450 είναι λιποδιαλυτές ενώσεις οι οποίες διαπερνούν το Λ.Ε.Δ. και εγκλωβίζονται σ' αυτό λόγω της λιποειδικής φύσης των μεμβρανών του. Οι ουσίες που μεταβολίζονται γίνονται κατά κανόνα λιγότερο λιποδιαλυτές γιατί αποκτούν στο μόριό τους ιονιζόμενες ομάδες οι οποίες μπορούν να συνδεθούν περαιτέρω με ενδογενή υδατοδιαλυτά μόρια του οργανισμού μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, οι μεταβολίτες χάνουν την ικανότητά τους να διαχέονται παθητικά μέσα από βιολογικές μεμβράνες και απεκκρίνονται από τους νεφρούς, περισσότερο με μηχανισμούς ενεργητικής μεταφοράς [2, 5].

Μερικές από τις αντιδράσεις που καταλύει το σύστημα αυτό είναι απαραίτητες για τη ζωή, όπως η μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες, η ω-υδροξυλίωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση των χολικών οξέων καθώς και η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών [6, 7]. Άλλες πάλι αντιδράσεις του ίδιου συστήματος είναι σημαντικές για την αποτοξίνωση από ξένες προς τον οργανισμό ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) και για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. Το σύστημα P450, όμως, ευθύνεται και για την *in vivo* χημική ενεργοποίηση μερικών

από τα πιο ισχυρά καρκινογόνα [1,8]. Οι οξειδώσεις που καταλύει το σύστημα P450 απαιτούν NADPH και O₂ προκειμένου να επιτευχθεί η υδροξυλίωση των υποστρωμάτων. Το άτομο του οξυγόνου της ενσωματούμενης υδροξυλομάδας προέρχεται από το μοριακό οξυγόνο, όπως δείχθηκε με την χρήση ραδιενεργά σημασμένου O₂. Ένα άτομο του μοριακού οξυγόνου ενσωματώνεται στο υπόστρωμα ενώ το άλλο ανάγεται προς H₂O. Εξαιτίας αυτού, τα ένζυμα του συστήματος P450 αποκαλούνται μονοξυγονάσες ή οξειδάσες μικτής λειτουργίας [1]. Η τάση αυτή του P450 για μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε νερό έγινε αφορμή για την διατύπωση της πρότασης ότι, ίσως, ο κύριος ρόλος του συστήματος αυτού είναι η αποτοξίνωση από το οξυγόνο καθώς η διαδικασία αυτή απομακρύνει από το κύτταρο την περίσσεια του μοριακού οξυγόνου το οποίο, διαφορετικά, θα μπορούσε να μετατραπεί σε ρίζα οξυγόνου και άλλες δραστικές και, συνεπώς, τοξικές μορφές οξυγόνου [6].

Η υπεροικογένεια αυτή των αιμοπρωτεϊνών προέρχεται από, τουλάχιστον, 18 διακριτές οικογένειες γονιδίων P450 οι οποίες κωδικοποιούν για 60 τουλάχιστον κυτοχρώματα P450 τα οποία είναι γνωστό ότι εκφράζονται στους ανθρώπινους ιστούς [4, 9, 10]. Το κριτήριο της υποδιαίρεσης σε οικογένειες και υποοικογένειες συνίσταται στην, τουλάχιστον, 40% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, μέσα στην ίδια οικογένεια και 55%, τουλάχιστον, μέσα στην ίδια υποοικογένεια [4]. Οι οικογένειες αυτές υποδιαιρούνται λειτουργικά σε δύο μείζονες κατηγορίες: σε εκείνη η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων, και σε εκείνη η οποία μεταβολίζει, κυρίως, τις εξωγενείς ενώσεις (ξενοβιοτικά). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει 13 οικογένειες γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για κυτοχρώματα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των θρομβοξανίων και της προστακυκλίνης (CYPs 5 και 8), για τις αντιδράσεις υδροξυλίωσης κατά τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών από τη χοληστερόλη (CYPs 11, 17, 19, 21, 39, 46), για τις υδροξυλίώσεις που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των χολικών οξέων, της βιταμίνης D3 και της χοληστερόλης (CYPs 7, 24, 27, 51), την υδροξυλίωση του ρετινοϊκού οξέος (CYP26), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει 4 οικογένειες γονιδίων (CYPs 1-4) [10]. Η οικογένεια CYP20 έχει άγνωστο υπόστρωμα και λειτουργία [4].

Η οικογένεια του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP1 αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική βασική (constitutive) έκφραση καθώς και ιστοειδική επαγωγιμότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων του CYP1A1 και του CYP1B1 παρουσιάζει ομοιότητα 72% και 40% με το CYP1A2, αντίστοιχα. Παρόλο που το

CYP1A1 και το CYP1A2 έχουν πιο ευρεία εξειδίκευση υποστρωμάτων από το CYP1B1, τα 3 αυτά ένζυμα παρουσιάζουν σημαντικές αλληλεπικαλύψεις στη δράση τους [11]. Το CYP1A2 απαντάται μόνο στο ήπαρ, το CYP1A1 στους πνεύμονες, στο λάρυγγα, στα νεφρά, στα λεμφοκύτταρα και στον πλακούντα και το CYP1B1 στα νεφρά, στον προστάτη, στις ωοθήκες και στην μήτρα [11]. Το CYP1A2 είναι ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ σε ποσοστό που προσεγγίζει το 15% του συνολικού περιεχομένου σε CYP [12]. Το γονίδιο του ανθρώπινου CYP1A2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15 και αποτελείται από μία ανοδικά (upstream) κείμενη περιοχή 3 kb περίπου καθώς και από 7 εξώνια και 6 ιντρόνια τα οποία κωδικοποιούν για μία πρωτεΐνη 515 αμινοξέων [13-15].

Το CYP1A2 ενεργοποιεί προκαρκινογόνα συστατικά των τροφών και του περιβάλλοντος προς καρκινογόνες ενώσεις όπως τις αρωματικές αμίνες και τις νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, τις N-ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες απαντώνται στο κρέας που ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) οι οποίοι περιέχονται στο πετρέλαιο, στο κάρβουνο, στα αέρια των εξατμίσεων, στον καπνό του τσιγάρου, στα κρέατα που ψήνονται στα κάρβουνα [12, 16, 17] και την αφλατοξίνη B1 [18, 19]. Επίσης είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό φαρμάκων όπως η καφεΐνη [16, 20, 21], η θεοφυλλίνη [22], η τακρίνη [23], η ιμιπραμίνη [24], η αντιπυρίνη [25], η κλοζαπίνη [26], η φαινακετίνη [27] και η ακεταμινοφαΐνη (παρακεταμόλη) [11] και ευθύνεται για την βιοενεργοποίηση της τελευταίας προς ηπατοτοξικούς μεταβολίτες [28]. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στον μεταβολισμό της 17-β-οιστραδιόλης προς 2-OH και 4-OH μεταβολίτες [29] και στον μεταβολισμό της μελατονίνης προς 6-υδροξυμελατονίνη [30]. Πέραν του ρόλου του CYP1A2 στον μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων και ξενοβιοτικών ενώσεων, φαίνεται ότι η ύπαρξή του σχετίζεται με βασικές ενδογενείς λειτουργίες του οργανισμού. Αυτό προκύπτει από μία μελέτη κατά την οποία διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου του CYP1A2 [CYP1A2(-/-)] παρουσίασαν σημαντική υποέκφραση ή υπερέκφραση, σε σχέση με αντίστοιχα CYP1A2(+/-) ποντίκια, 30 γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, με την δράση της ινσουλίνης, με την λιπογένεση και με τις βιοσυνθετικές οδούς των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης. Διαπιστώθηκε, επίσης, μία αδυναμία συσσώρευσης του λίπους στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, πιθανότατα, λόγω μίας γενικότερης διαταραχής της μεταβολικής λειτουργίας [31].

Η λειτουργία του CYP1A2 επάγεται και αναστέλλεται από διάφορους περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες ενώ φαινοτυπικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η δραστηριότητά του ρυθμίζεται από δύο, τουλάχιστον, μηχανισμούς: έναν ο οποίος ελέγχει τα βασικά (constitutive) επίπεδα έκφρασης και έναν δεύτερο ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγιμότητα [17, 32, 33].

Η επαγωγή του CYP1A2 είναι κυρίως μεταγραφική και εξαρτάται από τον υποδοχέα Ah (AhR, Αρωματικών Υδρογονανθράκων) όπως επίσης και άλλους άγνωστους παράγοντες. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με τη σύνδεση ενός κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα Ah μέσα στο κυτταρόπλασμα και μετατόπιση του ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσα στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερές με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT). Στην συνέχεια το διμερές AhR-ARNT αλληλεπιδρά με έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξενοβιοτικά (xenobiotic-response element) στην 5' περιοχή με συνέπεια την αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του CYP1A2, την σύνθεση του κατάλληλου m-RNA και την *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 [2, 10, 34]. Η επαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των φαρμακολογικών δράσεων η οποία προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων ή να δημιουργήσει ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης. Πράγματι, δεν είναι αποσαφηνισμένο εάν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα Ah συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου από την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων ή παρουσιάζει όφελος μέσω μιας πιο ταχείας αποβολής εν δυνάμει επικίνδυνων χημικών ουσιών [2, 35].

Η επαγωγή του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί ως συνέπεια του καπνίσματος [27, 36-39], της κατανάλωσης κρέατος ψημένου στα κάρβουνα ή μαγειρεμένου σε υψηλές θερμοκρασίες [17, 40, 41], της κατανάλωσης σταυρανθών λαχανικών όπως τα μπρόκολα, τα λαχανάκια Βρυξελλών και τα λάχανα τα οποία περιέχουν την ουσία ινδολ-3-καρβινόλη [42, 43], της χρήσης της ομεπραζόλης, της φαινυτοΐνης, της ριφαμπικίνης, καθώς και της περιβαλλοντικής έκθεσης σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια [11]. Η επαγωγή του CYP1A2 φαίνεται, επίσης, να σχετίζεται με την αυξημένη κατανάλωση καφεΐνης και προκαλείται είτε από την καφεΐνη καθεαυτή είτε από άλλα συστατικά του καφέ [17, 44, 45].

In vivo αναστολές του CYP1A2 είναι η α -ναφθοφλαβόνη [11] και διάφορα φάρμακα όπως η φλουβοξαμίνη [46, 47], η φουραφυλλίνη [48], η σιμετιδίνη [49], η μεξιλετίνη [50], η βεραπαμίλη [51], το 5-μεθόξυ-ψοραλένιο [52] και οι κινολόνες [53]. Επιπλέον, η δραστηριότητα του CYP1A2 αναστέλλεται από τον χυμό του γκρέϊπ-

φρούτ [54], το αλκοόλ [44, 55], τα αντισυλληπτικά [43, 56, 57] και την θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα [58]. Η αναστολή αυτή είναι αντιστρεπτή, είναι αποτέλεσμα συναγωνισμού για την ενεργό περιοχή του ενζύμου και ασκείται κυρίως από φάρμακα τα οποία περιέχουν άζωτο, συμπεριλαμβανομένων των πυριμιδινών, των ιμιδαζολών και των κινολινών. Τα φάρμακα αυτά προσδένονται τόσο στον σίδηρο της αίμης όσο και στην λιποφιλική περιοχή της πρωτεΐνης. Η ισχύς της αναστολής εξαρτάται από τη λιποφιλικότητα του φαρμάκου και από την ισχύ του δεσμού μεταξύ του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου και του σιδήρου της αίμης [35]. Συνοπτικά, τα κυριότερα φάρμακα τα οποία μεταβολίζονται από το CYP1A2 καθώς οι αναστολείς και οι επαγωγείς του παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει, επίσης, διαπιστωθεί σε άτομα με χαμηλή κατανάλωση πρωτεϊνών [59], ηπατική νόσο [60-62], υψηλό δείκτη σωματικής μάζας [45] και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης [43, 63]. Η εμμηνόπαυση δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα του CYP1A2 [64], ενώ διαφορούμενες είναι οι απόψεις για την επίδραση του φύλου, της ηλικίας και των φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου [65-67]. Συνοπτικά, οι μη φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην μεταβολική δραστηριότητα του CYP1A2 εμφανίζονται στον Πίνακα 2.

Η δραστηριότητά του παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου του ανθρώπινου CYP1A2 και του μεταβολικού φαινοτύπου του ενζύμου αυτού [68]. Παρόλο που έχουν περιγραφεί περισσότερα από 30 σημεία πολυμορφισμού εντός και πλησίον του γονιδίου στον άνθρωπο [69] δεν έχει βρεθεί εκείνη η διαφορά νουκλεοτιδίων που θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη φαινοτυπική ποικιλομορφία στο γονίδιο του CYP1A2, ούτε σε εξώνια, ούτε στην περιοχή σύνδεσης εξονίων-ιντρονίων, ούτε στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου σε Καυκάσιους και Ασιατικούς πληθυσμούς [70-72]. Υπάρχουν, όμως, 2 σημειακές μεταλλάξεις στο ιντρόνιο-1 και μία μετάλλαξη στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου του CYP1A2 που σχετίζονται με αυξημένη ή μειωμένη δυνατότητα επαγωγής του CYP1A2 από επαγωγικούς παράγοντες, αντίστοιχα [14, 73-75]. Έχει, επίσης, ταυτοποιηθεί μία σημειακή μετάλλαξη στο ιντρόνιο-1 η οποία σχετίζεται τόσο με μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2, *in vivo*, όσο και με μειωμένη επαγωγιμότητα, *in vitro*, αλλά η συχνότητά της είναι 3% στους Αιθίοπες, 3,7% στους Σαουδάραβες και μόλις 0,5% στα άτομα Ισπανικής καταγωγής [76]. Μία σπάνια, επίσης, σημειακή μετάλλαξη έχει βρεθεί στην 5'-ομόφωνη (consensus) περιοχή

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ
--------------------	-------------------	------------------

έχει μεταλλαχθεί σε AT (G3534>A) με αποτέλεσμα την απαλοιφή του ανωδικού (upstream) εξωνίου κατά την μεταγραφή, αλλοίωση της αλληλουχίας των αμινοξέων στην πρωτεΐνη και πιθανή παραγωγή ενός ανενεργού ενζύμου με απαλοιφή 29 αμινοξέων. Η μετάλλαξη αυτή είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο μεταβολισμό της καφεΐνης και αυξημένη συγκέντρωση της κλοζαπίνης στο πλάσμα. Η μετάλλαξη αυτή, όμως, ταυτοποιήθηκε σε μία μόνον γυναίκα Καυκάσιας καταγωγής ενώ δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνευθεί σε κανένα από 100 άλλα άτομα Γαλλικής καταγωγής τα οποία διερευνήθηκαν για την συγκεκριμένη αντικατάσταση [77].

Παρόλα τα ανωτέρω στοιχεία, τα οποία δεν έχουν δώσει ισχυρές ενδείξεις για γενετική προέλευση της ποικιλομορφίας στην δραστικότητα του CYP1A2, έχει υποστηριχθεί, μέσω της φαινοτυπικής μελέτης του CYP1A2 σε διδύμους, ότι η κληρονομικότητα ευθύνεται για το 72,5% της ποικιλομορφίας του CYP1A2 μεταξύ των ατόμων, ενώ μόνον το 27,5% της διακύμανσης της δραστηριότητάς του οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [78].

Επιδημιολογικά, αυξημένη δραστικότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο στο κόλον, ιδίως στα άτομα εκείνα τα οποία είχαν αυξημένη έκθεση σε ετεροκυκλικές αμίνες μέσω της κατανάλωσης «καλοψημμένου» κρέατος, με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης [11,79], ενώ μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων [80]. Επιπλέον, η δραστικότητα του CYP1A2 έχει εμφανίσει θετική συσχέτιση με την μαστογραφική πυκνότητα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και, κατά συνέπεια, η αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου αυτού έχει προταθεί ως παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού [81].

Αντιανδρογόνα	Αντικαταθλιπτικά	Αναστολείς αντλίας πρωτονίων
Φλουταμίδα (κύρια οδός), [82]	Φλουβοξαμίνη [46]	Ομεπραζόλη [100]
Αντικαταθλιπτικά	Καρδιαγγειακό	Αντιεπιληπτικό
Αμιτριπυλίνη (ελάσσων οδός) [83]	Μεξιλετίνη [50]	Φαινυτοΐνη [101]
Ιμιπραμίνη (30%) [24]	Βεραπαμίλη (ελάσσων οδός) [51]	Αντιφυματικό
Μιανσερίνη [84]	Προπραφανόνη [97]	Ριφαμπικίνη [102]
Χλομιπραμίνη [85]	Αντιασθματικό	
Αντιψυχωσικά	Φουραφυλλίνη [48]	
Κλοζαπίνη (22-30%) [26]	Αντιψωριασικό	
Ολανζαπίνη (50%) [86]	5-μεθοξυψωραλένιο [52]	
Οντανσετρόνη (ελάσσων οδός) [87]	Αντιμικροβιακό	
Φάρμακα για το καρδιαγγειακό και αντιπηκτικά	Κινολόνες [53]	
Λιδοκαΐνη (80%.) [88, 89]	Ανταγωνιστές H₂ υποδοχέων ισταμίνης	
Προπρανολόλη (σημαντική οδός,) [90, 91]	Σιμετιδίνη [49]	
Τριαμετέρη (σχεδόν 100%) [92]	Αντιμηκυτιασικά	
Βαρφαρίνη (ελάσσων οδός) [93]	Κετοκοναζόλη (11%), Τερβιναφίνη (21%) [98]	
Αναστολείς χολινεστεράσης	Μικοναζόλη [99]	
Τακρίνη (>90%) [23]	Αντισυλληπτικά [57]	
Τοπικά αναισθητικά	Θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων [58]	
Ροπιβακαΐνη (39%) [94]		
Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα		
Παρακεταμόλη (ελάσσων οδός) [95]		
Φαινακετίνη (μείζων οδός) [16, 27]		
Αντιπυρίνη (30%) [25, 96]		
Διεγερτικό Κ.Ν.Σ.		
Καφεΐνη (90%) [21]		
Αντιασθματικά		
Θεοφυλλίνη (75%) [21]		

Πίνακας 1. Φάρμακα τα οποία μεταβολίζονται από το CYP1A2, αναστολείς και επαγωγείς.

Πίνακας 2. Μη φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι αναφέρεται ότι επιδρούν στη

μεταβολική δραστικότητα του κυτοχρώματος P4501A2 (CYP1A2) στους ανθρώπους (Από Carrillo and Benitez, 2000, με προσαρμογή).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ CYP1A2
Δείκτης σωματικής μάζας	
Λεπτά άτομα	↑
Παχύσαρκα άτομα	↓
Καφές	↑
Σταυρανθή λαχανικά	↑
Άσκηση	↔
Αλκοόλ (αιθανόλη)	↓
Χυμός γκρέϊπ-φρούτ	↓
Κρέας ψημένο στη σχάρα	↑
Ηπατική νόσος	↓
Φύλο (?)	
Άνδρες	↑
Γυναίκες	↓
Παράγοντες ειδικοί του φύλου	
Εμμηνορρυσιακός κύκλος?	(ωχρινική φάση) ↓
Εγκυμοσύνη	↓
Εμμηνόπαυση (?)	↔
Κάπνισμα	↑

? = όχι πλήρως εξακριβωμένη επίδραση, ↑ = αύξηση δραστικότητας, ↓ = μείωση της δραστικότητας, ↔ = καμμία επίδραση

1.1.2. Γενικές πληροφορίες για το κυτόχρωμα P4502A6

Το κυτόχρωμα P4502A6 (CYP2A6) είναι ένα ένζυμο της οικογενείας του γονιδίου CYP2, η οποία είναι η μεγαλύτερη οικογένεια P450 στα θηλαστικά [4]. Εκφράζεται, κυρίως, στο ήπαρ σε ποσοστό 1-10% περίπου επί του συνολικού P450 και είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό πολλών φαρμάκων και χημικών ουσιών του περιβάλλοντος [2, 103]. Είναι, πρωτίστως, υπεύθυνο για τη μετατροπή της νικοτίνης σε κοτινίνη [104] και για τον μεταβολισμό του υπνωτικού και αντισπασμωδικού φαρμάκου χλωρμεθειαζόλη και του ανταγωνιστή του υποδοχέα του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων SM-12502. Συμβάλλει επίσης στο μεταβολισμό του μεθοξυφλουρανίου, του αλοθανίου, του βαλπροϊκού οξέος και της δισουλφιράμης [105]. Καταλύει την μεταβολική ενεργοποίηση διαφόρων προμεταλλαξιογόνων και προκαρκινογόνων όπως η αφλατοξίνη B1 και το 1,3-βουταδιένιο [105], η 3-μεθυλινδόλη [106] και ορισμένων νιτροζαμινών του καπνού και των τροφών όπως η N-νιτροζο-διαιθυλαμίνη και η 4-(μεθυλνιτροζάμινο)-1-(3-πυριδύλ)-1-βουτανόνη [105, 107, 108]. Η δραστηριότητά του επάγεται από διάφορους αντιεπιληπτικούς παράγοντες όπως η φαινυτοΐνη, η καρβαμαζεπίνη και η φαινοβαρβιτάλη [109], ενώ το κάπνισμα φαίνεται να αναστέλλει το μεταβολισμό της νικοτίνης και της κουμαρίνης οι οποίες μεταβολίζονται κυρίως από το CYP2A6 [103, 110]. Αναφέρονται επίσης και διάφοροι άλλοι *in vitro* και *in vivo* αναστολείς του CYP2A6 όπως το 8-μεθοξυψωραλένιο (αντιψωριασικό), η πιλοκαρπίνη (αγωνιστής μουσκαρινικών υποδοχέων), η τρανυλκυπρομίνη (αναστολέας της Μονοαμινο-Οξειδάσης, αντικαταθλιπτικό) και η κετοκοναζόλη (αντιμυκητιασικό), για την πρώτη περίπτωση, και το 8-μεθοξυψωραλένιο και τα φλαβονοειδή τα οποία περιέχονται στο χυμό του γκρέιπφρουτ, για την δεύτερη [103].

Η επαγωγή του CYP2A6 διαμεσολαβείται από τον πυρηνικό υποδοχέα PXR (Pregnane X receptor) ο οποίος, μετά την πρόσδεση του επαγωγικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα, μετακινείται στον πυρήνα. Το σύμπλεγμα αυτό προσδένεται σε πυρηνικούς υποδοχείς RXR (Retinoid X receptor) σχηματίζοντας ετεροδιμερή τα οποία επιστρατεύουν ενεργοποιητές, προσδένονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου (PXRRE) και πυροδοτούν τον μεταγραφικό μηχανισμό [111].

Αυξημένη έκφραση του CYP2A6 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε πληθυσμούς με συχνή έκθεση σε αφλατοξίνη [112] και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ορθού [113] ενώ υψηλά επίπεδα του CYP2A6 έχουν βρεθεί σε ηπατοκύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας B [114].

Το γονίδιο του CYP2A6 στον άνθρωπο εντοπίζεται στο επίμηκες σκέλος του

χρωμοσώματος 19, περιέχει 9 εξώνια, καλύπτει μία περιοχή 6.000 ζευγών βάσεων και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 494 αμινοξέων [105, 115, 116]. Έχουν βρεθεί διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού οι οποίοι δίνουν υπόσταση σε 7 αλληλόμορφα, με σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυλών στον γονότυπο. Τα αλληλόμορφο CYP2A6*4 έχει ελαττωματική λειτουργία και ευθύνεται για την αυξημένη συχνότητα (15-20%) των πτωχών μεταβολιστών μεταξύ των Ασιατών. Το αλληλόμορφο αυτό, όμως, απαντάται με συχνότητα 1% στους Καυκάσιους. Το αλληλόμορφο CYP2A6*2 κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που περιέχει την αντικατάσταση μίας λευκίνης από μία ιστιδίνη στη θέση 160 και το οποίο είναι ανενεργό καθώς δεν μπορεί να ενσωματώσει τον δακτύλιο της αίμης. Η συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού είναι 1-3% στους Καυκάσιους [105].

Παρόλη την μικρή αυτή συχνότητα μεταλλαγμένων αλληλίων, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλότητα στο φαινότυπο του CYP2A6 σε Καυκάσιους πληθυσμούς, όπως αυτός έχει προσδιοριστεί με τη μέτρηση των μεταβολιτών της κουμαρίνης, ενός φαρμάκου-δείκτη ειδικού για το CYP2A6, στα ούρα [103]. Η ποικιλότητα αυτή δεν ανταποκρίνεται επαρκώς στους πολυμορφισμούς του γονιδίου που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα με συνέπεια η μέτρηση του φαινοτύπου να παραμένει σημαντικός παράγων για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 [113, 117].

1.1.3. Γενικές πληροφορίες για την οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι ένα διαλυτό κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό των πουρινών καθώς καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης προς ξανθίνη και της ξανθίνης προς ουρικό οξύ [1, 118]. Εκτός από τις ανωτέρω αντιδράσεις, η XO συμμετέχει και στον μεταβολισμό φαρμάκων όπως η μερκαπτοπουρίνη, η αζαθειοπρίνη και οι μεθυλοξανθίνες [66, 119].

Στα θηλαστικά, η XO συνυπάρχει με την δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) και μαζί αποτελούν τις δύο αλληλομετατρέπομενες μορφές της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης (XOR). Το γονίδιο της XDH στον άνθρωπο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 2, αποτελείται από 36 εξώνια και 35 ιντρόνια και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 1.333 αμινοξέα. Η XDH μπορεί μετα-μεταφραστικά, με οξείδωση ή πρωτεόλυση, να μετατραπεί, αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά αντίστοιχα, προς XO [120, 121]. Η XDH ανάγει, κατά προτίμηση, το NAD⁺ ενώ η XO δεν μπορεί να το αναγάγει προτιμώντας το μοριακό οξυγόνο [118]. Είναι φλαβοπρωτεΐνη με

μολυβδένιο και σίδηρο στο ενεργό της κέντρο [1] και μέγιστη δραστικότητα στο ήπαρ και στο έντερο, ενώ αφθονεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο [122, 123]. Στο ανθρώπινο ήπαρ είναι παρούσα τόσο στα περιπυλαία και περικεντρικά κύτταρα όσο και στα κολλοειδή κύτταρα [121]. Η δραστικότητά της έχει εύρος 2-4 φορές στους ενήλικες χωρίς να είναι πολυμορφικό ένζυμο, γεγονός που ερμηνεύεται από τη συμμετοχή της XO σε αντιδράσεις καταβολισμού βασικών, για τον οργανισμό, ενδογενών ενώσεων [119, 124]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί άτομα με ιδιαίτερα χαμηλή ενεργότητα της XO σε πληθυσμούς από την Αιθιοπία (4%) [125], την Ιαπωνία (11%) [126], την Ισπανία (4%) [127], όπως και σε μικτό πληθυσμό (2%), [128], ενώ πλήρης έλλειψη ενεργότητας εμφανίζεται στη σπάνια κληρονομική νόσο ξανθινουρία [119]. Η XO είναι πηγή ελευθέρων ριζών και η δραστηριότητά της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης των ιστών (ischemia-reperfusion injury), σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα και τα καρδιαγγειακά νοσήματα οι οποίες παρουσιάζονται πιο συχνά σε ηλικιωμένους [129-131]. Σύμφωνα με έναν προτεινόμενο μηχανισμό, κατά την ιστική ισχαιμία η XDH μετατρέπεται σε XO ενώ, ταυτόχρονα, συσσωρεύεται υποξανθίνη εξαιτίας του καταβολισμού του ATP. Κατά την επαναιμάτωση αντιδρούν η XO και η υποξανθίνη με συνεπακόλουθο τον σχηματισμό των κυταροτοξικών υπεροξειδίου του υδρογόνου, ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ριζών υδροξυλίου [118]. Παρόμοιος μηχανισμός είναι πιθανόν να ενεργοποιείται κατά τις μολύνσεις και άλλες φλεγμονώδεις βλάβες [132]. Η δραστηριότητα της XO αναστέλλεται από την αλλοπουρινόλη [133] και επάγεται από την ιντερφερόνη-γ [134], τον TNF-α, την ιντερλευκίνη-1β [118], ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την κατανάλωση αλκοόλ [119]. Αναφέρεται, επίσης, ότι η XO καταλύει, κάτω από αναερόβιες συνθήκες, την μετατροπή των οργανικών νιτρικών του τύπου R-O-NO₂, όπως η τρινιτρογλυκερίνη και ο δινιτρικός ισοσορβίτης, σε μονοξειδίο του αζώτου. Οι ενώσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την θεραπεία της ισχαιμίας του μυοκαρδίου και η αποτελεσματικότητά τους αποδίδεται στη μετατροπή τους σε NO [118, 135].

1.1.4. Γενικές πληροφορίες για την N-ακετυλοτρανσφεράση-2

Η N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο απαντάται στο ήπαρ και στην βλεννογόνο της νήστιδας και διακρίνεται από την NAT-1 η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η πρωτεϊνική αλληλουχία των δύο αυτών ενζύμων είναι ταυτόσημη κατά 81% [136], τα γονίδιά τους, στον άνθρωπο,

εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 8 και έχουν μία κωδικοποιούσα περιοχή 870 ζευγών βάσεων χωρίς ιντρόνια [137]. Μετέχουν, και τα δύο, στις αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (σύζευξη) και καταλύουν την μεταφορά μιας ακετυλομάδας, προερχομένης από το ακετυλοσυνένζυμο-A, σε ένα άτομο αζώτου σε υποστρώματα όπως οι αρυλαμίνες και οι ετεροκυκλικές αμίνες και σε ένα άτομο οξυγόνου σε υποστρώματα όπως οι αρυλυδροξυλαμίνες [138]. Πιστεύεται ότι η N-ακετυλίωση αδρανοποιεί τις ενώσεις, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση, ενώ η O-ακετυλίωση τις ενεργοποιεί προς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να επιδράσουν στο DNA και να πυροδοτήσουν την καρκινογένεση [138, 139]. Η NAT-2 ακετυλιώνει περισσότερα από 25 φάρμακα μερικά εκ των οποίων είναι η ισονιαζίδη (αντιφυματικό), η υδραλαζίνη (αντιϋπερτασικό), η προκαϊναμίδη (αντιαρρυθμικό), η δαψόνη (αντιλεπρικό), οι σουλφοναμίδες (αντιμικροβιακό), η κλοναζεπάμη (αντιεπιληπτικό), η διπυρόνη (αντιφλεγμονώδες) και η καφεΐνη [139, 140]. Γενικώς, η NAT-2 θεωρείται ως ένα ένζυμο μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, ενώ η NAT-1 φαίνεται να παίζει ρόλο και στο μεταβολισμό ενδογενών ενώσεων όπως είναι το φολικό οξύ [137].

Η NAT-2 είναι πολυμορφικό ένζυμο και παρουσιάζει φυλετική ποικιλομορφία [141-143] η οποία οφείλεται περισσότερο σε γενετικούς και λιγότερο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [40]. Έχουν ταυτοποιηθεί 29 αλληλόμορφα της NAT-2 τα οποία προκύπτουν από το συνδυασμό 1-7 σημειακών μεταλλάξεων στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου [138, 144]. Οι γενετικοί αυτοί πολυμορφισμοί αντανακλώνται σε μία τρικόρυφη φαινοτυπική πληθυσμιακή κατανομή των ατόμων τα οποία, κατ' αυτόν τον τρόπο, χαρακτηρίζονται ως ταχείς, ενδιάμεσοι και βραδείς ακετυλιωτές [145, 146]. Η κλινική σημασία του πολυμορφισμού της ακετυλίωσης έχει διερευνηθεί επαρκώς. Η χορήγηση φαρμάκων των οποίων η κάθαρση εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την ακετυλίωση μπορεί να προκαλέσει, σε βραδείς ακετυλιωτές, ανεπιθύμητες ενέργειες όπως υπόταση στην περίπτωση της υδραλαζίνης, περιφερική νευροπάθεια και ηπατοτοξικότητα στην περίπτωση της ισονιαζίδης, και συστηματικό ερυθματώδη λύκο στις περιπτώσεις της ισονιαζίδης, της προκαϊναμίδης και της υδραλαζίνης. Στους ασθενείς με φυματίωση-ταχείς ακετυλιωτές-εξάλλου, στους οποίους χορηγούνταν περιοδικά (1 φορά την εβδομάδα) ισονιαζίδη, το ποσοστό υποτροπής της φυματίωσης ήταν πολύ μεγαλύτερο απ' ό,τι στους βραδείς [139, 147].

Επιδημιολογικά, ο φαινότυπος και ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή απαντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης,

ειδικά στους καπνιστές και σ' αυτούς που εκτίθενται επαγγελματικά σε καρκινογενείς αρωματικές αμίνες [139, 148-151]. Ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή, επίσης, παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη αδενώματος του παχέος εντέρου, έναν πρόδρομο του καρκίνου του παχέος εντέρου, στους καπνιστές [152]. Τέλος, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα βραδέων ακετυλιωτών μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ οι καπνιστές που είχαν τον βραδό φαινότυπο παρουσίασαν, σχεδόν 11 φορές, υψηλότερο σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου από τους μη καπνιστές [139]. Ο ταχύς φαινότυπος απαντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και ειδικότερα σ' αυτούς που καταναλώνουν κρέας παρασκευασμένο σε υψηλές θερμοκρασίες, πιθανώς λόγω της υψηλότερης έκθεσης σε καρκινογόνα ετεροκυκλικών αμινών [139, 153]. Ο γονότυπος, εξάλλου, του ταχέος ακετυλιωτή συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου σ' αυτούς που καταναλώνουν συχνά κόκκινο κρέας [154].

1.2. Δυναμικές δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργίας

Οι συνήθεις λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος, ειδικά αυτές που αφορούν διάφορα ένζυμα στον ορό του αίματος, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την φλεγμονή και την χολόσταση αλλά δεν είναι ειδικοί δείκτες ηπατικής δυσλειτουργίας. Τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν τις αμινοτρανσφεράσες του ασπαραγινικού (AST) και της αλανίνης (ALT), την αλκαλική φωσφατάση (ALP) και την γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (γ-GT). Η αυξημένη δραστηριότητα των αμινοτρανσφερασών αντανάκλα την κυτταρική νέκρωση αλλά, ενώ η κυριώτερη παραγωγή της ALT εντοπίζεται στο ήπαρ με μικρή συμμετοχή των σκελετικών μυών, των νεφρών και της καρδιάς, η AST είναι ευρύτατα διαδεδομένη στον οργανισμό και παράγεται στην καρδιά, στους μύες, στα νεφρά και στα ερυθρά αιμοσφαίρια και, κατά συνέπεια, είναι δυνατόν να αυξάνει και σε άλλες παθήσεις, πλὴν των ηπατικών. Κατά την οξεία και χρόνια ηπατίτιδα, συμπεριλαμβανομένης και της αλκοολικής, παρατηρούνται αυξήσεις στις τιμές των AST και ALT κατά 3-10 φορές πέραν των τιμών αναφοράς, ενώ μικρότερη αύξηση παρατηρείται κατά την λιπώδη διήθηση και κατά την ιογενή ηπατίτιδα C.

Η ALP αποτελείται από μία οικογένεια ισοενζύμων που βρίσκονται στα οστά, στο ήπαρ, στο έντερο και στον πλακούντα και τα φυσιολογικά της επίπεδα στους ενήλικες προέρχονται, κυρίως, από το ήπαρ και τα οστά. Τα επίπεδα της ALP αυξάνονται σε χολοστατικά σύνδρομα, ενώ άλλα αίτια αύξησης είναι οι ασθένειες των

οστών με οστεοβλαστική δραστηριότητα, η εγκυμοσύνη και η ύπαρξη κακοήθων όγκων.

Η γ-GT απαντάται στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στον σπλήνα, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στην σπερματοδόχο κύστη. Εντοπίζεται σε όλο το χοληφόρο δένδρο του ήπατος και, εκτός των νοσημάτων του ήπατος και των χοληφόρων, οι τιμές της είναι αυξημένες σε παθήσεις του παγκρέατος και, σπανιότερα, σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε νεφρική ανεπάρκεια, σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και στον σακχαρώδη διαβήτη. Σε νοσήματα του ήπατος οι τιμές της αυξάνονται παράλληλα με αυτές της ALP παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ευαισθησία με χαμηλή, όμως, ειδικότητα καθώς εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς και, πολλές φορές, ο προσδιορισμός της χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό νοσημάτων των οστών σε ασθενείς με αυξημένη ALP [155, 156].

Μία άλλη δοκιμασία της ηπατικής λειτουργίας αποτελεί και η μέτρηση της χολερυθρίνης του πλάσματος. Η μη συζευγμένη με γλυκουρονικό χολερυθρίνη (έμμεση) αποτελεί δείκτη της μεταβολικής ικανότητας του ήπατος (σύζευξη), ενώ η συζευγμένη (άμεση) αποτελεί δείκτη της ικανότητας απέκκρισης από τα χοληφόρα τριχοειδή. Η μέτρηση, όμως, της χολερυθρίνης στο πλάσμα παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία στην διάγνωση της ηπατικής νόσου καθώς η ημερήσια παραγωγή της χολερυθρίνης από την αποδόμηση της αίμης της αιμοσφαιρίνης, της μυοσφαιρίνης και των κυτοχρωμάτων είναι 300mg, περίπου, ενώ το υγιές ήπαρ έχει την δυνατότητα να μεταβολίζει και να εκκρίνει την δεκαπλάσια ποσότητα. Τιμές έμμεσης χολερυθρίνης υψηλότερες των 5 mg/dL, κατά κανόνα, δεν οφείλονται σε αιμόλυση αλλά σε ηπατική νόσο ενώ τιμές ολικής χολερυθρίνης υψηλότερες των 10 mg/dL αποτελούν απόλυτη ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος [156, 157].

Ο μεταβολισμός της χολερυθρίνης αποτελεί μία από τις βασικές ηπατικές λειτουργίες οι οποίες, συνοπτικά, περιλαμβάνουν την πρόσληψη των διαφόρων ουσιών από το αίμα, τον μεταβολισμό τους μέσα στο ήπαρ, την απέκκριση των μεταβολιτών και την πρωτεϊνική σύνθεση. Αυτή η τελευταία είναι δυνατόν να εκτιμηθεί, εν μέρει, από την αλβουμίνη του ορού και από την μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης των οποίων οι τιμές, όμως, παρουσιάζονται αλλοιωμένες σε προχωρημένες, μόνον, κλινικές καταστάσεις της ηπατικής νόσου όπως, για παράδειγμα, τιμές αλβουμίνης χαμηλότερες των 3 mg/dL υποδηλώνουν σοβαρού βαθμού ηπατική βλάβη. Πέραν τούτου, η υποαλβουμιναιμία δεν ειδικό εύρημα της ηπατοπάθειας και μπορεί να εμφανιστεί σε υποσιτισμό, χρόνια αλκοολισμό χωρίς

ηπατική νόσο, γαστρεντεροπάθεια με απώλεια λευκώματος, χρόνιες λοιμώξεις και νεφρωσικό σύνδρομο. Όσον αφορά τον χρόνο προθρομβίνης, αυτός εκτιμά το επίπεδο σύνθεσης διαφόρων παραγόντων της πήξης από το ήπαρ των οποίων, όμως, η ελάττωση ή η έλλειψή τους αντανακλά προχωρημέμη επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας καθώς η σύνθεσή τους από το ήπαρ γίνεται σε περίσσεια [156-158].

Οι ανωτέρω δοκιμασίες, πέραν της μειωμένης εξειδίκευσης και ευαισθησίας, δεν μπορούν να δώσουν κάποια ένδειξη για την ηπατική μεταβολική λειτουργία και, κατά συνέπεια, δεν έχουν την δυνατότητα να παράσχουν μία ικανοποιητική ποσοτική εκτίμηση του λειτουργικού ηπατικού αποθέματος παρά μόνον να προσδιορίσουν την παρουσία ή απουσία της ηπατικής νόσου και της χολόστασης. Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί διάφορες δυναμικές δοκιμασίες οι οποίες δίνουν μία ένδειξη για την λειτουργικότητα της ηπατοκυτταρικής μάζας αλλά δεν χρησιμοποιούνται ευρέως είτε εξαιτίας των τεχνικών δυσκολιών που παρουσιάζουν, είτε λόγω ανεπιθυμητών ενεργειών, είτε λόγω αυξημένου κόστους, είτε, εν τέλει, διότι δεν προσφέρουν κάποιο διαγνωστικό πλεονέκτημα έναντι των συνήθων, πιο προσιτών, εργαστηριακών δοκιμασιών [157, 159, 160]. Οι δοκιμασίες αυτές μπορούν να θεωρηθούν ανάλογες με την μέτρηση της κάθαρσης της κρεατινίνης για την νεφρική λειτουργία χρησιμοποιούν, δηλαδή, ουσίες-ιχνηθέτες που απεκκρίνονται ή μεταβολίζονται από το ήπαρ και καταμετρούν τον ρυθμό της απομάκρυνσής τους από το αίμα ή τον ρυθμό σχηματισμού ενός μεταβολίτη. Στην ίδια προοπτική έχει προταθεί ότι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφόρων μεταβολιτών του ιδίου φαρμάκου-δείκτη θα παρείχε το πλεονέκτημα της εκτίμησης της λειτουργίας διαφορετικών μεταβολικών οδών σε αντίθεση με την συνήθη πρακτική της παρακολούθησης του μητρικού φαρμάκου ή ενός μόνον μεταβολίτη [161]. Τέτοιες ποσοτικές δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργικότητας είναι:

α) η δοκιμασία κάθαρσης της γαλακτόζης [162] ή η δοκιμασία αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{13}C -γαλακτόζης [163] οι οποίες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροπλασματικής μεταβολικής ικανότητας του ήπατος καθώς η γαλακτόζη μεταβολίζεται από την γαλακτοκινάση, ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο

β) η δοκιμασία απέκκρισης του πράσινου της ινδοκυανίνης (ICG), μιάς ουσίας που απορροφάται αποκλειστικά από το ήπαρ και αμέσως αποβάλλεται αμετάβλητη στην χολή δίνοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, μία εκτίμηση της αιμάτωσης του ήπατος (liver perfusion) και της ικανότητας χολικής απέκκρισης [158, 164]. Η αιματική ροή, όπως προσδιορίζεται με την κάθαρση της ICG, παρουσιάζει μεγάλη συσχέτιση με την

απευθείας μέτρηση της ροής με την χρήση ηλεκτρομαγνητικών ροομέτρων [165]. Η κάθαρση της ICG είναι σημαντικά μειωμένη σ' όλες τις μορφές της χρόνιας ηπατικής νόσου και η αποβολή της είναι ιδιαίτερα μειωμένη στην αλκοολική κίρρωση και στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (PBC) σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 35 έως 94%, σε σχέση με τους υγιείς [164]

γ) η δοκιμασία κάθαρσης της σορβιτόλης, η οποία συνίσταται στην επεμβατική μέτρηση της αρτηριοφλεβικής διαφοράς στην συγκέντρωση της χορηγηθείσας σορβιτόλης και θεωρείται μέτρο της αιμάτωσης του ηπατικού παρεγχύματος (liver parenchymal perfusion) [166]

δ) η δοκιμασία της μέτρησης της συγκέντρωσης των χολικών οξέων στο πλάσμα, η οποία εξαρτάται από την ηπατική αιματική ροή καθώς τα χολικά άλατα έχουν υψηλό βαθμό κάθαρσης πρώτης διόδου (first pass elimination, 60-95%) και η οποία συγκέντρωση δείχνει μία πολύ ειδική αύξηση στην ηπατική νόσο [160, 167]

ε) η δοκιμασία κάθαρσης της αντιπυρίνης, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ως δείκτης για τον γενικό ηπατικό οξειδωτικό μεταβολισμό, τον μεσολαβούμενο από το κυτόχρωμα P450. Εξαιτίας της συμμετοχής διαφόρων ισομορφών του P450 στον μεταβολισμό της αντιπυρίνης, το φάρμακο αυτό δεν ενδείκνυται ως δείκτης δραστηριότητας συγκεκριμένων ενζύμων της οικογενείας του P450 [96, 168]

στ) η δοκιμασία αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{14}C -αμινοπυρίνης (διμεθυλαμινο-αντιπυρίνη) [169] ή ^{13}C -αμινοπυρίνης [170], η οποία εκτιμά τη μικροσωματική ενζυμική μεταβολική ικανότητα του ήπατος, μέσω της μέτρησης του εκπνεόμενου $^{14}\text{CO}_2$ ή $^{13}\text{CO}_2$

ζ) η δοκιμασία μέτρησης του μεταβολίτη της λιδοκαΐνης μονοεθυλ-γλυκινόξυλιδίδη (MEGX) στο πλάσμα η οποία εκτιμά την ικανότητα του οξειδωτικού μεταβολισμού του ήπατος αλλά και την ηπατική αιματική ροή [171]

η) η δοκιμασία κάθαρσης της καφεΐνης [172] και η δοκιμασία αναπνοής της ^{13}C -καφεΐνης [173, 174], οι οποίες, όπως και η προηγούμενη δοκιμασία, εκτιμά την δραστηριότητα των μικροσωματικών ενζύμων

Επειδή η τελευταία δοκιμασία χρησιμοποιεί την καφεΐνη ως ουσία-δείκτη, μία ένωση που θεωρείται αβλαβής, έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για την ανάπτυξη απλοποιημένων μεθόδων ελέγχου της ηπατικής λειτουργίας με βάση την ουσία αυτή. Στην συνέχεια εξετάζονται οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της καφεΐνης οι οποίες, εκτός από αβλαβή, την καθιστούν και αξιόπιστο δείκτη της μεταβολικής ικανότητας

του ήπατος.

1.3. Καφεΐνη

1.3.1. Γενικές ιδιότητες-απορρόφηση –κατανομή

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137X) είναι το φάρμακο με την μεγαλύτερη κατανάλωση μεταξύ των ανθρώπων σε τέτοιο βαθμό ώστε η χρήση της, γενικώς, να θεωρείται ασφαλής. Η καφεΐνη είναι δημοφιλής επειδή η δράση της σχετίζεται με την διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος η οποία εκδηλώνεται με καλύτερη διάθεση, καταπολέμηση της υπνηλίας, μείωση της κόπωσης και αύξηση της ικανότητας για εργασία. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, όταν καταναλώνεται σε μακροπρόθεσμη βάση, η καφεΐνη ενοχοποιείται για διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, διαταραχές της αναπαραγωγής, οστεοπόρωση, καρκινογένεση, ψυχιατρικές διαταραχές και προδιάθεση για κατάχρηση φαρμάκων [175].

Η καφεΐνη, όταν χορηγείται από το στόμα, απορροφάται ταχέως και πλήρως από τον γαστρεντερικό σωλήνα και η μέγιστη συγκέντρωση της στο πλάσμα (Cmax) επιτυγχάνεται σε 0,5-2,0 ώρες, περίπου, χωρίς να συμβαίνει σημαντική μετατροπή πρώτης δίοδου [175, 176]. Η καφεΐνη είναι επαρκώς υδρόφοβη ώστε να διέρχεται διαμέσου όλων των βιολογικών μεμβρανών και να κατανέμεται ταχέως στο σώμα. Ο όγκος κατανομής της είναι περίπου 0,7 L/kg και παρουσιάζει μικρή σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, της τάξης του 10-30%. Έτσι, δεν παρατηρείται συσσώρευση της καφεΐνης σε κάποια όργανα και ιστούς και η παρουσία της ανιχνεύεται σε όλα τα σωματικά υγρά. Εισέρχεται στον σίελο, στο σπέρμα, στο μητρικό γάλα και στην χολή [175, 177]. Ο χρόνος ημισείας ζωής της καφεΐνης, για τα περισσότερα ενήλικα άτομα, κυμαίνεται από 3 έως 6 ώρες αλλά είναι σχεδόν δύο φορές μεγαλύτερος σ' εκείνα τα άτομα που δεν καταναλώνουν καφέ σε σχέση με αυτά που καταναλώνουν τακτικά μεγάλες ποσότητες [178]. Τα νεογέννητα αποβάλλουν την καφεΐνη με πολύ αργό ρυθμό παρουσιάζοντας χρόνους ημισείας ζωής με μέσο όρο τις 100 ώρες [175]. Η καφεΐνη μεταβολίζεται στο ήπαρ και τα προϊόντα της διάσπασής της απεκκρίνονται στα ούρα, χωρίς σημαντική συμμετοχή άλλων οργάνων [179].

1.3.2. Μεταβολισμός και αποβολή

Ο μεταβολισμός της καφεΐνης παρουσιάζει μεγάλη περιπλοκότητα εξαιτίας της συμμετοχής ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων και ενδιάμεσων προϊόντων (Εικόνα 1). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 25 μεταβολίτες στον άνθρωπο [180]. *In vivo* [127, 178, 181] και *in vitro* [21] μελέτες έδειξαν ότι η καφεΐνη αποβάλλεται, κυρίως, μέσω N-3 απομεθυλίωσης προς 1,7-διμεθυλοξανθίνη (17X, παραξανθίνη; Εικόνα 1). Όταν λαμβάνονται υπόψη μόνον οι μεταβολικές οδοί της απομεθυλίωσης, τότε η παραπάνω αντίδραση ευθύνεται, κατά προσέγγιση, για το 84% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Η N-1 απομεθυλίωση, με προϊόν την 3,7-διμεθυλοξανθίνη (37X, θεοβρωμίνη) και η N-7 απομεθυλίωση με προϊόν την 1,3-διμεθυλοξανθίνη (13X, θεοφυλλίνη), ευθύνονται, κατά προσέγγιση, για το 11-12% και 4-5% αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίωσεων της καφεΐνης [21, 181].

Η ηπατική N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται, ειδικά, από το CYP1A2 [16, 20, 21]. Επιπρόσθετα, το CYP1A2 συμμετέχει τόσο στις N-1 όσο και N-7 απομεθυλίωσεις. Κατ' αυτόν τον τρόπο, το CYP1A2 ευθύνεται για περισσότερο από το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης. Ένα μικρό ποσοστό των N-1 και N-7 απομεθυλίωσεων δεν μπορεί να αποδοθεί στην δραστηριότητα του CYP1A2 και αποδίδεται στην καταλυτική δράση του CYP2E1, του κυτοχρώματος που επάγεται από την αιθανόλη [21].

Κάθε μία από τις τρεις διμεθυλοξανθίνες (17X, 13X, 37X) μπορεί να απομεθυλωθεί περαιτέρω προς μονομεθυλοξανθίνες (1-μεθυλοξανθίνη ή 1X, 7-μεθυλοξανθίνη ή 7X, 3-μεθυλοξανθίνη ή 3X) [21, 182, 183]. Η 17X, ειδικότερα, υδροξυλιώνεται προς 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (17U) από το CYP2A6 και από το CYP1A2 [21] και απομεθυλιώνεται προς 1-μεθυλοξανθίνη (1X) από το CYP1A2. Έτσι, η 17X είναι τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα για το ένζυμο. Η περαιτέρω διάσπαση της 1X περιλαμβάνει την 8-υδροξυλίωσή της προς 1-μεθυλουρικό οξύ (1U) από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) με την συμμετοχή του CYP1A2 [133] (Εικόνα 1).

Η 1X, θεωρητικά, μπορεί να προέλθει από την 17X και την 13X. Πρακτικώς, όμως, τόσο η 1X όσο και το 1U προέρχονται, σχεδόν εξ ολοκλήρου, από την 17X. Οι δύο θεωρητικές πηγές της 7X είναι η 17X και η 37X αλλά στην πραγματικότητα η κύρια πηγή της είναι η 37X. Αντίθετα, η 3X έχει διπλή προέλευση χωρίς διάκριση μεταξύ 37X και 13X [57].

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι το CYP1A2 είναι σε θέση να καταλύει πρακτικώς όλες τις οξειδωτικές αντιδράσεις της καφεΐνης και των

μεταβολιτών της [21] παρόλο που αυτό συμβαίνει, σχεδόν πάντα, σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα (εκτός από την N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης και την N-7 απομεθυλίωση της 17X). Δύο απ' αυτά μπορεί να έχουν συνέπειες στους ενζυμικούς ελέγχους που γίνονται με τη χρήση της καφεΐνης:

1) η 8-υδροξυλίωση της 1X προς 1U καταλύεται, κυρίως, από την XO με την συμμετοχή του CYP1A2 [133].

2) το CYP2A6 είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U με σημαντική συμμετοχή του CYP1A2 η οποία επηρεάζει την ερμηνεία των δεδομένων που χρησιμοποιούν το 17U ως μεταβολικό δείκτη [21]. Επιπλέον, *in vitro* μελέτη με την χρήση ανθρώπινου ηπατικού ιστού, έδειξε ότι υπάρχει το ενδεχόμενο για μερική συμμετοχή της XO στο σχηματισμό της 17U από την 17X [133].

1.3.2.1. Σχηματισμός ουρακίλης: η αντίδραση ακετυλίωσης

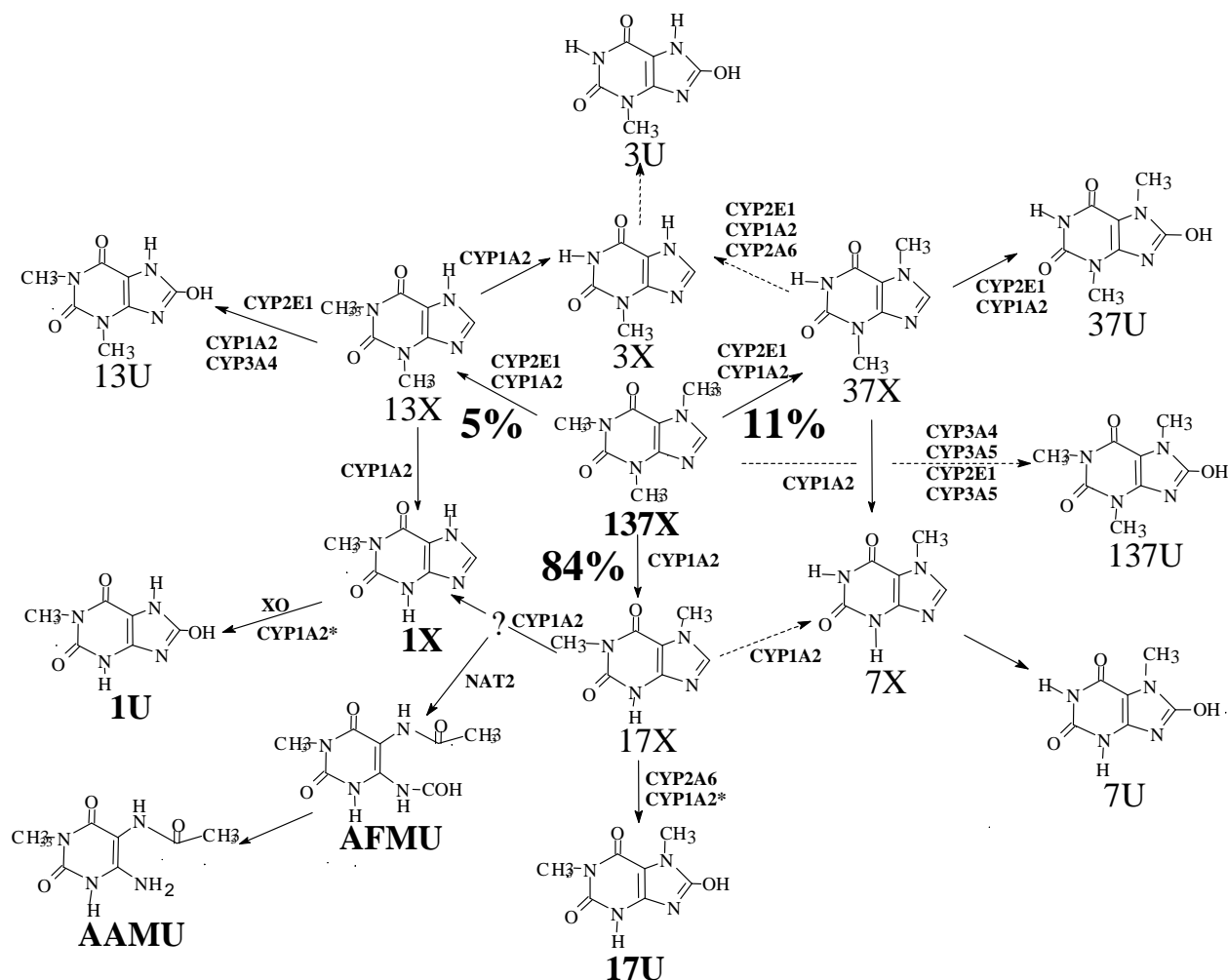
Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα προϊόντα μεταβολισμού της καφεΐνης με ανοιχτό δακτύλιο αλλά μόνον η 5-ακετυλάμινο-6-φορμυλάμινο-3-μεθλουρακίλη (AFMU), η οποία προέρχεται από την οδό της 17X, είναι ποσοτικώς σημαντική στα ούρα μετά από πρόσληψη καφεΐνης [183, 184] (Εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα, η 7-απομεθυλίωση της 17X συνεχίζεται μέσω του σχηματισμού ενός ασταθούς ενδιάμεσου με ανοιχτό δακτύλιο το οποίο είτε σταθεροποιείται, με ακετυλίωση, ως AFMU, είτε σταθεροποιείται με εσωτερική επαναδιάταξη που οδηγεί προς 1X. Ο σχηματισμός, όμως, του AFMU δεν έχει δειχθεί σε κανένα *in vitro* σύστημα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η ακετυλίωση αυτή συμβαίνει από το πολυμορφικό ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2) Το AFMU μπορεί αυθόρμητα να αποβάλει την φορμυλο-ομάδα και να δώσει 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθλουρακίλη (AAMU). Η μετατροπή είναι, γενικώς, βραδεία αλλά επιταχύνεται με αύξηση του pH. Κλινικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι αυτή η μετατροπή συμβαίνει σε σημαντικό βαθμό μέσα στην ουροδόχο κύστη σε μερικά, κατ' εξαίρεση, άτομα αλλά δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτό συμβαίνει εξαιτίας του υψηλού pH των ούρων ή εξαιτίας διαφόρων συστατικών των ούρων που ενισχύουν την δράση του pH [57].

1.3.2.2. Απέκκριση στα ούρα

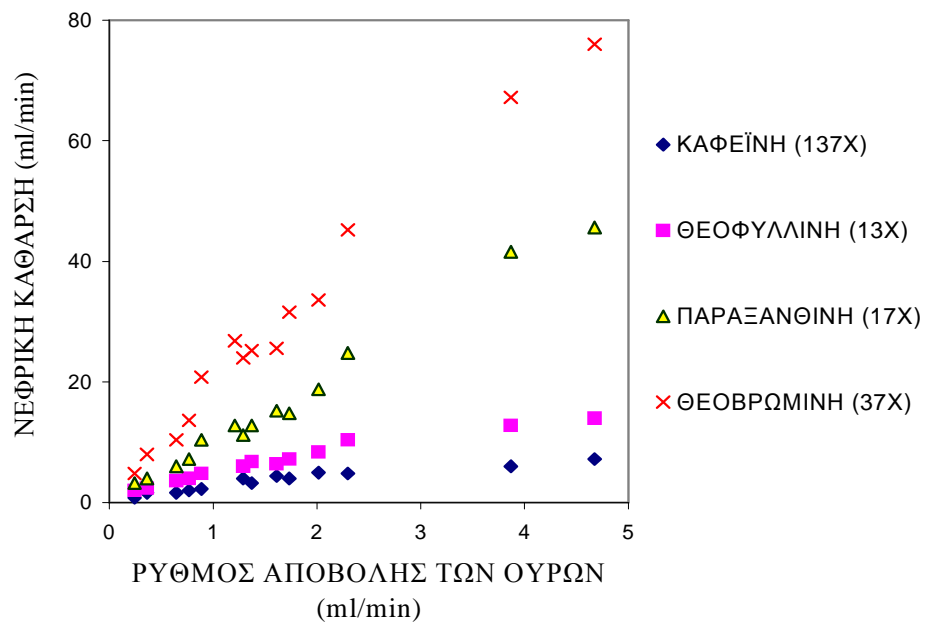
Οι κυριότεροι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα είναι το 1U, η AFMU, η 1X, το 17U και η 17X. Μόνον ένα μικρό ποσοστό (1-2%) της χορηγούμενης δόσης

στον άνθρωπο απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα εξαιτίας υψηλής νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης [127, 185-187].

Νεφρικοί παράγοντες, όπως ο ρυθμός αποβολής των ούρων (urine flow rate), παράλληλα με την μεταβολική ποικιλότητα, παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της τύχης της καφεΐνης και κάποιων από τους μεταβολίτες της, *in vivo*. Εξάρτηση από τη ροή των ούρων σημαίνει ότι η ποσότητα των υγρών που λαμβάνονται από ένα άτομο μπορεί να επηρεάσει την νεφρική απέκκριση των μεθυλοξανθινών [57]. Συγκεκριμένα, η νεφρική κάθαρση της καφεΐνης αυξάνεται κατά 3,4 φορές όταν ο ρυθμός ροής των ούρων αυξάνεται από 0,6 σε 3,2 ml/min [57]. Για τον λόγο αυτό, η *συγκέντρωση της καφεΐνης στα ούρα* είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε *διαφοροποιήσεις του χρόνου συλλογής του δείγματος* των ούρων. Η νεφρική απέκκριση των 17X, 13X και 37X εξαρτάται, επίσης, από τον ρυθμό αποβολής των ούρων και η νεφρική τους κάθαρση είναι υψηλότερη απ' αυτή της καφεΐνης [188] (Εικόνα 2). Γενικώς, όμως, η νεφρική τους απέκκριση είναι χαμηλή και η συγκέντρωση της 17X στο πλάσμα αυξάνει μετά την κατανάλωση καφεΐνης [124, 186]. Αντίθετα, οι μονομεθυλοξανθίνες, τα ουρικά οξέα και η AFMU έχουν μεγάλο βαθμό νεφρικής απέκκρισης και δύσκολα μπορούν να μετρηθούν στο πλάσμα, εξαιτίας των χαμηλών τους συγκεντρώσεων αλλά μπορούν, εύκολα, να μετρηθούν στα ούρα. Οι μεταβολίτες αυτοί, εξαιτίας της πολικότητάς τους, μόλις σχηματίζονται αποβάλλονται αμέσως στα ούρα χωρίς επαναρρόφηση από τα νεφρά, και για τον λόγο αυτό είναι πολύ καλοί δείκτες των μεταβολικών διαδικασιών [56, 57].



Εικόνα 1. Μεταβολικές οδοί της καφεΐνης στο ανθρώπινο ήπαρ. Τα συμπαγή βέλη υποδηλώνουν τις κύριες μεταβολικές οδούς και τα στικτά βέλη επισημαίνουν ήσσονος σημασίας μεταβολικές οδούς που δεν συμβάλλουν στον προσδιορισμό κανενός μεταβολικού λόγου που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2. Τα σύμβολα πάνω στα βέλη υποδεικνύουν τα διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν. Ο αστερίσκος υποδηλώνει μικρή συμμετοχή του συγκεκριμένου ενζύμου στην μεταβολική οδό.



Εικόνα 2. Συσχέτιση ανάμεσα στον ρυθμό αποβολής των ούρων (urine flow rate), τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και των τριών διμεθυλοξανθινών σε ένα άτομο μετά από μεμονωμένη δόση καφεΐνης (Από Tang-Liu *et al.*, 1983).

1.4. *In vivo* προσδιορισμός της δραστηριότητας του CYP1A2 με την χρήση της καφεΐνης

Το CYP1A2 απαντάται στο ήπαρ αλλά όχι στα κύτταρα του αίματος. Για τον λόγο αυτό ο προσδιορισμός της ενζυμικής του παρουσίας με την βοήθεια της μεθόδου του Western blot ή ο προσδιορισμός του σχηματισμού του μέσω της μέτρησης του mRNA είναι δυνατός με εξέταση ηπατικού ιστού αλλά όχι με εξέταση αίματος ή άλλου προσβάσιμου ιστού. Επιπλέον, η βιοψία του ήπατος είναι ελάχιστα πρακτική μέθοδος και η *in vitro* μέτρηση της δραστηριότητας του CYP1A2 δεν είναι βέβαιο ότι αντικατοπτρίζει επακριβώς την λειτουργική ικανότητα του ήπατος *in vivo*. Κατά συνέπεια, και με δεδομένο ότι υπάρχει έλλειψη δειγμάτων βιοψίας ήπατος για συγκριτικές μελέτες, **ο ποσοτικός προσδιορισμός της συστηματικής κάθαρσης της καφεΐνης** με μετρήσεις των συγκεντρώσεών της στο πλάσμα, **αποτελεί το βέλτιστο πρότυπο** όταν πρόκειται να αναπτυχθούν απλοποιημένες μέθοδοι **για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2** [57, 189]. Αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι, όπως έχει επισημανθεί και ανωτέρω, οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της καφεΐνης σε συνάρτηση με τον σχεδόν αποκλειστικό μεταβολισμό της από το CYP1A2, την καθιστούν ιδανικό υπόστρωμα για την διερεύνηση της δραστηριότητας του ηπατικού αυτού ενζύμου.

1.4.1. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηρότητας του CYP1A2 με την χρήση καφεΐνης

1.4.1.1. Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης

Συνίσταται στην χορήγηση μίας δόσης καφεΐνης με επισημασμένο άτομο άνθρακα [^{13}C] στην 3-μεθυλική ομάδα του μορίου και στην μέτρηση της δίωρης σωρευτικής εκπνοής ραδιοεπισημασμένου CO_2 [173] ή μεμονωμένης εκπνοής 1 ώρα μετά την από του στόματος χορήγηση [190]. Έρευνες σε αρουραίους έχουν δείξει την εγκυρότητα της δοκιμασίας αναπνοής της καφεΐνης [191]. Ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων της αναπνοής παίζει κρίσιμο ρόλο προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση της μέτρησης από την 3-απομεθυλίωση της 37X και της 13X. Τα άτομα πρέπει να βρίσκονται σε ηρεμία επειδή η σωματική δραστηριότητα επηρεάζει την παραγωγή του CO_2 και μπορεί να αλλοιώσει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Έχει δειχθεί ότι η ραδιοσήμανση με [^{13}C] και [^{14}C] δίνει τα ίδια αποτελέσματα [192]. Επιπλέον, τόσο η σωρευτική όσο και η μεμονωμένη δοκιμασία αναπνοής έδειξαν εξαιρετική συσχέτιση ($r = 0,90$ και $r = 0,85$ αντίστοιχα) με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης, επιβεβαιώνοντας έτσι την εγκυρότητα της μεθόδου [190, 192, 193]. Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης έχει επιδείξει επαρκή αξιοπιστία καθώς έχει εκτιμήσει, ορθώς, υψηλές τιμές του CYP1A2 στους καπνιστές [190-192], στα παιδιά [173], σε άτομα που εκτέθηκαν σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια [174], σε άτομα μετά από πρόσληψη ομεπραζόλης [194] και χαμηλές τιμές του CYP1A2 σε άτομα με χαμηλή πρόσληψη πρωτεϊνών [59], σε ασθενείς με διάφορες μορφές ηπατικής ασθένειας [190, 193], σε γυναίκες που λαμβάνουν από του στόματος αντισυλληπτικά και σε γυναίκες που είναι έγκυες [57]. Μειονέκτημα της δοκιμασίας αυτής είναι η ανάγκη για ραδιοεπισημασμένη καφεΐνη και η ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό για την μέτρηση του ραδιοεπισημασμένου CO_2 στον εκπνεόμενο αέρα.

1.4.1.2. Κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Jost *et al.* και περιλαμβάνει τον υπολογισμό της κάθαρσης της καφεΐνης από την σίελο με δύο μετρήσεις των συγκεντρώσεων της καφεΐνης. Συγκεκριμένα, χορηγείται καφεΐνη το απόγευμα και μετρώνται οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης στην σίελο πριν την κατάκλιση και κατά την πρωινή έγερση με ανοσοενζυμική μέθοδο (EMIT) [195]. Η μέθοδος θεωρείται έγκυρη καθώς οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης στην σίελο συσχετίζονται, σε μεγάλο βαθμό, με αυτές

στο πλάσμα ($r = 0,74$). Περαιτέρω έρευνα έχει δείξει ότι μία μεμονωμένη μέτρηση της συγκέντρωσης της καφεΐνης της δίαιτας στην σίελο, μετά από ολονύκτια αποχή καφεΐνης, παρουσιάζει μεγάλη συσχέτιση με την κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο ($r = -0,94$) και μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης της δραστικότητας του CYP1A2 [196].

1.4.1.3. Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης

Η χρήση των μεταβολικών λόγων για την εκτίμηση της δραστικότητας ενός ηπατικού ενζύμου πηγάζει από την εργασία του Evans το 1962, ο οποίος χρησιμοποίησε το κλάσμα της σουλφαμεθαζίνης των ούρων προς τον ακετυλιωμένο μεταβολίτη της ως δείκτη της δραστικότητας της ακετυλίωσης [139]. Όσον αφορά την διερεύνηση της δραστικότητας του CYP1A2, έχουν προταθεί διάφοροι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης, σε διάφορα βιολογικά υγρά, οι οποίοι παρουσιάζουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

α) Ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στο πλάσμα και την σίελο

Η εγκυρότητα του λόγου στο 17X/137X πλάσμα και στην σίελο, όσον αφορά την εκτίμηση της δραστικότητας του CYP1A2, εξετάστηκε από τους Fuhr and Rost χρησιμοποιώντας την κάθαρση της καφεΐνης ως μέθοδο αναφοράς. Επιπλέον, στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν διάφοροι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα, καθώς και η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης. Οι λόγοι 17X/137X στο πλάσμα και στην σίελο προσδιορίστηκαν, κατά προτίμηση, 5-7 ώρες μετά την χορήγηση της καφεΐνης και βρέθηκε ότι οι λόγοι αυτοί συσχετίζονται, καλύτερα από τις άλλες μεθόδους, με την συστηματική κάθαρση της καφεΐνης με συντελεστές συσχέτισης υψηλότερους από $r = 0,85$. Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της σημαντικής μείωσης του χρόνου, του κόστους και του απαιτούμενου εξοπλισμού για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2. Ο λόγος αυτός υπολογιζόμενος στην σίελο, ως μια μη επεμβατική μέθοδος, είναι κατάλληλος για επιδημιολογικές μελέτες [197].

Παρομοίως, ο λόγος $(13X+17X+37X)/137X$ στο πλάσμα, παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση ($r = 0,905$) με την κάθαρση της καφεΐνης, 4 ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση της [198]. Παρόλο που απαιτείται μία μόνον μέτρηση, οι μέθοδοι μέτρησης των μεταβολικών λόγων στο πλάσμα απαιτούν τη λήψη αίματος η οποία είναι μία επεμβατική διαδικασία.

β) Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα

Έξι τουλάχιστον μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα έχουν προταθεί ως δείκτες για τη δραστικότητα του CYP1A2:

- 1) $(AFMU+1U+1X)/17U$ [56]
- 2) $(17X+17U)/137X$ [32]
- 3) $(AFMU+1U+1X)/17X$ [199]
- 4) $17X/137X$ [200]
- 5) $(AFMU+1X+1U+17X)/137X$ [201]
- 6) $(AFMU+1X+1U+17X+17U)/137X$ [178]

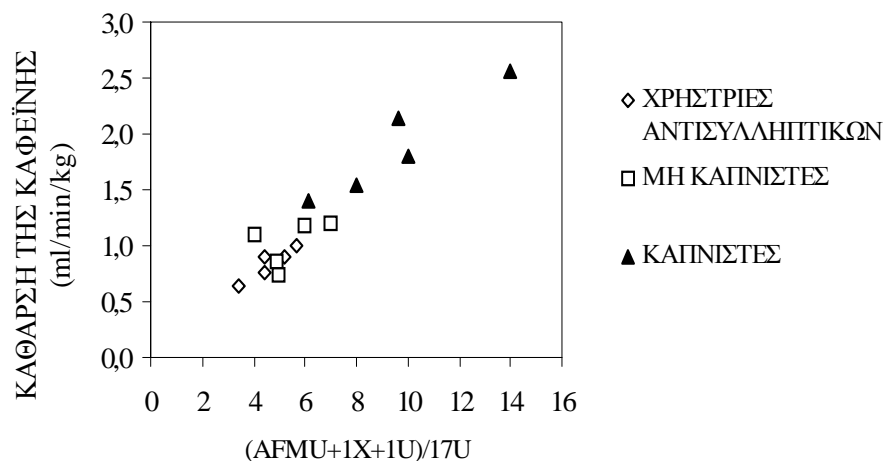
Όλοι οι παραπάνω μεταβολικοί λόγοι έχουν ως βάση τις αντιδράσεις της απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Οι διάφοροι μεταβολικοί λόγοι συσχετίζουν συγκεντρώσεις των μεταβολιτών μεταξύ τους και έτσι, κατά βάση, είναι ανεξάρτητοι της συνολικής ανάκτησής τους στα ούρα [202]. **Επίσης, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι σχετικές αναλογίες των μεταβολιτών της καφεΐνης δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ ολονύκτιας συλλογής ούρων, 8ωρης συλλογής και μεμονωμένων δειγματοληψιών στο διάστημα 2 έως 6 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης** [201].

Ο μεταβολικός λόγος **$(AFMU+1U+1X)/17U$** , ειδικότερα, εμφανίζει στον αριθμητή τα προϊόντα της 7-απομεθυλίωσης της 17X και στον παρονομαστή το προϊόν της οξείδωσης της 17X αντί της ίδιας της 17X, όπως θα ήταν αναμενόμενο. Αυτό συμβαίνει διότι η απομεθυλίωση της 17X συσχετίζεται, σε μεγάλο βαθμό, με την οξείδωσή της προς 17U ($r = 0,87$) [22] και κατ' αυτόν τον τρόπο το **17U αποτελεί έναν αξιόπιστο αντικαταστάτη της 17X, καθώς η απέκκρισή του δεν εξαρτάται από τη ροή των ούρων όπως αυτή της 17X** [124]. Συνεπώς, ο λόγος αυτός δεν επηρεάζεται από το ρυθμό αποβολής των ούρων καθώς δεν περιλαμβάνει ούτε την ίδια την καφεΐνη ούτε κάποια από τις διμεθυλοξανθίνες αλλά μόνο πολικούς μεταβολίτες οι οποίοι απεκκρίνονται ταχέως χωρίς να επαναρροφώνται, από τα νεφρά [56, 203]. Η συγκέντρωση, επίσης, του 17U στα ούρα έχει παρουσιάσει τη μικρότερη διακύμανση μεταξύ των διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων όπως καπνιστές, μη καπνιστές, και χρήστριες αντισυλληπτικών [56] χρησιμεύοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, ως κοινός παρονομαστής του ανωτέρω κλάσματος και συμβάλλοντας στην ορθή κατάταξη των διαφόρων ατόμων με βάση τις διαφοροποιούμενες, σε κάθε περίπτωση, τιμές του αριθμητή. **Ο λόγος αυτός περιλαμβάνει μόνον τελικούς μεταβολίτες της καφεΐνης και, κατά συνέπεια, είναι σχετικά ανεξάρτητος από**

τον χρόνο συλλογής του δείγματος, με την προϋπόθεση να έχει διέλθει επαρκές χρονικό διάστημα από τη λήψη της καφεΐνης και η χορηγηθείσα ποσότητα να είναι αρκετά μεγάλη για αξιόπιστες μετρήσεις των μεταβολιτών [57].

Ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U μπορεί να μετρηθεί στα ούρα σε ένα χρονικό σημείο 2-6 ωρών, τουλάχιστον, μετά τη λήψη της καφεΐνης [201, 204, 205], σε ολονύχτια ούρα [57] ή σε ούρα 24ώρου [56]. Για τον έλεγχο της εγκυρότητας του λόγου αυτού έγινε μελέτη συσχέτισής του τόσο με την συστηματική κάθαρση της καφεΐνης, όσο και με την δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) του λόγου με την κάθαρση της καφεΐνης ήταν 0,91 [56] (Εικόνα 3), 0,82 [57], 0,77 [206] και 0,79 [60] και με τη δοκιμασία αναπνοής ήταν 0,74 [174]. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι ο μεταβολικός αυτός λόγος, η δοκιμασία αναπνοής και η συστηματική κάθαρση της καφεΐνης παρουσιάζουν παρομοίου μεγέθους μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων [57].

Η δραστικότητα του CYP1A2, όπως εκφράζεται μέσω αυτού του μεταβολικού λόγου, εμφανίζεται, ορθώς, αυξημένη στους καπνιστές [36, 37, 39, 204], στα παιδιά [56] και σε άτομα εκτεθειμένα σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια [174]. Επίσης, η δραστικότητα του CYP1A2 εμφανίζεται, ορθώς, μειωμένη σε έγκυες γυναίκες [207], σε γυναίκες με χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών [56; 204] και σε άτομα που λαμβάνουν σιμετιδίνη [49].



Εικόνα 3. Συσχέτιση ανάμεσα στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U και την κάθαρση της καφεΐνης (Από Campbell *et al.*, 1987).

Ο δεύτερος, από τους ανωτέρω, λόγος (17X+17U)/137X χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της δραστικότητας του CYP1A2 [32] με μέτρηση των συγκεντρώσεων των 17X, 17U και της καφεΐνης σε δείγμα ούρων που λήφθηκε 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης καφεΐνης. Σε άλλες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί και ο λόγος 17X/137X [200]. Το σκεπτικό της χρήσης αυτών των λόγων είναι ότι, προκειμένου να υπολογιστεί ο δείκτης σχηματισμού ενός πρωτογενούς μεταβολίτη, διαιρείται η συγκέντρωση του μεταβολίτη αυτού με τη συγκέντρωση του μητρικού φαρμάκου (θεωρητικός λόγος: «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο»). Επειδή, όμως, η 17X είναι τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα για το CYP1A2, ο χρόνος συλλογής των ούρων είναι κρίσιμος και αυτή πρέπει να γίνεται αυστηρά στο χρονικό διάστημα μεταξύ 4 και 5 ωρών από τη λήψη της καφεΐνης προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της μετατροπής της 17X σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Η νεφρική απέκκριση της καφεΐνης, εξάλλου, όπως και η απέκκριση των διμεθυλοξανθινών, όπως η 17X, εξαρτάται από τον ρυθμό αποβολής των ούρων. Στους λόγους αυτούς υπάρχει, τόσο στον αριθμητή όσο και στον παρονομαστή, ένα συστατικό που εξαρτάται από τη ροή των ούρων. Είναι πιθανόν αυτοί οι δύο παράγοντες να αλληλοαναιρούνται, αλλά ούτε η εξάρτηση από τη ροή ούτε η νεφρική κάθαρση είναι οι ίδιες για την καφεΐνη και την 17X (Εικόνα 2). Πράγματι, οι δύο αυτοί μεταβολικοί λόγοι έδειξαν σημαντική συσχέτιση με τη ροή των ούρων, σε διάφορα διαστήματα συλλογής των ούρων μετά την κατανάλωση καφεΐνης [203, 206]. Οι μεταβολικοί αυτοί λόγοι ανέδειξαν την επαγωγή του CYP1A2 από το κάπνισμα, σε κάποιες περιπτώσεις, αλλά όχι σε άλλες όπως, για παράδειγμα, σε Κινέζους καπνιστές, διαφορετική δραστικότητα μεταξύ λευκών ατόμων από την Ιταλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες όπως και μεταξύ Κινέζων και λευκών, διαφορές που δεν διαπιστώθηκαν ούτε με τον πρώτο λόγο ούτε με την δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης [57, 127]. Επιπλέον, ο μεταβολικός λόγος (17X+17U)/137X, σε αντίθεση με τον (AFMU+1U+1X)/17U, δεν κατέστη δυνατόν να αντικατοπτρίσει την μείωση της δραστικότητας του CYP1A2 κατόπιν λήψης από του στόματος αντισυλληπτικών [206]. Επίσης, ο μεταβολικός λόγος (17X+17U)/137X παρουσίασε μικρότερη από τον (AFMU+1U+1X)/17U ή καθόλου σημαντική συσχέτιση με την κάθαρση της καφεΐνης [60, 206], και τόσο αυτός όσο και ο 17X/137X δεν παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των τσιγάρων σε καπνιστές, σε αντίθεση με τον (AFMU+1U+1X)/17U [203]. Οι δύο αυτοί μεταβολικοί λόγοι παρουσίασαν δικόρυφες και τρικόρυφες κατανομές τιμών σε διάφορες μελέτες [32, 200, 206, 208] κάτι το οποίο δεν συμβαίνει με τον μεταβολικό λόγο

(AFMU+1U+1X)/17U. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία της καφεΐνης στον παρονομαστή των λόγων αυτών, της οποίας η νεφρική κάθαρση εμφανίζει δικόρυφη κατανομή [206].

Ο τρίτος, από τους ανωτέρω, μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17X αντιπροσωπεύει την δραστικότητα 7-απομεθυλάσης της 17X, η οποία οφείλεται στο CYP1A2, καθώς στον αριθμητή εμφανίζονται τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από την αρχική 7-απομεθυλίωση της 17X και στον παρονομαστή η αρχική ένωση. Ο λόγος, όμως, αυτός παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση στους ενήλικες (εύρος τιμών από 0,89 έως 25,54-σχεδόν 29 φορές, Grant *et al.*, 1983b) ενώ η κάθαρση της καφεΐνης 9 φορές [206] και αυτό ίσως εξηγείται, εν μέρει, από την επίδραση της ροής των ούρων στην απέκκριση της 17X. Πράγματι, ο λόγος αυτός παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με την ροή των ούρων [203] ενώ, αντίθετα, δεν παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με την κάθαρση της καφεΐνης [60]. Ο λόγος αυτός, ενώ διέκρινε τους καπνιστές από τους μη καπνιστές, είχε μικρότερη διακριτική ικανότητα από το λόγο (AFMU+1U+1X)/17U [203].

Ο πέμπτος λόγος (AFMU+1X+1U+17X)/137X όπως και ο λόγος (AFMU+1X+1U+17X+17U)/137X χρησιμοποιούν την 17X και τα προϊόντα της απομεθυλίωσής της προς την καφεΐνη και συμφωνούν καλύτερα με το θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο» οι οποίοι εμπλέκονται στην κύρια, και εξαρτώμενη από το CYP1A2, μεταβολική οδό της καφεΐνης. Ο δεύτερος, μάλιστα, από αυτούς παρουσίασε την καλύτερη συσχέτιση με την συνολική κάθαρση της καφεΐνης και την μερική κάθαρση της καφεΐνης προς 17X, τόσο σε δείγματα ούρων 0-8 ωρών όσο και σε δείγματα 0-24 ωρών υγιών ατόμων σε σχέση με τους λόγους (AFMU+1X+1U)/17U, (17U+17X)/137X και 17X/137X. Ο ίδιος λόγος, επίσης, έδειξε πιο ξεκάθαρα τη διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών [178] αλλά δεν είχε συσχέτιση με τον αριθμό των τσιγάρων στους καπνιστές όπως είχαν οι λόγοι (AFMU+1U+1X)/17U και (AFMU+1U+1X)/17X [203]. Στον αριθμητή και στον παρονομαστή, όμως, αυτών των λόγων βρίσκονται συστατικά που εξαρτώνται από νεφρικούς παράγοντες (17X, 137X) τα οποία ενδέχεται να αλλοιώνουν την απεικόνιση της δραστικότητας του CYP1A2. Πράγματι, ο λόγος (AFMU+1X+1U+17X+17U)/137X παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με τη ροή των ούρων [203] και έτσι η τιμή του αντανακλά τόσο μεταβολικούς όσο και νεφρικούς παράγοντες.

Η εγκυρότητα των ανωτέρω μεταβολικών λόγων στα ούρα, στο πλάσμα και

στην σίελο διερευνήθηκε με την ανάπτυξη εξομοιώσεων σε Η/Υ πάνω στην βάση των τιμών των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της καφεΐνης και των μεταβολιτών της που απαντώνται στη βιβλιογραφία. Εξετάστηκε η πιθανή επίδραση της νεφρικής κάθαρσης της καφεΐνης και των δραστηριοτήτων των CYP2A6 και CYP2E1 πάνω στην δραστικότητα του CYP1A2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U συσχετίζεται θετικά και με μεγάλη εγγύτητα με την δραστικότητα του CYP1A2. Συσχετίζεται, όμως, αρνητικά με τη δραστικότητα του CYP2A6, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει με τους άλλους λόγους, ενώ δεν εξαρτάται από τη δραστικότητα του CYP2E1 και τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης. Κανείς μεταβολικός λόγος δεν είχε εξάρτηση από τις δραστηριότητες της οξειδάσης της ξανθίνης και της NAT-2. Στην ίδια μελέτη, οι λόγοι (AFMU+1U+1X)/17X και (AFMU+1X+1U+17X)/137X παρουσίασαν, επίσης, μεγάλη συσχέτιση με την δραστικότητα του CYP1A2 και επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεταβολές της δραστικότητας του CYP1A2 από το λόγο (AFMU+1U+1X)/17U εμφάνισαν, όμως, μεγάλη εξάρτηση από την νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και της 17X και μικρότερη από την δραστικότητα του CYP2E1. Οι υπόλοιποι λόγοι παρουσίασαν πολύ μικρότερη ευαισθησία στην απεικόνιση της δραστικότητας του CYP1A2 από τους προαναφερθέντες. Δείχθηκε, επίσης ότι, σε αντίθεση με τους μεταβολικούς λόγους στα ούρα, ο λόγος 17X/137X στο πλάσμα και στην σίελο, όταν μετράται σε ένα συγκεκριμένο, μικρού εύρους, χρονικό διάστημα έχει μικρή εξάρτηση από την ροή των ούρων και από την δράση άλλων ενζύμων και αποτελεί έναν πιο αξιόπιστο δείκτη της δραστικότητας του CYP1A2 [189].

1.4.2. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας του CYP2A6 με την χρήση της καφεΐνης

Μία πολύ ειδική αντίδραση η οποία καταλύεται από το CYP2A6 είναι η 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης (1,2-βενζοπυρόνη) η οποία είναι μία φυτική ουσία που απαντάται στη φύση. Η κουμαρίνη αποτελεί την πρόδρομη ένωση για διάφορα αντιπηκτικά και ιδιαίτερα για την βαρφαρίνη, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και προκαλεί χαλάρωση των λείων μυών και του σφιγκτήρα του Oddi. Μετά από κατανάλωση κουμαρίνης, ποσοστό μεγαλύτερο του 95% της 7-OH- κουμαρίνης που σχηματίζεται απεκκρίνεται μέσα σε 4 ώρες στα ούρα, συνδεδεμένη με γλυκουρονικό, με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ατόμων, αλλά χωρίς διαφορές ανάμεσα στα φύλα. Συνεπώς, η κουμαρίνη είναι το κατ' εξοχήν υπόστρωμα για την εκτίμηση της

μεταβολικής ικανότητας του CYP2A6 *in vivo* [105, 209].

Εκτός από την 7-OH- της κουμαρίνης, μία άλλη αντίδραση η οποία καταλύεται, κυρίως, από το CYP2A6 είναι η 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U με μικρότερη συμμετοχή του CYP1A2 [21, 210]. Σε μικρές συγκεντρώσεις 17X (0,1 mM), όμως, το CYP2A6 είναι το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση [113]. Επομένως, η καφεΐνη, παρόλο που παρουσιάζει μικρότερη ειδικότητα, μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 *in vivo*.

Με βάση, λοιπόν, την οξείδωση της 17X έχουν προταθεί τρεις μεταβολικοί λόγοι ως δείκτες της δραστηριότητας του CYP2A6: ο λόγος 17U/17X, ως ο πλησιέστερος στον θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο» [113, 202], ο λόγος $17U/(17U+17X+1X+1U+7X+7U+AFMU+AAMU)$ ο οποίος εκφράζει την 8-υδροξυλίωση της 17X ως το ποσοστό της παραγωγής 17U σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της N-3 απομεθυλίωσης της καφεΐνης στα ούρα [211] και ο λόγος $17U/(AFMU+1U+1X+17U+17X)$ ο οποίος εκφράζει την 8-υδροξυλίωση της 17X ως το ποσοστό της παραγωγής 17U σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της παραξανθίνης (17X) στα ούρα [207]. Οι δύο τελευταίοι λόγοι, όμως, ενδέχεται να επηρεάζονται ανάστροφα από την δραστηριότητα του CYP1A2 καθώς ο αριθμητής είναι ίδιος με τον παρονομαστή του λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ και ο παρονομαστής περιέχει όλους τους όρους του αριθμητή του λόγου που εκφράζει τη δραστηριότητα του CYP1A2. Πράγματι, οι Krul και Hageman σε μία μελέτη 26 υγιών ατόμων, διαπίστωσαν ότι οι τιμές του λόγου $17U/(AFMU+1U+1X+17U+17X)$ παρουσίασαν σημαντική αρνητική συσχέτιση με τις τιμές του λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ στα άτομα αυτά [212].

1.4.3. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με την χρήση της καφεΐνης

Η δραστηριότητα της XO στο ήπαρ έχει προσδιοριστεί, σε διάφορες μελέτες, με την επώαση ομογενοποιημένου ηπατικού ιστού παρουσία ξανθίνης και τον φασματοφωτομετρικό ή ραδιοχημικό προσδιορισμό του σχηματιζόμενου ουρικού οξέος [119, 121]. Ο ηπατικός ιστός προερχόταν από επεμβάσεις μερικής ηπατεκτομής, από βιοψίες ήπατος και από επεμβάσεις ηπατικής μεταμόσχευσης. Οι ανωτέρω μέθοδοι έχουν ερευνητικό χαρακτήρα και δεν μπορούν να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της XO *in vivo*. Σ' αυτή την περίπτωση, η χρήση της

καφεΐνης ως υποστρώματος για την ΧΟ παρέχει την δυνατότητα για τον ασφαλή και μη επεμβατικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της ΧΟ *in vivo*. Πιο συγκεκριμένα, και όπως προκύπτει από το σχήμα του μεταβολισμού της καφεΐνης, η ΧΟ ευθύνεται για τον σχεδόν αποκλειστικό μετασχηματισμό της 1X σε 1U. Το δεδομένο αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι η μετατροπή αυτή αναστέλλεται από την αλλοπουρινόλη, έναν ειδικό αναστολέα της ΧΟ [133].

Με δεδομένο αυτήν την μεταβολική οδό έχουν προταθεί δύο μεταβολικοί λόγοι για την μέτρηση της δραστηριότητας της ΧΟ: ο λόγος 1U/1X [202] ο οποίος ανταποκρίνεται στον θεωρητικό λόγο μεταβολίτης/μητρική ουσία και ο λόγος 1U/(1U+1X) [127] ο οποίος εκφράζει την οξείδωση της 1X ως το ποσοστό του παραγομένου 1U στα ούρα σε σχέση με την συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της σχετικής με την εμπλοκή της ΧΟ.

1.4.4. Οι κυριότερες μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της NAT-2 με την χρήση της καφεΐνης

Το φάρμακο το οποίο, για πρώτη φορά, χρησιμοποιήθηκε το 1960 από τον Jenne ως δείκτης για την δραστηριότητα της NAT-2 ήταν η ισονιαζίδη της οποίας ο χρόνος ημισείας ζωής έδωσε μία ξεκάθαρη διάκριση μεταξύ δύο φαινοτύπων, δηλαδή του βραδέος και του ταχέος ακετυλιωτή. Κατόπιν, μέσα στο ίδιο έτος, ο Evans σε μια προσπάθεια απλοποίησης, μέτρησε την συγκέντρωση της ισονιαζίδης στο πλάσμα 6 ώρες μετά την από του στόματος χορήγησή της, με πτωχότερα όμως αποτελέσματα ως προς την διάκριση των δύο φαινοτύπων. Έκτοτε, αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού του φαινοτύπου της ακετυλίωσης, είτε με την χρησιμοποίηση της ισονιαζίδης, είτε με την χρησιμοποίηση άλλων φαρμάκων. Αυτά περιλαμβάνουν την σουλφαμεθαζίνη (αντιμικροβιακό) η οποία χρησιμοποιήθηκε από τον Evans το 1960, την σουλφαπυριδίνη (αντιμικροβιακό) η οποία χρησιμοποιήθηκε από τους Schorer και Evans το 1972, την δαψόνη (αντιλεπρωτικό) η οποία χρησιμοποιήθηκε από τον Peters και τους συνεργάτες του το 1972, όπως ανασκοπούνται από τον Evans (1989) καθώς και η καφεΐνη [202].

Με βάση την καφεΐνη και τους μεταβολίτες της στα ούρα έχουν προταθεί διάφοροι μεταβολικοί λόγοι ως δείκτες της δραστηριότητας της πολυμορφικής NAT-2. Ο πρώτος, χρονολογικά, προτάθηκε από τους [141] και ήταν ο λόγος AFMU/(AFMU+1U+1X+17U+17X) σε ούρα 24ώρου μετά την από του στόματος χορήγηση καφεΐνης. Ο λόγος αυτός εκφράζει την παραγωγή του AFMU ως ποσοστό

όλων των μεταβολιτών της οδού της 3-απομεθυλίωσης της καφεΐνης και διαχωρίζει τον πληθυσμό σε δύο ξεκάθαρες ομάδες βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών. Ο διαχωρισμός των ατόμων με βάση το λόγο αυτό επιβεβαιώθηκε με την δοκιμασία σουλφαμεθαζίνης στον ίδιο πληθυσμό. Στην συνέχεια, επιδιώχθηκε απλοποίηση του λόγου αυτού και δείχθηκε ότι ο λόγος AFMU/1X σε ούρα 24ώρου και σε ούρα 2-6 ώρες μετά την λήψη καφεΐνης έδωσε και αυτός ικανοποιητικά αποτελέσματα, όσον αφορά την διάκριση βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών [202, 213]. Στο ίδιο πλαίσιο έρευνας οι Tang *et al.* πρότειναν τον λόγο AAMU/(AAMU+1U+1X) σε ολονύκτια συλλογή ούρων μετά από απογευματινή λήψη καφεΐνης [214] και οι Relling *et al.* τον ισοδύναμο λόγο AFMU/(AFMU+1U+1X) σε συγκεντρωτικά ούρα των 4 πρώτων ωρών μετά την λήψη της καφεΐνης [215]. Οι τελευταίοι λόγοι κάνουν καλύτερη διάκριση, από τον AFMU/1X, μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών των οποίων οι τιμές βρίσκονται πλησίον του σημείου διαχωρισμού των δύο κατανομών ενώ, ταυτόχρονα, υπάρχει πλήρης συμφωνία του λόγου AAMU/(AAMU+1U+1X) με το κλάσμα N-ακετυλοσουλφαμεθαζίνη/σουλφαμεθαζίνη στο αίμα, όσον αφορά το φαινότυπο της N-ακετυλίωσης [216]. Ο λόγος αυτός, επίσης, προτείνεται ως πιο κατάλληλος για την ορθή κατάταξη των ατόμων σε περίπτωση ηπατικής ή άλλης ασθένειας [57, 217]. Σε προαναφερθείσα συγκριτική μελέτη που έγινε για τους μεταβολικούς λόγους που αφορούν το CYP1A2 και στην οποία λήφθηκαν υπόψη οι βιβλιογραφικές φαρμακοκινητικές παράμετροι της καφεΐνης μέσω εξομοίωσης με τη χρήση H/Y, δείχθηκε ότι ο λόγος AFMU/(AFMU+1U+1X) είναι ο πιο αξιόπιστος στην απεικόνιση της δραστηριότητας της NAT-2 καθώς φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από την δράση άλλων παραγόντων, όπως για παράδειγμα από την δράση της XO ή του CYP1A2 [189].

1.5. Ηπατική νόσος και δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων

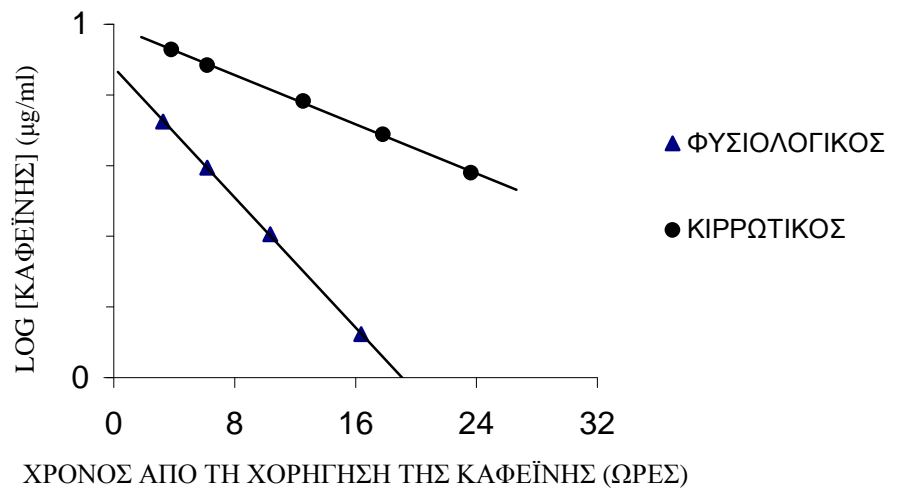
Ο μεταβολισμός των φαρμάκων σε ασθενείς με ηπατική νόσο, σε γενικές γραμμές, επιβραδύνεται και το συνολικό περιεχόμενο σε κυτόχρωμα P450 είναι σημαντικά μειωμένο [164, 218, 219]. Ο μεταβολισμός της καφεΐνης, επίσης, επηρεάζεται από την ηπατική νόσο και η μέτρηση της κάθαρσης της καφεΐνης έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ηπατικής λειτουργίας σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος, οφειλομένης σε διάφορες αιτίες, καθώς και σε ασθενείς με μη κίρρωτική ηπατική νόσο [60, 160, 172; 211, 220-223]. Γενικώς, έχει παρατηρηθεί μειωμένη κάθαρση της καφεΐνης στους ηπατοπαθείς, αύξηση του χρόνου ημισείας

ζωής της στο πλάσμα και στο σίελο καθώς και συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης της καφεΐνης και της βαρύτητας της κίρρωσης, όπως αυτή προσδιορίζεται από το σύστημα ταξινόμησης κατά Child-Pugh [159, 224, 225] (Εικόνα 4).

Παράλληλα, η δραστικότητα της NAT-2 στην ηπατική νόσο, έχει εξεταστεί με διάφορα υποστρώματα όπως η ισονιαζίδη, η διπυρόνη, η προκαϊναμίδη, η δαψόνη και η καφεΐνη. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι η ηπατική νόσος έχει μία μέτρια επίδραση στην N-ακετυλίωση και πάντως μικρότερη από την επίδρασή της στις αντιδράσεις οξειδωσης. Η επίπτωση της μείωσης της δραστικότητας της NAT-2 δεν είναι η ίδια σε όλα τα παραπάνω φάρμακα-υποστρώματα αλλά, γενικώς, παρατηρείται απώλεια της τυπικής δικόρυφης κατανομής του ενζύμου αυτού στην χρόνια ηπατική νόσο, πιθανότατα εξαιτίας μεγαλύτερης μείωσης της ικανότητας ακετυλίωσης στους ταχείς ακετυλιωτές [147].

Η ηπατική νόσος επηρεάζει, επίσης, και την δραστικότητα της XO, όπως εξακριβώθηκε σε δείγματα ηπατικού ιστού ασθενών με ηπατική νόσο διαφορετικής αιτιολογίας τα οποία επώαστηκαν με υποστρώματα ειδικά για το ένζυμο αυτό. Η επίδραση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας της XO τόσο σε ασθενείς με κίρρωση ιικής αιτιολογίας όσο και σε ασθενείς με κίρρωση οφειλόμενη σε άλλες αιτίες [121, 226].

Η δραστικότητα, τέλος, του CYP2A6 έχει διερευνηθεί σε ασθενείς με σοβαρή, μέτρια και ήπια ηπατική νόσο αλκοολικής αιτιολογίας καθώς και σε ασθενείς με ηπατίτιδα Α με την χρήση της κουμαρίνης η οποία είναι το ειδικό υπόστρωμα για το ένζυμο αυτό. Διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολισμός της κουμαρίνης ήταν μειωμένος στους ασθενείς με σοβαρή και μέτρια ηπατική νόσο όπως και στην οξεία ηπατίτιδα Α, αλλά δεν επηρεάστηκε στους ασθενείς με ήπια νόσο [109, 209].



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτική κάθαρση της καφεΐνης σε ένα υγιές άτομο και σε έναν ασθενή με κίρρωση (Από Cheng *et al.*, 1990).

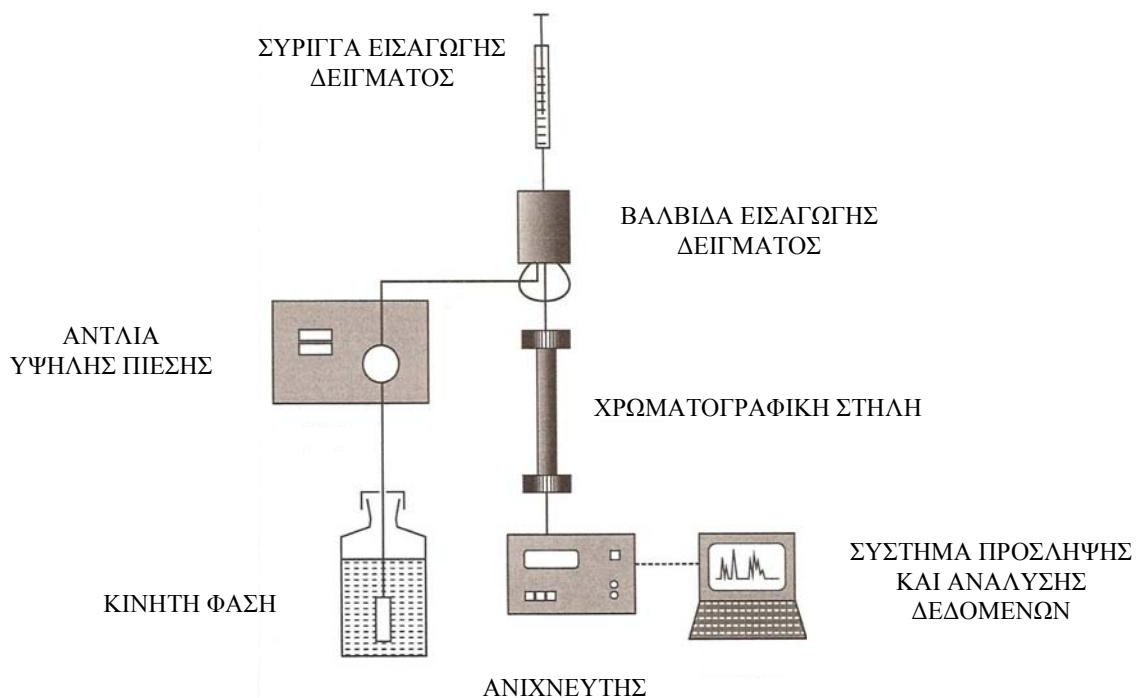
1.6. Η ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η χρωματογραφία αποτελεί διαδικασία διαχωρισμού ουσιών που βρίσκονται σε μίγμα κατά την οποία τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων στην χρωματογραφική κλίνη η οποία μπορεί να είναι μία στήλη ή μία επίπεδη επιφάνεια. Η μία φάση είναι στατική ενώ η άλλη διέρχεται συνεχώς διαμέσου της χρωματογραφικής κλίνης. Η στατική φάση είναι είτε ένα στερεό, πορώδες, επιφανειοδραστικό υλικό με την μορφή μικροσκοπικών σωματιδίων είτε μία λεπτή ταινία υγρού η οποία επενδύει μία στερεή επιφάνεια, ή το τοίχωμα μίας στήλης. Η κινητή φάση είναι αέρια ή υγρή. Στην πρώτη περίπτωση η διαδικασία ονομάζεται αέρια, ενώ στην δεύτερη ονομάζεται υγρή χρωματογραφία. Αν κάποια συστατικά του μίγματος κατανέμονται ευκολότερα στην κινητή φάση τότε περνούν με μεγαλύτερη ταχύτητα από άλλα τα οποία κατανέμονται ευκολότερα στην στατική φάση. Η κατανομή είναι αποτέλεσμα ισορροπίας δυνάμεων ανάμεσα στα μόρια του συστατικού, αφενός, και στα μόρια της κινητής και στατικής φάσης, αφετέρου. Η προέλευση των δυνάμεων αυτών είναι ιοντικής φύσης, παροδικά ή μόνιμα ηλεκτρικά πεδία και δυνάμεις van der Waals.

Κατά την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ειδικότερα, επιτυγχάνεται εξαιρετικός διαχωρισμός σε μικρό, σχετικά, χρονικό διάστημα εξαιτίας των πολύ μικρών σωματιδίων που αποτελούν την στατική φάση. Ως συνέπεια, προκύπτει η απαίτηση για την άσκηση υψηλής πίεσης στην κινητή φάση προκειμένου αυτή να διέλθει διαμέσου της στήλης. Για τον λόγο αυτό η HPLC αναφέρεται και ως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης [227]. Κάτω από κατάλληλα επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες τα διάφορα συστατικά του μίγματος σχηματίζουν ζώνες κατά μήκος της στήλης και καθώς εξέρχονται από αυτήν ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή ο οποίος έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τις διάφορες ουσίες με βάση κάποια φυσικοχημική ιδιότητά τους, όπως η απορρόφησή τους στο ορατό-υπεριώδες, ο φθορισμός, η αγωγιμότητα, η ικανότητα οξειδοαναγωγής κλπ. Ο ανιχνευτής μετατρέπει την φυσικοχημική αυτή ιδιότητα σε ηλεκτρικό σήμα και το μεταφέρει σε μία καταγραφική συσκευή ή σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με λογισμικό σύστημα πρόσληψης και ανάλυσης του σήματος (Εικόνα 5).

Η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) αποτελεί μία υποπερίπτωση της HPLC κατά την οποία η στατική φάση είναι μη πολική ενώ η κινητή φάση είναι πολική. Η μη πολική στατική φάση είναι, ως επί το πλείστον, σφαιρικά σωματίδια σιλικόνης τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση στην επιφάνειά τους με την πρόσδεση

υδρογονανθρακικών αλυσίδων αποτελούμενων, συνήθως, από 8 ή 18 άτομα άνθρακα. Ο μηχανισμός του διαχωρισμού είναι παρόμοιος με την εκχύλιση διαφόρων ενώσεων από το νερό σε έναν οργανικό διαλύτη όπου οι περισσότεροι υδρόφοβες ενώσεις (μη πολικές) εκχυλίζονται εκλεκτικά στην μη πολική οργανική φάση. Κατά την RP-HPLC, αντίστοιχα, οι μη πολικές ενώσεις του μίγματος κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση και καθυστερούν να εξέλθουν από την στήλη, ενώ οι πολικές ενώσεις κατακρατούνται λιγότερο ισχυρά με αποτέλεσμα να εξέρχονται πρώτες σε σειρά έκλυσης [228, 229].



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα της διάταξης της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι HPLC για τον προσδιορισμό της καφεΐνης και διαφόρων από τους κύριους και δευτερογενείς μεταβολίτες της στα ούρα. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν είτε ισοκρατική έκλυση των ουσιών κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια της ανάλυσης [204, 212, 230], είτε βαθμιδωτή έκλυση κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ανάλυσης [231-233]. Όσον αφορά τον χειρισμό του AFMU, σε κάποιες μεθόδους γίνεται η μετατροπή του, κάτω από αλκαλικό pH, σε AAMU και προσδιορίζεται ξεχωριστά από τους υπόλοιπους μεταβολίτες [216,234], ενώ σε άλλες γίνεται ταυτόχρονα, με τους υπόλοιπους μεταβολίτες, προσδιορισμός

του AAMU με μικρή [235, 236] ή καθόλου [237] προκατεργασία του δείγματος των ούρων. Σε μία διαφορετική προσέγγιση, κάποιες μέθοδοι χρησιμοποιούν μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης οι οποίοι δεν περιέχουν την AFMU ή την AAMU και κατ' αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχει η ανάγκη προσδιορισμού των μεταβολιτών αυτών [231, 232]. Τέλος, η καφεΐνη και οι μεταβολίτες της μπορούν να απομονωθούν από τα ούρα είτε με εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) με την χρήση διαφόρων συστημάτων οργανικών διαλυτών, όπως το σύστημα χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης [202, 212, 230] και το σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/ισοπροπανόλης [204], είτε με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) με την χρήση διαφόρων προσροφητικών υλικών [231, 232, 234].

1.7. Σκοποί της εργασίας

Με βάση τα ανωτέρω, οι σκοποί της παρούσας εργασίας ήταν:

α) η ανάπτυξη μίας αξιόπιστης μεθόδου RP-HPLC για τον επαρκή διαχωρισμό της καφεΐνης και 14 μεταβολιτών της καθώς, επίσης, και για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X στα ούρα

β) η μελέτη της δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 σε πληθυσμό υγιών ατόμων με την μέθοδο των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και ο καθορισμός των τιμών αναφοράς του μεταβολικού λόγου του αφορώντος στην δραστηριότητα του CYP1A2, ως του πλέον αντιπροσωπευτικού ενζύμου της ηπατικής λειτουργίας

γ) η μελέτη της διακύμανσης της δραστηριότητας των ανωτέρω ενζύμων, σε βάθος χρόνου, σε υγιή άτομα

δ) η μελέτη της δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 σε μεγάλο αριθμό ηπατοπαθών ταξινομημένων με αυστηρά κριτήρια όσον αφορά το είδος και την βαρύτητα της ηπατικής νόσου

ε) ο προσδιορισμός της εξειδίκευσης και της ευαισθησίας της μεθόδου των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα όσον αφορά στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου, με στόχο την εφαρμογή της μεθόδου στην κλινική πράξη και απώτερο σκοπό την βελτίωση της διάγνωσης και παρακολούθησης της εξέλιξης της ηπατικής νόσου.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1. Χημικές ουσίες

Η προμήθεια των προτύπων μεταβολιτών της καφεΐνης 1-μεθυλοξανθίνη (1X), 3-μεθυλοξανθίνη (3X), 7-μεθυλοξανθίνη (7X), 3,7-διμεθυλοξανθίνη (37X), 1,7-διμεθυλοξανθίνη (17X), 1-μεθυλουρικό οξύ (1U), 3-μεθυλουρικό οξύ (3U), 7-μεθυλουρικό οξύ (7U), 1,3-διμεθυλουρικό οξύ (13U), 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (17U), 1,3,7-τριμεθυλουρικό οξύ (137U) και της 4-ακεταμιδοφαινόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (IS), έγινε από την εταιρεία Sigma (Steinheim-Γερμανία). Η προμήθεια του προτύπου μεταβολίτη 1,3-διμεθυλοξανθίνη (13X) έγινε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Γερμανία) και της καφεΐνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137X) καθώς και του 3,7-διμεθυλουρικού οξέος (37U) έγινε από την εταιρεία Fluca (Buchs, Ελβετία). Η 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλουρακίλη (AFMU), καθαρότητας 98%, ήταν ευγενική προσφορά του κ. R. Foumeaux (Centre Recherche Nestle–Laussane, Ελβετία) και του Dr. Pfeleiderer (Konstanz University, Germany) Η προμήθεια του ακετονιτριλίου και της μεθανόλης έγινε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Seelze, Γερμανία) και ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC. Το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θεϊκό αμμώνιο ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και η προμήθειά τους έγινε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Seelze, Γερμανία). Υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα στάδια της ανάλυσης.

2.1.2. Συσκευές χρωματογραφίας και χρωματογραφικές συνθήκες

Η χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της πραγματοποιήθηκε με την χρήση αντλίας υψηλής πίεσης τύπου Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα) η οποία ήταν εξοπλισμένη με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού μεταβλητού μήκους κύματος τύπου FASMA 500 (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα) και βαλβίδα εισαγωγής δείγματος τύπου Rheodyne 7010 (Rheodyne, California, ΗΠΑ) η οποία έφερε βρόγχο, όγκου 20 μl , από ανοξείδωτο χάλυβα.

Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με την χρήση χρωματογραφικής στήλης Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων του υλικού πληρώσεως 5 μm , διαμέτρου των πόρων των σωματιδίων 100 \AA , μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία). Η επιλογή της στήλης αυτής έγινε με κριτήριο την

ικανότητά της για καλύτερο διαχωρισμό των βασικών ενώσεων, εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητάς της σε ελεύθερες επιφανειακές σιλανόλες (-SiOH) οι οποίες έχουν όξινο χαρακτήρα. Ο ιδιότητα αυτή των σιλανολών προκαλεί αυξημένη κατακράτηση των βασικών ουσιών, διεύρυνση και ασυμμετρία των κορυφών τους με αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα στον διαχωρισμό. Επιπλέον, το υλικό πληρώσεως της στήλης αυτής είναι, σε μεγάλο βαθμό, απαλλαγμένο από επιμόλυνση μεταλλικών ιχνοστοιχείων τα οποία προκαλούν παρόμοια με τις σιλανόλες αποτελέσματα. Τα χαρακτηριστικά αυτά της στήλης την καθιστούν, εν τέλει, μία από τις πλέον ενδεδειγμένες για τον διαχωρισμό όχι μόνον βασικών αλλά και μη βασικών ενώσεων [229].

Πριν από την σύνδεση της χρωματογραφικής στήλης ελαχιστοποιήθηκε ο νεκρός όγκος της διάταξης ο οποίος ορίζεται ως ο όγκος που μεσολαβεί μεταξύ του σημείου έγχυσης του δείγματος και του ανιχνευτή, χωρίς να υπολογίζεται ο όγκος της στήλης. Είναι ο όγκος των τριχοειδών σωλήνων, των συνδετήρων τους και της κυψελίδας του ανιχνευτή. Ο νεκρός όγκος πρέπει να ελαχιστοποιείται για να αποφεύγεται η διάχυση του δείγματος και συνεπώς να μειώνεται η διεύρυνση των κορυφών [238]. Στην προκειμένη περίπτωση, συνδέθηκαν οι τριχοειδείς σωλήνες μεταξύ τους με την βοήθεια ενός συνδετήρα μηδενικού νεκρού όγκου. Η ταχύτητα ροής της αντλίας ρυθμίστηκε στα 0,2 ml/min και έγινε έγχυση προτύπου διαλύματος 17X. Η κορυφή της ουσίας εμφανίστηκε στα 0,14 min. Ο νεκρός όγκος υπολογίστηκε από τον τύπο $V_d = F \text{ (ml/min)} \times t \text{ (min)}$ και ήταν 28 μl , τιμή η οποία βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια (<60 μl) [238].

Η καλή λειτουργία της αντλίας ελέγχονταν περιοδικά και αφορούσε στην ακρίβεια της ταχύτητας ροής και στην σταθερότητά της. Η ακρίβεια της αντλίας ελέγχονταν με την χρονομέτρηση της πληρώσεως μιας ογκομετρικής φιάλης 5 ml με την ταχύτητα ροής ρυθμισμένη στο 1 ml/min. Η απόκλιση της πραγματικής από την ονομαστική ροή που παρουσιάστηκε κατά την διάρκεια των αναλύσεων κυμάνθηκε από 0,33% έως 3,39%, η οποία βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια για ένα ισοκρατικό σύστημα (<5%) [238].

Η σταθερότητα της αντλίας διακρίνεται σε μακροχρόνια (long-term) και βραχυχρόνια (short-term). Η μακροχρόνια σταθερότητα μετράται με την επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης μιας ουσίας μετά από 6, τουλάχιστον, εγχύσεις της ουσίας. Η βραχυχρόνια σταθερότητα συνίσταται στην σταθερότητα ροής κατά την διάρκεια της έκλουσης της κορυφής της ουσίας και μετράται με τον

συντελεστή μεταβλητότητας (CV%) των εμβადών της κορυφής μετά από 6, τουλάχιστον, εγχύσεις. Οι ανωτέρω μετρήσεις έγιναν με την έγχυση διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα 10% με κινητή φάση ακετονιτρίλιο/H₂O 60/40 (v/v) και ταχύτητα ροής 1 ml/min. Ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων του περιοδικού ελέγχου της σταθερότητας της αντλίας εμφανίζεται στον Πίνακα 3. Οι τιμές της απόκλισης βρίσκονται πλησίον του ανωτάτου ορίου του 0,5% το οποίο συνίσταται για θερμοστατούμενη στήλη [238]. Στην προκειμένη περίπτωση, όμως, η θερμοκρασία της ανάλυσης ήταν αυτή του περιβάλλοντος (22-24⁰ C) γεγονός που ερμηνεύει την ύπαρξη μικρών αποκλίσεων οι οποίες δεν οφείλονται στην σταθερότητα της αντλίας αλλά στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας.

Για την έκλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση δύο διαλύτες με βαθμιδωτή διαδικασία, σύμφωνα με το πρόγραμμα ροής το οποίο εμφανίζεται στον Πίνακα 4. Ο διαλύτης A απετελείτο από 0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, σε αναλογίες όγκων 92/4/5 και ο διαλύτης B από 0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη, σε αναλογίες όγκων 60/40. Η προσθήκη του οξικού οξέος ενδείκνυται για την περαιτέρω μείωση της επίδρασης των, ελαχίστων, ελεύθερων σιλανολών καθώς σε χαμηλό pH μειώνεται ο ιονισμός των σιλανολών και όλες οι ανεπιθύμητες, εξαιτίας τους, δράσεις που έχουν προαναφερθεί.

Ο διαλελυμένος στην κινητή φάση αέρας απομακρυνόταν συνεχώς μέσω της εν σειρά χρήσης ενός ηλεκτρικού απαερωτή δημιουργίας κενού (Alltech Associates Inc., Deefield IL, ΗΠΑ). Η πρόσληψη και η ανάλυση των αναλογικών/ψηφιακών δεδομένων έγινε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος Chrom & Spec (Ampersand Ltd, Ρωσία).

2.1.3. Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Τα πυκνά διαλύματα της καφεΐνης καθώς και καθενός από τους μεταβολίτες της ξεχωριστά, παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 5 mM το καθένα. Συγκεκριμένα, τα διαλύματα της καφεΐνης (137X), της 137U, της 13X, της 17X και του 13U παρασκευάστηκαν με διάλυση των αντιστοίχων προτύπων ουσιών σε υπερκαθαρό ύδωρ. Τα διαλύματα της 37X, του 17U, του 37U και του 3U σε 2,5 mM NaOH. Τα διαλύματα της 1X, της 3X, της 7X, του 1U και του 7U σε 5,0 mM NaOH. Τα διαλύματα της AFMU και του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) παρασκευάστηκαν σε 0,1% οξικό οξύ. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C. Ένα μίγμα προτύπων μεταβολιτών αποτελούμενο από 1U, 1X, 17U, 17X

Πίνακας 3. Μακροχρόνια και βραχυχρόνια σταθερότητα της αντλίας HPLC μετά την επαναλαμβανόμενη έγχυση προτύπου διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα 10% με κινητή φάση ακετονιτρίλιο 60%, και ταχύτητα ροής 1 ml/min.

α/α	Χρόνος κατακράτησης κορυφής (min)	Εμβαδόν κορυφής (mV*sec)
1	4,850	117,590
2	4,850	117,120
3	4,860	117,210
4	4,850	117,610
5	4,870	115,900
6	4,850	116,910
MT±TA	4,855±0,008	116,950±0,630
CV%	0,17%	0,54%

Πίνακας 4. Πρόγραμμα ροής των διαλυτών έκλουσης της καφεΐνης και των μεταβολιτών της.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ταχύτητα ροής (ml/min)
0	100	0	0,7
5	100	0	0,7
5	100	0	1,1
15	100	0	1,1
15	0	100	1,1
19	0	100	0,7

Διαλύτης A: 0.1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (92/4/5, v/v).

Διαλύτης B: 0.1% οξικό οξύ-μεθανόλη (60/40, v/v)

και AFMU σε συγκέντρωση 1 mM παρασκευάστηκε από τα διαλύματα εργασίας και αποθηκεύτηκε στους -20° C. Το pH του μίγματος των 1U, 1X, 17U και 17X ρυθμίστηκε στην τιμή 3,5 με οξικό οξύ πριν από την προσθήκη του AFMU. Το μίγμα αυτό των 5 μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των καταλλήλων προτύπων μιγμάτων των ανωτέρω μεταβολιτών με ούρα υγιούς ατόμου τα οποία συλλέχθηκαν κατόπιν τετραήμερης αποχής από τροφές και ποτά που περιέχουν μεθυλοξανθίνες (blank spiked urine).

2.1.4. Επεξεργασία των δειγμάτων των ούρων

Μία ποσότητα ούρων 200μl κορέστηκε με 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των ενυπαρχουσών πρωτεϊνών. Στην συνέχεια προστέθηκαν 200 μl διαλύματος οξικού οξέος 0,1% και 20 μl διαλύματος του εσωτερικού προτύπου. Οι μεταβολίτες της καφεΐνης και το εσωτερικό πρότυπο εκχυλίστηκαν από τα ούρα με 6 ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης σε αναλογία όγκων 85/15 κατόπιν ισχυράς αναδεύσεως για 30''. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm με σκοπό την διάσπαση του τυχόν δημιουργηθέντος γαλακτώματος. Στην συνέχεια, η υδατική φάση απομακρύνθηκε με την χρήση μίας διαχωριστικής χοάνης και η οργανική φάση εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με θέρμανση στους 40° C και ταυτόχρονη εφαρμογή ήπιου ρεύματος αζώτου, καθαρότητας 99,99%. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl οξικού οξέος 0,1%, αναδεύθηκε ισχυρά για 15'' και διηθήθηκε με πλαστικό φίλτρο σύριγγας διαμέτρου πόρων 0,2 μm. Τέλος, 20 μl του διαλύματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης (spiked calibration standards) και των διαλυμάτων ποιοτικού ελέγχου (quality controls) 200 μl ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών αναμίχθηκαν με 200 μl των προτύπων μιγμάτων των 5 μεταβολιτών, σε διάφορες συγκεντρώσεις, καθώς και με 20 μl του διαλύματος του εσωτερικού προτύπου και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

2.1.5. Πιστοποίηση της μεθόδου

2.1.5.1. Εξειδίκευση

Η εξειδίκευση της μεθόδου προσδιορίστηκε με την ανάλυση δειγμάτων ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες. Όπως μπορεί να διαπιστωθεί από το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος των ανωτέρω ούρων δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες κορυφές, προερχόμενες από την ύπαρξη ενδογενών στα ούρα ουσιών,

οι οποίες να παρεμβάλλονται με τις κορυφές των AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X ή του εσωτερικού προτύπου (Εικόνα 6B).

2.1.5.2. Ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση των AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X και του εσωτερικού προτύπου προσδιορίστηκε με την σύγκριση των υψών των χρωματογραφικών κορυφών των εκχυλισθέντων δειγμάτων βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, και 200 μM με τα αντίστοιχα ύψη των κορυφών των ανεκχύλιστων προτύπων μιγμάτων των ανωτέρω μεταβολιτών στις αυτές συγκεντρώσεις για κάθε ένα μεταβολίτη.

2.1.5.3. Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με σκοπό την εξασφάλιση της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των λόγων του ύψους της χρωματογραφικής κορυφής των υπό εξέταση ουσιών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου, αφενός, και των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων των ανωτέρω μεταβολιτών σε ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών (spiked urine samples). Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, και 200 μM παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με πρότυπα μίγματα των 5 μεταβολιτών στις ανωτέρω συγκεντρώσεις και περαιτέρω προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Τα δείγματα βαθμονόμησης εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Μετά το πέρας της ανάλυσης, οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με τη χρήση της μεθόδου της γραμμικής παλινδρόμησης.

2.1.5.4. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα (accuracy and precision) της μεθόδου παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου ποιότητας με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο διάλυμα αποτελούμενο από τους πέντε υπό εξέταση μεταβολίτες και του εσωτερικού προτύπου σε χαμηλές (15 μM), ενδιάμεσες (75 μM) και υψηλές (150 μM) συγκεντρώσεις για κάθε μεταβολίτη. Η εντός σειράς (intra-day) και μεταξύ σειρών (inter-day) ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκαν με την χρωματογραφική ανάλυση 6 ταυτόσημων δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου για κάθε συγκέντρωση των

μεταβολιτών και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον Πίνακα 9. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε δείγμα ποιοτικού ελέγχου επαναπροσδιορίστηκε μέσω των εξισώσεων των αντίστοιχων ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης. Οι κατ' αυτόν τον τρόπο υπολογισθείσες συγκεντρώσεις χρησίμευσαν για τον υπολογισμό των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης των οποίων η ακρίβεια και επαναληψιμότητα εμφανίζονται στον Πίνακα 10.

2.1.5.5. Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation, LOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (Limit of Detection, LOD)

Το LOQ της μεθόδου καθορίστηκε ως η ελάχιστη ποσότητα των μεταβολιτών της καφεΐνης η οποία είναι δυνατόν να προσδιοριστεί σε ένα δείγμα ούρων με ακρίβεια και επαναληψιμότητα μεγαλύτερη του 85%. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα των 5 μεταβολιτών της καφεΐνης σε ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών σε διαδοχικά μειούμενες συγκεντρώσεις και έγιναν 5 αναλύσεις για κάθε αραιώση. Οι συγκεντρώσεις αυτές επαναπροσδιορίστηκαν από τις πρότυπες καμπύλες των μεταβολιτών. Το LOD της μεθόδου, το οποίο ορίζεται ως το τριπλάσιο του λόγου του ηλεκτρονικού σήματος, δηλαδή του ύψους της κορυφής των μεταβολιτών προς τον ηλεκτρονικό θόρυβο, ο οποίος υπολογίζεται με το ύψος των παρακείμενων διαταραχών της βασικής γραμμής του χρωματογραφήματος, προσδιορίστηκε με την έγχυση προτύπων διαλυμάτων μίγματος των 5 μεταβολιτών τα οποία υπέστησαν διαδοχικές αραιώσεις.

2.1.6. Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 125 υγιείς εθελοντές και 342 ασθενείς πάσχοντες από διάφορων τύπων ηπατικά νοσήματα οι οποίοι παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ηπατολογικό ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Οι υγιείς εθελοντές ήταν φοιτητές και εργαζόμενοι στον χώρο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, εργαζόμενοι στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας καθώς και άτομα του φιλικού περιβάλλοντος. Έγινε προσπάθεια για τυχαιοποίηση του δείγματος καθώς συμπεριλήφθηκαν εθελοντές διάφορων επαγγελμάτων με ευρύ φάσμα ηλικιών. Κανείς από τους υγιείς εθελοντές δεν είχε ιστορικό ηπατικής νόσου και δεν ελάμβανε κάποια φαρμακευτική αγωγή ενώ η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών ήταν σποραδική και ποτέ μεγαλύτερη των 3 εβδομαδιαίως. Οι υγιείς εθελοντές δεν ρωτήθηκαν για το εμβόλιο έναντι του ιού της

ηπατίτιδας Β. Καμμία από τις συμμετέχουσες γυναίκες δεν ελάμβανε από του στόματος αντισυλληπτικά ενώ εξαιρέθηκαν από τη μελέτη εθελοντές με πρόσφατη γαστρεντερική αιμορραγία, νεφρική ανεπάρκεια ή σοβαρά καρδιολογικά προβλήματα.

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα Β διαιρέθηκαν σε 3 ομάδες:

α) ανενεργοί φορείς, με φυσιολογικές τιμές αμινοτρανσφερασών 6 μήνες, τουλάχιστον, πριν την εισδοχή στη μελέτη (n=47),

β) ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β, ιστολογικώς, ιολογικώς ή βιοχημικώς αποδεδειγμένη (n=29) και

γ) ασθενείς με κίρρωση οφειλόμενη σε μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας Β, διαπιστωμένη κλινικώς ή μέσω βιοψίας (n=50).

Οι ασθενείς με ηπατίτιδα C διαιρέθηκαν σε 3, επίσης, ομάδες:

α) ασθενείς πάσχοντες από ηπατίτιδα C με φυσιολογικές τιμές αμινοτρανσφερασών 6 μήνες, τουλάχιστον, πριν την εισδοχή στη μελέτη (n=9),

β) ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ιστολογικώς, ιολογικώς ή βιοχημικώς αποδεδειγμένη (n=27) και

γ) ασθενείς με κίρρωση οφειλόμενη σε μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C, διαπιστωμένη κλινικώς ή με βιοψία (n=20).

Οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια διαιρέθηκαν σε 2 ομάδες:

α) ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση (ΑΗΧΚ, n=26) και

β) ασθενείς με κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας (n=22) εκ των οποίων οι 9 είχαν κλινικώς διαπιστωμένη κίρρωση με την ύπαρξη ασκίτη ή/και κίρροραγια ενώ οι υπόλοιποι είχαν κίρρωση διαπιστωμένη μέσω βιοψίας. Οι ασθενείς αυτοί απείχαν από την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών για, τουλάχιστον, 3 εβδομάδες πριν την είσοδο στη μελέτη. Οι ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση (Primary Billiary Cirrhosis, PBC, n=35) και Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (Autoimmune Hepatitis, AH, n=30) πληρούσαν τα κλινικά, βιοχημικά και ανοσολογικά κριτήρια για μία οριστική διάγνωση της νόσου. Στη μελέτη συμμετείχαν επίσης και 17 ασθενείς με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα (Primary Sclerosing Cholangiitis, PSC) και 30 ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non-alcoholic Steato-hepatitis, NASH).

Τα δημογραφικά στοιχεία των υγιών και ασθενών εθελοντών εμφανίζονται στον Πίνακα 5 και οι συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος των ασθενών εθελοντών στον Πίνακα 6. Ο δείκτης σωματικής μάζας (Body Mass Index, BMI) ορίζεται ως το πηλίκον του βάρους του σώματος, σε χιλιόγραμμα, προς το ύψος, σε μέτρα, υψωμένο στο τετράγωνο ($BMI = \text{kg/m}^2$) [239] και είναι ένα μέτρο της

σωματικής διάπλασης. Άλλα μέτρα της σωματικής διάπλασης είναι το κλάσμα της περιφέρειας της μέσης προς την περιφέρεια των ισχίων (Waist-to-Hip ratio, WHR) καθώς και η περιφέρεια της μέσης (Waist Circumference, WC). Παρόλο που φαίνεται ότι η περιφέρεια της μέσης είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης της κατανομής του λιπώδους ιστού στην περιοχή της κοιλιάς, εντούτοις όλα τα παραπάνω μεγέθη σχετίζονται σημαντικά με την κατανομή του σωματικού λίπους [240]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο BMI καθώς δεν έγιναν μετρήσεις της περιφέρειας της μέσης και του ισχίου. Όλοι οι εθελοντές οι οποίοι συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη παρείχαν την προφορική συγκατάθεσή τους. Όλοι οι εθελοντές απείχαν από την κατανάλωση τροφών και ποτών τα οποία περιέχουν μεθυλοξανθίνες για, τουλάχιστον, 30 ώρες πριν την δοκιμασία και κατά την διάρκεια αυτής. Επίσης, έγινε διακοπή τροφών όπως τα σταυρανθή λαχανικά (κουνουπίδι, μπρόκολο, λάχανο), του χυμού γκρέϊπ-φρουτ και των αλκοολούχων ποτών τα οποία επιδρούν στη λειτουργία του CYP1A2. Όλοι οι εθελοντές διέκοψαν, επίσης, τυχόν φαρμακευτική αγωγή που ελάμβαναν, όπου αυτό ήταν δυνατόν, 48 ώρες πριν την δοκιμασία, ελέγχθηκαν για φάρμακα που επάγουν ή αναστέλλουν την λειτουργία του CYP1A2 και, οπωσδήποτε, απείχαν από την λήψη παρακεταμόλης. Το πρωί της ημέρας της δοκιμασίας, μετά την έγερση και μετά την κένωση της ουροδόχου κύστης, οι εθελοντές κατανάλωσαν μία κάψουλα ζελατίνης η οποία περιείχε 200 mg καφεΐνης (Fluka, Ελβετία). Οι κάψουλες δεν περιείχαν λακτόζη και η συσκευασία τους έγινε από εντεταλμένο φαρμακοποιό. Μετά την πάροδο 6 ωρών, συλλέχτηκαν μεμονωμένα δείγματα ούρων σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες οι οποίοι περιείχαν 200 ml υδροχλωρικού οξέος 6N. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο όπου το pH τους ρυθμίστηκε στην τιμή 3,5 με σκοπό την εξασφάλιση της σταθερότητας του AFMU [241]. Κατόπιν αναδέυσεως, ποσότητα 10 ml από τα ούρα αυτά επιμερίστηκε σε ποσότητες του 1 ml και αποθηκεύτηκε στους -20° C έως ότου αναλυθεί.

2.1.7. Αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας .

Η αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας, σε βάθος χρόνου, προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου μία φορά εβδομαδιαίως, για 10 συνεχόμενες εβδομάδες, σε ομάδα υγιών εθελοντών αποτελούμενη από 3 άνδρες και 3 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εκ των οποίων κανείς δεν ήταν καπνιστής. Ένας άνδρας εθελοντής συμμορφώθηκε με τη διαδικασία για 8 συνεχόμενες εβδομάδες. Η φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου δεν ελέγχθηκε στις γυναίκες εθελόντριες καθώς ο παράγων

αυτός δεν αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, XO και NAT-2 [66]. Η δραστικότητα του ενζύμου CYP1A2 προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U, του CYP2A6 μέσω των μεταβολικών λόγων 17U/17X και 17U/(17U+17X), της XO μέσω των μεταβολικών λόγων 1U/1X και 1U/(1U+1X) και της NAT-2 μέσω των μεταβολικών λόγων AFMU/1X και AFMU/(AFMU+1U+1X). Στην περίπτωση των τριών τελευταίων ενζύμων, οι μεταβολικοί λόγοι με την μικρότερη διακύμανση σε βάθος χρόνου χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια της μελέτης.

2.1.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS 9.0. Οι ηλικίες, ο δείκτης σωματικής μάζας καθώς και τα αποτελέσματα των συνήθων βιοχημικών εξετάσεων των εθελοντών εκφράστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση. Οι τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης εκφράστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση συνοδευόμενες από τον ενδιάμεσο και το εύρος. Η επίδραση της ηλικίας, του φύλου, του καπνίσματος και του δείκτη σωματικής μάζας στις τιμές των μεταβολικών λόγων διερευνήθηκε με την χρήση της στατιστικής δοκιμασίας της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης με την χρήση του υποπρογράμματος του ανωτέρω λογισμικού «Univariate-General Linear Model» στο οποίο ως εξαρτημένη μεταβλητή τοποθετήθηκε, κατά περίπτωση, ο φυσικός λογάριθμος ή η αμετάτρεπτη τιμή του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου και ως συμπαράγοντες (covariates) το φύλο (0 για τις γυναίκες, 1 για τους άνδρες), η ηλικία (απόλυτες τιμές) και το κάπνισμα (0 για τους μη καπνίζοντες, 1 για τους καπνίζοντες). Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε ένα κατ' επιλογήν (custom) μοντέλο ανάλυσης στο οποίο, επιπροσθέτως, ελήφθησαν υπόψη και όλες οι πιθανές, ανά δύο, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων.

Οι διαφορές των μέσων τιμών των μεταβολικών λόγων μεταξύ των διαφόρων ομάδων των συμμετεχόντων ελέγχθηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (Univariate Analysis of Variance) ακολουθούμενης από τη διόρθωση Bonferoni για πολλαπλές συγκρίσεις, εκεί όπου ανέκυπτε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η ανωτέρω ανάλυση εφαρμόστηκε στις περιπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες πληρούντο οι συνθήκες της κανονικότητας και των ίσων διασπορών μεταξύ των υπό σύγκριση ομάδων. Στην περίπτωση κατά την οποία κάποια από τις δύο αυτές συνθήκες δεν ίσχυε, τότε οι διαφορές των μεταβολικών λόγων μεταξύ των ομάδων

ελέγχθηκαν με την σύγκριση των ενδιάμεσων (median) τιμών των μεταβολικών λόγων μέσω της μη παραμετρικής δοκιμασίας Kruskal-Wallis ακολουθούμενης από την δοκιμασία Mann-Whitney για τις ανά δύο συγκρίσεις μεταξύ των υποομάδων [242].

Η ευαισθησία μίας μεθόδου στην ανίχνευση πιθανής νόσου είναι το μέτρο της επίπτωσης των θετικών αποτελεσμάτων σε άτομα που είναι γνωστό ότι είναι ασθενείς, είναι δηλαδή «αληθώς θετικά» και η ειδικότητα είναι το μέτρο της επίπτωσης των αρνητικών αποτελεσμάτων σε άτομα που είναι γνωστό ότι δεν πάσχουν, είναι δηλαδή «αληθώς αρνητικά». Η ευαισθησία εκφράζεται με το λόγο $A\Theta/(A\Theta+\Psi A)$ και η ειδικότητα με τον λόγο $AA/(AA+\Psi\Theta)$, όπου ο όρος $A\Theta$ υποδηλώνει τα αληθώς θετικά αποτελέσματα, ο όρος ΨA τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ο όρος AA τα αληθώς αρνητικά αποτελέσματα και ο όρος $\Psi\Theta$ τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, με βάση μία τιμή της δοκιμασίας η οποία καθορίζεται ως η οριακή τιμή διάγνωσης. Στην παρούσα μελέτη, ως δείκτης της ηπατικής λειτουργίας, επιλέχθηκε η δραστηριότητα του CYP1A2, ως το πλέον ειδικό ένζυμο του ήπατος, και η οριακή τιμή διάγνωσης της ηπατικής νόσου καθορίστηκε ως η διαφορά της μέσης τιμής του φυσικού λογαρίθμου των τιμών του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ των υγιών εθελοντών και της τυπικής απόκλισης των τιμών αυτών (Mean-1SD) [195]. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για την διάκριση των καταστάσεων της υγείας και της ασθένειας καθώς και οι τιμές αναφοράς ελέγχθηκαν, επίσης, με την δοκιμασία της ανάλυσης καμπύλης ROC (Receiver Operating Characteristics). Η ανάλυση αυτή συνίσταται στην εφαρμογή κάποιας διαγνωστικής δοκιμασίας σε αριθμό ατόμων που πάσχουν από κάποια ασθένεια και σε άτομα που δεν πάσχουν. Στην συνέχεια επιλέγονται διάφορες οριακές τιμές για να διαχωριστεί η ύπαρξη ή η απουσία της ασθένειας και, με βάση αυτές, υπολογίζονται τα αληθώς θετικά καθώς και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η γραφική παράσταση των δεδομένων αυτών αποτελεί την καμπύλη ROC η οποία απεικονίζει την διαπραγμάτευση (tradeoff) μεταξύ της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης (η μία αυξάνεται εις βάρος της άλλης) [157].

Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ και των τιμών των συμβατικών λειτουργικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας των ασθενών έγιναν με την δοκιμασία Pearson.

Η κανονικότητα των κατανομών των τιμών των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης ελέγχθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov Z test.

Ο έλεγχος της διαφοράς των ποσοστών, για διάφορα μεγέθη, μεταξύ των

διαφόρων ομάδων των εθελοντών έγινε είτε με την δοκιμασία χ^2 είτε με την δοκιμασία Z.

Οι διαφορές και οι συσχετίσεις θεωρήθηκαν σημαντικές για επίπεδο σημαντικότητας μικρότερο του 5%.

Πίνακας 5. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών και ασθενών εθελοντών

	Αριθμός ατόμων	Φύλο(Α/Γ)	Ηλικία ΜΤ±ΤΑ Εύρος	BMI (kg/m ²) ΜΤ±ΤΑ	Μη καπνιστές/ καπνιστές
Υγιείς	125	51/74	40,5±14,3 19-78	25,7±3,9	82/43
HBV κίρρωση	50	41/9	59,9±9,3 33-80	26,8±4,5	42/8
Χρόνια HBV	29	18/11	54,1±14,8 18-75	26,6±4,6	21/8
Ανενεργοί φορείς HBV	47	29/18	50,8±12,1 20-67	27,3±3,2	30/17
HCV κίρρωση	20	12/8	57,3±14,8 32-78	25,9±4,8	14/6
HCV χρόνια	36	22/14	45,0±14,4 19-76	25,4±3,7	17/19
Αλκοολική κίρρωση	22	21/1	60,2±10,6 39-80	27,0±3,6	10/12
Αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση (Α.Η.Χ.Κ)	26	25/1	49,4±11,8 22-69	27,1±3,8	11/15
Αυτοάνοσα χολοστατικά ηπατικά νοσήματα (ACLD)	52	16/36	53,3±11,9 31-76	26,4±3,7	39/13
Αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ)	30	7/23	56,6±14,7 20-76	26,3±3,7	27/3
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH)	30	14/16	45,9±11,6 22-65	27,8±3,7	22/8
Σύνολο ασθενών	342	205/137	53,1±13,3 18-80	26,5±3,8	233/109

ΜΤ±ΤΑ=Μέση Τιμή±Τυπική Απόκλιση, BMI=Δείκτης Σωματικής Μάζας

2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1. Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης

Με βάση τις χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός και ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός των υπό εξέταση μεταβολιτών της καφεΐνης (AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X) και του εσωτερικού προτύπου κατά τη διάρκεια μίας μεμονωμένης χρωματογραφικής ανάλυσης (single run) χωρίς παρεμβολές από την καφεΐνη, τους κύριους και δευτερεύοντες μεταβολίτες της ή από διάφορα συστατικά του βιολογικού υποστρώματος των ούρων (Εικόνες 6A και 6B). Η διαδικασία της βηματικής βαθμιδωτής έκλουσης, με την χρήση δύο διαλυτών με διαφορετική ισχύ έκλουσης (Πίνακας 4) επέτρεψε τον επαρκή διαχωρισμό των μεταβολιτών μέσω ενός συστήματος RP-HPLC χαμηλού κόστους. Η σύσταση του διαλύτη A βελτιστοποιήθηκε με αποτέλεσμα οι συντελεστές διαχωρισμού (resolution factors) των 5 υπό εξέταση μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου να κυμαίνονται από 1,48 έως 6,31 (Πίνακας 7) οι οποίοι, συγκρινόμενοι με τον ελάχιστο για επαρκή ποσοτικό προσδιορισμό συντελεστή 1,25, επισημαίνουν τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των ανωτέρω ουσιών [227]. Στο χρονικό σημείο των 5' από την έναρξη της χρωματογραφικής ανάλυσης η ταχύτητα ροής προσαρμόστηκε από 0,7 ml/min στα 1,1 ml/min με αποτέλεσμα οι πέντε υπόψη μεταβολίτες της καφεΐνης (AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X) να εκλουσθούν σε 15', κατά προσέγγιση. Στο χρονικό σημείο των 15' χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης B προκειμένου να εκλουσθούν οι λιγότερο πολικές ουσίες 137U και καφεΐνη ενώ στο χρονικό σημείο των 19' η ταχύτητα ροής επαναπροσαρμόστηκε σε 0,7 ml/min (Εικόνα 6A, Πίνακας 4). Κατά τη διάρκεια των συνήθων αναλύσεων των δειγμάτων ούρων, όμως, η χρήση του διαλύτη B είναι δυνατόν να παραλειφθεί καθώς το 137U και η καφεΐνη καθεαυτή δεν χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό της τιμής των, ανωτέρω αναφερθέντων, μεταβολικών λόγων. Στην περίπτωση αυτή, μετά την έκλουση της 17X και πριν την ανάλυση του επομένου δείγματος, η στήλη εκπλύνεται με την έγχυση 3×20 μl ακετονιτριλίου 100%. Κατά προσέγγιση, απαιτούνται 20' για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό όλων των μεταβολιτών της καφεΐνης καθώς και της ίδιας της καφεΐνης. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα ενός δείγματος ούρων ελεύθερου από μεθυλοξανθίνες, ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων ενός υγιούς ατόμου και ενός ασθενούς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, 6 ώρες μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης εμφανίζονται στην Εικόνα 6B, Γ και Δ, αντίστοιχα. Στο χρωματογράφημα της πρώτης περίπτωσης εμφανίζονται κάποιες ελάσσονες διαταραχές της βασικής

γραμμής, προερχόμενες από το βιολογικό υπόστρωμα των ούρων (Εικόνα 6B), οι οποίες, ωστόσο, δεν παρεμβάλλονται στην έκλυση κανενός από τους 5 υπόψη μεταβολίτες και του εσωτερικού προτύπου.

Η μέση απόλυτη ανάκτηση των 5 μεταβολιτών στις διάφορες εξετασθείσες συγκεντρώσεις ήταν 73,6%, 65,2%, 94,3%, 91,7%, και 97,5% για τους AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X, αντίστοιχα, ενώ η μέση ανάκτηση του εσωτερικού προτύπου ήταν 91,6%.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης των ανωτέρω μεταβολιτών ήταν γραμμικές σε εύρος συγκεντρώσεων από 0-200 μM και οι συντελεστές της γραμμικής παλινδρόμησης (R^2) ήταν μεγαλύτεροι από 0,9989 (Πίνακας 8).

Τα αποτελέσματα της εντός σειράς ($n=6$) και μεταξύ σειρών ($n=6$) πιστοποίησης της μεθόδου απεικονίζονται στον Πίνακα 9. Η μέθοδος εμφάνισε εντός σειράς συντελεστή μεταβλητότητας μικρότερο του 8,02% ενώ ο αντίστοιχος συντελεστής για την μεταξύ σειρών επαναληψιμότητα ήταν μικρότερος του 8,78%. Οι τιμές της ακρίβειας της μεθόδου, όσον αφορά στην μέτρηση των 5 μεταβολιτών σε όλες τις εξετασθείσες συγκεντρώσεις, κυμάνθηκε από 94,1% έως 106,3%.

Η συνολική εντός σειράς και μεταξύ σειρών ακρίβεια των τιμών των μεταβολικών λόγων $(\text{AFMU}+1\text{X}+1\text{U})/17\text{U}$, $17\text{U}/17\text{X}$, $1\text{U}/(1\text{U}+1\text{X})$ και $\text{AFMU}/(\text{AFMU}+1\text{U}+1\text{X})$, όπως αυτές υπολογίσθηκαν από την ανάλυση των δειγμάτων ούρων ποιοτικού ελέγχου, κυμάνθηκε από 99,0% έως 105,0% με συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ 0,77% και 9,66% (Πίνακας 10).

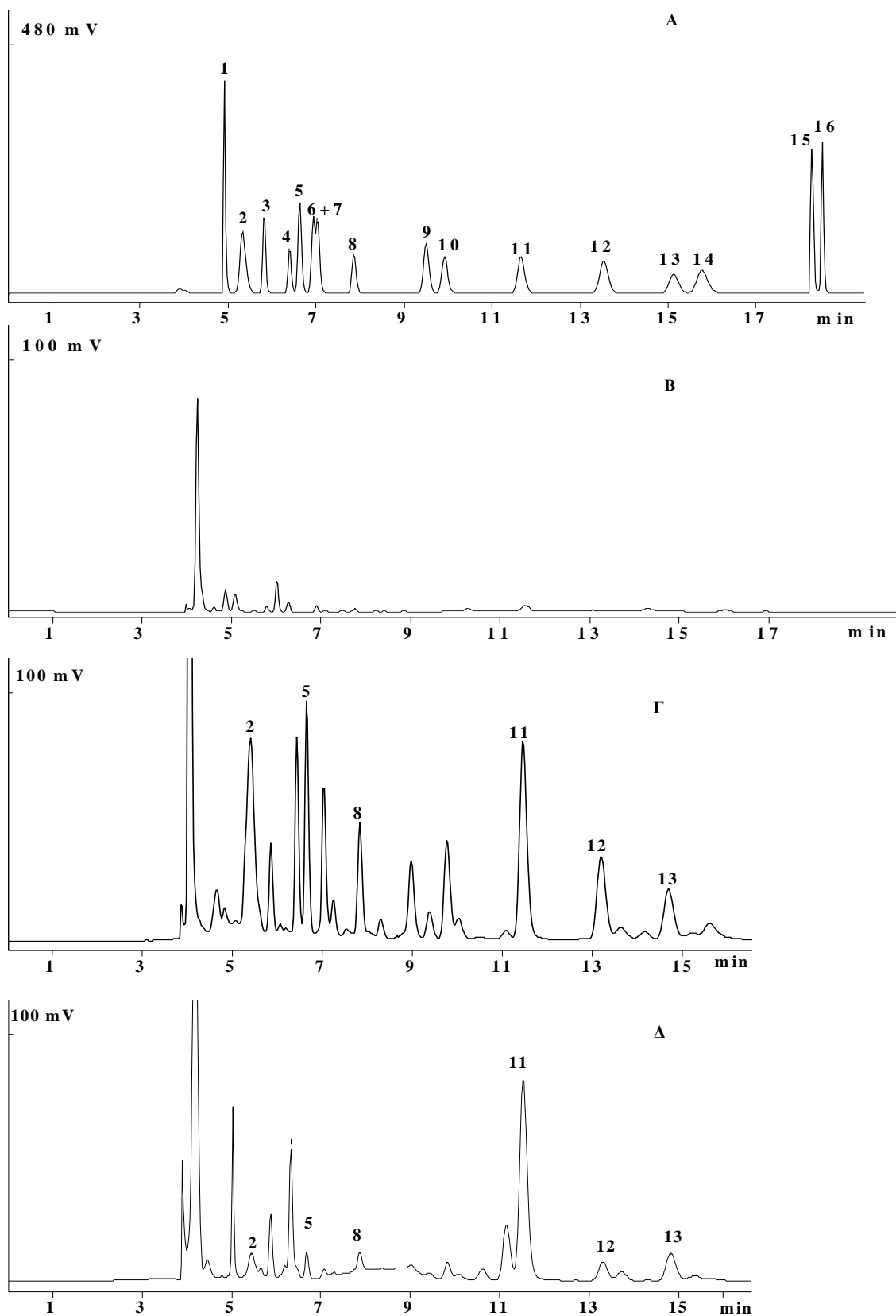
Το όριο ανιχνευσιμότητας προσδιορίστηκε ως 0,08 μM , 0,03 μM , 0,09 μM , 0,10 μM , και 0,17 μM για τους AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X, αντίστοιχα, ενώ το όριο ποσοτικού προσδιορισμού προσδιορίστηκε στα 5 μM για τους 5 ανωτέρω μεταβολίτες με ακρίβεια μεγαλύτερη του 86% και συντελεστή μεταβλητότητας μικρότερο του 5%, μετά από 5 διαδοχικούς προσδιορισμούς [39].

Πίνακας 7. Χρόνοι κατακράτησης και συντελεστές διαχωρισμού της καφεΐνης (137X), των 14 μεταβολιτών της και του εσωτερικού προτύπου (I.S.).

A/A	Μεταβολίτης	Χρόνος κατακράτησης (min)	Συντελεστής διαχωρισμού (μεταξύ n, n+1 κορυφών)
1	3U	4,89	2,51
2	AFMU	5,31	2,48
3	7U	5,79	4,37
4	7X	6,37	1,59
5	1U	6,60	1,90
6+7	3X+37U	6,91+7,01	4,53
8	1X	7,82	7,88
9	13U	9,45	1,76
10	37X	9,88	6,31
11	I.S.	11,60	5,62
12	17U	13,45	4,12
13	17X	15,03	1,48
14	13X	15,66	9,34
15	137U	18,35	2,30
16	137X	18,61	---

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης για τους 5 κύριους μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα.

Εξίσωση ελαχίστων τετραγώνων $\psi = \alpha + \beta\chi$				
	Καμπύλη	R ²	α	β
1	AFMU	0,9997	0,0118	0,0117
2	1U	0,9995	0,0409	0,0096
3	1X	0,9997	0,0109	0,0049
4	17U	0,9994	0,0034	0,0047
5	17X	0,9989	0,0167	0,0026



Εικόνα 6. Χρωματογραφήματα HPLC: Α: πρότυπο μίγμα της καφεΐνης, 14 μεταβολιτών της (100 μM) και του εσωτερικού προτύπου. Β: ούρα υγιούς ατόμου ελεύθερα μεθυλοξανθινών. Γ: δείγμα ούρων υγιούς ατόμου 6 ώρες μετά από την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης. Δ: δείγμα ούρων ατόμου με μη αντιρροπούμενη κίρρωση. **1, 3U; 2, AFMU; 3, 7U; 4, 7X; 5, 1U; 6, 3X; 7, 37U; 8, 1X; 9, 13U; 10, 37X; 11, IS; 12, 17U; 13, 17X; 14, 13X; 15, 137U; 16, Καφεΐνη (137X).**

2.2.2. Αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας

Κατά την διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων ούρων των υγιών και των ασθενών εθελοντών κατασκευάζονταν καμπύλες βαθμονόμησης, με εύρος συγκεντρώσεων 0-200 μM , στην αρχή και στο τέλος των αναλύσεων κάθε σειράς 30 δειγμάτων, ενώ μετρήσεις δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου σε χαμηλές (15 μM) και υψηλές (150 μM) συγκεντρώσεις πραγματοποιούνταν καθημερινά. Οι μέσες συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου χαμηλής συγκέντρωσης ήταν 15,33 μM , 16,10 μM , 15,55 μM , 15,45 μM και 15,22 μM με μεταβλητότητα μεταξύ των ημερών 6,71%, 6,52%, 5,98%, 6,63% και 6,55% για τους μεταβολίτες AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X, αντίστοιχα. Οι μέσες συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης ήταν 144,94 μM , 143,57 μM , 144,88 μM , 151,89 μM και 147,21 μM με μεταβλητότητα μεταξύ των ημερών 6,06%, 5,67%, 2,99%, 3,86% και 2,49% για τους AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X, αντίστοιχα (n=30).

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της δοκιμασίας της καφεΐνης σε 6 υγιείς εθελοντές κατά την διάρκεια των 10 διαδοχικών εβδομάδων παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Από τα αποτελέσματα αυτά γίνεται φανερό ότι οι μέσες διακυμάνσεις των μεταβολικών λόγων $17\text{U}/(17\text{U}+17\text{X})$, $1\text{U}/(1\text{U}+1\text{X})$ και $\text{AFMU}/(\text{AFMU}+1\text{U}+1\text{X})$ είναι μικρότερες των μέσων διακυμάνσεων των εναλλακτικών λόγων $17\text{U}/17\text{X}$, $1\text{U}/1\text{X}$ και $\text{AFMU}/1\text{X}$ και, συνεπώς, προτιμήθηκαν στην συνέχεια της μελέτης, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των CYP2A6, XO και NAT-2, αντίστοιχα.

2.2.3. Κατανομή των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης σε υγιείς και ασθενείς

Η κατανομή συχνοτήτων του φυσικού λογαρίθμου των τιμών του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$, αντιπροσωπευτικού της δραστικότητας του CYP1A2, προσέγγισε την κανονική, τόσο για τους υγιείς όσο και τους ασθενείς εθελοντές, καθώς η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας δεν απορρίφθηκε από τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov ($p=0,073$ και $p=0,089$, αντίστοιχα) (Εικόνα 7Α).

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $17U/(17U+17X)$, αντιπροσωπευτικού της δραστικότητας του CYP2A6, ήταν, παρομοίως, κανονική τόσο για τους 125 υγιείς όσο και για τους 342 ασθενείς (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,499$ και $p=0,846$, αντίστοιχα) (Εικόνα 7Β).

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$, αντιπροσωπευτικού της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης, παρουσίασε κανονικότητα στους υγιείς (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,385$), ενώ στους ασθενείς, παρόλο που η κατανομή ήταν μονοκόρυφη, η κανονικότητα απορρίφθηκε τόσο για τις αμετάτρεπτες τιμές του λόγου όσο και για τον φυσικό λογάριθμο των τιμών (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,005$ και $p=0,006$ αντίστοιχα). Όταν, όμως, αφαιρέθηκαν από το δείγμα 4 ιδιαίτερα υψηλές τιμές (1,17% του συνόλου) η κατανομή των αμετάτρεπτων τιμών του λόγου αυτού προσέγγισε την κανονική (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,099$). Οι 4 αυτές τιμές ανήκαν σε κίρρωτικούς ασθενείς, εκ των οποίων ο ένας με μη αντιροπούμενη κίρρωση (Εικόνα 7Γ).

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ παρουσίασε μία εμφανέστατα δικόρυφη κατανομή, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς διαχωρίζοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, τους δύο αυτούς πληθυσμούς σε δύο υποομάδες βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών τον καθένα (Εικόνα 7Δ). Η γραφική παράσταση της κατανομής αυτής στους υγιείς είχε μία φαινόμενη τιμή διαχωρισμού 0,22 και αποφασίστηκε ότι άτομα με τιμή του ως άνω μεταβολικού λόγου μικρότερη ή ίση του 0,22 να ταξινομηθούν ως βραδείς ακετυλιωτές ενώ άτομα με τιμές του αυτού μεταβολικού λόγου μεγαλύτερη του 0,22 να ταξινομηθούν ως ταχείς ακετυλιωτές. Το ποσοστό των πρώτων ανήλθε στο 59,2% (74/125) ενώ το ποσοστό των δευτέρων στο 40,8% (51/125) του συνόλου των υγιών εθελοντών ενώ οι επιμέρους κατανομές των δύο αυτών υποομάδων ήταν κανονικές (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,101$ και $p=0,486$ αντίστοιχα).

Η γραφική παράσταση της κατανομής των τιμών του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ στους ασθενείς παρουσίασε μία φαινόμενη περιοχή

διαχωρισμού στην ίδια, κατά προσέγγιση, περιοχή τιμών με αυτή των υγιών με συνέπεια η τιμή 0,22 να αποτελέσει το όριο του διαχωρισμού των βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών και στους ασθενείς. Στην περίπτωση αυτή η κατανομή συχνοτήτων των βραδέων ακετυλιωτών δεν ήταν κανονική (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,013$), ενώ η λογαριθμική τροποποίηση των τιμών αυτών προσέγγισε την κανονικότητα (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,396$) με το 57,0% (195/342) των ασθενών να χαρακτηρίζονται ως βραδείς ακετυλιωτές. Η κατανομή συχνοτήτων, αντίθετα, των τιμών του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ στους ταχείς ακετυλιωτές ήταν κανονική, χωρίς λογαριθμική τροποποίηση (Kolmogorov-Smirnov Z test, $p=0,058$) με το 43,0% (147/342) των ασθενών να χαρακτηρίζονται ως ταχείς ακετυλιωτές. Τα ποσοστά αυτά δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά με τα αντίστοιχα των υγιών (χ^2 test, $p=0,751$).

2.2.4. Συσχέτιση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης και των συμβατικών λειτουργικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας στους ασθενείς (LFTs)

Η συσχέτιση μεταξύ του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ και των συμβατικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας των ηπατοπαθών εμφανίζεται στον Πίνακα 12. Ο φυσικός λογάριθμος του λόγου αυτού παρουσίασε μικρού βαθμού, πλην όμως στατιστικώς σημαντική, θετική συσχέτιση με τις τιμές της αλβουμίνης στους κίρρωτικούς καθώς και σημαντική θετική συσχέτιση στο σύνολο των ασθενών με συντελεστές Pearson 0,199 ($p=0,040$) και 0,200 ($p<0,001$), αντίστοιχα. Ο ίδιος λόγος παρουσίασε της αυτής τάξης μεγέθους αρνητική συσχέτιση με τις τιμές του INR στους κίρρωτικούς και στο σύνολο των ασθενών με συντελεστές Pearson -0,193 ($p=0,045$) και -0,230 ($p<0,001$), αντίστοιχα. Ο δείκτης INR μετρά την εξωτερική οδό της πήξης του αίματος και επινοήθηκε ως εναλλακτική μέτρηση για τον χρόνο προθρομβίνης. Ο χρόνος προθρομβίνης, ο οποίος είναι ο χρόνος της πήξης του αίματος μετά από προσθήκη ιστικού παράγοντα (παράγοντας III ή θρομβοπλαστίνη) και ιόντων ασβεστίου, μετρά την συνδυασμένη δράση των παραγόντων της πήξης II (προθρομβίνη), V, VII, X και του ινωδογόνου οι οποίοι παράγονται στο ήπαρ [243]. Το INR είναι ο λόγος του χρόνου προθρομβίνης του δείγματος του ασθενούς προς ένα δείγμα ελέγχου, υψωμένο στη δύναμη της τιμής ISI (International Sensitivity Index), για το δείγμα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε [$INR=(PT_{patient}/PT_{normal})^{ISI}$]. Κάθε κατασκευαστής δίνει την τιμή ISI για τον ιστικό παράγοντα που κατασκευάζει και η τιμή αυτή υποδηλώνει την

σύγκριση της συγκεκριμένης παρτίδας του ιστικού παράγοντα με ένα διεθνώς προτυποποιημένο από την WHO δείγμα. Οι τιμές του ISI κυμαίνονται από 1,0-1,4 εξαιτίας των διαφορών μεταξύ των διαφόρων παρτίδων και των διαφορετικών κατασκευαστών του ιστικού παράγοντα και κατά συνέπεια το INR επινοήθηκε για να προτυποποιήσει τα αποτελέσματα [244, 245].

Της αυτής τάξης μεγέθους συσχέτιση παρατηρήθηκε και με την ολική χολερυθρίνη όπου προσδιορίστηκαν, για μεν τους κίρρωτικούς, οριακά σημαντική συσχέτιση με συντελεστή Pearson $-0,186$ ($p=0,053$) και για το σύνολο των ασθενών με συντελεστή Pearson $-0,174$ ($p=0,001$). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση του λόγου αυτού με την αιμοσφαιρίνη τόσο στους κίρρωτικούς όσο και στους μη κίρρωτικούς ασθενείς καθώς και στο σύνολο των ασθενών με συντελεστές Pearson $0,280$ ($p=0,003$), $0,220$ ($p<0,001$) και $0,278$ ($p<0,001$), αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ανωτέρω λογαρίθμου και των τιμών της ουρίας, της συνολικής πρωτεΐνης, της αμινοτρανφεράσης της αλανίνης, της αμινοτρανφεράσης του ασπαραγινικού, της αλκαλικής φωσφατάσης και της γ -γλουταμυλ-τρανφεράσης στις ανωτέρω ομάδες των ασθενών.

Ο μεταβολικός λόγος $1U/(1U+1X)$ παρουσίασε μικρού βαθμού, αλλά στατιστικώς σημαντική, θετική συσχέτιση με τις τιμές της ουρίας με συντελεστές Pearson $0,242$ ($p=0,012$), $0,152$ ($p=0,024$) και $0,204$ ($p<0,001$) στους κίρρωτικούς, στους μη κίρρωτικούς και στο σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα. Ο ίδιος λόγος παρουσίασε μικρού βαθμού αρνητική συσχέτιση με τις τιμές της αλβουμίνης με συντελεστές Pearson $r=-0,173$ ($p=0,011$) και $r=-0,155$ ($p=0,005$) στους μη κίρρωτικούς και στο σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές συσχετίσεις του ανωτέρω λόγου με τις υπόλοιπες βιοχημικές δοκιμασίες των ηπατοπαθών. Δεν παρατηρήθηκαν, επίσης, σημαντικές συσχετίσεις των μεταβολικών λόγων των αφορώντων στην λειτουργία του CYP2A6 και της NAT-2 με κάποια βιοχημική παράμετρο των ασθενών, επιβεβαιώνοντας την ιστική εξειδίκευση της μεθόδου της δοκιμασίας της καφεΐνης για τη λειτουργικότητα του ήπατος CYP1A2.

	Κίρρωτικοί (n=109)	Μη κίρρωτικοί (n=233)	Σύνολο (n=342)
--	---------------------------	------------------------------	-----------------------

Δοκιμασία	Συν/στής Pearson (r)	p	Συν/στής Pearson (r)	p	Συν/στής Pearson (r)	p
INR	-0,193	0,045	-0,109	0,111	-0,230	<0,001
Αλβουμίνη	0,199	0,040	0,057	0,402	0,200	<0,001
Ολική χολερυθρίνη	-0,186	0,053	-0,005	0,941	-0,174	0,001
Λευκά αιμοσφαίρια	0,180	0,063	0,168	0,011	0,214	<0,001
Αιμοσφαιρίνη	0,280	0,003	0,222	<0,001	0,278	<0,001
Αιμοπετάλια	0,246	0,010	0,034	0,617	0,236	<0,001
Ουρία	0,080	0,405	0,004	0,955	0,013	0,817
AST	0,074	0,447	-0,072	0,284	-0,041	0,461
ALT	0,149	0,126	0,069	0,302	0,057	0,300
ALP	-0,074	0,449	0,058	0,390	-0,011	0,845
γ-GT	-0,068	0,482	-0,029	0,664	-0,061	0,267

Πίνακας 12. Συσχέτιση μεταξύ του $\ln[(AFMU+1U+1X)/17U]$ και των συμβατικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας (LFTs) στους ηπατοπαθείς.

2.2.5. Επίδραση της ηλικίας, του φύλου, του καπνίσματος και του δείκτη σωματικής μάζας (BMI) στη δραστηριότητα των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης για τα CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Δεν ανέκυψε στατιστικώς σημαντική επίδραση του φύλου, της ηλικίας ή του δείκτη σωματικής μάζας στην διακύμανση των τιμών του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$, αντιπροσωπευτικού της δραστηριότητας του CYP1A2, στο δείγμα των 125 υγιών εθελοντών που συμμετείχαν στην μελέτη. Το κάπνισμα είχε, στατιστικώς σημαντική, θετική επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2, ενώ οι ανά δύο αλληλεπιδράσεις των τεσσάρων αυτών παραγόντων δεν είχαν κάποια σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου. Κατόπιν τούτου, και με σκοπό την σύγκριση της δραστηριότητας του CYP1A2 μεταξύ υγιών και ασθενών, αποφασίστηκε να διαχωριστούν οι συμμετέχοντες στην μελέτη εθελοντές σε δύο μείζονες κατηγορίες, αυτές των μη καπνιστών και των καπνιστών. Ο διαχωρισμός αυτός επέτρεψε τον σαφέστερο προσδιορισμό της επίπτωσης της ηπατικής νόσου στην λειτουργικότητα του ήπατος καθώς το CYP1A2 εντοπίζεται αποκλειστικά στο ήπαρ και η επαγωγή του από το κάπνισμα θα επέφερε συσκότιση όσον αφορά στην εκτίμηση του λειτουργικού ενζυμικού μικροσωματικού αποθέματος κατά την ηπατική νόσο.

Όσον αφορά το CYP2A6, η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης δεν αποκάλυψε καμία στατιστικώς σημαντική επίδραση του φύλου, της ηλικίας και του δείκτη σωματικής μάζας στις τιμές του μεταβολικού λόγου $17U/(17U+17X)$, ενώ το κάπνισμα είχε στατιστικώς σημαντική αρνητική επίδραση. Η αλληλεπίδραση, ανά δύο, των τεσσάρων αυτών παραμέτρων δεν είχε καμία επίδραση στο γραμμικό μοντέλο.

Όσον αφορά την XO, η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης δεν αποκάλυψε καμία στατιστικώς σημαντική επίδραση του φύλου, της ηλικίας, του καπνίσματος, του δείκτη σωματικής μάζας και των αλληλεπιδράσεων τους στις τιμές των μεταβολικών λόγων $1U/(1U+1X)$.

Παρομοίως, η δραστηριότητα της NAT-2, προσδιορισθείσα μέσω του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$, δεν δείχθηκε να επηρεάζεται από τους παραπάνω παράγοντες και την αλληλεπίδρασή τους, τόσο στους βραδείς όσο και στους ταχείς ακετυλιωτές.

2.2.6. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα των ενζύμων

2.2.6.1. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα του CYP1A2

Η επίδραση της ηπατικής νόσου, διαφόρου αιτιολογίας, στην δραστικότητα του CYP1A2 παρουσιάζεται στον Πίνακα 14 όπου τόσο οι υγιείς όσο και οι ασθενείς έχουν διαχωριστεί σε δύο μείζονες κατηγορίες, σε σχέση με το κάπνισμα. Η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis rank test απεκάλυψε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαμέσων τιμών του μεταβολικού λόγου στις διάφορες ομάδες των εθελοντών, τόσο στους μη καπνιστές ($p < 0,001$) όσο και στους καπνιστές ($p < 0,05$). Οι επιμέρους, ανά δύο συγκρίσεις με την δοκιμασία Mann-Whitney έδειξαν ότι οι διάμεσες τιμές του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 ήταν μειωμένες στο σύνολο των ηπατοπαθών, τόσο για τους μη καπνιστές (2,56; $p < 0,001$) όσο και για τους καπνιστές (4,29; $p = 0,067$), σε σχέση με τους υγιείς μη καπνιστές (3,26) και υγιείς καπνιστές (5,28), αντίστοιχα, παρόλο που μόνον στην περίπτωση των μη καπνιστών υπήρξε στατιστική σημαντικότητα. Όσον αφορά στην κατηγορία των μη καπνιστών, η δραστικότητα του CYP1A2 ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη, σε σχέση με τους υγιείς μη καπνιστές, στους ηπατοπαθείς με ηπατίτιδα HBV αιτιολογίας (2,72; $p < 0,001$), HCV αιτιολογίας (2,23; $p < 0,001$), στο σύνολο των ασθενών ιογενούς αιτιολογίας (2,68; $p < 0,001$), στους ασθενείς αλκοολικής αιτιολογίας (2,19; $p < 0,001$), στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα (2,18; $p < 0,001$), με NASH (2,63; $p < 0,01$) και με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα (2,34; $p < 0,001$) τα οποία αποτελούνται από την PBC και PSC, καθώς και στο σύνολο των ασθενών μη ιογενούς αιτιολογίας (2,43; $p < 0,001$). Από την περαιτέρω κατάτμηση των ομάδων έγινε φανερό ότι μόνον οι κίρρωτικοί HBV αιτιολογίας (2,49; $p < 0,001$), HCV αιτιολογίας (1,93; $p < 0,001$) και αλκοολικής αιτιολογίας (1,91; $p < 0,001$) είχαν σημαντικά μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ από τους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα και αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα τόσο οι κίρρωτικοί (αυτ. ηπατ. 2,05; $p < 0,001$ -αυτ. χολοστ. νοσημ. 1,98; $p < 0,001$) όσο και οι μη κίρρωτικοί (αυτ. ηπατ. 2,45; $p < 0,001$ -αυτ. χολοστ. νοσημ. 2,48; $p < 0,001$) είχαν σημαντικά μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2, σε σχέση με τους υγιείς.

Όσον αφορά τους καπνιστές, η δραστικότητα του CYP1A2 ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη, σε σχέση με τους υγιείς καπνιστές (5,28), στο σύνολο των ασθενών με αλκοολική ηπατοπάθεια (3,68; $p < 0,001$) και συγκεκριμένα στους κίρρωτικούς (3,09; $p < 0,05$) και στους μη κίρρωτικούς (3,88; $p < 0,05$) της αυτής ομάδας, στους ασθενείς με NASH (3,69; $p < 0,05$), στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά

νοσήματα (3,90; $p < 0,05$), στο σύνολο των ασθενών με μη ιογενή ηπατοπάθεια (3,87; $p < 0,001$) τόσο στους κίρρωτικούς (2,64; $p < 0,001$) όσο και στους μη κίρρωτικούς (3,91; $p < 0,001$) της συγκεντρωτικής αυτής ομάδας.

Όσον αφορά στην επίδραση του καπνίσματος στην δραστικότητα του CYP1A2, τόσο οι υγιείς καπνιστές (5,28; $p < 0,05$) όσο και οι ασθενείς καπνιστές (4,29; $p < 0,05$) είχαν υψηλότερο ενδιάμεσο του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 σε σχέση με τους υγιείς μη καπνιστές (3,26) και τους ασθενείς μη καπνιστές (2,56), αντίστοιχα. Επιπλέον, όλες οι επιμέρους υποομάδες των καπνιστών ασθενών παρουσίασαν υψηλότερες ενδιάμεσες τιμές του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U σε σχέση με τους αντίστοιχους μη καπνιστές. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική στις περισσότερες των περιπτώσεων, ενώ σε εκείνες στις οποίες η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική αυτό, πιθανότατα, οφείλεται στον μικρό αριθμό των υπαγομένων σε αυτές εθελοντών (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Σύγκριση των τιμών του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 μεταξύ υγιών και ασθενών σε σχέση με την αιτιολογία της ασθένειας και το κάπνισμα

		Μη καπνιστές ^{&}			Καπνιστές [§]		
		Ενδιάμεσος	Εύρος	N	Ενδιάμεσος	Εύρος	N
Υγιείς εθελοντές		3,26	2,17-5,13	82	5,28 ^ε	2,19-11,15	43
Ιογενής ηπατίτιδα	Σύνολο	2,68***	1,20-6,03	124	5,19 ^ε	2,22-12,46	58
	Μη κίρρωτικοί	2,89***	1,52-6,03	68	5,52 ^ε	2,59-12,46	44
	Κίρρωτικοί	2,36***	1,20-4,84	56	4,71 ^ε	2,22-7,70	14
HBV	Σύνολο	2,72***	1,23-6,03	93	5,10 ^ε	2,59-9,88	33
	Ανενεργοί φορείς	2,78	1,68-5,13	30	5,98 ^ε	2,59-9,88	17
	Χρόνιοι	2,97	1,55-6,03	21	4,97 ^ε	2,82-6,00	8
HCV	Κίρρωτικοί	2,49***	1,23-4,84	42	4,96 ^ε	3,73-7,46	8
	Σύνολο	2,23***	1,20-4,81	31	5,57 ^ε	2,22-12,46	25
	Μη κίρρωτικοί	2,86	1,52-4,81	17	6,01 ^ε	2,61-12,46	19
Μη ιογενής ηπατίτιδα	Κίρρωτικοί	1,93***	1,20-3,06	14	3,60 ^ε	2,22-7,70	6
	Σύνολο	2,43***	0,81-7,54	109	3,87*** ^ε	1,59-8,76	51
	Μη κίρρωτικοί	2,57***	1,24-7,54	85	3,91*** ^ε	1,56-8,76	36
Αλκοολική ηπατοπάθεια	Κίρρωτικοί	2,03***	0,81-3,67	24	2,64*** ^ε	1,80-7,75	15
	Σύνολο	2,19***	1,31-4,88	21	3,68*** ^ε	1,59-8,32	27
	Μη κίρρωτικοί	2,98	2,11-4,88	11	3,88*	1,59-8,32	15
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	Κίρρωτικοί	1,91***	1,31-4,55	10	3,09* ^ε	2,13-7,75	12
	Σύνολο	2,18***	0,81-4,80	27	4,14 ^ε	2,43-4,83	3
	Μη κίρρωτικοί	2,45***	1,69-4,80	16	4,48	4,14-4,83	2
Αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα	Κίρρωτικοί	2,05***	0,81-2,97	11	2,43		1
	Σύνολο	2,34***	1,23-4,76	39	3,90* ^ε	1,80-8,76	13
	Μη κίρρωτικοί	2,48***	1,23-4,76	36	3,92* ^ε	2,65-8,76	11
Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	Κίρρωτικοί	1,98**	1,52-2,18	3	2,83	1,80-3,85	2
		2,63**	1,36-7,54	22	3,69*	1,74-7,26	8
Ασθενείς σύνολο		2,56***	0,81-7,54	233	4,29 ^ε	1,59-12,46	109

[&] p≤0,001 μεταξύ υγιών και συγκεντρωτικών ομάδων ασθενών καθώς και μεταξύ υγιών και μερικών ομάδων ασθενών, Kruskal-Wallis rank test

[§] p<0,05 μεταξύ υγιών και συγκεντρωτικών ομάδων ασθενών καθώς και μεταξύ υγιών και μερικών ομάδων ασθενών, Kruskal-Wallis rank test

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές;

^ε p<0,05 σε σχέση με τους μη καπνιστές, Mann-Whitney test

Ακολούθως, διερευνήθηκε η επίπτωση της βαρύτητας της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα του CYP1A2 (Πίνακας 15, Εικόνα 8). Στην κατηγορία των μη καπνιστών, το σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη ενδιάμεση τιμή του δείκτη του CYP1A2 (2,71) τόσο σε σχέση με τους υγιείς (3,26; $p < 0,001$) όσο και σε σχέση με τους ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση (2,32; $p < 0,001$). Οι ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση, επίσης, είχαν σημαντικά μειωμένη ενδιάμεση τιμή του δείκτη σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$) ενώ στους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση η ενδιάμεση τιμή του δείκτη ήταν εμφανέστερα χαμηλότερη (1,90), τόσο σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$) όσο και σε σχέση με τους ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση ($p < 0,05$).

Στην κατηγορία, όμως, των καπνιστών, μόνον οι ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση (2,56; $p < 0,01$) εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση στη δραστικότητα του CYP1A2 σε σχέση με τους υγιείς καπνιστές (5,28), ενώ και σε αυτήν την περίπτωση, υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών αυτών και των ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση (4,70; $p < 0,05$).

Πίνακας 15. Σύγκριση των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U μεταξύ υγιών και ασθενών σε σχέση με την βαρύτητα της ασθένειας

	Μη καπνιστές [€]			Καπνιστές [¥]		
	Ενδιάμεσος	Εύρος	<i>n</i>	Ενδιάμεσος	Εύρος	<i>n</i>
Υγιείς εθελοντές	3,26	2,17-5,13	82	5,28 ^{\$}	2,19-11,15	43
Μη κίρρωτικοί	2,71 ^{***, &}	1,24-7,54	153	4,47 ^{\$}	1,56-12,46	80
Κίρρωτικοί						
Αντιρροπούμενη κίρρωση	2,32 ^{***}	1,20-4,84	68	4,70 ^{\$}	2,22-7,74	17
Μη αντιρροπούμενη κίρρωση	1,90 ^{***, ≠}	0,81-3,67	12	2,56 ^{** ≠ \$}	1,80-7,68	12

[€] $p \leq 0,001$ Kruskal-Wallis rank test μεταξύ υγιών, μη κίρρωτικών ασθενών, ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και μη αντιρροπούμενη κίρρωση

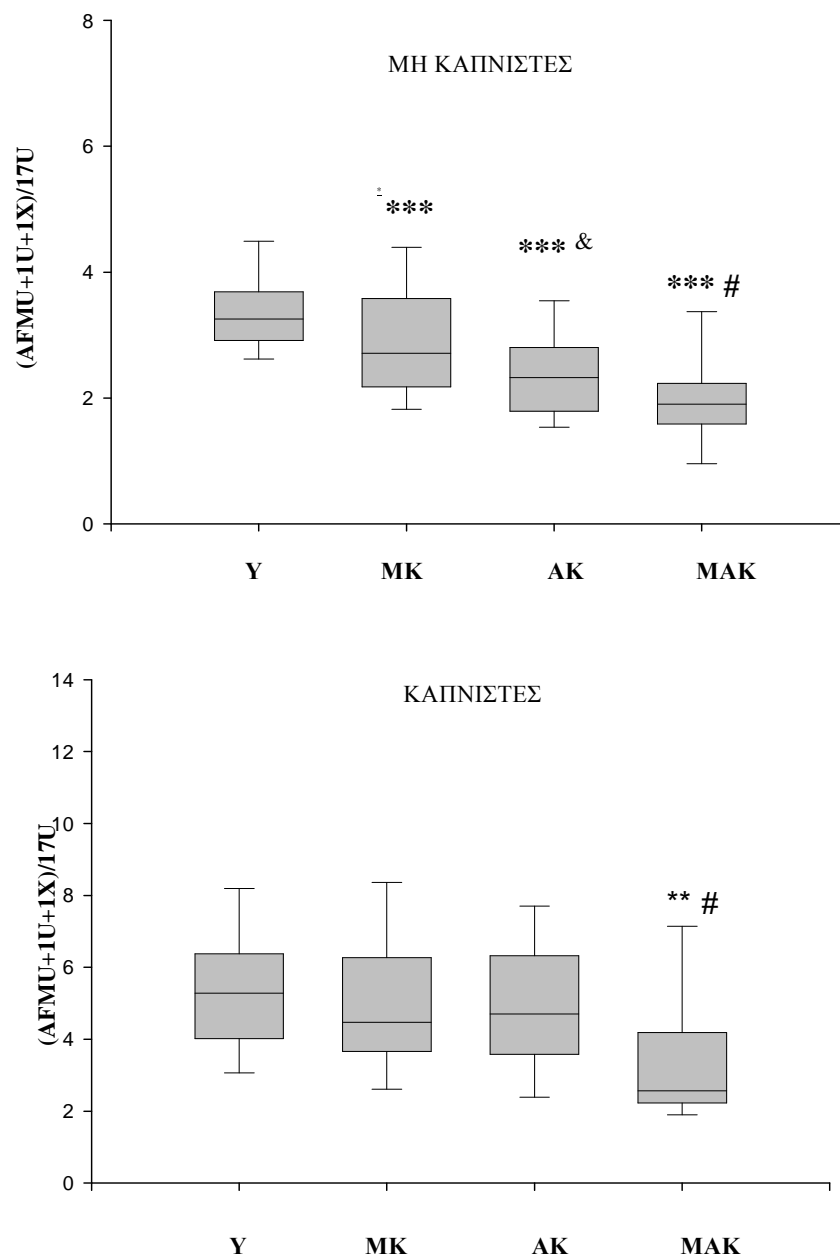
[¥] $p = 0,006$ Kruskal-Wallis rank test μεταξύ υγιών, μη κίρρωτικών ασθενών, ασθενών με αντιρροπούμενη κίρρωση και μη αντιρροπούμενη κίρρωση

^{***} $p \leq 0,001$, ^{**} $p < 0,01$ σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές, Mann-Whitney test

[≠] $p < 0,05$ σε σύγκριση με την αντιρροπούμενη κίρρωση, Mann-Whitney test

^{\$} $p < 0,01$ σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, Mann-Whitney test

[&] $p \leq 0,001$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση



Εικόνα 8. Θηκογράμματα των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στους μη καπνιστές και στους καπνιστές. Y= υγιείς, MK= μη κίρρωτικοί, AK= αντιρροπούμενη κίρρωση, MAK= μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ***p<0,001, **p<0,01, σε σχέση με τους υγιείς, &p<0,001 σε σχέση με μη κίρρωτικούς, #p<0,05 σε σχέση με αντιρροπούμενη κίρρωση, Mann-Whitney test.

2.2.6.2. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστηριότητα του CYP2A6

Οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) του μεταβολικού λόγου $17U/(17U+17X)$ για τους υγιείς, τους κίρρωτικούς και τους μη κίρρωτικούς, μετά από προσαρμογή για το κάπνισμα, ήταν $0,604\pm 0,134$, $0,538\pm 0,144$ και $0,582\pm 0,137$, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Univariate analysis of variance, $p=0,005$) και οι κίρρωτικοί είχαν σημαντικά χαμηλότερη μέση τιμή από τους υγιείς και τους μη κίρρωτικούς ($p=0,002$ και $p=0,022$ αντίστοιχα), ενώ οι μη κίρρωτικοί δεν διέφεραν από τους υγιείς ($p=0,448$) (Πίνακας 16).

Όταν οι ασθενείς διαχωρίστηκαν με βάση αιτιολογία της νόσου, οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) του μεταβολικού λόγου, μετά από προσαρμογή για το κάπνισμα, ήταν $0,560\pm 0,135$ και $0,585\pm 0,139$ για τους πάσχοντες από ιογενή και μη ιογενή ηπατίτιδα, αντίστοιχα, και δεν παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των τιμών και της αντίστοιχης των υγιών (Univariate analysis of variance, $p=0,126$) (Πίνακας 16).

Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) του ανωτέρω λόγου για το σύνολο των ασθενών ήταν $0,569\pm 0,129$ και διέφερε σημαντικά από αυτή των υγιών (Univariate Analysis of Variance, $p=0,030$, μετά από προσαρμογή για το κάπνισμα).

2.2.6.3. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστηριότητα της XO

Οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ για τους υγιείς, τους κίρρωτικούς και τους μη κίρρωτικούς ήταν $0,528\pm 0,057$, $0,548\pm 0,103$ και $0,544\pm 0,054$, αντίστοιχα. Η διερεύνηση των διασπορών των δειγμάτων αυτών, όμως, απεκάλυψε ότι αυτές διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Levene's test, $F=21,82$, $p\leq 0,001$). Προκειμένου, λοιπόν, να γίνει σύγκριση της δραστηριότητας της XO στις ανωτέρω ομάδες χρησιμοποιήθηκαν οι μη παραμετρικές δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Mann-Whitney. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενδιάμεσες τιμές (εύρος) για τις τρεις ομάδες ήταν $0,520$ ($0,390-0,690$), $0,550$ ($0,260-0,890$) και $0,540$ ($0,400-0,780$), αντίστοιχα, οι οποίες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (K-W test, $p=0,010$). Περαιτέρω σύγκριση έδειξε ότι τόσο οι κίρρωτικοί όσο και οι μη κίρρωτικοί είχαν σημαντικά υψηλότερες ενδιάμεσες τιμές από τους υγιείς (M-W test, $p=0,019$ και $p=0,005$, αντίστοιχα), ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών (M-W test, $p=0,441$).

Όταν οι ασθενείς διαχωρίστηκαν με βάση την αιτιολογία της νόσου, οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ ήταν $0,553\pm 0,071$

και $0,539 \pm 0,068$ για τους ασθενείς ιογενούς και μη ιογενούς αιτιολογίας, αντίστοιχα. Η ανάλυση διασποράς απεκάλυψε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των ομάδων αυτών και του δείγματος ελέγχου (Univariate analysis of variance, $p=0,004$). Η μέση τιμή για τους ασθενείς ιογενούς αιτιολογίας διέφερε σημαντικά από αυτή των υγιών (Univariate analysis of variance, $p=0,004$), ενώ η αντίστοιχη των ασθενών μη ιογενούς αιτιολογίας δεν διέφερε (Univariate analysis of variance, $p=0,477$). Επίσης, δεν προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών (Univariate analysis of variance, $p=0,157$). Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) του ανωτέρω λόγου για το σύνολο των ασθενών ήταν $0,545 \pm 0,074$ και διέφερε σημαντικά από αυτή των υγιών (Student's t-test, $p=0,017$, Πίνακας 16).

Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της δραστηριότητας της ΧΟ εντός της ομάδος των κίρρωτικών για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ των κίρρωτικών ιογενούς και μη ιογενούς αιτιολογίας. Οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ για τις υποομάδες ιογενούς και μη ιογενούς κίρρωσης ήταν $0,563 \pm 0,088$ και $0,533 \pm 0,103$ αντίστοιχα. Οι διασπορές, όμως, των δειγμάτων αυτών και του δείγματος των υγιών διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Levene's test, $F=11,88$, $p \leq 0,001$) και κατά συνέπεια η σύγκριση έγινε με τις μη παραμετρικές δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Mann-Whitney. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενδιάμεσες τιμές (εύρος) για τις τρεις ομάδες ήταν $0,520$ ($0,39-0,69$), $0,555$ ($0,40-0,89$) και $0,530$ ($0,29-0,83$) αντίστοιχα οι οποίες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (K-W test, $p=0,016$). Περαιτέρω σύγκριση έδειξε ότι οι κίρρωτικοί ιογενούς αιτιολογίας είχαν σημαντικά υψηλότερη ενδιάμεση τιμή του ως άνω μεταβολικού λόγου από τους υγιείς (M-W test, $p=0,004$), ενώ οι κίρρωτικοί μη ιογενούς αιτιολογίας δεν διέφεραν σημαντικά από τους υγιείς (M-W test, $p=0,669$) όπως και οι ασθενείς μεταξύ τους (M-W test, $p=0,131$) (Πίνακας 16α).

Κατόπιν, έγινε αντίστοιχη διερεύνηση εντός της ομάδας των μη κίρρωτικών ασθενών και οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις) ήταν $0,547 \pm 0,053$ και $0,541 \pm 0,055$ για τους ασθενείς ιογενούς και μη ιογενούς αιτιολογίας, αντίστοιχα, ενώ η ανάλυση διασποράς έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τρεις υπό εξέταση ομάδες (Univariate analysis of variance, $p=0,026$). Περαιτέρω συγκρίσεις έδειξαν ότι οι ασθενείς ιογενούς αιτιολογίας είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή του μεταβολικού λόγου από τους υγιείς ($p=0,027$), ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών μη ιογενούς αιτιολογίας ($p=0,193$) καθώς και των δύο ομάδων των ασθενών μεταξύ τους ($p=1,00$) (Πίνακας 16α).

2.2.6.4. Επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστηριότητα της NAT-2

Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τους βραδείς ακετυλιωτές στην ομάδα ελέγχου ήταν 0,105 (0,034) ενώ η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για την αντίστοιχη κατηγορία στους ασθενείς ήταν $0,099 \pm 0,038$ χωρίς να υπάρξει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τιμών (Student t-test, $p=0,276$). Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τους ταχείς ακετυλιωτές στην ομάδα ελέγχου ήταν $0,380 \pm 0,078$, ενώ η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για την αντίστοιχη κατηγορία στους ασθενείς ήταν $0,336 \pm 0,079$ και, σε αντίθεση με την προηγούμενη περίπτωση, η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική (Student t-test, $p \leq 0,001$).

Στη συνέχεια, ο πληθυσμός των ασθενών εθελοντών διαχωρίστηκε, με βάση τη βαρύτητα της νόσου, σε κίρρωτικούς και μη κίρρωτικούς. Το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών στους πρώτους ήταν 49,5% (54/109) και των ταχέων 50,5% (55/109), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στους μη κίρρωτικούς ήταν 60,5% (141/233) και 39,5% (92/233). Τόσο τα ποσοστά αυτά όσο και αυτά των υγιών εθελοντών δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (χ^2 test, $p=0,147$). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η εμφάνιση ηπατικής νόσου δεν επιφέρει μεταβολές στο ποσοστό μεταξύ των ταχέων και βραδέων ακετυλιωτών.

Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τους κίρρωτικούς βραδείς ακετυλιωτές ήταν $0,111 \pm 0,037$, ενώ η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για την αντίστοιχη κατηγορία των μη κίρρωτικών ήταν $0,095 \pm 0,039$. Η σύγκριση των τιμών αυτών με την αντίστοιχη του δείγματος ελέγχου έδειξε ότι οι ομάδες αυτές δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Univariate Analysis of Variance, $p=0,135$).

Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) για τους ταχείς ακετυλιωτές κίρρωτικούς ήταν 0,334 (0,074) ενώ η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) για την αντίστοιχη κατηγορία των μη κίρρωτικών ήταν 0,339 (0,078). Οι τιμές αυτές σε συνδυασμό με αυτή των υγιών, διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Univariate Analysis of Variance, $p=0,003$) και περαιτέρω συγκρίσεις έδειξαν ότι τόσο η μέση τιμή των κίρρωτικών όσο και αυτή των μη κίρρωτικών ήταν στατιστικά χαμηλότερες από αυτή των υγιών ($p=0,007$ και $p=0,006$ αντίστοιχα) χωρίς να διαφέρουν μεταξύ τους ($p=1,00$).

Κατόπιν, έγινε σύγκριση των υποομάδων των ασθενών εθελοντών με βάση την ιογενή ή μη προέλευση της νόσου. Το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών στους πρώτους ήταν 54,9% (100/182) και των ταχέων 45,1% (82/182), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στους δευτέρους ήταν 59,4% (95/160) και 40,6% (65/160). Τόσο τα ποσοστά αυτά όσο και αυτά των υγιών εθελοντών δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά

μεταξύ τους (χ^2 test, $p=0,650$). Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1U+1X) στους ασθενείς ιογενούς αιτιολογίας οι οποίοι ήταν βραδείς ακετυλιωτές ήταν $0,100\pm 0,039$ και η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) του αυτού λόγου στους ασθενείς μη ιογενούς αιτιολογίας με τον ίδιο φαινότυπο ήταν $0,098\pm 0,038$. Η σύγκριση των τιμών αυτών με την αντίστοιχη τιμή του δείγματος ελέγχου έδειξε ότι οι ομάδες αυτές δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Univariate Analysis of Variance, $p=0,503$). Οι μέσες τιμές για τους ασθενείς με τον φαινότυπο του ταχέως ακετυλιωτή ήταν $0,332\pm 0,073$ και $0,341\pm 0,075$ για τους ασθενείς ιογενούς και μη ιογενούς αιτιολογίας, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές σε συνδυασμό με αυτή των υγιών διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Univariate Analysis of Variance, $p=0,002$) και ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των υγιών ($p=0,002$ και $p=0,018$, αντίστοιχα), ενώ δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($p=1,00$, Πίνακας 16).

Πίνακας 16α. Δραστικότητα της ΧΟ σε κίρρωτικούς και μη κίρρωτικούς ασθενείς

	Υγιείς (n=125)	Κίρρωτικοί (n=109) Μέση τιμή ± ΤΑ		Μη κίρρωτικοί (n=233) Μέση τιμή ± ΤΑ	
		Ιογενής (n=70)	Μη ιογενής (n=39)	Ιογενής (n=112)	Μη ιογενής (n=121)
ΜΤ ±ΤΑ	0,528 ± 0,057	0,563 ± 0,088**	0,533 ± 0,103	0,547 ± 0,058 *	0,541 ± 0,052
Διάμ (εύρος)	0,520 (0,39-0,69)	0,555 (0,40-0,89)**	0,530 (0,29-0,83)	-	-

**p=0,004 σε σύγκριση με τους υγιείς, M-W test (K-W test, p=0,016)

*p=0,027 σε σύγκριση με τους υγιείς, Univariate Analysis of Variance με διόρθωση Bonferroni

2.2.7. Εξειδίκευση και ευαισθησία των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U

Η εξειδίκευση και η ευαισθησία του μεταβολικού λόγου του σχετικού με την δραστικότητα του CYP1A2, όσον αφορά την διάγνωση της ηπατικής νόσου, προσδιορίστηκαν με βάση τον φυσικό λογάριθμο των τιμών του ανωτέρω λόγου. Πιο συγκεκριμένα, η οριακή τιμή διάγνωσης καθορίστηκε ως η μέση τιμή του φυσικού λογαρίθμου των τιμών του μεταβολικού λόγου των υγιών μετά την αφαίρεση της τυπικής απόκλισης (mean of control values minus 1 SD, Jost *et al.*, 1987). Ο υπολογισμός αυτός έδωσε ως αποτέλεσμα την τιμή $\leq 1,0$ για τους μη καπνιστές και την τιμή $\leq 1,28$ για τους καπνιστές.

Στην κατηγορία των μη καπνιστών, με βάση την οριακή τιμή 1,0, ταξινομήθηκαν ορθώς 11 από τους 12 ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση (91,7%), 51 από 68 ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση (75,0%), 62 από τους 80 ασθενείς με κίρρωση ανεξαρτήτως βαρύτητας (77,5%), 78 από τους 153 μη κίρρωτικούς ασθενείς (51,0%), 127 από τους 203 ασθενείς με ενεργό νόσο (62,6%), δηλαδή το σύνολο των ασθενών εξαιρουμένων των ανενεργών φορέων HBV και 140 από τους 233 συνολικά ασθενείς (60,1%, Πίνακας 19). Οι συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες είχαν μικρότερη ευαισθησία στον ορθό χαρακτηρισμό των ασθενών που ανήκαν στις αντίστοιχες, ως άνω, ομάδες. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά της ορθής ταξινόμησης των ασθενών με βάση τον δείκτη INR ήταν 75,0%, 32,8%, 39,2%, 6,9%, 20,9% και 18,3% για τους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, με κίρρωση συνολικά, χωρίς κίρρωση συνολικά, με

ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα, όταν η οριακή τιμή του δείκτη αυτού καθορίστηκε στο 1,2.

Τα αντίστοιχα ποσοστά της δοκιμασίας της αλβουμίνης του ορού ήταν 41,7%, 15,1%, 19,2%, 3,4%, 10,4% και 9,0%, για τους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, με κίρρωση συνολικά, χωρίς κίρρωση συνολικά, με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα, όταν η οριακή τιμή του δείκτη αυτού καθορίστηκε στα λιγότερα από 3,5 mg/dL.

Ο χαρακτηρισμός των ασθενών με βάση την τιμή της χολερυθρίνης ορού υψηλότερης του 1,2 mg/dl ήταν ορθός για το 58,3%, 25,0%, 30,0%, 6,1%, 16,2% και 14,7% των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, με κίρρωση συνολικά, των ασθενών χωρίς κίρρωση, των ασθενών με ενεργό νόσο και του συνόλου των ασθενών, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι τρεις αυτές συμβατικές δοκιμασίες θεωρήθηκαν συνολικά, όταν, δηλαδή, οποιαδήποτε από αυτές ήταν εκτός ορίων σε κάποιον εθελοντή, τότε τα ποσοστά της ορθής κατάταξης ανήλθαν στο 83,3%, 50,7%, 55,0%, 16,3%, 34,2% και 30,3% για τους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, με κίρρωση συνολικά, για τους ασθενείς χωρίς κίρρωση συνολικά, για τους ασθενείς με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα.

Όταν η οριακή τιμή της μεθόδου του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης συνδυάστηκε με τις τρεις συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος, τότε η ευαισθησία στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου ανήλθε στο 100% για την μη αντιρροπούμενη κίρρωση, στο 85,3% για την αντιρροπούμενη κίρρωση, στο 87,5% για την κίρρωση γενικώς, στο 58,3% για την ηπατική νόσο χωρίς κίρρωση, στο 72,2% για την ενεργό ηπατική νόσο και στο 69,8% για το σύνολο των ηπατοπαθών.

Στην κατηγορία των καπνιστών, με βάση την οριακή τιμή 1,28, ταξινομήθηκαν ορθώς 8 από τους 12 ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση (66,7%), 4 από 17 ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση (23,5%), 12 από 29 ασθενείς με κίρρωση ανεξαρτήτως βαρύτητας (41,4%), 19 από τους 80 μη κίρρωτικούς ασθενείς (23,8%) και 29 από τους 92 ασθενείς με ενεργό νόσο (31,5%) και 31 από το σύνολο των 109 ασθενών (28,4%, Πίνακας 19). Οι συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες είχαν, στις περισσότερες περιπτώσεις, μικρότερη ευαισθησία στον ορθό χαρακτηρισμό των εθελοντών με ηπατική νόσο για τις ίδιες ομάδες των ασθενών. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά ευαισθησίας για τον δείκτη INR ήταν 8,3%, 11,8%, 10,3%, 5,7%, 8,2% και

7,0% για τους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, για το σύνολο των κίρρωτικών, για το σύνολο των μη κίρρωτικών, για τους ασθενείς με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα. όταν η οριακή τιμή του δείκτη αυτού καθορίστηκε στο 1,2.

Τα αντίστοιχα ποσοστά της δοκιμασίας αλβουμίνης ορού ήταν 16,7%, 5,9%, 10,3%, 0,0%, 3,5% και 3,0% για τους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, για το σύνολο των κίρρωτικών, για το σύνολο των μη κίρρωτικών, για τους ασθενείς με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα. όταν η οριακή τιμή του δείκτη αυτού καθορίστηκε στα λιγότερα από 3,5 mg/dL.

Ο χαρακτηρισμός των ασθενών με βάση την τιμή της χολερυθρίνης ορού υψηλότερης του 1,2 mg/dL ήταν ορθός για το 41,7%, 35,3%, 37,9%, 9,6%, 19,5% και 14,7% των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, για το σύνολο των κίρρωτικών, για το σύνολο των μη κίρρωτικών, για τους ασθενείς με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι τρεις αυτές συμβατικές δοκιμασίες θεωρήθηκαν συνολικά, δηλαδή όταν οποιαδήποτε από αυτές ήταν εκτός ορίων σε κάποιον εθελοντή, τότε υπήρξε ορθή κατάταξη σε ποσοστά 41,7%, 52,9%, 48,3%, 16,4%, 27,4% και 24,4% των ασθενών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, με αντιρροπούμενη κίρρωση, για το σύνολο των κίρρωτικών, για το σύνολο των μη κίρρωτικών, για τους ασθενείς με ενεργό νόσο και για το σύνολο των ασθενών, αντίστοιχα.

Όταν η οριακή τιμή της μεθόδου του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης συνδυάστηκε με τις τρεις συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος, τότε η ευαισθησία στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου ανήλθε στο 75,0% για την μη αντιρροπούμενη κίρρωση, στο 64,7% για την αντιρροπούμενη κίρρωση, στο 69,0% για την κίρρωση γενικώς, στο 41,2% για την ηπατική νόσο χωρίς κίρρωση, στο 51,7% για την ενεργό ηπατική νόσο και στο 47,9% για το σύνολο των ασθενών.

Η εξειδίκευση του φυσικού λογαρίθμου του αυτού μεταβολικού λόγου, η ικανότητα του δηλαδή στον ορθό χαρακτηρισμό των υγιών εθελοντών, ανήλθε στο 85,4% (70 από 82 υγιείς) για τους μη καπνιστές και στο 86,0% (37 από 43 υγιείς) για τους καπνιστές, με βάση τις οριακές τιμές 1,0 και 1,28 αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της καμπύλης ROC για την διακριτική ικανότητα του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U

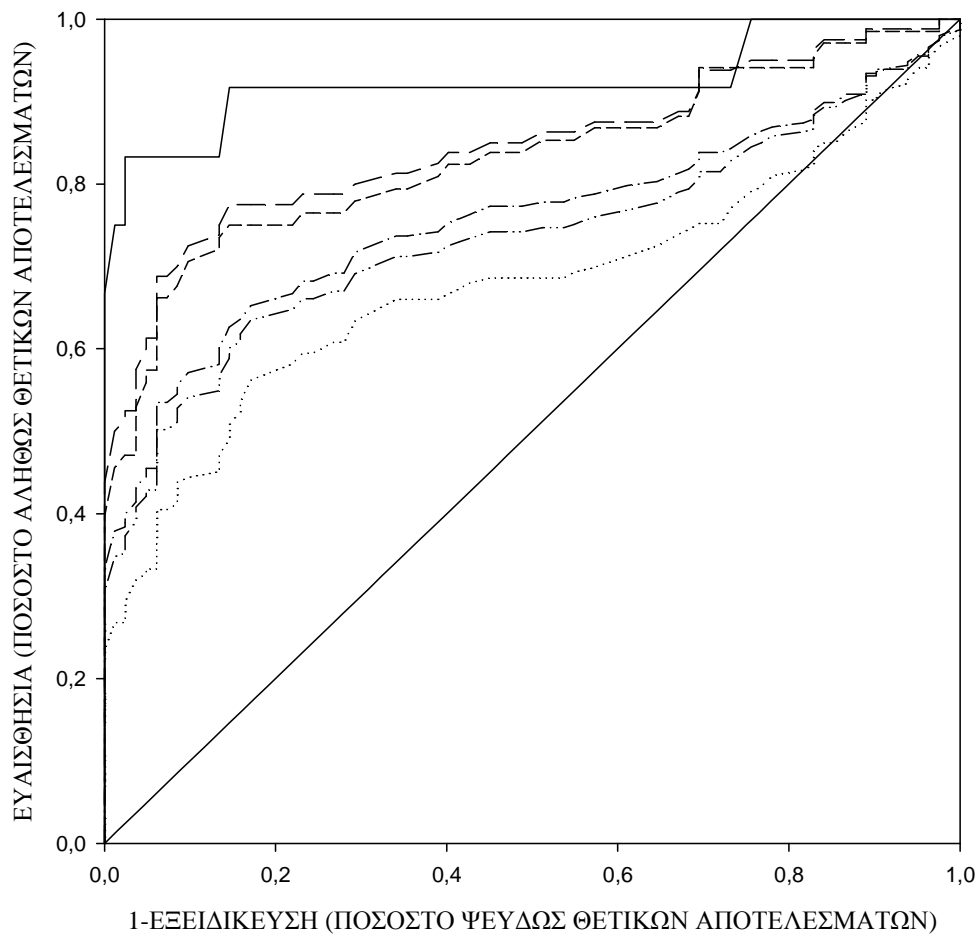
παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 και στην Εικόνα 9. Όσον αφορά τους μη καπνιστές, το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικό από το 0,5, για όλες τις κλινικές καταστάσεις, φανερόνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ικανότητα του μεταβολικού λόγου για διάκριση μεταξύ των ηπατοπαθών και των υγιών. Όσον αφορά τους καπνιστές, η ανάλυση της καμπύλης ROC επέδειξε σημαντική διακριτική ικανότητα για τις καταστάσεις της μη αντιρροπούμενης κίρρωσης, της κίρρωσης συνολικά και της ενεργού νόσου.

Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ ευαισθησίας και εξειδίκευσης του μεταβολικού λόγου στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου με βάση τις διάφορες οριακές τιμές (cut-off points) οι οποίες προέκυψαν από την ανάλυση της καμπύλης ROC (Εικόνα 10). Όταν επιλέχθηκαν οριακές τιμές πλησίον αυτών που προσδιορίστηκαν με βάση την διαφορά της μέσης τιμής του φυσικού λογαρίθμου και της τυπικής απόκλισης, τότε η εξειδίκευση και η ευαισθησία ήταν ταυτόσημες για τις δύο μεθόδους. Όταν επιλέχθηκαν οριακές τιμές παρακείμενες των προηγούμενων, τότε υπήρξε αύξηση της ευαισθησίας εις βάρος της εξειδίκευσης και αντίστροφα (Πίνακας 18).

Με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας και με βάση την ανάλυση της καμπύλης ROC επιλέχθηκαν οι εναλλακτικές οριακές τιμές 1,09 και 1,52 για τους μη καπνιστές και για τους καπνιστές, αντίστοιχα. Η τιμή 1,09 παρουσίασε αυξημένη ευαισθησία, σε σχέση με την μέθοδο «LnΜΛ-1 ΤΑ» σε όλες τις περιπτώσεις πλην της μη αντιρροπούμενης κίρρωσης ενώ το ίδιο συνέβη και με τον συνδυασμό της τιμής αυτής με τις συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες, στους μη καπνιστές. Παρόμοια ήταν η εικόνα και με την τιμή 1,52, στους καπνιστές (Πίνακας 19). Η εξειδίκευση των τιμών αυτών ήταν 70,7 και 72,0%, στους μη καπνιστές και 72,1% στους καπνιστές (Πίνακας 18).

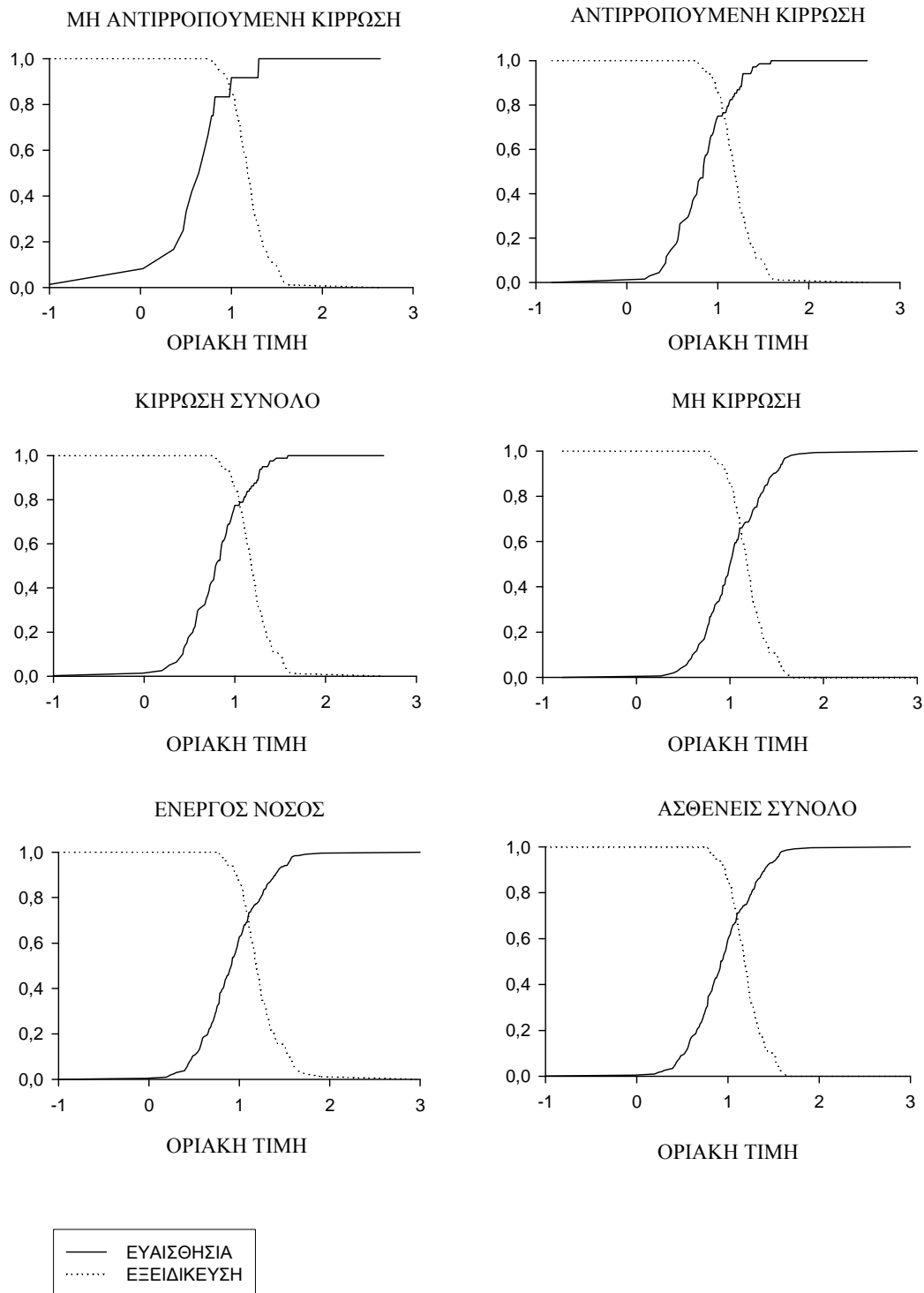
Πίνακας 17. Ανάλυση της καμπύλης ROC για την αποτελεσματικότητα του φυσικού λογαρίθμου του λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στην διάκριση μεταξύ υγιών και διαφόρων κλινικών καταστάσεων στους ηπατοπαθείς.

		Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη	95% δ.ε.	p
Μη καπνιστές	Μη αντιρροπούμενη κίρρωση	0,924	0,807-1,000	<0,001
	Αντιρροπούμενη κίρρωση	0,833	0,763-0,902	<0,001
	Κίρρωση σύνολο	0,846	0,783-0,909	<0,001
	Μη κίρρωση σύνολο	0,679	0,612-0,746	<0,001
	Ενεργός νόσος	0,766	0,712-0,820	<0,001
	Ασθενείς σύνολο	0,736	0,683-0,790	<0,001
Καπνιστές	Μη αντιρροπούμενη κίρρωση	0,803	0,638-0,969	0,001
	Αντιρροπούμενη κίρρωση	0,598	0,434-0,762	0,241
	Κίρρωση σύνολο	0,682	0,553-0,814	0,009
	Μη κίρρωση σύνολο	0,564	0,046-0,668	0,243
	Ενεργός νόσος	0,620	0,522-0,717	0,025
	Ασθενείς σύνολο	0,596	0,500-0,691	0,066



—————	ΜΗ ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ ΚΙΡΡΩΣΗ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,924, p<0,001
-----	ΚΙΡΡΩΣΗ ΣΥΝΟΛΟ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,846, p<0,001
- - - - -	ΑΝΤΙΡΡΟΠΟΥΜΕΝΗ ΚΙΡΡΩΣΗ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,833, p<0,001
- · - · -	ΕΝΕΡΓΟΣ ΝΟΣΟΣ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,766, p<0,001
- · · · ·	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΥΝΟΛΟ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,736, p<0,001
·····	ΜΗ ΚΙΡΡΩΣΗ, ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ=0,679, p<0,001

Εικόνα 9. Γράφημα καμπυλών ROC οι οποίες εμφανίζουν την εξειδίκευση και την ευαισθησία του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U για τις διάφορες καταστάσεις της ηπατικής νόσου και για τις διάφορες οριακές τιμές, στους μη καπνιστές. Όσο πλησιέστερη είναι η καμπύλη στο αριστερό και στο επάνω περιθώριο, όσο δηλαδή το εμβαδόν προσεγγίζει την μονάδα, τόσο πιο ακριβής είναι η δοκιμασία.



Εικόνα 10. Γραφήματα συσχέτισης της Ευαισθησίας και Εξειδίκευσης του φυσικού λογαρίθμου του λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ για τις διάφορες οριακές τιμές που προκύπτουν με βάση την ανάλυση των καμπυλών ROC και για τις διάφορες κλινικές καταστάσεις, στους μη καπνιστές.

Πίνακας 18. Εξειδίκευση και ευαισθησία του φυσικού λογαρίθμου του λόγου (AFMU+1U+1X)/17U για τις διάφορες οριακές τιμές που προκύπτουν από την ανάλυση της καμπύλης ROC για τις διάφορες κλινικές καταστάσεις στους ηπατοπαθείς

	Μη καπνιστές			Καπνιστές		
	Οριακή τιμή	Ευαισθησία	Εξειδίκευση	Οριακή τιμή	Ευαισθησία	Εξειδίκευση
Μη αντιρροπούμενη κίρρωση	0,82	83,3	97,6	1,02	58,3	95,3
	1,00	91,7	85,4	1,28	66,7	86,0
	1,30	100	24,4	1,52	83,3	72,1
Αντιρροπούμενη κίρρωση	0,96	70,6	90,2	-	-	-
	1,00	75,0	85,4	-	-	-
	1,09	77,9	70,7	-	-	-
Κίρρωση σύνολο	0,96	72,5	90,2	1,12	34,5	90,7
	1,00	77,5	85,4	1,28	41,4	86,0
	1,09	80,0	70,7	1,52	62,1	72,1
Μη κίρρωση σύνολο	0,96	44,4	90,2	-	-	-
	1,00	51,0	85,4	-	-	-
	1,09	63,4	70,7	-	-	-
Ενεργός νόσος	0,96	57,1	90,2	1,13	22,8	90,7
	1,00	62,6	86,6	1,28	31,5	86,0
	1,09	71,4	72,0	1,52	57,6	72,1
Ασθενείς σύνολο	0,96	54,1	90,2	-	-	-
	1,00	60,1	85,4	-	-	-
	1,09	69,1	70,7	-	-	-

Πίνακας 19. Ευαισθησία του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U με βάση τις οριακές τιμές «Ln MR[#]-1 SD.», τις τιμές με βάση την ανάλυση της καμπύλης ROC και των συμβατικών λειτουργικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας (LFTs)

		% Ευαισθησία					
Δείκτες ηπατικής λειτουργίας		Μη αντιρρ. κίρρωση (n=12)	Αντιρροπούμενη κίρρωση (n=68)	Κίρρωση σύνολο (n=80)	Μη κίρρωση σύνολο (n=153)	Ενεργός νόσος (n=203)	Ασθενείς σύνολο (n=233)
Μη κληνιστές	Ln MR [#] -1SD (≤1,0)	91,7	75,0	77,5	51,0	62,6	60,1
	ROC (≤1,09)	91,7	77,9	80,0	63,4	71,4	69,1
	INR (>1,2)	75,0 ^α	32,8***	39,2***	6,9***	20,9 ***	18,3***
	Αλβουμίνη (<3,5mg/dl)	41,7*	15,1***	19,2***	3,4***	10,4 ***	9,0***
	Ολική χολερυθρίνη (>1,2 mg/dl)	58,3 ^β	27,9***	30,0***	6,1***	16,2 ***	14,7***
	INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	83,3 ^γ	50,7**	55,0**	16,3***	34,2 **	30,3***
Μη κληνιστές	Ln MR [#] -1SD ή INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	100 ^δ	85,3 [†]	87,5 [†]	58,3 [†]	72,2 [†]	69,8 [†]
	ROC ή INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	100 ^δ	86,8 [†]	90,0 [†]	69,6 [†]	78,1 [†]	76,3 [†]
		Μη αντιρρ. κίρρωση (n=12)	Αντιρρ. κίρρωση (n=17)	Κίρρωση σύνολο (n=29)	Μη κίρρωση σύνολο (n=80)	Ενεργός νόσος (n=92)	Ασθενείς σύνολο (n=109)
Κληνιστές	Ln MR [#] -1SD (≤1,28)	66,7	23,5	41,4	23,8	31,5	28,4
	ROC (≤1,52)	83,3	-	62,1	-	57,6	-
	INR (>1,2)	8,3*	11,8	10,3*	5,7**	8,2**	7,0***
	Αλβουμίνη(<3,5 mg/dl)	16,7*	5,9	10,3*	0,0	3,5***	3,0***
	Ολική χολερυθρίνη (>1,2 mg/dl)	41,7 ^ε	35,3	37,9 ^ι	9,6*	19,5 ^ς	14,7*
	INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	41,7 ^ε	52,9	48,3 ^κ	16,4	29,3 ^ς	24,4
Κληνιστές	Ln MR [#] -1SD ή INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	75,0 ^ζ	64,7 ^θ	69,0 ^λ	41,2 ^ς	51,7 ^ς	47,9 [†]
	ROC ή INR ή Αλβουμίνη ή Ολική χολερυθρίνη	83,3 ^η	-	75,9 [€]	-	69,7 [†]	-

[#]MR, μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U

*p<0,05, **p<0,01, *** p≤0,001, σε σχέση με την ευαισθησία των δύο μεθόδων, Z test

[†]p≤0,001, [€]p=0,058, ^ςp=0,005 σε σχέση με την ευαισθησία των 3 LFTs

^ςp≤0,001 σε σχέση με την ευαισθησία της ανάλυσης καμπύλης ROC, Z test

Power: α=0,074, β=0,278, γ=0,0244, δ=0,100, Power: ε=0,410, ζ=0,223, η= 0,381, θ=0,052, ι=0,348, κ=0,119, λ=0,261

2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1 Χαρακτηριστικά της μεθόδου

Η μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης-Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα εργασία αποτελεί μία σχετικά απλή διαδικασία για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των κυριωτέρων τελικών μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα, δηλαδή των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X, κατά την διάρκεια μίας μεμονωμένης αναλυτικής πράξης, χωρίς παρεμβολές από την καφεΐνη καθεαυτή, τους κύριους και δευτερεύοντες μεταβολίτες της ή από το βιολογικό υπόστρωμα των ούρων. Η μέθοδος αυτή συνιστά ένα, αναλυτικώς, έγκυρο εργαλείο για την εκτίμηση της δραστικότητας των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 στους ανθρώπους καθώς, αποδεδειγμένα, παρουσιάζει επαρκή ανάκτηση των μεταβολιτών από τα ούρα, μικρή διακύμανση και χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού για όλους τους 5 ανωτέρω μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες της καφεΐνης απόμονώθηκαν από τα ούρα με εκχύλιση υγρού-υγρού (liquid- liquid extraction) μέσω της χρήσης ενός μίγματος χλωροφορμίου και ισοπροπανόλης σε αναλογίες όγκων 85/15, σύμφωνα με παραλλαγή της μεθόδου των Grant *et al.*, [202]. Η αναλογία αυτή των οργανικών διαλυτών είχε την καλύτερη απόδοση, όσον αφορά στην ανάκτηση των μεταβολιτών και στην εξάλειψη των παρεμβολών, σε σχέση με άλλες αναλογίες των ίδιων διαλυτών που εξετάστηκαν παράλληλα. Η μέτρια μέση ανάκτηση του 1U (65,2%) οφείλεται, πιθανώς, στην μικρή διαλυτότητα της ουσίας αυτής σε χαμηλές τιμές pH [216], αλλά το γεγονός αυτό δεν εμπόδισε τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του μεταβολίτη στα πλείστα των δειγμάτων ούρων που αναλύθηκαν. Το αυτό μίγμα οργανικών διαλυτών έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί από άλλους ερευνητές με διαφορετική αναλογία και με ποικίλα ποσοστά ανάκτησης των μεταβολιτών της καφεΐνης [212-230]. Με σκοπό την αποφυγή της χρήσης του τοξικού χλωροφορμίου, οι Rasmussen and Brosen [204] χρησιμοποίησαν το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-ισοπροπανόλης, αλλά η εκχύλιση διήρκεσε 10', ενώ το μίγμα χλωροφορμίου-ισοπροπανόλης απαιτεί μόνον 30' ισχυρής ανάδευσης του υπό εκχύλιση δείγματος των ούρων. Έχουν, επίσης, αναφερθεί στην βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι εκχύλισης των μεταβολιτών της καφεΐνης με την χρήση της μεθοδολογίας στερεάς φάσης (solid phase extraction) [231, 232, 234]. Οι μέθοδοι αυτές μειώνουν την χρήση των οργανικών διαλυτών και παρουσιάζουν ποσοστά ανάκτησης των μεταβολιτών

μεγαλύτερα του 90%. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναφερθεί κάποια μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης για την ταυτόχρονη εκχύλιση του AFMU και των υπολοίπων μεταβολιτών της καφεΐνης ούτε για την μεμονωμένη εκχύλιση του AFMU.

Η παρούσα μέθοδος RP-HPLC επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (5-200 μM). Το εύρος αυτό κάλυψε το 88% των αναλυθέντων δειγμάτων, ενώ το υπόλοιπο 12% είχε έναν ή περισσότερους από τους 5 μεταβολίτες, ελαφρώς, εκτός των ανωτέρω ορίων και των οποίων οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν με αραίωση ή συμπύκνωση των αντιστοιχών δειγμάτων και επανάληψη της ανάλυσης.

Ο χρόνος διαχωρισμού των 5 υπ' όψιν μεταβολιτών της καφεΐνης προσέγγισε τα 15' και ήταν ο μικρότερος από τις σχετικές μεθόδους που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [204, 212, 230, 233, 236].

2.3.2. Διακύμανση της δραστηριότητας των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 σε σχέση με τον χρόνο

Στην παρούσα εργασία έγινε παρακολούθηση της διακύμανσης της δραστηριότητας των υπό εξέταση ενζύμων σε μία ομάδα 6 υγιών ατόμων (3 άνδρες, 3 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες) για 10 συνεχόμενες εβδομάδες, με μία μέτρηση ανά εβδομάδα. Η μέση διακύμανση του CYP1A2, όπως προσδιορίστηκε με τον μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U, ήταν 10,5% με εύρος 7,6-16,7%. Η μέση διακύμανση της XO, όπως προσδιορίστηκε από τους μεταβολικούς λόγους 1U/1X και 1U/(1U+1X), ήταν 11,0% (εύρος 8,5-13,8%) και 5,3% (εύρος 4,2-6,1%), αντίστοιχα. Η μέση διακύμανση του CYP2A6, όπως προσδιορίστηκε από τους μεταβολικούς λόγους 17U/17X και 17U/(17U+17X) ήταν 47,8%, (εύρος 31,2-61,1%) και 17,4%, (εύρος 11,5-22,6%), αντίστοιχα. Ο δεύτερος από αυτούς εμφάνισε σαφώς μικρότερη διακύμανση από τον πρώτο και υιοθετήθηκε για τις περαιτέρω συγκρίσεις κατ' αντιστοιχίαν με τον μεταβολικό λόγο 1U/(1U+1X), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτικός του 1U/1X στην απεικόνιση της δραστηριότητας της XO. Τέλος, η δραστηριότητα της NAT-2 προσδιορίστηκε με βάση τους μεταβολικούς λόγους AFMU/1X και AFMU/(AFMU+1U+1X) των οποίων η διακύμανση ήταν διαφορετική για τους βραδείς και ταχείς ακετυλιωτές. Συγκεκριμένα, οι βραδείς ακετυλιωτές παρουσίασαν μέση διακύμανση 22,8%, (εύρος 10,8-29,2%), και 17,9% (εύρος 10,0-27%) για τους δύο

λόγους, αντίστοιχα, ενώ οι ταχείς παρουσίασαν μέση διακύμανση 21,1% (εύρος 14,1-28,2%) και 9,8% (εύρος 6,0-13,5%) για τους δύο λόγους αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο φαινότυπος του βραδέος ή ταχέος ακετυλιωτή δεν μεταβλήθηκε σε κανέναν από τους εθελοντές κατά την διάρκεια της παρακολούθησης.

Σε άλλη μελέτη, η διακύμανση των μεταβολικών λόγων (AFMU+1U+1X)/17U, 1U/(1U+1X) και AFMU/1X, σε μεμονωμένη δειγματοληψία ούρων 5 ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης, ήταν 3,1%, 0,8% και 10,2% αντίστοιχα, σε δείγμα 9 υγιών ανδρών, χωρίς να γίνει διαχωρισμός μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών. Η παρακολούθηση, όμως, ήταν μάλλον ελλιπής καθώς περιελάμβανε δύο μόνο δοκιμασίες με την παρεμβολή διαστήματος μιας εβδομάδας και έτσι οι τιμές αυτές δεν είναι αντιπροσωπευτικές της πραγματικής διακύμανσης της δραστηριότητας των συγκεκριμένων ενζύμων [212].

Δύο μόνο επαναλήψεις της δοκιμασίας της καφεΐνης σε 4 υγιή άτομα παρουσίασαν μέση διακύμανση της δραστηριότητας του CYP1A2 της τάξεως του 18%, με την χρήση του ίδιου, ως άνω, μεταβολικού λόγου σε συγκεντρωτική συλλογή ούρων 6 ωρών μετά τη χορήγηση της καφεΐνης [246].

Ο ελαφρώς τροποποιημένος, μεταβολικός λόγος (AAMU+1U+1X)/17U, σε δείγμα ολονύκτιας ή 24ωρης συλλογής ούρων, χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της βιολογικής μεταβλητότητας του CYP1A2 σε 11 υγιείς λευκούς άνδρες οι οποίοι συμμετείχαν σε 4 διαδοχικές μελέτες διάρκειας 8-10 ημερών η κάθε μία. Στις μελέτες αυτές έγινε διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης του καφέ, του αλκοόλ και του κικκάδιου ρυθμού στη δραστηριότητα του CYP1A2 και βρέθηκε ότι η διακύμανση στη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού, χωρίς την επίδραση των ως άνω παραγόντων, ανήλθε στο 17,2%. Στην ίδια μελέτη η διακύμανση του λόγου 1U/(1U+1X), αντιπροσωπευτικού της δραστηριότητας της XO, ανήλθε στο 5,0% [127].

Σε μία πιο αντιπροσωπευτική μελέτη συμμετείχαν 20 υγιή άτομα (10 άνδρες και 10 γυναίκες) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε 3 δοκιμασίες της καφεΐνης για 3 συνεχόμενες εβδομάδες. Η δραστηριότητα του CYP1A2 προσδιορίστηκε με τον μεταβολικό λόγο 17X/137X σε ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων, 5 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, και η μέση διακύμανση ήταν 25,3% με εύρος 3,0-71,5%. Η παρατηρηθείσα, στην περίπτωση αυτή, υπερδιπλάσια σε σχέση με την παρούσα μελέτη, μέση διακύμανση είναι πιθανόν να οφείλεται στην χρήση του μεταβολικού λόγου 17X/137X του οποίου οι τιμές, όπως έχει και προηγουμένως αναφερθεί, επηρεάζονται από τον ρυθμό αποβολής των

ούρων. Στην ίδια μελέτη η δραστηριότητα της NAT-2 εκτιμήθηκε με τη χρήση του μεταβολικού λόγου AFMU/1X και η μέση διακύμανσή του για τους ταχείς ακετυλιωτές ήταν 11,6%, με εύρος 3,3-26,5%, ενώ η μέση διακύμανση για τους βραδείς ακετυλιωτές ήταν 16,6% με εύρος 5,6-34,7%. Οι μικρότερες, σε σχέση με τον αντίστοιχο μεταβολικό λόγο της παρούσας εργασίας, διακυμάνσεις αυτές ενδέχεται να οφείλονται στην μικρότερη διάρκεια παρακολούθησης, αφενός, και σε μεθοδολογικούς και άλλους αστάθμητους παράγοντες, αφετέρου, καθώς παρατηρήθηκε και αλλαγή του φαινοτύπου της N-ακετυλίωσης σε 4 άτομα. Και στις δύο εργασίες, όμως, η μέση διακύμανση που παρατηρήθηκε στους ταχείς ακετυλιωτές ήταν μικρότερη από αυτή των βραδέων [247].

Η διακύμανση, σε βάθος χρόνου, των CYP1A2, XO και NAT-2 διερευνήθηκε επίσης και σε μελέτη με τη συμμετοχή 10 ανδρών και 8 προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, όλων μη καπνιστών, οι οποίοι υποβλήθηκαν στη δοκιμασία της καφεΐνης για 3 μήνες με επανάληψη της δοκιμασίας ανά 14 ημέρες. Στην δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολικοί λόγοι (AFMU+1U+1X)/17U για το CYP1A2, 1U/1X και 1U/(1U+1X) για την XO και AFMU/1X, AFMU/(1U+1X) και AFMU/(AFMU+1U+1X), για την NAT-2, σε ολονύκτια συλλογή ούρων. Η μέση διακύμανση για το CYP1A2 ήταν 19,63% με εύρος 4,53-49,3%, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών ούτε μεταξύ των φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου στις γυναίκες. Όσον αφορά τα δύο άλλα ένζυμα, αναφέρεται ότι οι μεταβολικοί λόγοι 1U/(1U+1X) και AFMU/(AFMU+1U+1X) παρουσίασαν την μικρότερη μεταβλητότητα, έναντι των άλλων ομολόγων τους, και μόνον αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στην έκθεση των αποτελεσμάτων για τις XO και NAT-2, αντίστοιχα, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η μέση διακύμανση για την XO ήταν 5,63% με εύρος 2,29-13,05% και είναι παραπλήσια με τη διακύμανση του αυτού μεταβολικού λόγου της παρούσας μελέτης. Η μέση διακύμανση της NAT-2 για μεν τους βραδείς ακετυλιωτές ήταν 16,0%, με εύρος 7,5-27,2%, για δε τους ταχείς ήταν 3,1%, με εύρος 2,2-4,7%, αποτελέσματα που είναι της ίδιας τάξεως μεγέθους με αυτά της παρούσας μελέτης, ενώ, και σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκε μικρότερη μέση διακύμανση στην δραστηριότητα της NAT-2 στους ταχείς σε σχέση με αυτή των βραδέων ακετυλιωτών [66].

Ένας άλλος, διαφορετικής σύλληψης, μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στα ούρα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 σε 9 υγιείς άνδρες και 9 υγιείς γυναίκες για διάστημα 4 εβδομάδων με μία δειγματοληψία ανά

εβδομάδα. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν οι τιμές του λόγου $(17U+17X)/137U$ σε δείγμα ούρων 4-5 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης και η μέση μεταβλητότητα ήταν 23,2% με εύρος από 10,8-39,0% [44]. Παρόλη την μικρότερη διάρκεια της μελέτης αυτής, σε σχέση με την παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε υπερδιπλάσια μεταβλητότητα οφειλόμενη, πιθανώς, στον μεγαλύτερο αριθμό των συμμεταχόντων (18 έναντι 6). Υπάρχει, όμως, σοβαρή ένδειξη ότι το μέγεθος της διακύμανσης αυτής οφείλεται στον μεταβολικό λόγο καθεαυτόν καθώς περιλαμβάνει στον αριθμητή την 17X και στον παρονομαστή την καφεΐνη (137X), ουσίες των οποίων η απέκκριση εξαρτάται από την ποσότητα των ούρων στην μονάδα του χρόνου εξαρτάται, δηλαδή, από την ποσότητα πρόσληψης υγρών και από ατομικά χαρακτηριστικά των νεφρών, παράγοντες των οποίων η διακύμανση είναι ανεξάρτητη από την λειτουργία του CYP1A2 και προστίθεται σ' αυτήν του συγκεκριμένου ενζύμου.

Ο μεταβολικός λόγος $17X/137X$ στο πλάσμα, 5 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης, απετέλεσε τον δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2 κατά την διάρκεια μιας μελέτης 12 εβδομάδων στην οποία συμμετείχαν 16 νεαροί και 16 ηλικιωμένοι υγιείς εθελοντές, μέσης ηλικίας 25 και 70 ετών, αντίστοιχα. Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν στην δοκιμασία 5 φορές, με απόσταση 3 εβδομάδων μεταξύ των δοκιμασιών, χωρίς να βρεθεί κάποια σημαντική διαφορά στη μέση διακύμανση του λόγου αυτού μεταξύ νεαρών και ηλικιωμένων η οποία ήταν 17,6%, με εύρος 6,9-26,5%, για τους νεαρότερους και 16,2%, με εύρος 8,6-32,9%, για τους περισσότερο ηλικιωμένους εθελοντές [249]. Παρόλο που η δοκιμασία του συγκεκριμένου μεταβολικού λόγου στο πλάσμα θεωρείται πιο αντιπροσωπευτική της δραστηριότητας του CYP1A2, σε σχέση με τις δοκιμασίες στα ούρα, η παρατηρηθείσα διακύμανση των τιμών είναι της αυτής τάξης μεγέθους, και κατά τι μεγαλύτερη, από την διακύμανση που προσδιορίστηκε στην παρούσα εργασία, με την χρήση του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ στα ούρα.

Σε άλλη μελέτη, στην οποία διερευνήθηκαν οι διακυμάνσεις της δραστηριότητας της XO και της NAT-2 σε 10 άτομα, με έξι μηνιαίους προσδιορισμούς, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολικοί λόγοι $1U/(1U+1X)$ και $AFMU/1X$ σε ούρα 24ώρου μετά την από του στόματος χορήγηση 300 mg καφεΐνης. Η μέση διακύμανση ήταν 25,8% και 15,4%, για τους δύο μεταβολικούς λόγους, αντίστοιχα, χωρίς την αλλαγή του φαινοτύπου της ακετυλίωσης σε κάποιο άτομο κατά την διάρκεια της μελέτης αλλά με, παραδόξως, μεγάλη σε σχέση με τις προηγούμενες εργασίες, διακύμανση της

δραστηριότητας της ΧΟ [127]. Το γεγονός αυτό δεν είναι πιθανόν να ερμηνεύεται από την μεγάλη διάρκεια της μελέτης καθώς η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού δεν φαίνεται να επηρεάζεται, σε σημαντικό βαθμό, από περιβαλλοντικούς παράγοντες πλύν της κατανάλωσης καφεΐνης και της έντονης σωματικής άσκησης [43].

Η διακύμανση, τέλος, της δραστηριότητας του CYP2A6 προσδιορίστηκε σε 5 υγιή άτομα για 4 εβδομάδες με τον μεταβολικό λόγο 17U/17X σε μεμονωμένο δείγμα ούρων 4-5 ώρες μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης και είχε εύρος από 12-24% [113]. Οι αντίστοιχες τιμές του αυτού μεταβολικού λόγου που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία είναι, κατά προσέγγιση, 2,5 φορές μεγαλύτερες και η διαφορά αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στη μεγαλύτερη διάρκεια της παρακολούθησης (10 έναντι 4 εβδομάδων).

2.3.3. Η κατανομή των τιμών των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης

2.3.3.1. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U

Στην παρούσα εργασία οι τιμές του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U παρουσίασαν κανονική κατανομή, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς, ελαχιστοποιώντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την πιθανότητα ύπαρξης κάποιου γενετικού πολυμορφισμού ο οποίος θα μπορούσε να επηρεάσει την φαινοτυπική έκφραση του ενζύμου. Η κατανομή του αυτού ή κάποιων ελαφρώς τροποποιημένων μεταβολικών λόγων έχει εξεταστεί σε αρκετές μελέτες διαφόρων πληθυσμών με διαφορετικά πρωτόκολλα χορήγησης της καφεΐνης και δειγματοληψίας των ούρων.

Σε μία πρώιμη μελέτη της δραστηριότητας του CYP1A2 με την μέθοδο των μεταβολικών λόγων εξετάστηκε η κατανομή του λόγου (AFMU+1U+1X)/17X σε ούρα 24ώρου σε έναν πληθυσμό αποτελούμενο από 42 Καυκάσιους και 26 Ασιάτες, οι οποίοι ήταν όλοι μη καπνιστές. Οι μέσες τιμές του μεταβολικού αυτού λόγου ήταν σημαντικά υψηλότερες στους Καυκάσιους, αλλά οι τιμές του δεκαδικού λογαρίθμου παρουσίασαν κανονική κατανομή και στις δύο φυλετικές ομάδες. Οι απόλυτες τιμές του μεταβολικού λόγου είχαν εύρος από 0,89-25,54 στο σύνολο των συμμετεχόντων (περίπου 30 φορές). Οι συγγραφείς αποδίδουν την μεγάλη αυτή μεταβλητότητα σε περιβαλλοντικές επιρροές προερχόμενες από την διαίτα και από επαγωγικούς παράγοντες. Παρατηρούν, επίσης, ότι η απέκκριση της 17X παρουσίασε θετική συσχέτιση με τον όγκο των ούρων του 24ώρου και συνεπώς η συγκέντρωση του μεταβολίτη αυτού εξαρτάται από τη ροή των ούρων (flow-dependet) [202].

Ο λόγος (AFMU+1U+1X)/17X στα συνολικά ούρα των 4 πρώτων ωρών μετά την κατανάλωση καφεϊνούχου αναψυκτικού, χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε 331 υγιείς εθελοντές λευκής και μαύρης φυλής. Η κατανομή των απολύτων τιμών του μεταβολικού αυτού λόγου δεν ήταν κανονική αλλά ο διπλός φυσικός λογάριθμος εμφάνισε μία πιο συμμετρική κατανομή. Η διακύμανση των απολύτων τιμών του μεταβολικού λόγου στον πληθυσμό ήταν 85% [215].

Σε άλλη μελέτη συμμετείχαν 144 εθελοντές λευκής φυλής, 21 Ασιατικής καταγωγής και 13 διαφόρων άλλων εθνικοτήτων. Από αυτούς οι 19 ήταν καπνιστές και 18 γυναίκες χρησιμοποιούσαν από του στόματος αντισυλληπτικά. Η δραστηριότητα του CYP1A2 προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου (AAMU+1U+1X)/17U σε πρωϊνά ούρα μετά από απογευματινή κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών. Ο δεκαδικός λογάριθμος του μεταβολικού αυτού λόγου παρουσίασε κανονική κατανομή με μέση απόλυτη τιμή 5,96, συντελεστή μεταβλητότητας 40,3% και εύρος τιμών δέκα φορές, περίπου. Εν κατακλείδι, οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι το ένζυμο δεν παρουσιάζει πολυμορφική μεταβλητότητα και συμπληρώνουν ότι η κατανομή αυτή είναι δηλωτική μιας πολυπαραγοντικής επίδρασης η οποία, χωρίς περαιτέρω έλεγχο, είναι αδύνατον να προσδιοριστεί αν και σε ποια έκταση είναι περιβαλλοντική ή γενετική [36, 127].

Ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U διερευνήθηκε σε μεσημβρινά μεμονωμένα δείγματα ούρων 335 υγιών εθελοντών μετά από πρωϊνή κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών. Μεταξύ των εθελοντών υπήρχαν 171 γυναίκες εκ των οποίων οι 12 ήταν σε κατάσταση εγκυμοσύνης και οι 28 ήταν χρήστριες από του στόματος αντισυλληπτικών. Η κατανομή των συχνοτήτων του δεκαδικού λογάριθμου του λόγου αυτού προσαρμόστηκε σε μία κανονική κατανομή και, όπως επισημαίνουν οι ίδιοι οι συγγραφείς, το γεγονός αυτό υποδηλώνει την απουσία πολυμορφισμού [43].

Παρομοίως, κανονική κατανομή, μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό, παρατηρήθηκε και στις τιμές του μεταβολικού λόγου (AAMU+1U+1X)/17U στα ούρα 24ώρου 107 υγιών ατόμων ισπανικής καταγωγής, εκ των οποίων οι 37 ήταν καπνιστές ενώ καμία γυναίκα δεν έκανε χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών. Και σ' αυτήν την περίπτωση οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι η κατανομή αυτή είναι ενδεικτική μιας πολυπαραγοντικής μεταβλητότητας στην δραστηριότητα του CYP1A2 [127].

Το αυτό έτος διεξήχθη μία μελέτη για την αξιολόγηση της ικανότητας διαφόρων μεταβολικών λόγων να απεικονίσουν την δραστηριότητα του CYP1A2 στην οποία

συμμετείχαν 39 υγιείς φοιτητές, εκ των οποίων οι 26 ήταν Καυκάσιοι και οι 13 Ασιάτες. Οι 20 ήταν γυναίκες, εκ των οποίων οι 8 ελάμβαναν από του στόματος αντισυλληπτικά, οι 19 ήταν άνδρες και μόνον ένας εθελοντής ήταν καπνιστής. Οι ανωτέρω έλαβαν μία πρωινή δόση 140 mg καφεΐνης και η ολονύκτια συλλογή ούρων τους χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U, ενώ η συλλογή ούρων του χρονικού διαστήματος 4-5 ωρών μετά την κατανάλωση της καφεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του λόγου (17U+17X)/137X. Οι τιμές του πρώτου λόγου είχαν εύρος 5 φορές, ενώ του δεύτερου 12 φορές. Ο δεκαδικός λογάριθμος του λόγου (17U+17X)/137X εμφάνισε δικόρυφη κατανομή ενώ του (AFMU+1U+1X)/17U εμφάνισε κανονική κατανομή. Περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι οι τιμές του δεύτερου από τους λόγους αυτούς είχαν εξάρτηση από την νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και από τον ρυθμό ροής των ούρων και κατά συνέπεια ο λόγος αυτός, πέραν της μεταβολικής λειτουργίας αντανακλά και παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας. Αντίθετα, ο λόγος (AFMU+1U+1X)/17U δεν εμφάνισε τέτοιου είδους εξάρτηση και κρίθηκε καταλληλότερος για την απεικόνιση της δραστικότητας του CYP1A2. Συνεπώς, η κανονική κατανομή των τιμών του λόγου αυτού φαίνεται να αντιπροσωπεύει πλησιέστερα την δραστικότητα του ενζύμου στους υγιείς [206].

Σε άλλη μελέτη, ο μεταβολικός λόγος (AAMU+1U+1X)/17U σε μεμονωμένα δείγματα ούρων 237 εθελοντών, 2-6 ώρες μετά την κατανάλωση μιας κούπας καφέ ή τσαγιού, δεν παρουσίασε ενδείξεις δικόρυφης ή τρικόρυφης κατανομής, ενώ η τετραγωνική ρίζα του δεκαδικού λογαρίθμου του λόγου αυτού προσέγγισε την κανονική κατανομή. Οι τιμές του ως άνω λόγου είχαν εύρος από 1,43 έως 180,53 (126 φορές) με μέσο όρο (τυπική απόκλιση) 12,19 (18,20) και οι συγγραφείς αναφέρουν ότι, αν υποθεθεί ότι ο λόγος αυτός αντανακλά τη δραστικότητα του CYP1A2, τότε είναι πιθανόν το ένζυμο αυτό να υπόκειται, κυρίως, σε έλεγχο από τις συνθήκες του περιβάλλοντος [201].

Ο δεκαδικός λογάριθμος του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης, 277 υγιών Δανών εθελοντών εμφάνισε, επίσης, μονοκόρυφη κατανομή με ενδιάμεση τιμή των απολύτων τιμών 4,1 και εύρος από 0,91-15,2 (17 φορές). Από τους εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη 41 άτομα ήταν καπνιστές και 64 γυναίκες έκαναν χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών [204]. Με την ίδια αναλυτική μέθοδο, οι τιμές του αυτού μεταβολικού λόγου είχαν μονοκόρυφη κατανομή σε έναν πληθυσμό 378 μονοζυγωτικών και

διζυγωτικών Δανών διδύμων με μέση τιμή $5,9 \pm 3,4$, ενώ μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονταν 80 καπνιστές και 31 χρήστριες από του στόματος αντισυλληπτικών [78]. Ένας ειδικός πληθυσμός 416 εγκύων γυναικών Δανικής καταγωγής, μεταξύ αυτών και 48 καπνίστριες, συμμετείχε σε μία παρόμοια, με τις δύο προηγούμενες, μελέτη με την διαφορά ότι ο προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου έγινε μέσω της καφεΐνης της δίαιτας και τυχαίας δειγματοληψίας των ούρων. Οι τιμές του δεκαδικού λογαρίθμου του ως άνω λόγου παρουσίασε κανονική κατανομή με εύρος τιμών από 0,48 έως 76,0 (70 φορές) και μέση τιμή $6,8 \pm 6,6$ [205]. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορούσαν στους διδύμους υπέδειξαν ότι η κληρονομικότητα ήταν υπεύθυνη για το 72,5% της μεταβλητότητας στην δραστικότητα του CYP1A2, ενώ οι περιβαλλοντικές επιδράσεις, εξαιρουμένων του καπνίσματος και των από του στόματος αντισυλληπτικών, ευθύνονταν για το υπόλοιπο 27,5%.

Σε αντίθεση με το τελευταίο αυτό συμπέρασμα, από μελέτη η οποία διεξήχθη σε Γαλλικό πληθυσμό διαπιστώθηκε ότι οι γενετικοί παράγοντες είναι αμελητέοι στον καθορισμό της δραστικότητας του CYP1A2, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την χρήση του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ σε ολονύκτιο δείγμα ούρων μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης. Στην μελέτη αυτή συμμετείχαν 164, μη συγγενείς, καπνιστές, 68 οικογένειες καπνιστών στις οποίες ένας τουλάχιστον γονέας και τα τέκνα ήταν καπνιστές και 81 μη καπνιστές. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης στις 68 οικογένειες δεν έδειξαν σημαντική οικογενή ομοιότητα στην δραστικότητα του CYP1A2 ούτε την μεταβίβαση κάποιου κυρίαρχου γονιδίου. Επιπλέον, οι κατανομές συχνοτήτων του δεκαδικού λογαρίθμου των τιμών του μεταβολικού λόγου ήταν κανονικές, τόσο για τους καπνιστές όσο και για τους μη καπνιστές. Το γενικό συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν οι συγγραφείς είναι ότι, με την *in vivo* χρήση της καφεΐνης, δεν βρέθηκε κάποιος γενετικός πολυμορφισμός στους φαινότυπους του CYP1A2 και ότι η συνήθης διακύμανση της δραστικότητας του ενζύμου η οποία παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφόρων ατόμων υποδηλώνει την ύπαρξη μιας πολυπαραγοντικής επίδρασης [37].

Κανονική κατανομή παρουσιάστηκε και στις τιμές του δεκαδικού λογαρίθμου του αυτού μεταβολικού λόγου τόσο σε συλλογές ούρων 24ώρου όσο και σε συλλογή ούρων 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση 200 mg καφεΐνης σε 125 άτομα ενός Ισπανικού πληθυσμού. Το εύρος των απολύτων τιμών του μεταβολικού λόγου ήταν από 0,99-18,08 (18 φορές, CV%=43,20%) στην πρώτη περίπτωση και 2,54-18,24 (7 φορές, CV%=45,77%) στην

δεύτερη ενώ 66 εθελοντές ήταν καπνιστές και καμία γυναίκα δεν ήταν χρήστρια από του στόματος αντισυλληπτικών [203].

Μία άλλη προσέγγιση του αυτού μεταβολικού λόγου, σε συνολική συλλογή ούρων 6 ωρών 192 Καυκάσιων εθελοντών μετά από κατανάλωση 200 mg καφεΐνης, έγινε από τους Schrenk *et al.* [246]. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές αυτοί εξέτασαν την κατανομή των τιμών του λόγου αυτού χωρίς την λογαριθμική μετατροπή τους και διαπίστωσαν ότι οι τιμές αυτές προσαρμόζονται καλύτερα σε δύο διακριτές κανονικές κατανομές απ' ό,τι σε μία μονοκόρυφη ασύμμετρη (skewed) κατανομή στους άνδρες, είτε αυτοί ήταν καπνιστές είτε μη καπνιστές, αλλά αυτό δεν συνέβη με τις γυναίκες. Οι τιμές του λόγου αυτού είχαν εύρος από 2,2 έως 14,0 στον συνολικό πληθυσμό (περίπου 6,5 φορές). Οι συγγραφείς σχολιάζουν ότι το αποτέλεσμα αυτό αφήνει, αφενός, ανοιχτό το ερώτημα για την ύπαρξη περισσότερων του ενός φαινοτυπικού υποπληθυσμού στους Καυκάσιους - άνδρες και γυναίκες, καπνιστές και μη καπνιστές - και αφετέρου είναι ενδεικτικό της ύπαρξης υποομάδων που ανταποκρίνονται περισσότερο ή λιγότερο σε επαγωγικούς παράγοντες που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου και της διαίτας. Το τελευταίο εύρημα αποδίδεται, πιθανότατα, στην ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού στην δυνατότητα απόκρισης της σηματοδοτικής οδού του υποδοχέα Ah (Aryl hydrocarbon).

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $(AAMU+1U+1X)/17U$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων εξετάστηκε σε έναν Ιαπωνικό πληθυσμό 182 ατόμων, εκ των οποίων οι 29 ήταν καπνιστές, χωρίς ο δεκαδικός λογάριθμος τους να εμφανίσει δικόρυφη κατανομή ενώ οι απόλυτες τιμές είχαν εύρος από 2,1 έως 112,0 (53 φορές, $CV\% = 130\%$). Οι συγγραφείς, σχολιάζοντας το αποτέλεσμα, επιβεβαιώνουν την απουσία φαινοτυπικού πολυμορφισμού του CYP1A2 που διαπιστώθηκε σε προγενέστερες μελέτες [126].

Σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 146 προεμμηνοπαυσιακές και 149 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η κατανομή του δεκαδικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ σε ούρα 24ώρου, με βάση την καφεΐνη της διαίτας, παρουσίασε κανονική κατανομή στο σύνολο του πληθυσμού αυτού. Το εύρος των απόλυτων τιμών του λόγου αυτού κυμάνθηκε από 0,77-23,5 [81].

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη της δραστηριότητας του CYP1A2 σε έναν ελληνικό πληθυσμό περιλήφθηκαν 21 άνδρες και 23 γυναίκες, χωρίς χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών, ενώ 23 από τους εθελοντές ήταν καπνιστές. Στους εθελοντές αυτούς

προσδιορίστηκε ο μεταβολικός λόγος $(AFMU+1U+1X)/17U$ σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης. Η κατανομή της τετραγωνικής ρίζας του δεκαδικού λογαρίθμου των τιμών του λόγου αυτού ήταν κανονική με εύρος των αμετάτρεπτων τιμών 3,06-11,15 (3,6 φορές) [39].

Κατόπιν των ανωτέρω αναφορών, διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται, σε γενικές γραμμές, σε συμφωνία με τις περισσότερες εργασίες οι οποίες αφορούν στην κατανομή του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ και, κατ' επέκταση, συνηγορούν στην μη πολυμορφική δραστικότητα του CYP1A2. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία, η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου, στο σύνολο των 125 υγιών εθελοντών, ήταν της τάξεως του 4,08, το εύρος τιμών ήταν περίπου 5 φορές (2,17-11,15), παρόμοιο με αυτό που αναφέρθηκε στην εργασία των Tang *et al.* [206], ενώ η διακύμανση ήταν της τάξεως του 39,7%. Τα μεγέθη αυτά είναι ελαφρώς μικρότερα από αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πιθανώς λόγω της αυστηρά καθορισμένης δόσης και μορφής της καφεΐνης, του χρόνου δειγματοληψίας των ούρων και του αριθμού των υγιών εθελοντών. Πρέπει να επισημανθεί, επίσης, ότι στην παρούσα μελέτη δεν συμμετείχαν γυναίκες που έκαναν χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών, γεγονός που μείωσε την διακύμανση των τιμών του μεταβολικού λόγου καθώς τα αντισυλληπτικά είναι παράγοντας αναστολής της δραστικότητας του CYP1A2 και εισάγουν χαμηλότερες τιμές στο δείγμα του πληθυσμού. Τα μεγέθη αυτά, αν και κατά τι μικρότερα, ήταν της αυτής τάξεως μεγέθους με τις περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες γεγονός που, πέραν των άλλων, συνηγορεί στην αξιοπιστία της εφαρμοσθείσας αναλυτικής μεθόδου.

Πέραν των ανωτέρω μελετών που έγιναν με την χρήση του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ ή του ισοδυνάμου $(AAMU+1U+1X)/17U$, έχουν διεξαχθεί και άλλες μελέτες οι οποίες χρησιμοποιούν διαφορετικούς λόγους των μεταβολιτών της καφεΐνης. Σε μία πολυφυλετική μελέτη 274 ατόμων προερχομένων από τις ΗΠΑ, την Ιταλία και την Κίνα, η κατανομή του μεταβολικού λόγου $(17X+17U)/137X$, σε ούρα συλλεχθέντα 4-5 ώρες μετά την χορήγηση της καφεΐνης, ήταν τρικόρυφη στους μη καπνιστές [32]. Η νεφρική απέκκριση, όμως, των διμεθυλοξανθινών και της καφεΐνης εξαρτάται από την ροή των ούρων και, κατά συνέπεια, το είδος αυτό της κατανομής είναι πολύ πιθανόν να αντανakλά διαφυλετικές διαφορές στην νεφρική λειτουργία, μάλλον, παρά την φαινοτυπική διακύμανση του CYP1A2 [57]. Ο λογάριθμος του ίδιου

μεταβολικού λόγου στα ούρα, όμως, σε δύο μεταγενέστερες μελέτες κατά τις οποίες διερευνήθηκε η επαγωγιμότητα του CYP1A2 από τις ετεροκυκλικές αμίνες σε 66 μη καπνιστές εθελοντές από τις ΗΠΑ, παρουσίασε μονοκόρυφη κατανομή, τύπου καμπύλης Gauss. Στις μελέτες αυτές δεν έγινε αναφορά για την φυλετική καταγωγή των συμμετεχόντων [17, 40]. Σε καυκάσιο πληθυσμό 92 μη καπνιστών εθελοντών, εξάλλου, η κατανομή του λογαρίθμου του ίδιου μεταβολικού λόγου στα ούρα ήταν κανονική με εύρος απολύτων τιμών από 1,48 έως 18,65 (περίπου 13 φορές). Στην ίδια μελέτη έγινε διερεύνηση του γονιδίου του CYP1A2 για γενετικούς πολυμορφισμούς χωρίς να βρεθούν διαφορές αλληλουχίας του DNA, με πιθανή λειτουργική σημασία, μεταξύ των βραδέων και ταχέων μεταβολιστών. Κατόπιν των συνδυασμένων αυτών μελετών οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το CYP1A2 δεν παρουσιάζει σημαντικό λειτουργικό πολυμορφισμό και κατά συνέπεια η μεγάλη διακύμανση στην δραστικότητα του ενζύμου αυτού πρέπει να οφείλεται στην επίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος [250].

Η διερεύνηση του γονιδίου του CYP1A2 απετέλεσε και το αντικείμενο μελέτης κατά την οποία διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού μεμονωμένου νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP), με την αντικατάσταση C →A στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου στην θέση 734 από το πρώτο μεταγραφόμενο νουκλεοτίδιο. Η αντικατάσταση αυτή δεν επηρέασε την δραστικότητα του ενζύμου σε 185 μη καπνιστές, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τον μεταβολικό λόγο $(17X+17U)/137X$ σε συλλογή ούρων 0-5 ώρες μετά την χορήγηση της καφεΐνης. Αντίθετα, οι ομοζυγώτες για την μετάλλαξη καπνιστές εμφάνισαν αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου, σε σχέση με τους άλλους γονοτύπους, με βάση τον μεταβολικό λόγο $17X/137X$ στο πλάσμα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη αυτή, στην μη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου, επηρεάζει την επαγωγιμότητα του ενζύμου στους καπνιστές, πιθανώς μέσω της διαφορικής σύνδεσης εν δυνάμει ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι κατανομές συχνοτήτων των δεκαδικών λογαρίθμων των τιμών των δύο μεταβολικών λόγων ήταν κανονικές [73]. Το γεγονός αυτό φαίνεται ως φυσικό επακόλουθο για τους μη καπνιστές καθώς ο ανιχνευθείς πολυμορφισμός δεν επηρέασε την φαινοτυπική δραστικότητα του ενζύμου στους διάφορους γονοτύπους. Αντίθετα, δικόρυφη κατανομή τιμών θα ήταν αναμενόμενη στους καπνιστές καθώς υπήρξε σημαντική διαφορά στην δραστικότητα του ενζύμου μεταξύ των ομοζυγωτών για την μετάλλαξη και των άλλων γονοτύπων. Είναι, όμως, πιθανόν ότι η γενικώς διαπιστωμένη μεγάλη διακύμανση της δραστικότητας του

CYP1A2 μεταξύ των ατόμων να επεσκίασε την παρατηρηθείσα, στην συγκεκριμένη περίπτωση, διαφορά καθώς, όπως απεικονίζεται και στα ιστογράμματα που παραθέτουν οι συγγραφείς, υπήρξε μεγάλη αλληλεπικάλυψη στις τιμές του μεταβολικού λόγου 17X/137X μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων.

Ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στο πλάσμα 229 Κινέζων φοιτητών, 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης, απετέλεσε το αντικείμενο μελέτης για τη διερεύνηση πιθανού φαινοτυπικού πολυμορφισμού του CYP1A2. Κανείς από τους συμμετέχοντες δεν ήταν καπνιστής και οι γυναίκες δεν έκαναν χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανομή του λογαρίθμου του λόγου αυτού δεν ήταν κανονική και ένα ποσοστό 5,24% των εθελοντών χαρακτηρίστηκαν ως πτωχοί μεταβολιστές του CYP1A2. Οι απόλυτες τιμές του λόγου αυτού είχαν εύρος 16 φορές και διακύμανση 62,9% [251]. Παρόλο που οι συγγραφείς παραθέτουν μία σειρά μελετών οι οποίες έχουν ανακαλύψει διάφορες ρυθμιστικές περιοχές και διάφορους ρυθμιστικούς παράγοντες του γονιδίου του CYP1A2 καθώς και τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς στην 5'-πλευρική περιοχή, οι οποίοι ρυθμίζουν την επαγωγιμότητα από το κάπνισμα, καταλήγουν στην θέση ότι πρέπει να υπάρξει περαιτέρω διερεύνηση της υπόθεσης ότι γενετικοί πολυμορφισμοί των παραγόντων αυτών αποτελούν τη μοριακή βάση του διαπιστωθέντος φαινοτυπικού πολυμορφισμού.

Ο αυτός, όπως και προηγουμένως, λόγος χρησιμοποιήθηκε για την φαινοτυπική διερεύνηση της δραστηριότητας του CYP1A2 και την σύγκρισή της με πέντε, γνωστούς, γενετικούς πολυμορφισμούς σε έναν μικτό πληθυσμό 194 Σουηδών και 150 Κορεατών. Ο δεκαδικός λογάριθμος των τιμών του λόγου αυτού εμφάνισε κανονική κατανομή, τόσο στους Κορεάτες όσο και στους Σουηδούς, ενώ, αφού λήφθηκε υπόψη το κάπνισμα και η χρήση αντισυλληπτικών, η μέση τιμή του λόγου ήταν υψηλότερη στους τελευταίους χωρίς, όμως, η διαφορά αυτή να συσχετίζεται με κάποιον συγκεκριμένο γονότυπο, οφειλόμενο στον συνδυασμό των πέντε εξετασθέντων σημειακών πολυμορφισμών. Οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι υπάρχει η πιθανότητα κάποιοι άγνωστοι, μέχρι σήμερα, πολυμορφισμοί του γονιδίου του CYP1A2 σε συνδυασμό με διαιτητικές συνήθειες να είναι υπαίτιοι των παρατηρουμένων διαφορών, τόσο μεταξύ των ατόμων της αυτής εθνικής προέλευσης όσο και μεταξύ ατόμων διαφορετικής καταγωγής [72].

Οι τελευταίες αυτές φαινοτυπικές μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη αλλά με διαφορετικούς σε σύλληψη μεταβολικούς λόγους και σε

διαφορετικά βιολογικά υγρά, σε σχέση με την παρούσα εργασία, καθώς και η γενετική διερεύνηση του γονιδίου δεν κατόρθωσαν να διαπιστώσουν με βεβαιότητα την ύπαρξη κάποιου γενετικού πολυμορφισμού ο οποίος θα καθόριζε την δραστικότητα του CYP1A2. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα AhR, από τον οποίο εξαρτάται η απόκριση του γονιδίου του CYP1A2 στα ξενοβιοτικά, είναι σπάνιοι και οι ελάχιστες υπάρχουσες γενετικές παραλλαγές δεν φαίνεται ότι ασκούν ισχυρή επίδραση στην λειτουργία του υποδοχέα [34]. Όσον αφορά το γονίδιο της ARNT, τέλος, έχει διερευνηθεί η πιθανότητα της επίδρασης των τυχόν υπαρχόντων πολυμορφισμών στην δραστηριότητα του CYP1A2. Στο πλαίσιο αυτό ταυτοποιήθηκαν 6 πολυμορφικές περιοχές σε έναν δείγμα 79 Καυκάσιων, μη καπνιστών, εθελοντών ενώ, ταυτόχρονα, διερευνήθηκε η δραστικότητα του CYP1A2 με την χρήση του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στα ίδια άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των υπαρχόντων πολυμορφισμών της ARNT και της δραστηριότητας του CYP1A2 [252].

Κατόπιν αυτών, και σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η δραστικότητα του ηπατικού αυτού ενζύμου, στους υγιείς, υπόκειται, σε μεγάλο βαθμό, σε επιδράσεις περιβαλλοντικής προέλευσης οι οποίες, σε συνδυασμό με την περιγραφείσα δυνατότητά του για επαγωγή και αναστολή, μπορούν να ερμηνεύσουν επαρκώς την παρατηρούμενη στους διάφορους πληθυσμούς ευρεία διακύμανση της δραστικότητας αυτής.

2.3.3.2. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X)

Στην παρούσα μελέτη έγινε, για πρώτη φορά, χρήση του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X) ως εναλλακτικού του λόγου 17U/17X για την μελέτη της δραστικότητας του CYP2A6. Η ανάγκη αυτή προέκυψε από την διαπίστωση ότι ο δεύτερος λόγος παρουσίασε σημαντικά υψηλότερο βαθμό διακύμανσης κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των 6 υγιών εθελοντών για 10 συνεχείς εβδομάδες. Πράγματι, η μέση διακύμανση του λόγου αυτού ήταν 47,8% με εύρος 31,2-61,1% ενώ του πρώτου ήταν 17,4% με εύρος 11,5-22,6%. Σε άλλη μελέτη, κατά την οποία είχε γίνει παρακολούθηση 5 υγιών ατόμων για 4 εβδομάδες, το εύρος της διακύμανσης του λόγου 17U/17X, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 4-5 ώρες μετά την χορήγηση της καφεΐνης, ήταν 12-24% [113]. Η υψηλότερη διακύμανση του αυτού λόγου που παρατηρήθηκε στην παρούσα

μελέτη είναι πιθανόν να οφείλεται στην μεγαλύτερη διάρκεια της παρακολούθησης (10 αντί 4 εβδομάδων), στον μεγαλύτερο αριθμό των εθελοντών (6 αντί για 5) και, τέλος, στο γεγονός ότι η νεφρική απέκκριση της 17X, όπως και των άλλων διμεθυλοξανθινών, είναι χαμηλή και εξαρτάται από το ρυθμό αποβολής των ούρων [124, 186]. Εξάρτηση από τη ροή σημαίνει ότι η ποσότητα των υγρών που λαμβάνονται από ένα άτομο μπορεί να επηρεάσει την νεφρική απέκκριση των μεθυλοξανθινών [57], με συνέπεια η απέκκριση της 17X, στο αυτό άτομο, να παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, ανάλογα με την ποσότητα λήψης υγρών από το άτομο αυτό.

Στην παρούσα μελέτη η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου $17U/(17U+17X)$ ήταν κανονική τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς, χωρίς να γίνει διαχωρισμός μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της απουσίας κάποιου γενετικού πολυμορφισμού ο οποίος να επηρεάζει την φαινοτυπική δραστηριότητα του CYP2A6. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη σύμφωνα με την οποία η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου $17U/17X$, σε ούρα 24ώρου, ήταν μονοκόρυφη τόσο σε 42 καυκάσιους όσο και σε 26 ασιάτες με τους καυκάσιους να παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές [202]. Παρόμοιο ήταν και το συμπέρασμα νεότερης μελέτης κατά την οποία η συνάρτηση της πυκνότητας συχνοτήτων του φυσικού λογαρίθμου του αυτού μεταβολικού λόγου σε έναν πληθυσμό υγιών εθελοντών 333 ατόμων ήταν μονοκόρυφη, τόσο στους καπνιστές όσο και στους μη καπνιστές, με μεγάλο βαθμό αλληλεπικάλυψης μεταξύ των δύο αυτών υποπληθυσμών [113]. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, τέλος, η οποία διεξήχθη σε ελληνικό πληθυσμό 44 ατόμων, εκ των οποίων οι 23 ήταν καπνιστές, η κατανομή συχνοτήτων του δεκαδικού λογαρίθμου του λόγου $17U/17X$ σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης, ήταν κανονική. Κατ' αυτόν τον τρόπο και παρά την διαφορετική δειγματοληψία ούρων που ακολουθήθηκε, επιβεβαιώθηκε η απουσία πολυμορφισμού στην δραστηριότητα του CYP2A6 [39].

2.3.3.3. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$

Στην παρούσα μελέτη η δραστηριότητα της XO προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ ο οποίος παρουσίασε μικρότερη μέση μεταβλητότητα, στο αυτό άτομο, από τον $1U/1X$, στην διάρκεια της παρακολούθησης των 6 υγιών ατόμων για 10 εβδομάδες. Πράγματι, ο δεύτερος λόγος είχε μέση μεταβλητότητα 11,0% ενώ ο

πρώτος είχε 5,3%. Η κατανομή συχνοτήτων του ανωτέρω μεταβολικού λόγου ήταν κανονική, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς, με την εξαίρεση 4 ασυνήθιστα υψηλών τιμών στους ασθενείς.

Η κατανομή του μεταβολικού λόγου $1U/1X$ σε ούρα 24ώρου εξετάστηκε και σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 42 καυκάσιοι και 26 ασιάτες, όλοι μη καπνιστές. Η κατανομή συχνοτήτων του δεκαδικού λογαρίθμου του λόγου αυτού παρουσίασε μονοκόρυφη κατανομή χωρίς διαφορά για τις δύο φυλετικές ομάδες. Η διακύμανση των τιμών του λόγου αυτού ήταν πολύ μικρότερη, στο σύνολο των εθελοντών, από την διακύμανση των τιμών των λόγων $(AFMU+1U+1X)/17X$, δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2, και $17U/17X$, δείκτη της δραστηριότητας του CYP2A6. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι το γεγονός αυτό, πιθανώς, αντανακλά μία τελολογική διαφορά μεταξύ βασικών (constitutive) ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, και επαγωγίμων συστημάτων όπως είναι το P450 το οποίο πρέπει να διατηρήσει μεγαλύτερη ευελιξία σε περιβαλλοντικές επιδράσεις [202].

Σε άλλη μελέτη συμμετείχαν 144 εθελοντές λευκής φυλής, 21 ασιατικής καταγωγής και 13 διαφόρων άλλων εθνικοτήτων. Η δραστηριότητα της XO προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ σε πρωϊνά ούρα μετά από απογευματινή κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών. Η κατανομή των συχνοτήτων τόσο των απόλυτων τιμών του λόγου αυτού όσο και των λογαριθμικά μετασχηματισμένων τιμών εμφάνισε παρόμοιες καμπύλες οι οποίες ήταν μονοκόρυφες με την παρουσία, όμως, τεσσάρων ατόμων (2,2%) με πολύ χαμηλές τιμές δραστηριότητας της XO [127].

Δύο μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης, οι $1U/1X$ και $1U/(1U+1X)$, σε συνολικά ούρα 4 ωρών μετά την κατανάλωση κεφεϊνούχων αναψυκτικών, διερευνήθηκαν σε μικτό πληθυσμό 265 λευκών και 75 μαύρων εθελοντών. Η κατανομή συχνοτήτων του φυσικού λογαρίθμου των δύο μεταβολικών λόγων ήταν μονοκόρυφη και στους δύο υποπληθυσμούς, αλλά η κατανομή του δεύτερου λόγου έδειξε πιο ξεκάθαρα την ύπαρξη μερικών ανδρών μαύρης φυλής με ιδιαίτερα χαμηλή δραστηριότητα της XO [215].

Ο δεύτερος από τους δύο αυτούς λόγους έγινε αντικείμενο μελέτης σε 335 υγιείς Δανούς εθελοντές με μεμονωμένη μεσημβρινή συλλογή ούρων μετά από πρωινή κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών. Η κατανομή συχνοτήτων του λόγου αυτού εμφάνισε αμιγώς κανονική κατανομή χωρίς κανενός είδους μετατροπή των δεδομένων [43].

Η δραστηριότητα της XO εξετάστηκε και σε ισπανικό πληθυσμό 107 ατόμων μέσω

του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$. Η κατανομή συχνοτήτων τού λογαρίθμου των τιμών του λόγου αυτού δεν προσαρμόστηκε στην κανονική κατανομή και ένα ποσοστό 4% των συμμετεχόντων παρουσίασε ασυνήθιστα χαμηλές τιμές. Καθώς η γενετική έλλειψη του ενζύμου αυτού είναι πολύ σπάνια, οι συγγραφείς αποδίδουν το αποτέλεσμα αυτό στην επίδραση αγνώστων παραγόντων του περιβάλλοντος [127].

Η κατανομή συχνοτήτων του λόγου $1U/1X$, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης σε 277 Δανούς εθελοντές, εμφάνισε μονοκόρυφη κατανομή χωρίς ιδιαίτερα χαμηλές τιμές σε κάποια άτομα παρά μόνον μία ασυνήθιστα υψηλή τιμή σε ένα άτομο [204].

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $1U/1X$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων εξετάστηκε σε ιαπωνικό πληθυσμό 182 ατόμων, εκ των οποίων οι 29 ήταν καπνιστές, και ο δεκαδικός λογάριθμος τους εμφάνισε δικόρυφη κατανομή. Με βάση το διάγραμμα της συνάρτησης αθροιστικής κατανομής 20 άτομα (11%) χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς μεταβολιστές για την ΧΟ [126].

Παρομοίως, μη κανονική κατανομή εμφανίστηκε και σε μία μελέτη με την συμμετοχή 173 Αιθίοπων στους οποίους προσδιορίστηκε ο μεταβολικός λόγος $1U/(1U+1X)$ σε ολονύκτια ούρα με ένα ποσοστό 4% εξ αυτών να χαρακτηρίζονται ως άτομα με χαμηλή δραστηριότητα της ΧΟ [125].

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, τέλος, η οποία αφορούσε ελληνικό πληθυσμό 44 υγιών ατόμων, εκ των οποίων οι 23 ήταν καπνιστές, η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου $1U/(1U +1X)$ σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, ήταν κανονική χωρίς την ύπαρξη κάποιων ακραίων τιμών [39].

Από τα ανωτέρω εκτεθέντα προκύπτει ότι η παρούσα εργασία, όσον αφορά τους υγιείς, βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών και το γενικό συμπέρασμα που συνάγεται είναι ότι η ΧΟ δεν εκφράζεται πολυμορφικά στους διάφορους πληθυσμούς, γεγονός που επιβεβαιώνει τον ρόλο του ενζύμου στον μεταβολισμό βασικών δομικών συστατικών του ανθρώπινου οργανισμού όπως είναι οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες.

2.3.3.4. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1U+1X)

Στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς καυκάσιας καταγωγής έχουν ταυτοποιηθεί 7 τουλάχιστον σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της NAT-2 και οι διάφοροι συνδυασμοί των μεταλλαγμένων αλληλίων έχουν ως αποτέλεσμα το φαινότυπο της βραδείας ακετυλίωσης. Σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα, το αγρίου τύπου αλληλίο, το οποίο συμβολίζεται ως NAT-2*4, αντικατοπτρίζεται στον φαινότυπο του ταχέως ακετυλιωτή. Τα ομόζυγα άτομα για το αγρίου τύπου αλληλίο (*4/*4) παρουσιάζουν πιο αυξημένη δραστηριότητα ακετυλίωσης από τα ετερόζυγα (*4/slow), παρέχοντας έτσι την δυνατότητα για περαιτέρω ταξινόμηση των ταχέων ακετυλιωτών σε ενδιάμεσους και αμιγώς ταχείς ακετυλιωτές [142, 253]..

Στο πλαίσιο αυτό έγιναν αρκετές μελέτες με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη προκειμένου να διαπιστωθεί η φαινοτυπική κατανομή της NAT-2 σε διάφορους πληθυσμούς. Έτσι, η κατανομή του μεταβολικού λόγου AFMU/1X σε ούρα 24ώρου εξετάστηκε σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 42 καυκάσιοι και 26 ασιάτες, όλοι μη καπνιστές. Η κατανομή συχνοτήτων του δεκαδικού λογαρίθμου παρουσίασε δικόρυφη κατανομή και στις δύο φυλετικές ομάδες. Οι καυκάσιοι βραδείς ακετυλιωτές ήταν 61,9% του συνόλου ενώ οι αντίστοιχοι Ασιάτες 23% [202].

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου AAMU/(AAMU+1U+1X) σε ολονύκτια ούρα 49 ατόμων λευκής φυλής εμφάνισε τρικόρυφη κατανομή και αποδίδει, σύμφωνα με τους συγγραφείς, την διάκριση μεταξύ ομόζυγων βραδέων ακετυλιωτών καθώς και ετερόζυγων και ομόζυγων ταχέων ακετυλιωτών. Οι συγγραφείς επισημαίνουν, εξάλλου, ότι παρόλο που η κατανομή αυτή προσαρμόζεται ικανοποιητικά στη θεωρία των Hardy-Weinberg περί της συχνότητας των γονοτύπων που προκύπτουν από ένα επικρατές και ένα υπολειπόμενο αλληλόμορφο, η πραγματική της αντιστοιχία με τους γονοτύπους της NAT-2 πρέπει να αποδειχθεί με μελέτες οικογενειών [214].

Σε άλλη, παρόμοια, μελέτη στην οποία συμμετείχαν 178 άτομα διαφόρων εθνικοτήτων, εκ των οποίων οι 144 ήταν λευκής φυλής, οι 5 μαύρης φυλής, οι 21 Ασιάτες και οι 8 μικτής προέλευσης, η κατανομή των μεταβολικών λόγων AAMU/(AAMU+1U+1X) και AAMU/1X, τόσο σε πρωινά ούρα όσο και σε ούρα 6 ώρες μετά την κατανάλωση καφεΐνης, παρουσίασε δικόρυφη κατανομή με σημείο διαχωρισμού (antimode) την τιμή 0,34 και 1,23 αντίστοιχα. Οι συγγραφείς προτείνουν, επίσης, ένα

δεύτερο σημείο διαχωρισμού μεταξύ ετεροζύγων και ομοζύγων ταχέων ακετυλιωτών στα σημεία με τιμή 0,58 και 3,4 για τους αντίστοιχους μεταβολικούς λόγους, ενώ επισημαίνουν ότι η παράλληλη δοκιμασία σουλφαμεθαζίνης, η οποία διεξήχθη ως μέθοδος αναφοράς, δεν παρουσίασε υπόνοια τρικόρυφης κατανομής αλλά εμφάνισε μία ξεκάθαρη δικόρυφη κατανομή. Το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών, στο σύνολο των εθελοντών, με την δοκιμασία της καφεΐνης ήταν 57,9% και 59,0% για τους δύο μεταβολικούς λόγους αντίστοιχα, στα ούρα των 6 ωρών, και 56,7% και για τους δύο μεταβολικούς λόγους για τα πρωινά ούρα, ενώ υπήρξε ταύτιση μεταξύ της φαινοτυπικής ταξινόμησης μέσω της δοκιμασίας καφεΐνης στα πρωινά ούρα και της δοκιμασίας σουλφαμεθαζίνης στο αίμα, χωρίς, όπως σχολιάζουν οι συγγραφείς, να προκρίνεται κάποια από τις δύο δοκιμασίες της καφεΐνης ως προτιμότερη. Στις επιμέρους πληθυσμιακές ομάδες τα ποσοστά των βραδέων ακετυλιωτών ήταν 61,8%, 19,0% και 61,5% για τους λευκούς, τους ασιάτες και τους μαύρους-μικτούς αντίστοιχα [216].

Σε μία προσπάθεια διερεύνησης της εγκυρότητας των μεταβολικών λόγων AAMU/(AAMU+1X+1U) και AAMU/1X στον προσδιορισμό του γονοτύπου των ομοζύγων βραδέων καθώς και των ετεροζύγων και ομοζύγων ταχέων ακετυλιωτών, οι λόγοι αυτοί μετρήθηκαν σε ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων 20 λευκών εθελοντών, 6 ώρες μετά την κατανάλωση ενός καφεϊνούχου ποτού. Τα άτομα αυτά είχαν προηγουμένως καταταχθεί ως βραδείς (8 άτομα, 40%), ενδιάμεσοι (8 άτομα, 40%) και ταχείς (4 άτομα, 20%) ακετυλιωτές με την χρήση της δαψόνης ως φαρμάκου-δείκτη. Η δοκιμασία της καφεΐνης και ο δεύτερος μεταβολικός λόγος παρουσίασαν πλήρη συμφωνία με την δοκιμασία της δαψόνης ενώ με βάση τον πρώτο μεταβολικό λόγο, 2 άτομα τα οποία ελάμβαναν θεοφυλλίνη, κατατάχθηκαν διαφορετικά σε σχέση με την δοκιμασία της δαψόνης. Στο πλαίσιο της ίδιας μελέτης οι δύο μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης σε 42 άτομα παρουσίασαν τρικόρυφη κατανομή και, με βάση τον πρώτο μεταβολικό λόγο, το 50% των ατόμων χαρακτηρίστηκαν ως ομόζυγοι βραδείς ακετυλιωτές, το 42,9% ως ετερόζυγοι ταχείς ακετυλιωτές και το 7,1% ως ομόζυγοι ταχείς ακετυλιωτές ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά με βάση τον δεύτερο λόγο ήταν 47,6%, 42,9% και 9,5% [254].

Σε ένα μικτό πληθυσμό λευκών και μαύρων εθελοντών, η δραστηριότητα της NAT-2 διερευνήθηκε μέσω των μεταβολικών λόγων AFMU/1X, AFMU/(1X+1U) και AFMU/(AFMU+1X+1U). Η κατανομή συχνοτήτων του φυσικού λογαρίθμου του πρώτου μεταβολικού λόγου ήταν δικόρυφη και στους δύο υποπληθυσμούς με 64% βραδείς

ακετυλιωτές στους λευκούς και 39% στους μαύρους. Ο φυσικός λογάριθμος του δεύτερου λόγου παρουσίασε δικόρυφη κατανομή στους λευκούς και μονοκόρυφη κατανομή στους μαύρους με 70% βραδείς ακετυλιωτές στους λευκούς και 54% στους μαύρους. Τέλος, ο φυσικός λογάριθμος του τρίτου λόγου παρουσίασε δικόρυφη κατανομή τόσο στους λευκούς όσο και στους μαύρους με 72% βραδείς ακετυλιωτές μεταξύ των λευκών και 58% μεταξύ των μαύρων [215]. Το ίδιο έτος δημοσιεύθηκε μία άλλη μελέτη με τη συμμετοχή 335 υγιών ατόμων Δανικής καταγωγής κατά την οποία διερευνήθηκε ο μεταβολικός λόγος AFMU/1X σε μεσημβρινά μεμονωμένα δείγματα ούρων μετά την πρωινή κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών. Η κατανομή των συχνοτήτων του λόγου αυτού προσαρμόστηκε σε μία δικόρυφη κατανομή με σημείο διαχωρισμού των δύο κατανομών το σημείο 0,55 σύμφωνα με το οποίο το 54% των εθελοντών χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές και το 46% ως ενδιάμεσοι ετεροζυγώτες ακετυλιωτές και ομόζυγοι ταχείς ακετυλιωτές χωρίς την ύπαρξη ενός δεύτερου σημείου διαχωρισμού μεταξύ των δύο τελευταίων. Η κατανομή των βραδέων ακετυλιωτών ήταν αμιγώς κανονική ενώ αυτή των ενδιάμεσων και ταχέων ακετυλιωτών παρουσιάστηκε ως κανονική μετά από λογαριθμική μετατροπή των δεδομένων [43].

Ο μεταβολικός λόγος AAMU/1X σε ούρα 24ώρου διερευνήθηκε και σε έναν Ισπανικό πληθυσμό 107 ατόμων. Η κατανομή συχνοτήτων του λογαρίθμου των τιμών του λόγου αυτού εμφάνισε τρικόρυφη κατανομή με σημεία διαχωρισμού των βραδέων, μέσων και ταχέων ακετυλιωτών τις τιμές 1,8 και 5,8. Με βάση τις τιμές αυτές, οι βραδείς ακετυλιωτές ανήλθαν στο ποσοστό του 65,4% [127].

Οι βραδείς ακετυλιωτές υπερέιχαν σε αριθμό και σε 563 άτομα γερμανικής καταγωγής στα οποία μελετήθηκε η κατανομή των τιμών του μεταβολικού λόγου AFMU/1X σε συνολικά ούρα 5 ωρών μετά την κατανάλωση μιας κούπας καφέ ή ενός δισκίου 100 mg καφεΐνης. Συγκεκριμένα, ο δεκαδικός λογάριθμος των τιμών του μεταβολικού αυτού λόγου παρουσίασε εμφανώς δικόρυφη κατανομή με επιμέρους κατανομές οι οποίες προσομοίαζαν με κανονικές, τύπου Gauss. Ο δεκαδικός λογάριθμος της τιμής 0,5 (-0,30) ήταν το σημείο διαχωρισμού μεταξύ των δύο κατανομών με το 55,1% των εθελοντών να ταξινομούνται ως βραδείς ακετυλιωτές και το 44,9% ως ταχείς. Στην ίδια μελέτη έγινε και γονοτυπικός προσδιορισμός της NAT-2 με τη μέθοδο της PCR/RFLP και ταυτοποιήθηκαν 7 σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου οι οποίες έδωσαν ύπαρξη σε 8 αλληλίες, συμπεριλαμβανομένου του αγρίου τύπου, τα οποία κωδικοποιούν

για ταχείς ακετυλιωτές και 7 αλληλόμορφα τα οποία κωδικοποιούν για βραδείς. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ασυμφωνία της τάξεως του 6,7% μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου η οποία αποδόθηκε στην βιολογική και μεθοδολογική μεταβλητότητα της NAT-2 καθώς δεν βρέθηκαν άλλες μεταλλάξεις στα άτομα αυτά με την μέθοδο της ευρέσεως της αλληλουχίας του DNA (sequencing, Cascorbi *et al.*, 1995).

Η κατανομή συχνοτήτων του λόγου AFMU/1X σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης σε 277 Δανούς εθελοντές, εμφάνισε δικόρυφη κατανομή με σημείο διαχωρισμού την τιμή 0,49 σύμφωνα με την οποία το 56% των ατόμων χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές [204].

Ο λογάριθμος του ίδιου μεταβολικού λόγου εμφάνισε δικόρυφη κατανομή σε άλλη μελέτη 66 υγιών ατόμων από τις ΗΠΑ με συλλογή ούρων στο χρονικό σημείο των 5 ωρών από την κατανάλωση της καφεΐνης. 34 άτομα (51,5%) χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς και 32 άτομα (48,5%) ως ταχείς ακετυλιωτές. Στη μελέτη αυτή, όμως, δεν έγινε αναφορά για την φυλετική καταγωγή των συμμετεχόντων [40].

Ο φαινότυπος της N-ακετυλίωσης απετέλεσε και το αντικείμενο μελέτης σε ελληνικό πληθυσμό 83 υγιών ατόμων στα οποία προσδιορίστηκε ο μεταβολικός λόγος AFMU/1X σε συγκεντρωτική συλλογή ούρων των 8 πρώτων ωρών μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης. Η κατανομή των συχνοτήτων του λόγου αυτού ήταν εμφανώς δικόρυφη και το 66,3% των συμμετεχόντων χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς, ενώ το 33,7% ως ταχείς ακετυλιωτές [255].

Σε άλλη, λιγότερο εκτεταμένη μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 21 άτομα χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολικοί λόγοι AFMU/1X και AFMU/(AFMU+1U+1X) σε μεμονωμένα δείγματα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση 200mg καφεΐνης, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της δραστηριότητας της XO στις τιμές των λόγων αυτών. Με βάση τις τιμές 0,55 και 0,26 για τους δύο αυτούς λόγους, αντίστοιχα, οι εθελοντές διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών με τους πρώτους να απαριθμούν 13 άτομα, δηλαδή ποσοστό 61,9% και τους δεύτερους 8 άτομα, δηλαδή ποσοστό 38,1%. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα της XO επιδρά στις τιμές του πρώτου μεταβολικού λόγου αφήνοντας ανεπηρέαστο τον δεύτερο [256].

Το ίδιο έτος δημοσιεύθηκε μία μεγαλύτερη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 222 λευκοί, Αμερικανικής καταγωγής, στους οποίους προσδιορίστηκε ο φαινότυπος της N-

ακετυλίωσης με φάρμακο δείκτη την καφεΐνη και ο γονότυπος με τη μέθοδο της PCR/RFLP. Ο μεταβολικός λόγος AFMU/1X προσδιορίστηκε κατόπιν λήψης 200 mg καφεΐνης και μίας μεμονωμένης συλλογής ούρων, 5 ώρες αργότερα. Η κατανομή του παραπάνω λόγου ήταν, κατά βάση, δικόρυφη με σημείο διαχωρισμού την τιμή 0,66 και το 58,1% των ατόμων χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές ενώ το 41,9% ως ταχείς. Εναλλακτικά, ανιχνεύθηκε ένα δεύτερο σημείο διαχωρισμού το οποίο δημιούργησε μία τρικόρυφη κατανομή με βάση την οποία οι ταχείς ακετυλιωτές της δικόρυφης κατανομής διαχωρίστηκαν σε ενδιάμεσους (39,2%) και αμιγώς ταχείς (2,7%). Κατά την ανάλυση του γονοτύπου εντοπίστηκαν 10 αλλήλια της NAT-2 εκ των οποίων 3, συμπεριλαμβανομένου και το αγρίου τύπου NAT-2*4, εμφανίστηκαν σε ποσοστό 85,4%, ενώ τα υπόλοιπα σε ποσοστά από 0,2-6,8%. Η σύμπτωση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου ανήλθε στο ποσοστό 97,8% και 92,8% για τη δικόρυφη και την τρικόρυφη κατανομή, αντίστοιχα, με την επισήμανση ότι άτομα με δύο μεταλλαγμένα αλλήλια έχουν, γενικά, βραδύ φαινότυπο ενώ οι ετεροζυγώτες και οι ομοζυγώτες με το αγρίου τύπου αλληλίο NAT-2*4 εμφανίζονται ως ταχείς ακετυλιωτές. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι το μοντέλο της τρικόρυφης κατανομής της NAT-2 περιλήφθηκε εξαιτίας του γεγονότος ότι άτομα τα οποία ταξινομούνται ως ενδιάμεσοι ετεροζυγώτες και ταχείς ομοζυγώτες ακετυλιωτές εμφανίζουν αλληλεπικάλυψη στις τιμές του φαινοτύπου αλλά, παράλληλα, εμφανίζουν και στατιστικώς σημαντική διαφορά στην μέση δραστηριότητα της ακετυλίωσης. Η αλληλεπικάλυψη αυτή, σύμφωνα με τους συγγραφείς, μπορεί να οφείλεται σε άγνωστες μεταλλάξεις εντός και εκτός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου οι οποίες δεν διερευνήθηκαν, σε περιβαλλοντικές επιδράσεις καθώς και στην βιολογική και αναλυτική μεταβλητότητα του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης [143].

Μία παράλληλη φαινοτυπική και γονοτυπική μελέτη της NAT-2 διεξήχθη και σε έναν Καυκάσιο πληθυσμό 77 υγιών εθελοντών στο πλαίσιο της πιστοποίησης μιας πιο ευαίσθητης αναλυτικής μεθόδου με την χρήση της φασματοσκοπίας μάζας. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ο μεταβολικός λόγος $(AFMU+AAMU)/(AFMU+AAMU+1U+1X)$ στα ούρα έγινε, δηλαδή, προσπάθεια να προσδιορισθεί ποσοτικά και το προϊόν της αυθόρμητης αποφορμυλίωσης της AFMU, η οποία, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς μπορεί να συμβεί ακόμη και μέσα στην ουροδόχο κύστη [214]. Με αυτή την μεθοδολογία οι συγγραφείς διαπίστωσαν την ύπαρξη του AAMU στα ούρα όλων, πλην ενός, εθελοντών, παρόλο που αυτά είχαν οξινιστεί αμέσως μετά την συλλογή

τους. Η κατανομή του μεταβολικού αυτού λόγου, σε ούρα 5-6 ώρες μετά την χορήγηση 150-200 mg καφεΐνης, εμφάνισε δικόρυφη κατανομή και το 54,7% των εθελοντών χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές, ενώ το 45,3% ως ταχείς. Όλοι οι βραδείς ακετυλιωτές είχαν τιμές του λόγου μικρότερες του 0,228 και οι ταχείς μεγαλύτερες του 0,238. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών του μεταβολικού λόγου των βραδέων ακετυλιωτών ήταν 0,132 και 0,047, αντίστοιχα, ενώ των ταχέων 0,38 και 0,079 αντίστοιχα. Η γονοτυπική ανάλυση 41 εθελοντών περιέλαβε την διερεύνηση των 4 πλέον συνήθων πολυμορφισμών στους καυκάσιους και όλοι οι εθελοντές οι οποίοι είχαν ένα τουλάχιστο NAT-2*4, αγρίου τύπου, αλληλίο είχαν το φαινότυπο του ταχέος ακετυλιωτή, ενώ οι βραδείς είχαν έναν ή περισσότερους πολυμορφισμούς μεμονωμένου νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP) και στα δύο αλληλία [257].

Σε μία πρόσφατη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 38 καυκάσιοι άνδρες, εργάτες γερμανικών εργοστασίων εκ των οποίων οι 30 ήταν καπνιστές, προσδιορίστηκε ο μεταβολικός λόγος AFMU/(AFMU+1U+1X) σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 7-8 ώρες μετά την κατανάλωση ενός δισκίου καφεΐνης 200 mg. Η κατανομή των τιμών του μεταβολικού αυτού λόγου εμφανίστηκε σαφώς διαχωρισμένη σε δύο περιοχές βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών εκ των οποίων οι πρώτοι είχαν τιμές του λόγου μεταξύ 0,03 και 0,25 με μέση τιμή και τυπική απόκλιση 0,13 και 0,06, αντίστοιχα, ενώ οι δεύτεροι είχαν τιμές του λόγου μεταξύ 0,34 και 0,48 με μέση τιμή και τυπική απόκλιση 0,41 και 0,04 αντίστοιχα. Οι βραδείς ακετυλιωτές ήταν 27 άτομα (71%) ενώ οι ταχείς ήταν 11 (29%) [144].

Το ίδιο έτος διεξήχθη παρόμοια μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό 44 υγιών ατόμων (21 άντρες, 23 γυναίκες, 23 καπνιστές) στους οποίους προσδιορίστηκε ο αυτός, όπως και προηγουμένως, μεταβολικός λόγος σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση μιας κάψουλας 200 mg καφεΐνης. Η κατανομή των τιμών του λόγου αυτού ήταν, παρομοίως, δικόρυφη με τιμή διαχωρισμού 0,25, ταυτόσημη με αυτήν της προηγούμενης μελέτης. Οι εθελοντές με τιμές του λόγου μικρότερες του 0,25 ήταν 28 (63,6%) και χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιωτές ενώ οι εθελοντές με τιμές του λόγου υψηλότερες του 0,25 ήταν 16 (36,4%) και χαρακτηρίστηκαν ως ταχείς ακετυλιωτές [39].

Η κατανομή συχνοτήτων των τιμών του μεταβολικού λόγου AAMU/(AAMU+1U+1X) σε ολονύκτια συλλογή ούρων, εξετάστηκε σε ιαπωνικό

πληθυσμό 182 ατόμων εκ των οποίων οι 29 ήταν καπνιστές και ο δεκαδικός λογάριθμος εμφάνισε τρικόρυφη κατανομή ενώ οι απόλυτες τιμές είχαν εύρος από 0,12 έως 0,78 (7 φορές, CV%=31%). Με βάση την κατανομή αυτή 20 άτομα χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς (11%), 151 άτομα ως ενδιάμεσοι (83%), και 11(6%) ως ταχείς ακετυλιωτές [126].

Ο πολυμορφισμός της NAT-2 στους Ιάπωνες ήταν, επίσης, το αντικείμενο μελέτης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο-δείκτης η δαψόνη. Η μελέτη αυτή ανέδειξε το 6,6% ενός πληθυσμού 182 ατόμων ως βραδείς ακετυλιωτές, ενώ η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου της μονοακετυλοδαψόνης προς την δαψόνη στο πλάσμα εμφάνισε τρικόρυφη κατανομή [258].

Σε έναν άλλο ιαπωνικό πληθυσμό 145 ατόμων προσδιορίστηκε ο γονότυπος της NAT-2 με τη μέθοδο της PCR/RFLP και το 44% του πληθυσμού αυτού είχε τον γονότυπο του ομοζυγώτη για το αγρίου τύπου αλλήλιο NAT-2*4 ο οποίος αντιστοιχεί στο φαινότυπο του ταχείου ακετυλιωτή, το 49% είχε τον γονότυπο του ετεροζυγώτη για το αλλήλιο NAT-2*4 συνδυαζομένου με ένα μεταλλαγμένο αλλήλιο ο οποίος γονότυπος αντιστοιχεί στο φαινότυπο του ενδιάμεσου ακετυλιωτή, ενώ ένα 7% του πληθυσμού είχε έναν συνδυασμό από τα διάφορα μεταλλαγμένα αλλήλια τα οποία αντιστοιχούν στο φαινότυπο του βραδέου ακετυλιωτή [142].

Μία αναδρομική μελέτη, εξάλλου, που αφορούσε τον φαινότυπο 3.516 Κινέζων όπως αυτός προσδιορίστηκε με φάρμακα-δείκτες την ισονιαζίδη, την σουλφαδιμιδίνη, την καφεΐνη, την σουλφαμεθαζίνη και την δαψόνη, ανέφερε ότι ο μέσος όρος των βραδέων ακετυλιωτών στον πληθυσμό αυτόν ήταν 19,9% με εύρος τιμών, στις διάφορες μελέτες, από 15,8 έως 25,5% [259].

Ανακεφαλαιώνοντας, στις εργασίες με δικόρυφη κατανομή της NAT-2 το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών κυμάνθηκε από 51,5% έως 72,0%, ενώ σ' αυτές με τρικόρυφη κατανομή το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών κυμάνθηκε από 47,6% έως 65,4%, των διάμεσων από 39,2% έως 42,9% και των ταχέων από 2,7% έως 9,5%. Στους ασιατές εμφανίζεται μία αντίστροφη εικόνα με τους βραδείς ακετυλιωτές να υστερούν με ποσοστά από 6,6-25,5% έναντι των ενδιάμεσων (49-83%) και των ταχέων (6-77%). Στην παρούσα εργασία, με βάση τον μεταβολικό λόγο AFMU/(AFMU+1U+1X), τα ποσοστά των βραδέων ακετυλιωτών ήταν 59,2% και 57,0% για τους υγιείς και ασθενείς, αντίστοιχα, τα οποία δεν είχαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους και βρίσκονται μέσα στο σύνηθες εύρος που απαντάται στους καυκάσιους πληθυσμούς. Ο ανωτέρω λόγος

παρουσίασε μικρότερη διακύμανση, σε βάθος χρόνου, από τον λόγο AFMU/IX και προτιμήθηκε για την απεικόνιση της δραστηκότητας της NAT-2.

2.3.4. Ο ρόλος του φύλου στην δραστηκότητα των ενζύμων

Διάφοροι φυσιολογικοί παράγοντες, ειδικοί τού φύλου, επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την φαρμακοκινητική πολλών φαρμάκων στους άνδρες και στις γυναίκες. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν το μέγεθος και την σύσταση του σώματος, την γαστρεντερική φυσιολογία, την νεφρική απέκκριση και τις ορμόνες του φύλου. Οι γυναίκες, γενικώς, έχουν μικρότερο σωματικό βάρος και συνεπώς μικρότερες διαστάσεις οργάνων και αιματικής ροής όπως, επίσης, και μεγαλύτερο ποσοστό σωματικού λίπους. Κάποιες διαφοροποιήσεις, όμως, που εμφανίστηκαν στον όγκο κατανομής μερικών φαρμάκων είχαν σχέση, κυρίως, με το σωματικό βάρος και απαλοιφθηκαν, στις περισσότερες μελέτες, μετά από προσαρμογή (normalization) των αποτελεσμάτων στο συνολικό σωματικό βάρος. Όσον αφορά το γαστρεντερικό σύστημα, οι γυναίκες παρουσιάζουν μικρότερη έκκριση γαστρικών οξέων συνοδευόμενη από μειωμένη γαστρική κένωση. Η επίδραση αυτών των παραγόντων στην διαδικασία απορρόφησης είναι προφανής, αλλά τα συγκεκριμένα παραδείγματα σπανίζουν. Επιπλέον, η σπειραματική διήθηση (glomerular filtration) εμφανίζεται, μειωμένη κατά 10%, κατά προσέγγιση, στις γυναίκες αλλά η διαφορά αυτή οφείλεται στην επίδραση του σωματικού βάρους, μάλλον, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η σπειραματική διήθηση είναι ανάλογη με το βάρος. Σε τελική ανάλυση, οι διαφορές μεταξύ των φύλων στην νεφρική απέκκριση έχουν μικρή κλινική σημασία για φάρμακα των οποίων η αποβολή οφείλεται σε μικρό μόνον βαθμό από τη νεφρική κάθαρση [260, 261]. Η εμμηνόπαυση, τέλος, φαίνεται να διαφοροποιεί τον μεταβολισμό κάποιων φαρμάκων στις γυναίκες καθώς έχει βρεθεί μειωμένος μεταβολισμός αυτών των φαρμάκων σε ηλικιωμένες γυναίκες σε σχέση με νεαρές γυναίκες. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε στην εμμηνόπαυση καθώς δεν διαπιστώθηκε παρόμοια διαφορά μεταξύ ηλικιωμένων και νεαρών ανδρών. Η επίδραση, όμως, της εμμηνόπαυσης στον μεταβολισμό των φαρμάκων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη καθώς υπάρχουν παραδείγματα κατά τα οποία είτε δεν υπήρξε διαφορά στο μεταβολισμό τους σε σχέση με την ηλικία των γυναικών, είτε ο μεταβολισμός τους ήταν μειωμένος στους ηλικιωμένους άνδρες αλλά όχι στις ηλικιωμένες γυναίκες σε σχέση με τα αντίστοιχα νεαρά άτομα.

2.3.4.1. Ένζυμα της οικογενείας CYP και φύλο

Όσον αφορά την δραστικότητα των ενζύμων του συστήματος P450 σε σχέση με το φύλο, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι νεαρές γυναίκες μεταβολίζουν φάρμακα-υποστρώματα του CYP3A4 24% ταχύτερα από τους νεαρούς άνδρες [262]. Άλλες μελέτες, αντίθετα, έχουν δείξει ότι τα ένζυμα CYP2C19 και CYP2D6 παρουσιάζουν αυξημένη δραστικότητα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, αλλά η πολυπλοκότητα του μεταβολισμού των διαφόρων υποστρωμάτων και ο χειρισμός των δεδομένων στις διάφορες μελέτες, σε σχέση με παράγοντες όπως το σωματικό βάρος και η λήψη από του στόματος αντισυλληπτικών, καθιστούν τα συμπεράσματα που αφορούν τα δύο τελευταία αυτά ένζυμα αμφισβητίσιμα [260].

Όσον αφορά την δραστικότητα του CYP1A2 σε σχέση με το φύλο, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες με φάρμακα-δείκτες την καφεΐνη και την θεοφυλλίνη. Στις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η καφεΐνη έγινε εκτίμηση των τιμών διαφόρων μεταβολικών λόγων της σε διάφορα βιολογικά υγρά και με διαφορετική χρονική δειγματοληψία. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι Grant *et al.* [202] δεν διαπίστωσαν κάποια διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών στις τιμές του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17X$ σε ούρα 24ώρου 68 υγιών εθελοντών καυκάσιας και ασιατικής καταγωγής. Οι Relling *et al.* [215], αντίθετα, διαπίστωσαν αυξημένη δραστικότητα του CYP1A2 στους άνδρες με την χρήση του αυτού μεταβολικού λόγου στα συνολικά ούρα των 4 ωρών 331 εθελοντών μετά τη χορήγηση της καφεΐνης, χωρίς όμως να έχει γίνει διαχωρισμός του πληθυσμού με βάση το κάπνισμα. Με τον μεταβολικό λόγο $(AFMU+1U+1X)/17U$, σε μεμονωμένα δείγματα ούρων, εξάλλου, οι Vistisen *et al.* [43] παρατήρησαν ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές στους άνδρες (16%), σε σχέση με τις γυναίκες, σε ένα δείγμα 335 υγιών ατόμων. Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Rasmussen and Brosen [204] και Rasmussen *et al.* [78] με την χρήση του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ σε μεμονωμένα δείγματα ούρων 277 και 378 υγιών εθελοντών, αντίστοιχα, 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, οι ανωτέρω διαπίστωσαν αυξημένη δραστικότητα του CYP1A2 στους άνδρες μη καπνιστές, σε σχέση με τις γυναίκες μη καπνίστριες και μη χρήστριες από του στόματος αντισυλληπτικών, κατά ένα ποσοστό 13% και 24,5% στις δύο προαναφερθείσες μελέτες. Στην δεύτερη, βέβαια, περίπτωση συμμετείχαν στη μελέτη μονοζυγωτικοί και διζυγωτικοί δίδυμοι, γεγονός το οποίο ενδέχεται να αλλοιώνει την πραγματική διαφορά στην δραστικότητα του

ενζύμου μεταξύ των δύο φύλων. Η ερευνητική αυτή ομάδα σχολιάζει ότι η επίδραση του φύλου στην δραστικότητα του CYP1A2 είναι μικρή και γι' αυτόν τον λόγο απαιτούνται μεγάλα δείγματα εθελοντών προκειμένου να αποφευχθούν στατιστικά σφάλματα τύπου II, δηλαδή η διαπίστωση μη ύπαρξης διαφοράς ενώ στην πραγματικότητα υπάρχει. Πράγματι, η χρήση του μεταβολικού λόγου 17X/137X στο σίελο, 5-7 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης σε 786 υγιείς Καυκάσιους εθελοντές, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τις γυναίκες να παρουσιάζουν μειωμένη, κατά 10%, δραστικότητα του CYP1A2, σε σχέση με τους άνδρες [45].

Ο ως άνω μεταβολικός λόγος, σε δείγματα πλάσματος 6 ωρών μετά την χορήγηση της καφεΐνης σε 229 μη καπνίζοντες Κινέζους φοιτητές, ήταν σημαντικά υψηλότερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, εκ των οποίων καμία δεν έκανε χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών ούτε ήταν έγκυος. Στον βαθμό που η κατανομή των τιμών του μεταβολικού αυτού λόγου ήταν παρόμοια μεταξύ ανδρών και γυναικών, οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η διαφορά αυτή μπορεί να μην οφείλεται σε διαφορά στον γονότυπο αλλά δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα της διαφορικής επίδρασης των φυλετικών ορμονών στην έκφραση του γονιδίου του CYP1A2 [251].

Ο ίδιος, επίσης, μεταβολικός λόγος, σε δείγμα πλάσματος 8 ωρών μετά την χορήγηση της καφεΐνης, παρουσίασε, οριακά ($p=0,054$), υψηλότερη μέση τιμή σε 79 άνδρες σε σχέση με 82 γυναίκες [263], μετά από προσαρμογή των δεδομένων για το κάπνισμα. Η διαφορά αυτή, όμως, δεν επιβεβαιώθηκε σε διαφορετική μελέτη κατά την οποία ο λόγος 17X/137X, σε δειγματοληψία πλάσματος 5 ωρών, δεν επηρεάστηκε από το φύλο των 32 συμμετεχόντων [249].

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 194 Σουηδοί και 150 Κορεάτες και στους οποίους προσδιορίστηκε ο φαινότυπος του CYP1A2 με τον αυτό λόγο σε δείγμα πλάσματος που λήφθηκε 4 ώρες μετά την χορήγηση της καφεΐνης. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου μεταξύ ανδρών και γυναικών, τόσο στους Σουηδούς όσο και στους Κορεάτες, μετά τον αποκλεισμό των καπνιστών και των γυναικών που έκαναν χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών [72].

Σε συμφωνία με το τελευταίο, οι Campbell *et al.* [56] και Catteau *et al.* [37] δεν διαπίστωσαν διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στην μέση τιμή του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)17U σε ούρα 24ώρου και ολονύκτια ούρα και σε πληθυσμιακά δείγματα

60 και 245 ατόμων, αντίστοιχα, ενώ το αυτό ήταν και το εύρημα των Carrillo and Benitez [127] με την χρήση του λόγου (AAMU+1U+1X)17U σε ούρα 24ώρου 107 ατόμων. Παρομοίως, οι Kalow and Tang [127] με τον ίδιο μεταβολικό λόγο σε πρωινά ούρα, δεν παρατήρησαν διαφορά στα δύο φύλα, σε πληθυσμό 160 υγιών φοιτητών, μετά την εξαίρεση 18 χρηστριών από του στόματος αντισυλληπτικών.

Το ίδιο αποτέλεσμα έδωσαν και τρεις μελέτες, με τους ίδιους μεταβολικούς λόγους σε ολονύκτια συλλογή ούρων [66, 126] ή σε κατά διαστήματα συλλογές ούρων [203], 20, 182 και 125 ατόμων, αντίστοιχα. Οι Krull and Hageman, [212], επίσης, δεν διαπίστωσαν διαφορά μεταξύ 5 γυναικών και 9 ανδρών στις τιμές του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)17U, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 5 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ή τσαγιού, ενώ στο αυτό συμπέρασμα κατέληξε και πρόσφατη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό 21 ανδρών και 23 γυναικών με την μέτρηση του αυτού μεταβολικού λόγου σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση 200 mg καφεΐνης [39].

Ένας άλλος μεταβολικός λόγος, ο (17U+17X)/137X, σε συλλογή ούρων 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης, δεν κατέστη, επίσης, δυνατόν να εντοπίσει διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα σε έναν κορεατικό και έναν καυκάσιο πληθυσμό, 95 και 92 ατόμων, αντίστοιχα [250, 264], ενώ ο ίδιος λόγος, με την ίδια δειγματοληψία, σε έναν Ιαπωνικό πληθυσμό 205 ατόμων εμφανίστηκε αυξημένος στους άνδρες [70].

Η δοκιμασία αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης καφεΐνης απετέλεσε, επίσης, αντικείμενο μελετών για την ανίχνευση πιθανών διαφορών ανάμεσα στα δύο φύλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η 2ωρη σωρευτική αποβολή του $^{13}\text{CO}_2$, παρόλο που ήταν αυξημένη στους άνδρες, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών [265]. Μία παρόμοια μελέτη διεξήχθη με τη χρήση ^{13}C -καφεΐνης σε 24 άνδρες και 24 γυναίκες, ηλικίας 18-40 ετών, εκ των οποίων κανείς δεν ήταν καπνιστής και καμία γυναίκα δεν έκανε χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών. Η τρίωρη σωρευτική αποβολή του $^{13}\text{CO}_2$ δεν παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα [266].

Με την χρήση της θεοφυλλίνης, αντίθετα, έχει διαπιστωθεί ότι οι νεαρές γυναίκες παρουσιάζουν μεγαλύτερη κάθαρση του φαρμάκου αυτού σε σχέση με τους νεαρούς άνδρες, όσον αφορά τους μη καπνιστές, ενώ ο χρόνος ημισείας ζωής του φαρμάκου είναι μικρότερος στις γυναίκες, τόσο στους καπνιστές όσο και στους μη καπνιστές [267]. Η θεοφυλλίνη (13X) μεταβολίζεται, κυρίως, από το CYP1A2 (75%) αλλά συμμετέχουν, επίσης, τα CYP2E1 και CYP3A4 [21, 268]. Έτσι, είναι πιθανόν, ότι η συμμετοχή του

CYP3A4, το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα στις γυναίκες, επηρεάζει το παραπάνω συμπέρασμα. Επιπλέον, η διαφορά αυτή μεταξύ ανδρών και γυναικών δεν εμφανίζεται σε ηλικιωμένους ασθενείς που ελάμβαναν θεοφυλλίνη [260].

Ο μεταβολισμός και άλλων υποστρωμάτων του CYP1A2 έχει εξεταστεί σε σχέση με το φύλο και τα συμπεράσματα ποικίλουν. Η N-απομεθυλίωση της αμινοπυρίνης, όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμασία αναπνοής της ^{14}C -αμινοπυρίνης, δεν επηρεάστηκε από το φύλο 28 υγιών εθελοντών, σε εύρος ηλικιών 26-86 ετών [269]. Η ίδια δοκιμασία, παράλληλα με την κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο και την δοκιμασία αποβολής της γαλακτόζης, δεν απέκλυσε διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα σε 13 εθελοντές ηλικίας από 71 έως 88 ετών [270]. Η δοκιμασία αναπνοής της ^{13}C -αμινοπυρίνης, αντίθετα, ανέδειξε στατιστικά υψηλότερες τιμές αποβολής του $^{13}\text{CO}_2$ σε 24 άνδρες σε σχέση με 24 γυναίκες, σε εύρος ηλικιών μεταξύ 18 και 40 ετών. Όλοι οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές, ενώ καμία γυναίκα δεν ελάμβανε από το στόμα αντισυλληπτικά. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η αμινοπυρίνη είναι μη ειδικός δείκτης της λειτουργίας του CYP1A2 καθώς εικάζεται ότι, στον βαθμό που ο μεταβολισμός της είναι παρόμοιος με αυτόν της αντιπυρίνης, μεταβολίζεται και από τα κυτοχρώματα CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 και CYP3A [266].

Η κάθαρση της φαινακετίνης, επίσης, δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών στους καυκάσιους αλλά οι Κινέζες γυναίκες είχαν σημαντικά μικρότερες τιμές από τους άνδρες κινεζικής καταγωγής και τις γυναίκες, τόσο καυκάσιες όσο και κινεζικής καταγωγής [271]. Η λιδοκαΐνη η οποία, επίσης, μεταβολίζεται από το CYP1A2 με την συμμετοχή του CYP3A4 [88], έδωσε διαφορούμενα αποτελέσματα σε σχέση με το μεταβολισμό της από τα δύο φύλα. Η συγκέντρωση της χορηγηθείσας λιδοκαΐνης στον ορό δεν διέφερε μεταξύ ασθματικών ανδρών και γυναικών κατά την διάρκεια και μετά το πέρας της βρογχοσκόπησης στην οποία υπεβλήθησαν [272], ενώ, αντίθετα, η συγκέντρωση του κύριου μεταβολίτη της λιδοκαΐνης, της μονοαιθυλ-γλυκινόξυλιδίδης (MEGX) στον ορό ήταν σημαντικά μειωμένη σε υγιείς γυναίκες νεαρότερες των 45 ετών, 30' μετά την χορήγηση του φαρμάκου [273].

Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της κλοζαπίνης, ενός φαρμάκου που μεταβολίζεται από το CYP1A2 σε συνδυασμό με το CYP3A4, παρουσιάζονται, επίσης, αυξημένες στις γυναίκες όπως και ο μεταβολίτης νορκλοζαπίνη, ειδικό προϊόν της δράσης του CYP1A2

[274]. Το αυτό διαπίστωσαν και οι Rostami-Hodjegan *et al.* σημειώνοντας ότι η αυξημένη συγκέντρωση της λιδοκαΐνης στο πλάσμα των γυναικών μπορεί, εν μέρει, να σημαίνει χαμηλότερη δραστικότητα του CYP1A2 στις γυναίκες. Ωστόσο, επισημαίνουν ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος του γυναικείου σώματος μπορεί να επηρεάζει το αποτέλεσμα αυτό [275]. Τέλος, η απομεθυλίωση της χλομιπραμίνης, η οποία οφείλεται στο CYP1A2, δεν επηρεάζεται από το φύλο [276]. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι η συγκέντρωση της ολανζαπίνης στο πλάσμα, η οποία, εν μέρει (50%), μεταβολίζεται από το CYP1A2 τείνει να εμφανίζεται κατά 11% υψηλότερη στις γυναίκες ($p=0,07$) [277].

Τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών, επίσης, δεν δίνουν μία αποσαφηνισμένη εικόνα όσον αφορά το ζήτημα αυτό. Σε μία *in vitro* μελέτη, με την χρήση ανθρώπινων ηπατικών μικροσωμάτων, διαπιστώθηκε ότι το περιεχόμενο και η ενζυμική δραστικότητα του CYP1A2, με υπόστρωμα την φαινακετίνη, ήταν ελαφρώς υψηλότερα στους καυκάσιους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, κάτι το οποίο δεν διαπιστώθηκε για τους Ιάπωνες [12]. Σε άλλη, παρόμοια, μελέτη η ενζυμική δραστικότητα του CYP1A2, με υπόστρωμα την 7-υδροξυρεζορουφίνη, ήταν υψηλότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες αλλά η διαφορά αυτή ήταν σχετικώς μικρή (<25%) [278]. Αντίθετα, η *in vitro* μικροσωματική ενζυμική δραστικότητα του CYP1A2, με υπόστρωμα την καφεΐνη [279] και την φαινακετίνη [280], δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών. Στις περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες είχε αποκλειστεί η επίδραση άλλων παραγόντων στην δραστικότητα του CYP1A2 όπως η χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών και το κάπνισμα. Τα αλληλοσυγκρουόμενα αυτά αποτελέσματα μπορεί, εν μέρει, να οφείλονται στο γεγονός ότι το CYP1A2 έχει διαφορετική εξειδίκευση για τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στο μεταβολισμό των οποίων συμμετέχουν και άλλα, κάθε φορά, ένζυμα. Εξάλλου, πρέπει να επισημανθεί και το γεγονός ότι στις περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες δεν είχε γίνει διαχωρισμός του πληθυσμού των γυναικών με βάση την εμμηνόπαυση.

Όσον αφορά την εμμηνόπαυση, ειδικότερα, σε μία μελέτη διερεύνησης διαφόρων παραγόντων κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε 295 γυναίκες διαφόρων εθνικοτήτων, παρόλο που η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U σε ούρα 24ώρου ήταν μικρότερη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές, η διαφορά αυτή ήταν, οριακά, μη σημαντική ($p=0,051$). Στην μελέτη, όμως, αυτή δεν έγινε διαχωρισμός των γυναικών σε σχέση με το κάπνισμα και δεν χορηγήθηκε

συγκεκριμένη δόση καφεΐνης αλλά ο προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου έγινε με βάση την καφεΐνη της διαίτας [81]. Σε άλλη μελέτη που αφορούσε τον μεταβολισμό της αλφεντανίλης βρέθηκε ότι οι γυναίκες άνω των 50 ετών είχαν μειωμένη κάθαρση του φαρμάκου, σε σχέση με τις γυναίκες κάτω των 50, ενώ δεν συνέβη κάτι αντίστοιχο με τους άνδρες εθελοντές [281]. Ηλικιακές διαφορές στον μεταβολισμό των φαρμάκων οι οποίες εμφανίζονται στις γυναίκες ενώ δεν εμφανίζονται στους άνδρες οφείλονται, πιθανότατα, στην εμμηνόπαυση. Με δεδομένο ότι ο *in vitro* μεταβολισμός της αλφεντανίλης αποδίδεται ειδικά στο CYP3A4 [282] φαίνεται ότι υπάρχει μείωση της δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου κατά την εμμηνόπαυση. Ο μεταβολισμός, επίσης, της στεροειδούς ορμόνης προδινζολόνης αναφέρεται ότι μειώνεται κατά την εμμηνόπαυση [283, 284]. Η προδινζολόνη, όπως και άλλες στεροειδείς ορμόνες, μεταβολίζεται, εν μέρει, από το CYP3A4 [285]. Η κάθαρση, επίσης, της πιροξικάμης, ενός μη στεροειδούς αντιφλεγμονώδους φαρμάκου, παρουσιάζεται μειωμένη στις ηλικιωμένες γυναίκες σε σχέση με τις νεαρότερες χωρίς παρόμοια διαφορά να εμφανίζεται στους άνδρες [286]. Μεγάλο ρόλο στο μεταβολισμό της πιροξικάμης παίζει το κυτόχρωμα CYP2C [287] και πιθανολογείται μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου αυτού κατά την εμμηνόπαυση.

Στην παρούσα μελέτη, με βάση την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης, δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση του φύλου στην δραστηριότητα του CYP1A2, παρόλο που στην μελέτη συμμετείχαν και 23 μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες. Η επίδραση της εμμηνόπαυσης δεν διερευνήθηκε παράλληλα με τους άλλους παράγοντες, καθώς οι υποομάδες των προεμμηνόπαυσιακών και μετεμμηνόπαυσιακών γυναικών, οι οποίες ήταν μη καπνίστριες, δεν περιελάμβαναν ικανοποιητικό αριθμό ατόμων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του παράγοντα αυτού στην δραστηριότητα του CYP1A2. Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης, εξάλλου, δεν ανέδειξε κάποια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλικίας και του φύλου των υγιών εθελοντών. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά την επίδραση του φύλου στην δραστηριότητα του CYP1A2, βρίσκονται σε συμφωνία με αρκετές μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν ως φάρμακο-δείκτη είτε την καφεΐνη είτε άλλα υποστρώματα του ενζύμου αυτού. Ο αυξημένος μεταβολισμός της καφεΐνης και διαφόρων άλλων φαρμάκων-δεικτών στους άνδρες ο οποίος εμφανίστηκε σε μερικές μελέτες δεν ήταν της τάξεως μεγέθους εκείνης που να

θεμελιώνει κάποια αξιοσημείωτη, κλινικής σημασίας, επίδραση του φύλου στην δραστικότητα του CYP1A2.

Όσον αφορά την δραστικότητα του CYP2A6 η οποία διερευνήθηκε σε μία προαναφερθείσα μελέτη, ο μεταβολικός λόγος 17U/17X μετρηθείς σε ούρα 24ώρου δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση σχετιζόμενη με το φύλο [202]. Ο δεκαδικός λογάριθμος του ιδίου λόγου ήταν υψηλότερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, με 333 εθελοντές διαφόρων εθνικοτήτων, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα [113]. Δεν έχει, επίσης, αναφερθεί διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στην 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης, του κατεξοχόν υποστρώματος του CYP2A6 [105, 209]. Η μεταβολικός λόγος, όμως, της 3-OH-κοτινίνης προς την κοτινίνη και η κάθαρση της νικοτίνης προς κοτινίνη, διαδικασίες που αποτελούν δείκτες της δραστικότητας του CYP2A6, ήταν σημαντικά υψηλότεροι στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, σε μία μελέτη 294 εθελοντών με εύρος ηλικιών 18-65 ετών. Επιπρόσθετα, η δραστικότητα του CYP2A6 στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ήταν μειωμένη, σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές, και ήταν παρόμοια με αυτή των ανδρών [288].

Στην παρούσα εργασία το φύλο των υγιών εθελοντών δεν εμφάνισε καμία σημαντική επίδραση στις τιμές του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X), ο οποίος επιλέχθηκε ως αντιπροσωπευτικός της δραστικότητας του CYP2A6. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι, παρόλο που η κατάλυση της μετατροπής της 17X προς 17U είναι αντίδραση ειδική για το CYP2A6, η απέκριση της 17X στα ούρα εξαρτάται, όπως έχει αναφερθεί και ανωτέρω, από το ρυθμό αποβολής των ούρων. Το γεγονός αυτό καθιστά τους μεταβολικούς λόγους που εμπεριέχουν την 17X εξαρτώμενους όχι μόνον από την δραστικότητα του εξεταζομένου ενζύμου αλλά και από την πρόσληψη υγρών καθώς και από την νεφρική λειτουργία.

2.3.4.2. XO, NAT-2 και φύλο

Σε μία μελέτη μικτού πληθυσμού αποτελουμένου από 42 καυκάσιους και 26 ασιάτες, οι τιμές των μεταβολικών λόγων 1U/1X και AFMU/1X σε ούρα 24ώρου, ενδεικτικών των ενζυμικών δραστηριοτήτων της XO και NAT-2 αντίστοιχα, δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα [202]. Σε άλλη μελέτη 178 ατόμων διαφορετικής εθνικής προέλευσης η δραστικότητα της NAT-2, όπως προσδιορίστηκε με τους μεταβολικούς λόγους AAMU/1X και AAMU/(AAMU+1U+1X)

σε μεμονωμένο δείγμα ούρων 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης καθώς και σε πρωινά ούρα, δεν παρουσίασε διαφορές ανάμεσα στα φύλα και στις εθνικότητες, με εξαίρεση 4 ασιάτες βραδείς ακετυλιωτές οι οποίοι είχαν σημαντικά χαμηλότερους μεταβολικούς λόγους από τους λευκούς βραδείς ακετυλιωτές [216]. Παρομοίως, ο λόγος AAMU/1X σε ούρα 24ώρου, σε ένα καυκάσιο πληθυσμό, δεν επηρεάστηκε από το φύλο, τόσο στους βραδείς όσο και στους ταχείς ακετυλιωτές [127]. Σε άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 342 λευκοί και μαύροι Αμερικανοί έγινε προσδιορισμός της επίπτωσης του φύλου και της φυλής στην δραστικότητα της NAT-2 με την χρήση των μεταβολικών λόγων AFMU/1X, AFMU/(1X+1U) και AFMU/(AFMU+1X+1U). Η μέση τιμή του λογαρίθμου του πρώτου μεταβολικού λόγου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις γυναίκες και στους μαύρους χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ φύλου και φυλής. Αντίθετα, οι υπόλοιποι δύο μεταβολικοί λόγοι δεν εμφάνισαν καμμία συσχέτιση με το φύλο, ενώ οι ανήκοντες στη μαύρη φυλή είχαν, πάλι, στατιστικά υψηλότερες τιμές από τους λευκούς. Η παρατηρηθείσα υψηλότερη δραστικότητα της NAT-2 στα άτομα της μαύρης φυλής οφείλεται, πιθανώς, στο γεγονός ότι ο φαινότυπος του ταχέως ακετυλιωτή υπερισχύει στα άτομα αυτά. Πράγματι, το επί τοίς εκατό ποσοστό των ταχέως ακετυλιωτών στους μαύρους και τους λευκούς ήταν 61%-36%, 46%-30% και 42%-28% για τους τρεις προαναφερθέντες μεταβολικούς λόγους, αντίστοιχα. Οι δύο τελευταίοι λόγοι είχαν μικρότερη διακύμανση τιμών στον πληθυσμό, σε σχέση με τον πρώτο, και δεν παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τον λόγο 1U/1X κάτι το οποίο συνέβη με τον λόγο AFMU/1X υποδηλώνοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την επίδραση της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης στις τιμές του ως άνω λόγου [215]. Το τελευταίο αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα προαναφερθέντα στην εισαγωγή σχετικά με την αυξημένη αξιοπιστία του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1X+1U) στον προσδιορισμό της δραστικότητας της NAT-2 [189].

Στην ίδια μελέτη, οι μέσες τιμές του λογαρίθμου των μεταβολικών λόγων 1U/1X και 1U/(1U+1X), οι οποίοι εκφράζουν την δραστικότητα της XO, ήταν υψηλότερες στα άτομα της λευκής φυλής και στις γυναίκες, το τελευταίο εκ των οποίων έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα *in vitro* μελέτης σε ανθρώπινα δείγματα βιοψιών ήπατος σύμφωνα με τα οποία παρατηρήθηκε 20% υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα της XO στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες [119].

Σε μία άλλη μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 335 καυκάσιοι εθελοντές, δεν

διαπιστώθηκε διαφορά της δραστηριότητας της ΧΟ ανάμεσα στα δύο φύλα, όπως αυτή προσδιορίστηκε από το μεταβολικό λόγο $1U/(1U+1X)$ σε μεμονωμένο μεσημβρινό δείγμα ούρων μετά από πρωινή κατανάλωση καφεΐνης [43]. Στην ίδια μελέτη η δραστηριότητα της NAT-2 προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου $AFMU/1X$ χωρίς να βρεθεί κάποια συσχέτιση με το φύλο. Σε μεταγενέστερη μελέτη, στην οποία έγινε φαινοτυπικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της NAT-2 μέσω του αυτού μεταβολικού λόγου και στην οποία συμμετείχαν 90 εθελοντές διαφόρων εθνικοτήτων εκ των οποίων οι 43 έπασχαν από καρκίνο του ορθού, δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του φύλου των συμμετεχόντων και της δραστηριότητας της NAT-2, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς [248].

Στα ίδια συμπεράσματα, όσον αφορά τα δύο αυτά ένζυμα, κατέληξε και μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 10 άνδρες και 10 γυναίκες λευκής φυλής κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν, για μεν την ΧΟ ο ίδιος με προηγουμένως μεταβολικός λόγος, για δε την NAT-2 ο μεταβολικός λόγος $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων. Όταν, όμως, έγινε σύγκριση με βάση τον φαινότυπο του βραδέος και του ταχέος ακετυλιωτή οι γυναίκες βραδείες ακετυλιώτριες παρουσίασαν αυξημένη, σε σχέση με τους αντίστοιχους άνδρες, δραστηριότητα της NAT-2 κατά 23% [66].

Σε μεμονωμένα δείγματα ούρων 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης δεν βρέθηκε, επίσης, επίδραση του φύλου στους μεταβολικούς λόγους $1U/1X$ και $AFMU/1X$ σε έναν καυκάσιο πληθυσμό 277 υγιών εθελοντών [204]. Σε 182 υγιείς Ιάπωνες, εξάλλου, οι μεταβολικοί λόγοι $1U/(1U+1X)$ και $AAMU/(AAMU+1U+1X)$, σε ολονύκτια συλλογή ούρων, δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών [126]. Το φύλο, παρομοίως, δεν είχε συσχέτιση με τον μεταβολικό λόγο $1U/1X$ σε ωριαία συλλογή ούρων 133 Κορεατών εθελοντών, 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης [264]. Το αυτό, σε σχέση με την NAT-2, παρατηρήθηκε και σε ελληνικό πληθυσμό αποτελούμενο από 49 γυναίκες και 34 άνδρες, χωρίς σημαντική διαφορά ηλικίας μεταξύ τους, όπου δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου $AFMU/1X$ μεταξύ ανδρών και γυναικών [255].

Σε σχέση με την ΧΟ, οι τιμές του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 100 Αιθίοπες οι οποίοι ζούσαν στην Αιθιοπία και 73 Αιθίοπες οι οποίοι ζούσαν στην Σουηδία [125]. Το αυτό, τέλος, παρατηρήθηκε σε πρόσφατη μελέτη ενός

ελληνικού πληθυσμού 44 υγιών εθελοντών κατά την οποία ο ανωτέρω λόγος δεν είχε σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών [39].

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με τις περισσότερες από τις ανωτέρω μελέτες καθώς η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης για τις τιμές των μεταβολικών λόγων $1U/(1U+1X)$ και $AFMU/(AFMU+1U+1X)$, οι οποίοι επελέγησαν για την απεικόνιση της δραστηριότητας των XO και NAT-2, δεν ανέδειξε κάποια, στατιστικώς σημαντική, επίδραση του φύλου στην διακύμανση των τιμών αυτών. Επιπρόσθετα, η έλλειψη της επίδρασης αυτής διαπιστώθηκε τόσο για τους βραδείς όσο και για τους ταχείς ακετυλιωτές.

2.3.5. Ο ρόλος της ηλικίας στην δραστηριότητα των μεταβολικών ενζύμων

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο λόγος της μάζας του ήπατος προς τη μάζα του σώματος μειώνεται στους ανθρώπους κατά 50% μεταξύ της εφηβείας και της ωριμότητας αλλά παραμένει σταθερός μετά από το σημείο αυτό. Σε νεότερες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ο όγκος του ήπατος μειώνεται κατά 24-35% και η αιματική ροή μειώνεται κατά 35% μεταξύ της νεανικής ωριμότητας και της γεροντικής ηλικίας [289-291]. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν τις βιοχημικές μεταβολές οι οποίες σχετίζονται με την ηλικία, είναι αντιφατικά. Η κάθαρση μερικών φαρμάκων, όπως για παράδειγμα της λιδοκαΐνης και της προπρανολόλης, τα οποία πριν την αποβολή τους υφίστανται οξειδωτικό μεταβολισμό στο ήπαρ, μειώνεται στα ηλικιωμένα άτομα [290]. Το γεγονός αυτό φαίνεται να αντικατοπτρίζει μείωση του όγκου του ήπατος και της ηπατικής αιματικής ροής, μάλλον, [292], παρά μείωση στην δραστηριότητα και το περιεχόμενο των μικροσωμακίων ενζύμων [293]. Αυτό συμβαίνει επειδή τα φάρμακα αυτά έχουν υψηλή ηπατική εξαγωγή (high extraction ratio) κατά την διάρκεια της πρώτης διέλευσής τους από το ήπαρ και, κατά συνέπεια, ο κύριος περιοριστικός παράγον για την κάθαρσή τους είναι η επαφή του αίματος με τα ηπατοκύτταρα, δηλαδή η ηπατική αιματική ροή [294]. Η κάθαρση του πράσινου της ινδοκυανίνης (ICG), μίας άλλης ουσίας της οποίας η αποβολή εξαρτάται, κατ' εξοχήν, από την ηπατική αιματική ροή μειώνεται και ο χρόνος ημισείας ζωής της αυξάνεται παράλληλα με την ηλικία [290]. Η απομεθυλίωση της αμινοπυρίνης, επίσης, η οποία είναι ανεξάρτητη από την αιματική ροή, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία αναπνοής της ^{14}C -αμινοπυρίνης, βρέθηκε να σχετίζεται ανάστροφα με την ηλικία σε ένα εύρος ηλικιών από 26 έως 86 ετών [269]. Η

κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο, η οποία και αυτή είναι ανεξάρτητη από την αιματική ροή [161], και η απομεθυλίωση της ¹⁴C-αμινοπυρίνης ήταν σημαντικά μειωμένες στους υγιείς ηλικίας άνω των 70 ετών, τόσο σε σχέση με τα άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών όσο και σε σχέση με τα άτομα ηλικίας μεταξύ 40 και 70 ετών [270]. Στην ίδια μελέτη η αποβολή της γαλακτόζης, η οποία είναι δείκτης της κυτταροπλασματικής μεταβολικής ικανότητας, ήταν επίσης μειωμένη σ' αυτήν την ηλικιακή ομάδα.

Σε άλλη μελέτη, η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα ήταν μειωμένη σε μία ομάδα 12 ηλικιωμένων με εύρος ηλικιών από 66-92 ετών σε σχέση με αυτή μίας ομάδας 12 νεαρών εθελοντών ηλικίας 12-35 ετών [295]. Σε δύο διαφορετικές μελέτες η κάθαρση της αντιπυρίνης από την σίελο ήταν μειωμένη σε ηλικιωμένους με μέση ηλικία άνω των 71 ετών, σε σχέση με νεαρότερα άτομα με μέση ηλικία 29 ετών [296, 297].

Η κάθαρση της θεοφυλλίνης, ανεξάρτητη και αυτή από την ηπατική αιματική ροή [161], παρουσιάζεται μειωμένη κατά 15-30% στα άτομα ηλικίας άνω των 40 ετών σε σχέση με ηλικιακές ομάδες κάτω των 40 ετών, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες [298]. Η θεοφυλλίνη μεταβολίζεται κυρίως από το CYP1A2 (75%) αλλά με τη συμμετοχή των CYP2E1 και CYP3A4 [21, 268]. Ο Sotaniemi *et al.*, επίσης, ανέφερε στατιστικώς σημαντική μείωση της τάξης του 16% και 32% στο συνολικό ηπατικό περιεχόμενο σε κυτόχρωμα P450 στις ηλικίες από 40-69 και άνω των 70 ετών, αντίστοιχα, σε σχέση με τις 3 πρώτες δεκαετίες της ζωής [299]. Η κάθαρση, όμως, της αντιπυρίνης δεν ακολούθησε παράλληλη πορεία καθώς παρατηρήθηκε μείωση κατά 0,9% για κάθε έτος από το 40^ο έως το 69^ο δηλαδή η μείωση του περιεχομένου του ήπατος σε CYP εμφανίστηκε μερικές δεκαετίες πριν παρατηρηθεί αντίστοιχη μείωση στην κάθαρση του φαρμάκου. Τα εμπλεκόμενα στο μεταβολισμό της αντιπυρίνης ένζυμα είναι τα CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2D, CYP2E1 και CYP3A [25, 96].

Σε *in vitro* μελέτη βρέθηκε ότι το ηπατικό μικροσωματικό περιεχόμενο του συνολικού P450 καθώς και των ισομορφών CYP2E1 και CYP3A μειώνονται σε σχέση με την ηλικία, ενώ το περιεχόμενο σε CYP1A2 και CYP2C παρέμειναν αμετάβλητα, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες [300]. Αντίθετα, σε δείγμα ηπατικών μικροσωμάτων δωρητών και ασθενών ηλικίας 12-73 ετών, δεν βρέθηκαν διαφορές στο συνολικό περιεχόμενο και τη δραστηριότητα του P450, γενικώς, και των ισομορφών CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A ειδικότερα [12]. Παρόμοια

αποτελέσματα είχε και μελέτη της συγκέντρωσης των CYP3A και CYP2C σε μικροσώματα ατόμων από 9 έως 89 ετών [293]. Σε συμφωνία με τα τελευταία, όσον αφορά το CYP3A, ο Hunt *et al.* αναφέρει ότι η *in vitro* μικροσωματική δραστηριότητα απομεθυλίωσης της ερυθρομυκίνης από το CYP3A δεν επηρεάζεται από την ηλικία σε εύρος ηλικιών από 23 έως 83 ετών [262].

Ο ρόλος της ηλικίας στην δραστηριότητα του CYP1A2, ειδικότερα, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί καθώς σε κάποιες μελέτες με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη παρουσιάζεται αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 στα παιδιά 3-11 ετών [56] όπως και σε νέους 20-29 ετών [264] σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικίες, ενώ σε άλλες δεν παρουσιάζονται διαφορές σε σχέση με την ηλικία [37, 43, 45, 127, 215, 249, 263]. Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης, τα βιολογικά υγρά και οι χρόνοι δειγματοληψίας οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι αυτοί όπως αναφέρθηκαν ανωτέρω, στις αντίστοιχες αναφορές των συγγραφέων αυτών για το φύλο. Σε μία *in vitro* μελέτη η οποία περιελάμβανε την επώαση ανθρώπινων μικροσωμάτων με υποστρώματα ειδικά για τα διάφορα ισοένζυμα του P450, η απαλκυλίωση της 7-αιθοξυ-ρεζορουφίνης, κατάλυση ειδική για το CYP1A2, ήταν κατά 25% υψηλότερη στα δείγματα ηλικίας μικρότερης των 20 ετών σε σχέση με τις ηλικίες 20-65 ετών και τις ηλικίες μεγαλύτερες των 65 ετών [278]. Η δοκιμασία αναπνοής, επίσης, της ραδιοεπισημασμένης στο 3-μεθύλιο καφεΐνης, ανέδειξε τη μείωση του εκπνεόμενου $^{13}\text{CO}_2$ στην εφηβική ηλικία σε σχέση με την παιδική [173]. Στους ενήλικες, όμως, η ίδια δοκιμασία δεν ανίχνευσε την ύπαρξη κάποιας συσχέτισης της δραστηριότητας του CYP1A2 και της ηλικίας σε 25 υγιείς εθελοντές και 40 ηπατοπαθείς [190].

Στην παρούσα μελέτη, παρόλο που υπήρξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας των υγιών εθελοντών και του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(\text{AFMU}+1\text{U}+1\text{X})/17\text{U}$, η αρνητική αυτή τιμή του συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ($B=-0,006$, $p=0,104$). Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η καφεΐνη ανήκει στην κατηγορία των φαρμάκων εκείνων με μικρή ηπατική εξαγωγή (low extraction ratio) και μικρού βαθμού σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και κατά συνέπεια η κάθαρσή της εξαρτάται, πρωτίστως, από τον ρυθμό από τον οποίο το ήπαρ είναι ικανό να την μεταβολίσει και όχι από την ηπατική αιματική ροή από την οποία εξαρτάται η κάθαρση των φαρμάκων εκείνων με υψηλή ηπατική εξαγωγή (high extraction ratio). Από τις προαναφερθείσες *in vivo* μελέτες με φάρμακο-δείκτη την

καφεΐνη, αλλά και από *in vivo* μελέτες με άλλα, χαμηλής ηπατικής εξαγωγής, φάρμακα δεν διαπιστώθηκε επαρκής συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και κάθαρσης, ενώ στις *in vitro* μελέτες δεν παρατηρήθηκαν, σε κάθε περίπτωση, μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα, σχετιζόμενες με την ηλικία.

Μέσα στο ίδιο πλαίσιο μπορεί να ενταχθεί και η εξέταση της δραστηριότητας του CYP2A6, καθώς είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία του συστήματος P450. Στην παρούσα εργασία η διαδικασία της γραμμικής παλινδρόμησης δεν ανέδειξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X) και της ηλικίας στους 125 υγιείς εθελοντές. Παρομοίως, ο μεταβολικός λόγος 17U/17X, προσδιορισθείς σε ούρα 24ώρου ενός μικτού πληθυσμού αποτελούμενου από 42 καυκάσιους και 26 ασιατές, δεν παρουσίασε διαφορές σχετιζόμενες με την ηλικία [202]. Αυξημένη, όμως, εμφανίστηκε η δραστηριότητα του CYP2A6 στο τμήμα του πληθυσμού άνω των 70 ετών σε μία μελέτη υγιών ατόμων με βάση τις τιμές του μεταβολικού λόγου 17U/17X σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 4-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης [113]. Σε άλλη μελέτη, κατά την οποία επωάστηκαν 150 δείγματα ανθρώπινων ηπατικών μικροσωμάτων με υπόστρωμα την κουμαρίνη, διαπιστώθηκε ότι η 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης, δράση ειδική για το CYP2A6, παρουσίασε μία τάση αύξησης της τάξεως του 25% στις ηλικίες άνω των 20 ετών σε σχέση με τις ηλικίες κάτω των 20 ετών, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα [278]. Σε μία προαναφερθείσα, εξάλλου, *in vitro* μελέτη, στην οποία είχε συμπεριληφθεί και η μελέτη της δραστηριότητας του CYP2A6, δεν βρέθηκε μεταβολή τόσο της περιεχομένης στο ήπαρ ποσότητας όσο και της δραστηριότητας του ενζύμου αυτού, σε σχέση με την ηλικία, σε ένα εύρος ηλικιών από 12-73 ετών [12].

Η ηλικία, επίσης, δεν ήταν προσδιοριστικός παράγοντας της δραστηριότητας της XO σε μία προαναφερθείσα μελέτη στην οποία εξετάστηκε ο μεταβολικός λόγος 1U/1X σε ούρα 24ώρου [202]. Το αυτό διαπιστώθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη, τόσο με τη χρήση του μεταβολικού λόγου 1U/1X όσο και του 1U/(1U+1X), όπως μετρήθηκαν σε συλλογή ούρων των τεσσάρων πρώτων ωρών μετά τη χορήγηση καφεϊνούχου αναψυκτικού σε 342 υγιή άτομα λευκής και μαύρης φυλής [215]. Δεν υπήρξαν, επίσης, διαφοροποιήσεις στην δραστηριότητα της XO σε σχέση με την ηλικία, σε έναν κορεατικό πληθυσμό, με βάση το μεταβολικό λόγο 1U/1X σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 4-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης [264]. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα *in*

in vitro μελέτης σε ανθρώπινα δείγματα βιοψιών ήπατος κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας της XO και της ηλικίας, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες [119].

Σε άμεση συνάφεια με τα ανωτέρω, οι τιμές του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ δεν παρουσίασαν σημαντικό βαθμό συσχέτιση με την ηλικία με βάση το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, όμως, σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η δραστηριότητα της XO στο πλάσμα είχε σημαντικά υψηλή συσχέτιση με την ηλικία ($r = 0,82$, $p=0,007$) σε ένα δείγμα 13 υγιών εθελοντών με εύρος ηλικιών από 38-65 ετών. Παρατηρήθηκε επίσης υψηλότερη δραστηριότητα στο πλάσμα και αυξημένη έκφραση του ενζύμου στην αορτή και στους σκελετικούς μύες ηλικιωμένων αρουραίων σε σχέση με αντίστοιχα νεαρά ενήλικα ζώα [123]. Είναι πιθανόν το τελευταίο αυτό εύρημα να οφείλεται στις μεταβολές που υφίσταται το αγγειακό ενδοθήλιο με την πάροδο της ηλικίας, ενώ η μετατροπή της $1X$ προς $1U$ συντελείται, κυρίως, στο ήπαρ.

Η δραστηριότητα της NAT-2, τέλος, έχει διερευνηθεί εκ παραλλήλου με την δραστηριότητα των άλλων ενζύμων στις προαναφερθείσες εργασίες. Κατ'αυτόν τον τρόπο, δείχτηκε ότι η ηλικία δεν είχε σημαντική επίδραση στις τιμές του μεταβολικού λόγου $AFMU/1X$ σε ούρα 24ώρου [202]. Τρεις μεταβολικοί λόγοι, επίσης, οι $AFMU/1X$, $AFMU/(1X+1U)$ και $AFMU/(AFMU+1X+1U)$, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της δραστηριότητας της NAT-2, δεν παρουσίασαν καμία συσχέτιση με την ηλικία σε έναν μικτό πληθυσμό λευκών και μαύρων, σε συλλογή ούρων 4 ωρών μετά την χορήγηση της καφεΐνης [215]. Η δραστηριότητα της NAT-2 προσδιορίστηκε με βάση την καφεΐνη, επίσης, σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 90 εθελοντές διαφόρων εθνικοτήτων εκ των οποίων οι 47 ήταν υγιείς και οι 43 έπασχαν από καρκίνο του ορθού. Τα αποτελέσματα έδειξαν την απουσία συσχέτισης μεταξύ των τιμών του λόγου $AFMU/1X$ και της ηλικίας, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς [248]. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με τα ανωτέρω καθώς η ηλικία δεν είχε σημαντική επίδραση στις τιμές του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1X+1U)$, τόσο στους βραδείς όσο και στους ταχείς ακετυλιωτές.

2.3.6. Ο ρόλος του καπνίσματος στην δραστηριότητα των ενζύμων

Είναι κοινή διαπίστωση πολλών μελετών ότι το κάπνισμα επάγει την

δραστηριότητα του CYP1A2 και η διαδικασία αυτή, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, είναι κυρίως μεταγραφική και εξαρτάται από τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα Ah (Αρωματικών Υδρογονανθράκων) όπως επίσης και άλλους άγνωστους παράγοντες. Οι χημικές ουσίες του καπνού οι οποίες ενέχονται στην διαδικασία αυτή ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών αμινών, όπως το 4-αμινοδιφαινύλιο (ABP), η 2-ναφθυλαμίνη (2-NA) και η ο-τολουϊδίνη [16] καθώς και στην κατηγορία των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs), [301].

Οι διάφορες *in vivo* μελέτες οι οποίες έχουν διεξαχθεί με υπόστρωμα την καφεΐνη έχουν επιβεβαιώσει την επαγωγή αυτή, είτε με την χρησιμοποίηση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης [36, 39, 37, 43, 45, 56, 70, 81, 126, 127, 203-205, 246, 249, 264], είτε με την χρησιμοποίηση της κάθαρσης της καφεΐνης από το πλάσμα και τον σίελο [110, 178, 190, 195, 302], είτε με την δοκιμασία αναπνοής της ¹³C-ραδιοεπισημασμένης καφεΐνης [190]. Τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, σε σχέση με το κάπνισμα, έρχονται να προστεθούν στην σειρά αυτή των μελετών καθώς η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης ανέδειξε θετική επίδραση του καπνίσματος στις τιμές του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U των υγιών εθελοντών, με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα.

Όσον αφορά το CYP2A6, ο μεταβολικός λόγος 17U/17X, σε ούρα 4-5 ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης, δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών σε 333 υγιή άτομα διαφόρων εθνικοτήτων [113]. Ο ίδιος μεταβολικός λόγος διερευνήθηκε και σε έναν ελληνικό πληθυσμό 44 ατόμων μετά από μεμονωμένη δειγματοληψία ούρων, 6 ώρες μετά την λήψη 200 mg καφεΐνης. Οι ενδιαμέσες τιμές του λόγου αυτού ήταν χαμηλότερες στους καπνιστές, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα, πιθανότατα λόγω του, σχετικώς, μικρού αριθμού των συμμετεχόντων [39].

Σε άλλες, αντίθετα, μελέτες το κάπνισμα φάνηκε να αναστέλλει τον μεταβολισμό της νικοτίνης και της κουμαρίνης, ουσίες οι οποίες μεταβολίζονται κυρίως από το CYP2A6 [103, 110]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τις δύο τελευταίες καθώς η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης απεκάλυψε στατιστικώς σημαντική αρνητική επίδραση του καπνίσματος στις τιμές του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X).

Η δραστηριότητα των XO και NAT-2, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους

μεταβολικούς λόγους $1U/1X$ και $AAMU/(AAMU+1U+1X)$, αντίστοιχα, σε συλλογή ούρων 6 ωρών δεν επηρεάστηκαν από το κάπνισμα [110]. Παρομοίως, δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών στην δραστικότητα της XO σε έναν κορεατικό πληθυσμό 133 ατόμων, με την χρήση του ίδιου μεταβολικού λόγου σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 4-5 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης [264]. Επιπλέον, ο μεταβολικός λόγος $1U/(1X+1U)$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών σε έναν πληθυσμό 173 ατόμων καταγομένων από την Αιθιοπία [125].

Το κάπνισμα δεν είχε επίδραση στους μεταβολικούς λόγους $AAMU/1X$ και $AAMU/(AAMU+1U+1X)$ των ταχέων ακετυλιωτών αλλά οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων των καπνιστών βραδέων ακετυλιωτών ήταν σημαντικά μικρότεροι από τους αντίστοιχους των μη καπνιστών, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης [216].

Σε παρόμοια διαδικασία, η δραστικότητα της NAT-2, όπως προσδιορίστηκε από τον μεταβολικό λόγο $AAMU/1X$ σε ούρα 24ώρου, δεν επηρεάστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από το κάπνισμα, τόσο στους ταχείς όσο και στους βραδείς ακετυλιωτές, παρόλο που οι μέσες τιμές του λόγου ήταν υψηλότερες στους καπνιστές και των δύο κατηγοριών [127]. Στην ίδια μελέτη ο μεταβολικός λόγος $1U/(1U+1X)$, ο οποίος εκφράζει την δραστικότητα της XO, δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ των καπνιστών και των μη καπνιστών. Σε μεμονωμένα δείγματα ούρων 277 υγιών εθελοντών καυκάσιας προέλευσης, επίσης, 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, δεν βρέθηκε επίδραση του καπνίσματος στους μεταβολικούς λόγους $1U/1X$ και $AFMU/1X$, σχετικών με τις XO και NAT-2 αντίστοιχα [204]. Σε 182 υγιείς Ιάπωνες, εξάλλου, οι αντίστοιχοι με τους προηγούμενους μεταβολικοί λόγοι $1U/(1U+1X)$ και $AAMU/(AAMU+1U+1X)$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων, δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών [126]. Παρομοίως, οι ενδιάμεσες τιμές του λόγου $1U/(1U+1X)$ σε μεμονωμένο δείγμα ούρων 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, ήταν σχεδόν ταυτόσημες στους 23 καπνιστές και 21 μη καπνιστές ενός δείγματος ελληνικού πληθυσμού [39].

Σε έναν μικτό πληθυσμό 90 ατόμων διαφόρων εθνικοτήτων, τέλος, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός της δραστικότητας της NAT-2 με την χρήση της καφεΐνης δεν ανέδειξε κάποια συσχέτιση μεταξύ του καπνίσματος και της διαδικασίας ακετυλίωσης [248] κάτι

το οποίο συνέβη και σε έναν αμιγή ελληνικό πληθυσμό 83 ατόμων [255].

Μία *in vitro* μελέτη, η οποία διερεύνησε την ενζυμική δραστικότητα της ΧΟ σε δείγματα ηπατικού ιστού προερχομένων από βιοψία και μερική ηπατεκτομή, δεν απεκάλυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας του ενζύμου και του καπνίσματος [119]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με τα περισσότερα από τα προηγούμενως εκτεθέντα, καθώς οι τιμές του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$, αντιπροσωπευτικού της δραστικότητας της ΧΟ, δεν είχαν σημαντική συσχέτιση με το κάπνισμα όπως, επίσης, το ίδιο συνέβη και για τις τιμές του λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$, τόσο στους βραδείς όσο και στους ταχείς ακετυλιωτές.

2.3.7. Ο ρόλος της σωματικής διάπλασης στην δραστικότητα των ενζύμων

Στην παρούσα εργασία δεν αναδείχθηκε κάποια σημαντική επίδραση του δείκτη σωματικής μάζας των υγιών εθελοντών στις τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντιπροσωπεύουν την δραστικότητα των τεσσάρων εξετασθέντων ενζύμων. Σε προγενέστερη μελέτη, κατά την οποία διερευνήθηκαν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της αντιπυρίνης σε παχύσαρκα άτομα, βρέθηκε, μεταξύ των άλλων, ότι η παχυσαρκία δεν επηρεάζει την κάθαρση του φαρμάκου αυτού. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παχυσαρκία, ακόμη και στις πιο ακραίες μορφές, έχει αμελητέα επίδραση στην οξειδωτική μεταβολική ικανότητα του ήπατος [303]. Όσον αφορά το CYP1A2, ειδικότερα, δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας του ενζύμου, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τον μεταβολικό λόγο $(17U+17X)/137X$ στα ούρα, και του σωματικού βάρους [44]. Μία, στατιστικώς σημαντική αλλά σχετικώς μικρή, αρνητική επίδραση του δείκτη σωματικής μάζας στην δραστικότητα του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί σε μελέτη κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε, όπως και προηγούμενως, η καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτης. Σύμφωνα μ' αυτήν, διαπιστώθηκε μεταβολή της βασικής κάθαρσης της καφεΐνης κατά 0,99 φορές για κάθε αύξηση του BMI κατά $1\text{kg}/\text{m}^2$ [45].

Σε σχέση με την σωματική διάπλαση, επίσης, προσδιορίστηκε η δραστικότητα της ΧΟ μέσω των επιπέδων του ουρικού οξέος της κυκλοφορίας σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια χωρίς να βρεθεί κάποια επίδραση του δείκτη σωματικής μάζας στα επίπεδα του ουρικού οξέος [304].

Σε μία *in vitro* διερεύνηση, εξάλλου, που αφορούσε την έκφραση διαφόρων ισομορφών του συστήματος P450 σε δείγματα βιοψίας ασθενών με αλκοολική και μη

αλκοολική ηπατική νόσο παρατηρήθηκε, ανοσοϊστοχημικά, άφθονη έκφραση του ισοενζύμου CYP2A6 σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ εξαιτίας παχυσαρκίας ή διαβήτη. Στην μελέτη αυτή, όμως, δεν έγινε σύγκριση των σχετικών εντάσεων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με δείγματα ηπατικού ιστού που να ανήκουν σε μη ηπατοπαθείς ενώ υπήρχαν 4 μόνον δείγματα λιπώδους ήπατος χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ των παχυσάρκων και των πασχόντων από διαβήτη [305].

Η δραστικότητα, τέλος, της NAT-2 σε σχέση με το σωματικό βάρος διερευνήθηκε, ταυτόχρονα με άλλους παράγοντες, σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 90 εθελοντές, εκ των οποίων οι 47 ήταν υγιείς και οι 43 έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Η δραστικότητα της NAT-2 προσδιορίστηκε μέσω του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης AFMU/1X σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, 5 ώρες μετά την κατανάλωση μιάς κούπας στιγμιαίου καφέ, χωρίς να βρεθεί σημαντική συσχέτιση του βάρους με τις τιμές του λόγου αυτού [248].

2.3.8. Η επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστικότητα των ηπατικών ενζύμων και στον μεταβολισμό των φαρμάκων

Η ηπατική νόσος περιλαμβάνει μία ποικιλία συνδρόμων που σχετίζονται με βλάβη του ηπατικού παρεγχύματος, κυτταρική νέκρωση και παθολογικές διαδικασίες αναγέννησης, μεταβολές στην ηπατική μικροκυκλοφορία και μεταβολές στο ενδοθήλιο των κολποειδών. Εξαιτίας αυτών των μεταβολών, η αποβολή των φαρμάκων τα οποία μεταβολίζονται από το ήπαρ είναι δυνατόν να επηρεαστεί, σε μεγάλο βαθμό, κατά την ηπατική νόσο.

Με βάση αυτές τις παθολογικές μεταβολές που παρουσιάζονται στην χρόνια ηπατική νόσο και στην κίρρωση, κατ' επέκταση, καθώς και τα πειράματα σε ένα μεγάλο πλήθος μελετών σε ανθρώπους και ζώα, έχουν διατυπωθεί 4 κύριες θεωρίες για την ερμηνεία της μειωμένης ηπατικής αποβολής των φαρμάκων:

α) η θεωρία του ασθενούς ηπατοκυττάρου ισχυρίζεται ότι υπάρχει μείωση του περιεχομένου και της δραστικότητας των ηπατικών ενζύμων που μεταβολίζουν τα φάρμακα, ενώ η αιματική ροή παραμένει φυσιολογική

β) η θεωρία του άθικτου ηπατοκυττάρου ισχυρίζεται ότι κατά την κίρρωση υπάρχει μία μειωμένη μάζα κυττάρων της οποίας η λειτουργία και η αιματική διαπότιση (perfusion) είναι σχετικώς φυσιολογική

γ) η θεωρία της μειωμένης πρόσληψης των φαρμάκων προτείνει ότι η πρόσληψη των φαρμάκων από τα ηπατοκύτταρα κατά την κίρρωση δυσχεραίνεται εξαιτίας της εναπόθεσης κολλαγόνου στο εξωκυττάριο διάστημα του Disse και της συνεπακόλουθης ανάπτυξης ενός φράγματος στο ενδοθήλιο των κολποειδών που παρεμποδίζει την ελεύθερη διάχυση των ουσιών προς τα ηπατοκύτταρα

δ) η θεωρία της μειωμένης οξυγόνωσης, τέλος, ισχυρίζεται ότι η μειωμένη πρόσληψη οξυγόνου από τα ηπατοκύτταρα ευθύνεται για τον μειωμένο μεταβολισμό των φαρμάκων, μάλλον, παρά η μειωμένη πρόσληψη του φαρμάκου καθεαυτού.

Υπάρχουν διάφορες *in vivo* και *in vitro* μελέτες οι οποίες στηρίζουν ή αναιρούν τις ανωτέρω θεωρίες γεγονός παραμένει, όμως, ότι κατά την ηπατική νόσο και ιδιαίτερα κατά την κίρρωση υπάρχει διαφορετικού βαθμού βλάβη στο μεταβολισμό διαφόρων φαρμάκων και στις μεταβολικές οδούς του ενός και του αυτού φαρμάκου [161]. Κατά την προχωρημένη κίρρωση που οφείλεται σε χρόνια ηπατίτιδα Β, για παράδειγμα, έχει αναφερθεί σημαντική μείωση τόσο στην κάθαρση φαρμάκων χαμηλής ηπατικής εξαγωγής, όπως είναι η αντιπυρίνη και αμινοπυρίνη, όσο και στην κάθαρση φαρμάκων υψηλής ηπατικής εξαγωγής, όπως είναι η λιδοκαΐνη και το πράσινο της ινδοκυανίνης (ICG) [306], ενώ τόσο στην κίρρωση, γενικώς, όσο και στον αποφρακτικό ίκτερο, ειδικότερα, το ηπατικό περιεχόμενο σε P450 είναι μειωμένο. Η μείωση αυτή, στην περίπτωση της κίρρωσης, προσεγγίζει το ποσοστό του 50% του φυσιολογικού περιεχομένου σε P450 [164].

Σε μία, πιο πρόσφατη, *in vivo* μελέτη αναφέρεται διαφορετική επίδραση της ηπατικής νόσου στα ένζυμα της οικογένειας του P450 (CYP) όπως αυτή διαπιστώθηκε μετά από χορήγηση ενός μίγματος 4 φαρμάκων-δεικτών σε ηπατοπαθείς διαφορετικής αιτιολογίας και βαρύτητας της νόσου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το ένζυμο CYP2C19 παρουσίασε την μεγαλύτερη μείωση της δραστηριότητάς του στους ασθενείς ακολουθούμενο κατά σειρά από τα CYP1A2, CYP2D6 και CYP2E1 [307]. Σε προηγούμενη *in vitro* μελέτη είχε γίνει συνδυασμένη διερεύνηση του περιεχομένου και της δραστηριότητας της ίδιας οικογένειας ενζύμων σε δείγματα ήπατος ασθενών οι οποίοι ήταν σε διαδικασία μεταμόσχευσης. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι το συνολικό περιεχόμενο σε κυτόχρωμα P450 ήταν μειωμένο, αφενός, και αφετέρου η συγκέντρωση και η καταλυτική δραστηριότητα του CYP1A2 ήταν μειωμένη στην κίρρωση, γενικώς, ενώ αυτές των CYP3A, CYP2E1 και CYP2C είχαν σχέση με την παρουσία χολόστασης: το

CYP3A ήταν μειωμένο μόνον στην κίρρωση χωρίς χολόσταση ενώ τα υπόλοιπα δύο ήταν μειωμένα μόνον στην κίρρωση με χολόσταση [219].

Η διαφορική επίδραση της ηπατικής νόσου στα ηπατικά ένζυμα έχει εξακριβωθεί και σε πειραματικά μοντέλα πρόκλησης κίρρωσης στους αρουραίους. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η πρόκληση χολικής κίρρωσης με την επίδραση του χοληδόχου πόρου είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του ηπατικού περιεχομένου σε CYP1A, CYP2C και CYP3A με αντίστοιχη μείωση των τιμών, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, στις δοκιμασίες αναπνοής της καφεΐνης, της αμινοπυρίνης και της ερυθρομυκίνης, υποστρωμάτων ειδικών για τα προαναφερθέντα ένζυμα. Το περιεχόμενο σε CYP2E1 και η αντίστοιχη δοκιμασία αναπνοής της νιτροζο-διμεθυλαμίνης παρέμειναν αμετάβλητα. Επιπλέον, η χορήγηση τετραχλωράνθρακα είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση ηπατικής κίρρωσης διαφορετικού βαθμού σοβαρότητας, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την μείωση του βάρους του ήπατος και της αλβουμίνης του ορού. Στους αρουραίους με ήπια κίρρωση υπήρξε μείωση του περιεχομένου του CYP2C, μόνον, και αύξηση της δραστηριότητας του CYP2E1. Στους αρουραίους με σοβαρότερη κίρρωση το ηπατικό περιεχόμενο στα τέσσερα ένζυμα και οι αντίστοιχες δοκιμασίες αναπνοής ήταν μειωμένες, με εξαίρεση την δοκιμασία αναπνοής της νιτροζο-διμεθυλαμίνης, ενδεικτικής της δραστηριότητας του CYP2E1, η οποία παρέμεινε αμετάβλητη. Και στα δύο μοντέλα της κίρρωσης υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δοκιμασιών αναπνοής και της σοβαρότητας της κίρρωσης η οποία καθορίστηκε με βάση της τιμές της αλβουμίνης του ορού [308].

Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, τα οποία αφορούν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των φαρμάκων, φαίνεται ότι κατά την ηπατική νόσο η αποβολή των φαρμάκων τα οποία υφίστανται σύζευξη δεν επηρεάζεται στον ίδιο βαθμό με την οξείδωση. Στην κίρρωση, για παράδειγμα, η γλυκουρονιδίωση των φαρμάκων είναι περισσότερο διατηρημένη σε σχέση με την οξείδωση, ενώ τα στοιχεία για την σουλφούρωση είναι αντιφατικά. Όσον αφορά στην ακετυλίωση φαρμάκων όπως η δαψόνη και η ισονιαζίδη, τέλος, φαίνεται ότι η διαδικασία αυτή επηρεάζεται σε μέτριο, μόνον, βαθμό από την κίρρωση αλλά το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζει τον φαινότυπο του βραδέος ακετυλιωτή είναι υψηλότερο σε σχέση με αυτό των υγιών [161].

Παράλληλα με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, έχει διαπιστωθεί ότι κατά την φλεγμονή, γενικά, και κατά την ηπατική νόσο, ειδικότερα, υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση διαφόρων κυτταροκινών στον ορό, όπως ο TNF-α, η IL-6, η IL-1β, η INF-γ

και ο TGF- β [114, 309, 310]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι κυτταροκίνες αυτές καταστέλλουν την έκφραση και την δραστικότητα των ενζύμων του συστήματος P450, αλλά ορισμένα από αυτά μένουν ανεπηρέαστα ή και επάγονται κάτω από αυτές τις συνθήκες [311]. Η μείωση των επιπέδων συγκεκριμένων ισοενζύμων P450 οφείλεται σε μείωση των επιπέδων του mRNA, ενώ διαφορετικές κυτταροκίνες αναστέλλουν διαφορετικά ισοένζυμα, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. [219, 312-314]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη διακριτών ρυθμιστικών μηχανισμών για τις διάφορες κυτταροκίνες. Η μείωση στα επίπεδα των mRNA η οποία προκαλείται από τις κυτταροκίνες έχει, γενικώς, αποδοθεί στην αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων του P450. Ο μηχανισμός της αναστολής σχετίζεται με την ενεργοποίηση από τις κυτταροκίνες, μετά από πρόσδεση με τον υποδοχέα τους, της οδού των κινασών της τυροσίνης της οικογένειας JAK και την εν συνεχεία ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας STAT μέσω φωσφορυλίωσης. Η εξειδίκευση των δράσεων των κυτταροκινών επιτυγχάνεται μέσω της εξειδικευμένης προσέλευσης διαφορετικών πρωτεϊνών STAT από τα διαφορετικά σύμπλοκα των υποδοχέων καθώς και από λεπτές διαφορές στις αλληλουχίες του DNA στις οποίες συνδέονται οι διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες. Η IL-6, για παράδειγμα, ενεργοποιεί τον σχηματισμό ομοδιμερών του STAT3, κυρίως, ενώ η IFN- γ ενεργοποιεί τον σχηματισμό ομοδιμερών του STAT1 [311, 315].

Μία άλλη οικογένεια πρωτεϊνών της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από από την IL-1 ή την IL-6 κατά την φλεγμονή είναι η οικογένεια C/EBP. Ο C/EBP α είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση πολλών γονιδίων του ήπατος, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων του CYP2C12, 2B6, 2C9 και 2D6. Κατά την διάρκεια της απόκρισης της οξείας φάσης στην φλεγμονή και στην μόλυνση η IL-6 προκαλεί μείωση στα επίπεδα του C/EBP α και αύξηση στα επίπεδα του C/EBP β στο ηπατοκύτταρο. Η επαγωγή από την IL-6 και από άλλες κυτταροκίνες του C/EBP β και του C/EBP δ αποτελεί έναν μηχανισμό της επαγωγής των γονιδίων της οξείας φάσης. Οι αποκρίσεις οι οποίες μεσολαβούνται από την επαγωγή του C/EBP β είναι βραδύτερες από αυτές οι οποίες οφείλονται στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση ενός γονιδίου-στόχου από μία συγκεκριμένη κυτταροκίνη μπορεί να επισυμβεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών και σε διαφορετικά χρονικά σημεία, μετά από την διέγερση του κυττάρου. Οι περισσότεροι, ανωτέρω προτεινόμενοι, μηχανισμοί

περιγράφουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι επάγουν την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων και τίθεται το ερώτημα με ποιόν τρόπο οι μηχανισμοί αυτοί καταστέλλουν τα γονίδια του P450. Μία πιθανή ερμηνεία αναφέρεται στην δυνατότητα των παραγόντων αυτών να ανταγωνίζονται για τις θέσεις πρόσδεσης στο DNA με έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα της βασικής έκφρασης του γονιδίου P450 ή να σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με αυτόν τον παράγοντα το οποίο να αναστέλλει την δράση του. Μία άλλη πιθανότητα είναι η δυνατότητα των μεταγραφικών παραγόντων για πρόσδεση πλησίον του εκκινητή του γονιδίου του P450 και η κατ' αυτόν τον τρόπο παρεμπόδιση της δράσης του συμπλόκου της έναρξης της μεταγραφής [316].

Η εμπλοκή διαφόρων μηχανισμών με διαφορετικά αποτελέσματα στην ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων P450 στο προμεταφραστικό στάδιο έχει διαπιστωθεί και σε μία μελέτη κατά την οποία διερευνήθηκαν τα επίπεδα του mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης των κυτοχρωμάτων CYP1A2, 2C9, 3A4 και 2E1 σε δείγματα ήπατος 20 ασθενών χωρίς ηπατικές μορφολογικές αλλοιώσεις και 50 κίρρωτικών ασθενών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για τα 3 πρώτα ισοένζυμα υπήρξε σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA και του πρωτεϊνικού περιεχομένου, με σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους, ενώ για το CYP2E1 υπήρξε μείωση στα επίπεδα του mRNA, μόνον, χωρίς αντίστοιχη μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την προμεταφραστική ρύθμιση της έκφρασης των 3 από τα 4 P450 ένζυμα σε συγκεκριμένες μορφές ηπατοπάθειας, ενώ για το CYP2E1 προέκυψε η πιθανότητα ρύθμισης όχι μόνον σε προμεταφραστικό αλλά και σε μεταφραστικό και σε μεταμεταφραστικό στάδιο [317].

Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις, μετά από πειράματα σε τρωκτικά και σε κυτταρικές σειρές, ότι κάποιες κυτταροκίνες επάγουν την αποδόμηση του mRNA μερικών ισοενζύμων του P450 και ότι κάποιες άλλες επάγουν την αποδόμηση των πρωτεϊνών του P450. Στην πρώτη περίπτωση, αρουραίοι οι οποίοι επιμολύνθηκαν με ενδοτοξίνη (λιποπολυσακχαρίτη, LPS) παρουσίασαν, εντός 12 ωρών, μείωση του mRNA του CYP2C12 κατά 95%, σε σχέση με την αρχική ποσότητα, και αντίστοιχη μείωση των mRNA των CYP2C11, 2E1 και 3A2 εντός 6 ωρών. Η έκφραση του mRNA του CYP2C11 κατεστάλη και από την IL-6, επίσης, σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων και από επαγωγείς της IFN, *in vivo*, παρόλο που αυτό συνέβη σε μεγαλύτερο χρονικό πλαίσιο απ' ότι προηγουμένως, ενισχύοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την υπόθεση ότι διαφορετικοί

μεσολαβητές της φλεγμονής είναι δυνατόν να ρυθμίζουν την έκφραση του P450 σε διαφορετικά επίπεδα.

Όσον αφορά την αποδόμηση της πρωτεΐνης του P450, έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης του CYP2C12 αρουραίων οι οποίοι επιμολύνθηκαν με LPS, υποχωρούν ραγδαία και παράλληλα με αυτά του αντίστοιχου mRNA, υποδηλώνοντας ότι η αποδόμηση του mRNA, από μόνη της, δεν επαρκεί να ερμηνεύσει την αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης. Αντίθετα, όταν σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων προκλήθηκε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, η μετέπειτα εφαρμογή IL-6 δεν επηρέασε το ποσοστό της μείωσης της πρωτεΐνης και της αντίστοιχης καταλυτικής δραστηριότητας του CYP2B1/2 επισημαίνοντας ότι η κυτταροκίνη αυτή δεν διεγείρει την αποδόμηση του CYP2B1/2 [316].

Ένας άλλος μηχανισμός που έχει διερευνηθεί σε σχέση με την επίδραση της φλεγμονής στο P450 είναι η αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου από τις κυτταροκίνες. Πράγματι, έχειδειχθεί ότι η IFN- γ , όταν εφαρμόστηκε σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων αρουραίων, κατέστειλε την έκφραση της πρωτεΐνης του CYP3A2 κατά 70%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η αντίστοιχη καταλυτική δραστηριότητα της β -υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης μειώθηκε κατά 97%, υποδηλώνοντας ότι η δραστηριότητα του εναπομείναντος ενζύμου ανεστάλη. Κατά την *in vivo* χορήγηση IFN- α σε αρουραίους, εξάλλου, οι δραστηριότητες των CYP1A1 και CYP2B κατεστάλησαν χωρίς να διαπιστωθεί ανιχνεύσιμη μεταβολή στα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί μιας τέτοιας αναστολής παραμένουν ασαφείς και είναι δυνατόν να συμπεριλαμβάνουν την οξειδωτική βλάβη από παραγόμενες κατά την φλεγμονή οξειδωτικές ρίζες ή την αναστολή από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) το οποίο παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα Kupffer κατά την απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα [311, 316]. Σύμφωνα με τον ίδιο συγγραφέα, η αναστολή του P450 μπορεί να αποτελεί συνέπεια της ανάγκης του ήπατος να αφιερώσει τον μεταφραστικό του μηχανισμό στην σύνθεση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της συστηματικής απόκρισης στην φλεγμονή.

Στη συνέχεια θα συζητηθούν λεπτομερέστερα τα αποτελέσματα της επίδρασης της ηπατικής νόσου στο μεταβολισμό της καφεΐνης και στα εμπλεκόμενα ένζυμα.

2.3.8.1. CYP1A2 και ηπατική νόσος

Σε μία διερεύνηση των μεταβολικών οδών της καφεΐνης σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση του ήπατος δείχθηκε ότι οι οδοί αυτοί δεν επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό στους ασθενείς. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η δραστηριότητα των οδών της N-3 απομεθυλίωσης της καφεΐνης και της N-7 απομεθυλίωσης της 17X, οι οποίες εξαρτώνται από το CYP1A2, ήταν μειωμένες στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, ενώ η οδός της N-1 απομεθυλίωσης της καφεΐνης, στην οποία συμμετέχουν το CYP1A2 και το CYP2E1, ήταν αυξημένη [211].

Χρησιμοποιώντας τους μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, μετά τη χορήγηση καφεΐνης, οι Denaro *et al.* διαπίστωσαν ότι ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U, ο οποίος αντανάκλα την δραστηριότητα του CYP1A2, ήταν σημαντικά μειωμένος σε ασθενείς με κίρρωση διαφόρων αιτιολογιών, σε σχέση με τους υγιείς, χωρίς όμως να παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την βαθμολόγηση της σοβαρότητας της νόσου σύμφωνα με την κλινικοεργαστηριακή κλίμακα κατά Child-Pugh. Επίσης, δεν παρουσιάστηκε διαφορά μεταξύ των ασθενών με χρόνια, μη κίρρωτική νόσο, και των υγιών [60]. Ο ίδιος μεταβολικός λόγος παρουσιάστηκε μειωμένος, επίσης, σε ούρα 48 ωρών παιδιατρικών ασθενών με ηπατικές νόσους διαφορετικής αιτιολογίας, παράλληλα με την μειωμένη κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο [222].

Οι δύο προηγούμενες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μικρό, σχετικά, αριθμό εθελοντών, της τάξεως των 10-30 ατόμων περίπου, αλλά σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών με αλκοολική κίρρωση και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (n=226 και n=67, αντίστοιχα) οι Bechtel *et al.* και οι Lelouet *et al.*, χρησιμοποιώντας τον ίδιο, όπως και προηγουμένως, μεταβολικό λόγο σε ούρα 24ώρου, διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα του CYP1A2 ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς αυτούς [61, 62]. Η μείωση αυτή ήταν εμφανής σε όλα τα στάδια της νόσου και σε άμεση συσχέτιση με την βαρύτητα αυτής, σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης της κίρρωσης κατά Child, για την αλκοολική κίρρωση, και σύμφωνα με το ιστολογικό στάδιο κατά Sheuer, για την PBC.

Διάφορες μελέτες, επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί για την διερεύνηση της κάθαρσης της καφεΐνης από το πλάσμα και την σίελο σε ηπατοπαθείς διαφόρων αιτιολογιών και ποικίλης βαρύτητας της νόσου. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, οι μέθοδοι αυτές και ειδικότερα η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα, αποτελούν τις *in vivo* μεθόδους αναφοράς για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2. Έτσι, σε μία

πρώιμη μελέτη, έχει δειχθεί ότι η κάθαρση της καφεΐνης είναι σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος σε σχέση με του υγιείς [172]. Σε μεταγενέστερη μελέτη δείχθηκε ότι η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα είναι μειωμένη τόσο στους κίρρωτικούς όσο και στους μη κίρρωτικούς ασθενείς [318]. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα, όπως και οι υπόλοιπες φαρμακοκινητικές σταθερές της καφεΐνης δεν βρέθηκε να διαφέρουν στους μη κίρρωτικούς ασθενείς, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ ήταν μειωμένες στους ασθενείς με κίρρωση [224]. Σε άλλες, πάλι, μελέτες που αφορούσαν μόνον κίρρωτικούς ασθενείς, η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα και την σίελο παρουσιάστηκε σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, σε σχέση με τους υγιείς, αλλά δεν διέφερε στους ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση [159, 187]. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα μελέτης κατά την οποία η συγκέντρωση του P450 και η ενζυμική δραστηριότητα της υδροξυλίωσης των αρωματικών αμινών σε δείγματα ηπατικού ιστού από βιοψία ήταν σημαντικά μειωμένες στους ασθενείς με σοβαρή ηπατίτιδα και ενεργό κίρρωση ενώ δεν διέφεραν μεταξύ υγιών και ασθενών με ήπια ηπατίτιδα ή ανενεργό (αντιρροπούμενη) κίρρωση [319].

Η κάθαρση της καφεΐνης από το πλάσμα απετέλεσε και το αντικείμενο μιας μεγαλύτερης μελέτης στην οποία συμμετείχαν 419 ασθενείς, κίρρωτικοί και μη κίρρωτικοί, καθώς και 71 υγιείς και ασθενείς με μη ηπατική νόσο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κάθαρση της καφεΐνης ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς με αλκοολική κίρρωση και με κίρρωση αγνώστου αιτιολογίας (cryptogenic). Αντίθετα, οι ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Β και κίρρωση οφειλόμενη σε ηπατίτιδα Β δεν παρουσίασαν διαφορά σε σχέση με τους υγιείς. Παραδόξως, αυξημένη κάθαρση της καφεΐνης παρουσίασαν οι ασθενείς με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα Β, με λιπώδες ήπαρ αλκοολικής αιτιολογίας και PBC. Περαιτέρω κατάταξη των ασθενών σε σχέση με τα επίπεδα της χολερυθρίνης του ορού έδειξε ότι η κάθαρση της καφεΐνης μειώνεται αυξανόμενης της χολερυθρίνης αλλά, παρόλα αυτά, οι κίρρωτικοί ασθενείς εξαιτίας ηπατίτιδας Β και ηπατίτιδας μη Α-μη Β με επίπεδα χολερυθρίνης έως και 3,0 mg/dL καθώς και ικτερικοί ασθενείς με PBC δεν είχαν διαφορά στην κάθαρση της καφεΐνης από τους υγιείς [220]. Σχολιάζοντας τα αποτελέσματα, οι συγγραφείς αποδίδουν την αύξηση της κάθαρσης της καφεΐνης κατά την αλκοολική στεατοηπατίτιδα σε ενζυμική επαγωγή. Είναι, όμως, γνωστό ότι το ένζυμο που επάγεται από το αλκοόλ είναι το CYP2E1 [320] του οποίου η

συμβολή στον μεταβολισμό της καφεΐνης είναι μικρή ενώ, αντίθετα, το CYP1A2 αναστέλλεται από την αιθανόλη [55]. Επιπλέον, πιθανολογούν ότι η μη μείωση της κάθαρσης της καφεΐνης στην χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση ιϊκής αιτιολογίας οφείλεται σε ενζυμική επαγωγή εξαιτίας της μόλυνσης. Είναι όμως γνωστό ότι κατά την ιϊκή μόλυνση, γενικώς, και κατά την οξεία και χρόνια ηπατίτιδα, ειδικότερα, αυξάνει η συγκέντρωση των κυτταροκινών όπως η IL-1β, η IL-6, ο TNF-α, η INF-γ και ο TGF-β οι οποίες αναστέλλουν την έκφραση μερικών ισοενζύμων του P450 όπως του CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 και CYP3A6 [312, 313, 321].

Ως υποκατάστατο της κάθαρσης της καφεΐνης, ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στο πλάσμα προσδιορίστηκε σε ασθενείς με κίρρωση, χρόνια ηπατίτιδα και χολολιθίαση και βρέθηκε σημαντικά μειωμένος στις δύο πρώτες περιπτώσεις, σε σύγκριση με το δείγμα των υγιών, ενώ δεν είχε διαφορά στους ασθενείς με χολολιθίαση [198, 322].

Η κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο, ως μη επεμβατική μέθοδος προσδιορισμού της ηπατικής λειτουργίας, διερευνήθηκε σε ασθενείς με κίρρωση διαφόρου αιτιολογίας, σε μη κίρρωτικούς ασθενείς και σε παιδιατρικούς ηπατοπαθείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι τρεις ομάδες είχαν σημαντικά μειωμένη κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, με τους κίρρωτικούς ασθενείς να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη υποχώρηση [195, 222]. Σε συμφωνία με αυτά, η κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο όπως και ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στην σίελο είχαν σημαντική μείωση σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια χωρίς κίρρωση [323].

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να προσδιορισθεί ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται ο μεταβολισμός της καφεΐνης από την ηπατική νόσο, τόσο σε σχέση με την βαρύτητα όσο και με την αιτιολογία αυτής. Διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U, ειδικός της δραστηριότητας του CYP1A2, ήταν σημαντικά μειωμένος, σε σχέση με τους υγιείς, όχι μόνον στους κίρρωτικούς αλλά και στους μη κίρρωτικούς ασθενείς, στην κατηγορία των μη καπνιστών, ενώ στην κατηγορία των καπνιστών η μείωση ήταν σημαντική μόνον στους ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση. Η μέθοδος του μεταβολικού λόγου, εξάλλου, επέδειξε αρκετή ευαισθησία ώστε να ανιχνεύσει τόσο την μετάβαση από το στάδιο της χρόνιας, μη κίρρωτικής, νόσου στο στάδιο της αντιρροπούμενης κίρρωσης όσο και την μετάβαση από το στάδιο της αντιρροπούμενης κίρρωσης σε εκείνο της μη αντιρροπούμενης καθώς υπήρξε στατιστικώς

σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιαμέσων τιμών του ανωτέρω μεταβολικού λόγου μεταξύ αυτών των ομάδων των ασθενών, στους μη καπνιστές.

Όταν διερευνήθηκε η βαρύτητα της νόσου σε συνδυασμό με την αιτιολογία αυτής, στους μη καπνιστές, διαπιστώθηκε ότι οι κίρρωτικοί, κάθε ομάδας ασθενών, είχαν σημαντικά μειωμένη λειτουργικότητα του CYP1A2, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ, όσον αφορά τους μη κίρρωτικούς, σημαντική μείωση υπήρξε μόνον στις ομάδες των πασχόντων από αυτοάνοση ηπατίτιδα, από αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα και από μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, δηλαδή από νοσήματα μη ιογενούς αιτιολογίας. Όταν, όμως, διερευνήθηκαν οι τιμές του μεταβολικού λόγου στις συγκεντρωτικές κατηγορίες των πασχόντων από ιογενή ηπατίτιδα και από μη ιογενή ηπατίτιδα τότε τόσο οι κίρρωτικοί όσο και οι μη κίρρωτικοί παρουσίασαν σημαντική μείωση σε σχέση με του υγιείς. Από τα ανωτέρω συνάγεται το συμπέρασμα ότι υπάρχει πραγματική μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στους μη κίρρωτικούς που πάσχουν από HBV και HCV ηπατίτιδα αλλά, προκειμένου η διαφορά αυτή να αποκτήσει στατιστική σημαντικότητα, απαιτείται η μελέτη ικανού αριθμού ασθενών από κάθε ομάδα. Επιπλέον, είναι πιθανόν το αυτό να ισχύει και στην περίπτωση των πασχόντων από αλκοολική ηπατοπάθεια καθώς η δραστηριότητα του CYP1A2 στους μη κίρρωτικούς αυτής της ομάδας, παρ'ότι χαμηλότερη, δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά από αυτή των υγιών.

Στην κατηγορία των καπνιστών, αντίθετα, παρόλο που οι τιμές του μεταβολικού λόγου ήταν χαμηλότερες σε όλες τις ομάδες των ασθενών, σε σχέση με τους υγιείς καπνιστές, μόνον οι πάσχοντες από αλκοολική ηπατοπάθεια, από αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα και από μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα καθώς και οι ανήκοντες στην συγκεντρωτική κατηγορία των πασχόντων από μη ιογενή ηπατίτιδα, κίρρωτικοί και μη κίρρωτικοί, εμφάνισαν σημαντική διαφορά. Επιπλέον, παρόλο που σε όλες τις ομάδες εντός της κατηγορίας των καπνιστών, οι κίρρωτικοί παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές στην δραστηριότητα του CYP1A2, σε σχέση με τους αντίστοιχους μη κίρρωτικούς ασθενείς, οι διαφορές αυτές δεν είχαν στατιστική σημαντικότητα, πιθανότατα εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών στις επιμέρους υποομάδες.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι δηλωτικά του γεγονότος ότι η μέθοδος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, βρίσκεται σε συμφωνία με τις περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες και ότι είναι επαρκώς ευαίσθητη να αναδείξει την δυσλειτουργία του CYP1A2 όχι μόνον σε προχωρημένα στάδια της νόσου

αλλά και σε στάδια χρονιότητας στα οποία δεν έχει αναπτυχθεί κίρρωση. Μεταξύ των σοβαρώς ασθενούντων, η μέθοδος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης επέτυχε να ανιχνεύσει την εντονότερη βλάβη της ηπατικής λειτουργίας στους ασθενείς εκείνους με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, σε σχέση με τους πάσχοντες από αντιρροπούμενη κίρρωση. Η μέθοδος αυτή επίσης, είχε επαρκή ευαισθησία να αναδείξει την μετάβαση από την μη κίρρωτική νόσο στην αντιρροπούμενη κίρρωση καθώς υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιάμεσων τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U μεταξύ των ασθενών των δύο αυτών κατηγοριών, στους μη καπνιστές.

Στην παρούσα μελέτη έγινε, επίσης, εμφανής η δυσλειτουργία του CYP1A2 στους ασθενείς με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα, δηλαδή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση (PBC) και με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC), στους μη καπνιστές. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μίας προαναφερθείσας μελέτης κατά την οποία ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U σε ούρα 24ώρου 67 ασθενών με PBC ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν των υγιών σε όλα τα στάδια της νόσου, σύμφωνα με την ιστολογική σταδιοποίηση κατά Sheuer [62]. Παρόμοιο αποτέλεσμα προέκυψε και σε μία μελέτη με φάρμακο-δείκτη την αντιτυρίνη η κάθαρση της οποίας ήταν σημαντικά μειωμένη σε 12 μη καπνιστές ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από PBC σταδίου III και IV σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ 23 ελαφρότερα ασθενείς σταδίου I και II δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση [324]. Στην παρούσα εργασία δεν υπήρξε ιστολογική σταδιοποίηση των ασθενών με αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα αλλά, με βάση την βιοψία, μόνον 4 από τους 29 μη καπνιστές ασθενείς με PBC και 1 από τους 7 μη καπνιστές ασθενείς με PSC έπασχαν από μη αντιρροπούμενη κίρρωση, ανήκαν δηλαδή στα υψηλότερα, από πλευράς βαρύτητας, στάδια της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη έγινε, για πρώτη φορά, διερεύνηση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε ασθενείς πάσχοντες από αυτοάνοση ηπατίτιδα και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη. Η μέθοδος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης αποκάλυψε ότι και αυτά τα νοσήματα είχαν σημαντική ανασταλτική επίδραση στην δραστηριότητα του CYP1A2. Αυτό συνέβη τόσο στους μη καπνιστές όσο και στους καπνιστές, όσον αφορά τους πάσχοντες από NASH, ενώ όσον αφορά τους πάσχοντες από αυτοάνοση ηπατίτιδα, η αναστολή ήταν σημαντική στους μη καπνιστές, μόνον, καθώς οι ανήκοντες στην κατηγορία των καπνιστών ήταν εμφανώς ολιγάριθμοι (3 άτομα).

Όσον αφορά την NASH, διαπιστώθηκε, σε *in vitro* μελέτη, ότι η επώαση καλλιέργειας ανθρώπινων ηπατοκυττάρων με ελεύθερα, μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα (ελαϊκό και παλμιτικό) είχε ως αποτέλεσμα την δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα, μείωση της τάξεως του 46-60% στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A4, καθώς και μείωση της τάξεως του 25-45% στα επίπεδα του mRNA των CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1, CYP2D6, και CYP3A4 σε σχέση με κύτταρα τα οποία δεν είχαν επωαστεί με λιπαρά οξέα [325]. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και σε άλλη μελέτη κατά την οποία διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, της ηπατικής μικροσωματικής έκφρασης των πρωτεϊνών των CYP1A2, CYP2E1, CYP2C11, και CYP3A κατά 27%, 68%, 53% και 50%, αντίστοιχα, σε αρουραίους με πρόιμη στεάτωση η οποία προκλήθηκε με την προσθήκη οροτικού οξέος στην διαίτα. Σε πλήρη συμφωνία με την μειωμένη έκφραση του CYP1A2, παρατηρήθηκε και μειωμένη, κατά 45% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, μικροσωματική Ο-αποαιθυλίωση της 7-αιθοξυρεζορουφίνης, κατάλυση ειδική για το CYP1A2, στα δείγματα ήπατος με στεάτωση [326]. Σύμφωνα με μία υπόθεση, η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ αυξάνει την ευπάθεια του οργάνου στο οξειδωτικό στρες, το οφειλόμενο σε αυξημένη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια και στην επαγωγή του CYP2E1 από τα λιπαρά οξέα και της κετόνες, επαγωγή που έχει διαπιστωθεί και ανοσοϊστοχημικά τόσο σε δείγματα βιοψίας τόσο ασθενών με NASH όσο και ασθενών με αλκοολική νόσο του ήπατος. Η κατάσταση αυτή έχει ως συνέπεια την υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, την κυτταρική νέκρωση και απόπτωση, την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων του ήπατος και την δημιουργία ίνωσης. Ο παθογενετικός μηχανισμός αυτός είναι κοινός για την ανάπτυξη τόσο της αλκοολικής όσο και της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Επιπλέον, ο TNF-α αυξάνεται σε παχύσαρκα και διαβητικά άτομα και η απώλεια βάρους μειώνει τα επίπεδά του ενώ, παράλληλα, η IL-6 φαίνεται να απελευθερώνεται συστηματικά από τον λιπώδη ιστό προκαλώντας την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer με αποτέλεσμα την δημιουργία ίνωσης [327-329]. Στην αλληλουχία των γεγονότων αυτών είναι πιθανόν να οφείλεται η μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 κατά την NASH και την αλκοολική νόσο καθώς, όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, οι κυτταροκίνες αποτελούν παράγοντα αναστολής του ενζύμου αυτού.

Όσον αφορά την αυτοάνοση ηπατίτιδα, εξάλλου, έχουν ανιχνευθεί αυτοαντισώματα εναντίον του CYP1A2 και CYP2A6 σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα-1 [330, 331]. Είναι πιθανόν, ότι ο μεταβολισμός των φαρμάκων μειώνεται λόγω της καταστροφής των ηπατοκυττάρων από αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων CYPs τα οποία εντοπίζονται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων αυτών. Πράγματι, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη διαφόρων κυτοχρωμάτων στην πλασματική μεμβράνη ανθρώπινων ηπατοκυττάρων όπως των P450 1A2, 2C, 2D6, 2E1, και 3A4 και σε περιεκτικότητα 9% αυτής των μικροσωμάτων, ενώ, ταυτόχρονα, τα κυτοχρώματα P450 1A2, 2D6, και 2C αναγνωρίστηκαν από αυτοαντισώματα έναντι μικροσωμάτων ήπατος και από αυτοαντισώματα έναντι μικροσωμάτων ήπατος/νεφρού τύπου 1 και τύπου 2, αντίστοιχα [332]. Στην ίδια σειρά μελετών, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη διαφόρων κυτοχρωμάτων στην συσκευή Golgi και ότι οι αναστολείς της κυστιδιακής μεταφοράς μειώνουν τα επίπεδα των CYP2B1/2 και CYP2C11 στην πλασματική μεμβράνη, υποδηλώνοντας την κυστιδιακή ροή των ισομορφών αυτών προς την συγκεκριμένη θέση [333, 334]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι διάφοροι αναστολείς της κυστιδιακής μεταφοράς μειώνουν τα επίπεδα του CYP1A1/2 στην πλασματική μεμβράνη ηπατοκυττάρων αρουραίων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Έχει, επίσης, εξακριβωθεί ότι μόνον τα νεοσυντιθέμενα CYPs μεταναστεύουν στην πλασματική μεμβράνη, προσανατολιζόμενα προς την εξωτερική επιφάνεια αυτής, ενώ τα μικροσωματικά CYPs παραμένουν σταθερά [335]. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν ενδείξεις για την επιβεβαίωση της διαπιστωθείσας μείωσης της δραστηριότητας του CYP1A2 κατά την NASH και την αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Ένα άλλο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ότι όταν οι ασθενείς που ήταν μη καπνιστές διαχωρίστηκαν σε πάσχοντες από ιογενή και μη ιογενή αιτιολογία της ηπατικής νόσου, τόσο οι πρώτοι όσο και οι δεύτεροι, είχαν σημαντικά χαμηλότερες ενδιάμεσες τιμές του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 από την ομάδα ελέγχου, ενώ όσον αφορά τους καπνιστές, αυτό συνέβη μόνον για τους πάσχοντες από μη ιογενή νόσο. Η διαπίστωση αυτή μπορεί, πιθανότατα, να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι η ομάδα των ασθενών με μη ιογενή νόσο καπνιστών περιελάμβανε το σύνολο των 12 καπνιστών με μη αντιρροπούμενη κίρρωση, των οποίων οι χαμηλές τιμές του μεταβολικού λόγου επέδρασαν στην σημαντική συνολική μείωση της ενδιάμεσης τιμής.

Διαπιστώθηκε, τέλος, ότι το κάπνισμα μπορεί να συσκοτίσει την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 και, προκειμένου να εξακριβωθεί η πραγματική επίδραση

της ηπατικής νόσου στους καπνιστές, απαιτούνται μελέτες οι οποίες να περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό καπνιστών από αυτόν της παρούσας εργασίας.

2.3.8.2. CYP2A6 και ηπατική νόσος

Η δραστηριότητα του CYP2A6 στην ηπατική νόσο έχει διερευνηθεί, μέσω της μεθόδου των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης, σε λίγες, σχετικά, μελέτες, καθώς το κλασικό υπόστρωμα για το CYP2A6 είναι η κουμαρίνη. Σε μία από αυτές διαπιστώθηκε ότι ο σχετικός με το CYP2A6 μεταβολικός λόγος 17U/17X, σε μεμονωμένο δείγμα ούρων, είναι αυξημένος στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση, ανεξαρτήτως του σταδίου αυτής, σε σχέση με τους υγιείς, χωρίς όμως η αύξηση να παρουσιάσει στατιστική σημαντικότητα [60]. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε ένα δείγμα ασθενών με αλκοολική κίρρωση με την χρήση ενός σπάνια, αν όχι καθόλου, χρησιμοποιούμενου μεταβολικού λόγου της καφεΐνης σε ούρα 24ώρου. Συγκεκριμένα, ο λόγος $17U/(17U+17X+1X+1U+7X+7U +AFMU+AAMU)$, ο οποίος απεικονίζει το ποσοστό της παραγωγής του 17U σε σχέση με τα συνολικά προϊόντα της οδού της 17X και, σύμφωνα με τους συγγραφείς, εκφράζει την C8-οξειδωση της 17X, δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών [211]. Οι συγγραφείς δεν προσδιορίζουν επακριβώς το ένζυμο το υπεύθυνο για την οξειδωση αυτή, αλλά είναι πλέον γνωστό ότι το ένζυμο αυτό είναι, κατά κύριο λόγο, το CYP2A6 [113, 210]. Αντίθετα με τα ανωτέρω, ο λόγος 17U/17X σε ούρα 24ώρου ασθενών με αλκοολική κίρρωση, στα σοβαρότερα στάδια της νόσου (Child B,C), και PBC ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τους υγιείς [61, 62]. Η διαφορά αυτή, πιθανώς, να αναδείχθηκε εξαιτίας των πολύ μεγαλύτερων, σε αριθμό εθελοντών, δειγμάτων των δύο αυτών μελετών. Τα τελευταία αυτά αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με ανοσοϊστοχημικές μελέτες δειγμάτων κίρρωτικού ηπατικού ιστού στις οποίες διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης του CYP2A6 σε ηπατοκύτταρα ευρισκόμενα στην περιφέρεια των κίρρωτικών όζων, άμεσα παρακειμένων σε περιοχές περιπυλίας ίνωσης και φλεγμονής, ιϊκής αιτιολογίας [114]. Παρόμοια υπερέκφραση του CYP2A6 διαπιστώθηκε σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες ηπατικού ιστού ασθενών με προχωρημένη αλκοολική νόσο και ασθενών με λιπώδες ήπαρ μη αλκοολικής αιτιολογίας, σε σχέση με ασθενείς πάσχοντες από πρώιμη αλκοολική νόσο και μη αλκοολική ηπατίτιδα ιϊκής αιτιολογίας [305]. Με την ίδια μέθοδο, αυξημένη έκφραση του CYP2A6 βρέθηκε σε ηπατοκύτταρα παρακείμενα σε συστάδες (clusters) φλεγμονωδών

κυττάρων και σε περιοχές με ίνωση δειγμάτων ηπατικού ιστού από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνο [336]. Δύο *in vivo* μελέτες, όμως, οι οποίες διερεύνησαν την δραστικότητα του CYP2A6 σε ασθενείς με ηπατίτιδα Α και ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος, χρησιμοποιώντας ως φάρμακο-δείκτη την κουμαρίνη, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολισμός της κουμαρίνης ήταν μειωμένος στους ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα Α και στους κίρρωτικούς αλκοολικούς ασθενείς με μέτρια και μεγάλη ινωτική δραστικότητα.. Συγκεκριμένα, η απέκκριση στα ούρα της 7-υδροξυκουμαρίνης τις 2 πρώτες ώρες μετά την χορήγηση της κουμαρίνης ήταν μειωμένη, κατά 26%, στους πάσχοντες από οξεία ηπατίτιδα Α, κατά 68% στους πάσχοντες από σοβαρή αλκοολική νόσο του ήπατος, κατά 39% στους πάσχοντες από μέτρια αλκοολική νόσο του ήπατος, ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών και των πασχόντων από ήπια αλκοολική νόσο [109, 209]. Η φαινομενική αυτή αντίφαση με τις προηγούμενες μελέτες μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την διαδικασία της ηπατικής βλάβης και κατά την κίρρωση, το στάδιο και το χρονικό σημείο της εξέλιξης της νόσου είναι κρίσιμοι παράγοντες όσον αφορά τις μεταβολές της ενζυμικής δραστικότητας. Επιπλέον, είναι πιθανόν, ότι η εντοπισμένη αύξηση της ποσότητας του CYP2A6 η οποία παρατηρείται στις ανοσοϊστοχημικές μελέτες να μην είναι δυνατόν να ανιχνευθεί από μία *in vivo* δοκιμασία [103].

Πέραν των ανωτέρω μελετών που αφορούσαν, κυρίως, σε ασθενείς με αλκοολική νόσο, υπάρχει η ένδειξη ότι η μειωμένη δραστικότητα του CYP2A6 κατά την ηπατική νόσο οφείλεται, εν μέρει, σε αυτοάνοσα αίτια καθώς έχουν ανιχνευθεί αυτοαντισώματα έναντι του CYP2A6 τόσο σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C όσο και σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα-1 [330, 337]. Επιπλέον, σύμφωνα με ανωτέρω καταχωρηθείσα αναφορά, η δραστικότητα του CYP2A6 εμφανίζεται να υποχωρεί κατά την μη αλκοολική στεάτωση των ηπατοκυττάρων [325].

Στην παρούσα εργασία η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης $17U/(17U+17X)$, ενδεικτικού της δραστικότητας του CYP2A6, μετά από προσαρμογή για το κάπνισμα, ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους κίρρωτικούς ασθενείς, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ δεν αναδείχτηκε κάποια διαφορά μεταξύ υγιών και μη κίρρωτικών ηπατοπαθών, διαφόρου αιτιολογίας. Η διάκριση των ασθενών με βάση την ιογενή ή μη αιτιολογία της νόσου δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, παρότι και οι δύο αυτές κατηγορίες των πασχόντων είχαν

χαμηλότερες μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου από αυτή των υγιών εθελοντών. Όταν, όμως, έγινε συνολική εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου του συνόλου των ασθενούντων και των υγιών, τότε οι επιμέρους διαφορές απέκτησαν στατιστική σημαντικότητα. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η ηπατική νόσος επηρεάζει ανασταλτικά την δραστικότητα του CYP2A6, αλλά η αναστολή αυτή αναδεικνύεται σε μεγάλα δείγματα ηπατοπαθών, με βάση τον συγκεκριμένο μεταβολικό λόγο της καφεΐνης. Πράγματι, με τη χρήση του ανωτέρω λόγου, ανεδείχθη μείωση της τάξης του 11% στην δραστικότητα του CYP2A6 στους κίρρωτικούς ασθενείς, αριθμός αρκετά μικρότερος από αυτούς που προέκυψαν στις μελέτες με φάρμακο-δείκτη την κουμαρίνη. Η διαπίστωση αυτή υποδηλώνει ότι η καφεΐνη δεν αποτελεί, αρκετά ευαίσθητο δείκτη της δραστικότητας του CYP2A6 όσο η κουμαρίνη, παρόλο που η οξειδωση της 17X προς 17U είναι αντίδραση ειδική για το ένζυμο αυτό. Η διαφορά αυτή μπορεί, πιθανόν, να οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση της 17X στα ούρα επηρεάζεται, όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί, από παράγοντες που δεν σχετίζονται αποκλειστικά από μεταβολικές διεργασίες καθώς η νεφρική απέκκριση του μεταβολίτη αυτού της καφεΐνης εξαρτάται από τον ρυθμό αποβολής των ούρων, δηλαδή από την ποσότητα πρόσληψης υγρών από τα άτομα και από την εν γένει λειτουργία των νεφρών.

2.3.8.3. XO και ηπατική νόσος

Σε μία μελέτη διερεύνησης των μεταβολικών οδών της καφεΐνης στην οποία συμμετείχαν 13 κίρρωτικοί ασθενείς αλκοολικής αιτιολογίας και 11 υγιείς διαπιστώθηκε ότι η οξειδωση του μεταβολίτη της καφεΐνης 1X προς 1U ήταν αυξημένη στους ασθενείς, γεγονός που αποδόθηκε στην αυξημένη δραστικότητα της XO στα άτομα αυτά [211]. Στην συνέχεια, η δραστικότητα της XO διερευνήθηκε σε ασθενείς με ιογενή κίρρωση και κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας καθώς και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα, με την μέθοδο των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα. Οι τιμές του μεταβολικού λόγου 1U/1X, ο οποίος εκφράζει την δραστικότητα της XO, εξετάστηκαν σε ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων, μετά την χορήγηση καφεΐνης, και βρέθηκε ότι οι ενδιάμεσες τιμές του λόγου αυτού δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των υγιών και των ασθενών, παρόλο που οι ασθενείς είχαν υψηλότερους ενδιάμεσους [60]. Ο ίδιος μεταβολικός λόγος μελετήθηκε και σε 9 παιδιατρικούς ηπατοπαθείς και, παρόλο που πάλι δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών και των ασθενών, η μέση τιμή του λόγου αυτού

στους ασθενείς ήταν διπλάσια από αυτή των υγιών [222]. Αντίθετα με τις προηγούμενες μελέτες, ο ίδιος μεταβολικός λόγος σε ούρα 24ώρου μεγαλύτερων δειγμάτων ασθενών παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά αυξημένες τιμές σε κίρρωτικούς ασθενείς αλκοολικής αιτιολογίας και σε ασθενείς με PBC, σε σχέση με τους υγιείς (n=226 και n=67 αντίστοχα) [61, 62].

Η δραστικότητα της XO προσδιορίστηκε με πιο άμεσο τρόπο και σε μελέτη κατά την οποία μετρήθηκε η ενζυμική μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ σε δείγματα ηπατικού ιστού ηπατοπαθών διαφορετικής αιτιολογίας και καρκινοπαθών μη ηπατικής αιτιολογίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη συνολική δραστικότητα της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης (XOR) στους ασθενείς με ιογενή κίρρωση, αλλά όχι στους ηπατοπαθείς μη ιογενούς αιτιολογίας. Εν τούτοις, η δραστικότητα της XO, παρότι αυξημένη στους ασθενείς ιογενούς αιτιολογίας, δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από αυτή των υγιών [121]. Οι συγγραφείς απέδωσαν την αύξηση της δραστικότητας της XOR στην πιθανή επαγωγή του ενζύμου από την εκκρινόμενη, εξαιτίας της ιϊκής μόλυνσης, IFN- γ , η οποία μαζί με την IFN- α είναι γνωστοί επαγωγείς της XOR [338, 339]. Έχει, επίσης, δειχθεί ότι η εφαρμογή TNF- α , IL-1 β και IFN- γ σε καλλιέργεια ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων μαστού οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα της XOR η οποία αποδόθηκε τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταφραστικό επίπεδο. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι η IFN- γ προκάλεσε 8-πλάσια αύξηση στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου σε αντιπαραβολή με την 2-πλάσια έως 3-πλάσια αύξηση του m-RNA και της πρωτεΐνης της XOR. Στο μεταγραφικό επίπεδο, έχουν ανιχνευθεί στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου της XOR περιοχές απόκρισης στην IL-6 και εν δυνάμει περιοχές απόκρισης στον NF-kB, στον TNF, στην IFN- γ και στην IL-1 β [118].

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η επαγωγή της XO κατά την ιϊκή μόλυνση έχει διαπιστωθεί σε παλαιότερες μελέτες κατά τις οποίες έγινε επιμόλυνση πειραματοζώων με διάφορους ιούς, όπως ο ιός της γρίπης, ο ερπητοϊός, ο ιός Coxsackie, ο ιός Hart Park κ.ά. [340, 341].

Η αποκλειστικά ιογενής, όμως, επαγωγή της XOR αμφισβητήθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη κατά την οποία διερευνήθηκε η συνολική δραστικότητα της XOR καθώς και η επί μέρους δραστικότητα της XO σε δείγματα ηπατικού ιστού ασθενών υπό μεταμόσχευση. Η μελέτη αυτή περιλάμβανε τόσο την μέτρηση της ενζυμικής

δραστηριότητας του ενζύμου όσο και τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ενζυμική δραστηριότητα της XO ήταν σημαντικά αυξημένη όχι μόνο στους ασθενείς με ιογενή κίρρωση αλλά και σε ασθενείς τελικού σταδίου με PBC, PSC και αλκοολική ηπατοπάθεια. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρήθηκε ταυτόχρονη ανοσοϊστοχημική παρουσία της XOR στα ηπατοκύτταρα και στα χοληφόρα, παρόμοια με αυτή των δειγμάτων ελέγχου. Οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι είναι δύσκολο να βεβαιωθεί αυξημένη παρουσία της XOR με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε ηπατοκύτταρα ηπατοπαθών αλλά η σημαντικά αυξημένη ενζυμική δραστηριότητά της είναι πολύ πιθανό να υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα του ενζύμου αυτού τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα χοληφόρα. Η αύξηση αυτή, σύμφωνα με τους συγγραφείς, σχετίζεται με την ικανότητα της XOR για την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) καθώς και με την δυνατότητα επαγωγής της από διάφορες κυτταροκίνες, γεγονός τα οποία την καθιστούν σημαντικό παράγοντα κατά τη διαδικασία της φλεγμονώδους απόκρισης [226]. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από την XO ενεργοποιεί τα κύτταρα Kupffer προς παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων για τα ουδετερόφιλα [342] και επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών [343], προάγει την συγκόλληση των λευκοκυττάρων [344], την παραγωγή κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα [345] και την συσσώρευση των λευκοκυττάρων στα ηπατικά τριχοειδή αγγεία, κατόπιν ηπατικής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης [346]. Ένα μειονέκτημα της τελευταίας αυτής μελέτης, όμως, είναι ότι διεξήχθη σε 17, μόνον, ασθενείς με 4 δείγματα ως ομάδα ελέγχου, ενώ η αμέσως προηγούμενη σε δείγματα 47 ασθενών με 12 δείγματα ως ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, οι συμμετέχοντες είχαν κίρρωση τελικού σταδίου και είναι πιθανόν το στάδιο της κίρρωσης να συσχετίζεται με την δραστηριότητα της XO.

Στην παρούσα μελέτη, όλες οι υποομάδες των ασθενών παρουσίασαν μεγαλύτερη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ από αυτή των υγιών χωρίς, όμως, όλες από αυτές τις διαφορές να έχουν στατιστική σημαντικότητα. Όταν έγινε διερεύνηση της δραστηριότητας της XO σε σχέση με την βαρύτητα της νόσου, δείχθηκε ότι τόσο οι κίρρωτικοί όσο και οι μη κίρρωτικοί, κάθε αιτιολογίας, είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα της XO από τους υγιείς. Όταν έγινε διερεύνηση της δραστηριότητας της XO σε σχέση με την αιτιολογία της νόσου, τότε δείχθηκε ότι μόνον οι ασθενείς ιογενούς αιτιολογίας είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα της XO, σε σχέση με τους υγιείς. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο στους κίρρωτικούς ιογενούς αιτιολογίας όσο και

στους μη κίρρωτικούς ιογενούς αιτιολογίας. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την επαγωγή της ΧΟ από την ηπατική νόσο με σημαντική, όμως, αύξηση μόνον στους ηπατοπαθείς ιογενούς αιτιολογίας, ανεξαρτήτως της βαρύτητας της νόσου. Η σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα της ΧΟ που διαπιστώθηκε στις προαναφερθείσες εργασίες των Bechtel *et al.* και Lelouet *et al.*, οι οποίες αφορούσαν την αλκοολική κίρρωση και την PBC αντίστοιχα, είναι πιθανόν να αναδείχθηκε εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των συμμετεχόντων στις μελέτες αυτές [61, 62]. Η ένδειξη, εξάλλου, για αυξημένη δραστηριότητα της ΧΟ κατά την ιϊκή μόλυνση, σε σχέση με την μη ιογενή νόσο, φαίνεται να ενισχύεται από το γεγονός ότι κατά την ιϊκή μόλυνση, πέραν της παραγωγής των κυτταροκινών, αυξάνεται ο μεταβολισμός των πουρινών λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA) με αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση μεταβολιτών όπως η ινοσίνη, η υποξανθίνη και η ξανθίνη οι οποίες είναι διαδοχικά προϊόντα της οδού του καταβολισμού της αδενοσίνης [341]. Οι δύο τελευταίοι μεταβολίτες αποτελούν υποστρώματα για την ΧΟ της οποίας η δραστηριότητα, όπως έχει δείχθει, αυξάνεται με την χορήγηση ξανθίνης σε αρουραίους 14 ημερών καθώς και με την χορήγηση ινοσίνης σε κοτόπουλα [340, 347]. Παράλληλα, δεν υπάρχει ένδειξη για επίδραση των κυτταροκινών στην μεταγραφή του γονιδίου και στην μετάφραση του mRNA της ADA της κυκλοφορίας [348].

2.3.8.4. NAT-2 και ηπατική νόσος

Σε προγενέστερη μελέτη, η δραστηριότητα της NAT-2 έχει διερευνηθεί σε υγιείς και ασθενείς με αλκοολική κίρρωση μέσω του μεταβολικού λόγου (AFMU+AAMU)/(AFMU+AAMU+1U+1X+17X+17U) στα ούρα ο οποίος απεικονίζει το ποσοστό της παραγωγής των ακετυλιωμένων ουρακινών σε σχέση με τα συνολικά προϊόντα της οδού της 17X, η οποία είναι η κυριότερη οδός μεταβολισμού της καφεΐνης, χωρίς να βρεθεί διαφορά δραστηριότητας μεταξύ υγιών και ασθενών. Στο σημείο αυτό, όμως, πρέπει να επισημανθεί ότι οι συγγραφείς δεν κάνουν διαχωρισμό μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών και έτσι δεν διαχωρίζουν την επίδραση της νόσου στις δύο αυτές διακριτές κατηγορίες του πληθυσμού [211]. Παρομοίως, οι ενδιάμεσες τιμές του έγκυρου λόγου AAMU/(AAMU+1U+1X) δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση σε μεμονωμένα δείγματα ούρων μετά την

χορήγηση καφεΐνης. Ούτε, όμως, και σε αυτή την μελέτη έγινε διαχωρισμός βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών [60]. Σε μεγαλύτερα, από τα προηγούμενα, δείγματα ασθενών με αλκοολική κίρρωση και PBC εξετάστηκαν οι τιμές του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1U+1X) σε ούρα 24ώρου μετά την χορήγηση καφεΐνης. Οι ασθενείς που ήταν αργοί ακετυλιωτές δεν παρουσίασαν διαφορά από τους αντίστοιχους υγιείς, ενώ οι ταχείς ακετυλιωτές, ταξινομημένοι ως Child B και C και Scheuer 3 και 4, δηλαδή οι ευρισκόμενοι στα σοβαρότερα στάδια της αλκοολικής κίρρωσης και της PBC αντίστοιχα, παρουσίασαν σημαντική μείωση της δραστηριότητας της NAT-2 σε σχέση με τους υγιείς. Στην αλκοολική κίρρωση παρατηρήθηκε απώλεια της συνήθους δικόρυφης κατανομής της δραστηριότητας της NAT-2 η οποία εμφανίζεται στους υγιείς, αλλά το ποσοστό των ασθενών βραδέων ακετυλιωτών δεν ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό των υγιών, όπως αυτό διαπιστώθηκε τόσο με το φαινοτυπικό σημείο καμπής της κατανομής που χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των υγιών, όσο και με την γονοτυπική κατάταξη των ασθενών. Στην PBC, παρομοίως με την αλκοολική κίρρωση, διαπιστώθηκε το αυτό ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών με τους υγιείς χωρίς, όμως, την απώλεια της τυπικής δικόρυφης κατανομής η οποία εμφανίστηκε στους αλκοολικούς ασθενείς [61, 62]. Από τις δύο παραπάνω μελέτες φαίνεται ότι η ταξινόμηση των ασθενών με βάση την τιμή διαχωρισμού των βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών που ισχύει για τους υγιείς δεν επηρέασε την ορθή κατάταξη των ασθενών, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την διαπίστωση των Levy *et al.*. Οι τελευταίοι, μετά από ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, διαπιστώνουν μια γενική απώλεια της τυπικής δικόρυφης κατανομής της NAT-2 στην χρόνια ηπατική νόσο, εξαιτίας της ειδικής μείωσης της δραστηριότητας της NAT-2 στους ασθενείς οι οποίοι είναι ταχείς ακετυλιωτές και καταλήγουν ότι στην ηπατοπάθεια δεν πρέπει να χρησιμοποιείται το αυτό σημείο διαχωρισμού με τους υγιείς αλλά ο διαχωρισμός μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών πρέπει να βασίζεται στην διερεύνηση του γονοτύπου της NAT-2. Στο συμπέρασμα αυτό φαίνεται να οδηγούνται από το γεγονός ότι η εξακρίβωση του φαινοτύπου στις διάφορες μελέτες έγινε με διάφορα φάρμακα-δείκτες, συμπεριλαμβανομένης και της καφεΐνης, η χρήση των οποίων έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με την επίδραση της ηπατικής νόσου στην δραστηριότητα της NAT-2 και στην συνεπακόλουθη κατάταξη των ασθενών [147].

Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1U+1X) εμφάνισαν σαφώς δικόρυφη κατανομή, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς, χωρίς

να υπάρξει ένδειξη για διαφορετικό σημείο διαχωρισμού μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών στις δύο αυτές ομάδες. Κατά συνέπεια, δεν φαίνεται να υπήρξε απώλεια της τυπικής δικόρυφης φαινοτυπικής κατανομής της δραστικότητας του ενζύμου κατά την ηπατική νόσο με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη και με δεδομένο τον μεγάλο αριθμό των συμμετεχόντων καθώς και το ευρύ φάσμα των ηπατοπαθειών που διερευνήθηκαν. Επιπλέον, τα ποσοστά των βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο αυτών ομάδων, γεγονός το οποίο είναι σε συμφωνία με τις δύο προαναφερθείσες μελέτες. Στη συνέχεια, όταν εξετάστηκε η επίδραση της βαρύτητας της νόσου στην δραστικότητα της NAT-2, δείχθηκε ότι αυτή έμεινε ανεπηρέαστη, τόσο στους κίρρωτικούς όσο και στους μη κίρρωτικούς βραδείς ακετυλιωτές, σε σχέση με τους υγιείς, ενώ αντίθετα, οι ταχείς ακετυλιωτές και των δύο αυτών υποομάδων εμφάνισαν σημαντική υποχώρηση στην δραστικότητα της NAT-2. Τα ίδια, με τα προηγούμενα, διαπιστώθηκαν όταν έγινε διερεύνηση της δραστικότητας της NAT-2 σε σχέση με την ιογενή ή μη αιτιολογία της νόσου με τους ταχείς ακετυλιωτές των δύο αυτών υποομάδων να παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου. Κατ' αυτόν τον τρόπο έγινε φανερό ότι η ηπατική νόσος, ανεξαρτήτως βαρύτητας και αιτιολογίας, δεν έχει επίπτωση στους βραδείς ακετυλιωτές ενώ, αντίθετα, αναστέλλει, σε σημαντικό βαθμό, την δραστικότητα της NAT-2 σε όσους είναι ταχείς ακετυλιωτές χωρίς να επηρεάζει την φαινοτυπική τους κατάταξη.

Όσον αφορά το αποτέλεσμα αυτό, είναι διαπιστωμένο ότι η καταλυτική δραστικότητα των N-ακετυλοτρανσφερασών εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση καθώς περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο την καταλυτική τριάδα αμινοξέων Cys-His-Asp. Το κατάλοιπο της ιστιδίνης μπορεί να οξειδωθεί, αντιστρεπτά, από το ενδοκυττάριο H_2O_2 προς κυστεϊνο-σουλφενικό οξύ (Cys-SOH) με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστικότητας του ενζύμου. Το H_2O_2 είναι μία από τις κυριότερες οξειδωτικές ουσίες στο κύτταρο και έχει διαπιστωθεί ότι σε περιοχές φλεγμονής τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα παράγουν H_2O_2 το οποίο φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση προκαλώντας την υπερέκφραση συγκολλητικών μορίων, ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση και τροποποιώντας την συσσώρευση των αιμοπεταλίων [349]. Κατόπιν των ανωτέρω, είναι πιθανόν ότι η φλεγμονή η οποία εκδηλώνεται κατά την ηπατική νόσο να προκαλεί την μείωση της δραστικότητας της NAT-2 η οποία είναι περισσότερο εμφανής στους ταχείς

ακετυλιωτές.

2.3.9. Η χρήση της καφεΐνης ως διαγνωστικού δείκτη-σύγκριση μεθόδων

Στην κλινική πράξη, η σοβαρότητα της ηπατικής νόσου μπορεί να εκτιμηθεί από τον συνδυασμό των πληροφοριών που προέρχονται από την κλινική εξέταση, από τις συμβατικές βιοχημικές δοκιμασίες, από απεικονιστικές δοκιμασίες όπως η υπερηχοτομογραφία και η αξονική και μαγνητική τομογραφία και από την βιοψία του ήπατος. Οι συνήθειες, όμως, εργαστηριακές μετρήσεις της ηπατικής λειτουργίας, οι οποίες περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της αλβουμίνης, των παραγόντων πήξης, των αμινοτρανσφερασών του ορού, της ολικής χολερυθρίνης, της αλκαλικής φωσφατάσης και της γ-γλουταμυλ-τρανσφεράσης, μεταβάλλονται σημαντικά μόνον σε προχωρημένα στάδια της ηπατικής νόσου. Αντίθετα, σε πρώιμα στάδια της ηπατικής δυσλειτουργίας, οι βιοχημικές παράμετροι χαρακτηρίζονται από έλλειψη εξειδίκευσης και ευαισθησίας καθώς οι τιμές τους μπορεί να βρίσκονται εντός του φυσιολογικού εύρους παρόλο που έχουν ήδη επισυμβεί διάφορες ιστολογικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, η πρώιμη κίρρωση χαρακτηρίζεται από μία φάση αντιρρόπησης (Child A) κατά την οποία τα κλινικά ευρήματα και οι βιοχημικές παράμετροι είναι σχετικά σταθερές παρόλη την πρόοδο της ηπατικής νόσου. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική επιδείνωση του λειτουργικού ηπατικού αποθέματος (reserve) και βρίσκονται σε κίνδυνο μη αντιρρόπησης [158, 160, 161].

Στην κατεύθυνση αυτή, οι ποσοτικές λειτουργικές δοκιμασίες, οι οποίες εκμεταλλεύονται την ικανότητα του ήπατος για την κάθαρση διαφόρων ουσιών, μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικές πληροφορίες σε σχέση με την λειτουργική ηπατική μάζα, αλλά είναι αρκετά επίπονες στην εκτέλεσή τους και περισσότερο δαπανηρές από τις συνήθειες εξετάσεις. Στην προσπάθεια ανάπτυξης τέτοιων δοκιμασιών κάθαρσης έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, διάφορες ουσίες όπως η γαλακτόζη, το πράσινο της ινδοκυανίνης, η σορβιτόλη, τα χολικά οξέα, η αντιπυρίνη, η αμινοπυρίνη, η μεθακετίνη, η λιδοκαΐνη και η καφεΐνη. Οι περισσότερες, όμως, από τις δοκιμασίες αυτές έχουν συναντήσει πρακτικές δυσκολίες στην εφαρμογή τους επειδή απαιτούν επαναλαμβανόμενες αιμοληψίες, εμπεριέχουν τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων αντιδράσεων και έχουν αυξημένο κόστος. Για τους λόγους αυτούς η κλινικοεργαστηριακή ταξινόμηση της σοβαρότητας της ηπατικής νόσου σύμφωνα με την

κλίμακα κατά Child-Pugh, η οποία συνεκτιμά παράγοντες όπως την χολερυθρίνη και την αλβουμίνη του ορού, τον χρόνο προθρομβίνης, την ύπαρξη ή την απουσία ασκίτη και ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, παραμένει η περισσότερο χρησιμοποιούμενη πρακτική παρόλη την υποκειμενικότητα στην εκτίμηση του βαθμού του ασκίτη και της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας καθώς και την αλλοίωσή της από τυχόν θεραπευτική αγωγή χορήγησης αλβουμίνης.

Παρόλο που η ιστολογική εξέταση δειγμάτων βιοψίας αποτελεί την πρότυπη μέθοδο αναφοράς για την εκτίμηση του βαθμού της ίνωσης και της κίρρωσης, η βιοψία είναι επεμβατική και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον, η βιοψία του ήπατος μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μέχρι του ποσοστού του 32% των περιπτώσεων, σε σχέση με την λαπαροσκοπική διάγνωση της κίρρωσης, όπως αυτό διαπιστώθηκε σε μία αναδρομική μελέτη κατά την οποία ανασκοπήθηκαν 434 περιπτώσεις συνδυασμένων λαπαροσκοπικών και ιστολογικών αναφορών μεταξύ των ετών 1992 και 1994 [350]. Ως εκ τούτου, οι μη επεμβατικές μέθοδοι θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στην διάγνωση και την σταδιοποίηση της ηπατικής νόσου. Η καφεΐνη, ως αβλαβής και ελάχιστα δαπανηρή, έχει αποτελέσει την ουσία-κλειδί για την ανάπτυξη τέτοιων μη επεμβατικών μεθόδων και οι μεταβολικοί της λόγοι στα ούρα συνιστούν μία απλή, αβλαβή και καλώς ανεκτή διαδικασία η οποία μπορεί να διεκπεραιωθεί με την ευρέως διαδεδομένη τεχνική της HPLC.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να καθοριστεί ένα εύρος αναφοράς για τις τιμές του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ με σκοπό να εκτιμηθεί η εξειδίκευση και η ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου. Ο ανωτέρω λόγος επιλέχτηκε επειδή εκφράζει την δραστικότητα του ενζύμου CYP1A2 το οποίο εντοπίζεται αποκλειστικά στο ήπαρ. Σε μία προγενέστερη μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε ο ισοδύναμος λόγος $(AAMU+1U+1X)/17U$ σε μεμονωμένα δείγματα ούρων, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, παρόλο που οι μέση τιμή του λόγου αυτού στους κίρρωτικούς και τους υγιείς ήταν σε θέση να διακρίνει τις δύο αυτές κατηγορίες των ασθενών, δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για ένα μεμονωμένο άτομο καθώς υπήρξε μεγάλου βαθμού αλληλοεπικάλυψη στις επιμέρους τιμές των υγιών και των ασθενών [60]. Παρομοίως, ο Bechtel *et al.* προσδιορίζοντας τον μεταβολικό λόγο $(AFMU+1U+1X)/17U$ σε ούρα 24ώρου 70 υγιών και 226 ηπατοπαθών,

παρατήρησαν μεγάλο βαθμού διακύμανση των τιμών του μεταξύ των συμμετεχόντων στην μελέτη και κατέληξαν στην διαπίστωση ότι η δοκιμασία της καφεΐνης δεν προσκόμισε επιπλέον διαγνωστικές πληροφορίες σε σχέση με τις συνήθεις εργαστηριακές δοκιμασίες [61]. Τα συμπεράσματα των ανωτέρω εργασιών, όμως, μπορεί να οφείλονται στον μικρό αριθμό των συμμετεχόντων στην πρώτη από αυτές, αφενός, και στην έλλειψη διαχωρισμού των καπνιστών από τους μη καπνιστές και στις δύο, αφετέρου.

Στην παρούσα εργασία, ο δείκτης της δραστηριότητας του CYP1A2 προσδιορίστηκε σε 125 υγιείς και 342 ηπατοπαθείς, με πλειάδα ηπατικών δυσλειτουργιών, οι οποίοι είχαν καταταχθεί με αυστηρά κριτήρια και οι συγκρίσεις μεταξύ τους έγιναν σε σχέση με το κάπνισμα προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση που επιφέρει στις τιμές του μεταβολικού λόγου η επαγωγική δράση του καπνίσματος στο συγκεκριμένο ένζυμο.

Με βάση, λοιπόν, τον διαχωρισμό μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών καθορίστηκαν δύο οριακές τιμές διαχωρισμού για την ανίχνευση της ηπατικής νόσου, μία για κάθε κατηγορία εθελοντών. Αυτές οι τιμές προσδιορίστηκαν ως οι μέσες τιμές του φυσικού λογαρίθμου του μεταβολικού λόγου, στους υγιείς, μετά την αφαίρεση της τυπικής απόκλισης του αντίστοιχου πληθυσμού ($\ln(MA-TA)$) [195, 351]. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει κανονική κατανομή των δεδομένων και για τον σκοπό αυτό έγινε λογαριθμική μετατροπή των αποτελεσμάτων. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν λαμβάνει υπόψη την ευαισθησία της δοκιμασίας καθώς η οριακή τιμή καθορίζεται με βάση το δείγμα ελέγχου. Η ανάλυση της καμπύλης ROC προσδιορίζει την διαγνωστική απόδοση του συστήματος με βάση την ευαισθησία και την ειδικότητα, για κάθε δυνατή οριακή τιμή της δοκιμασίας, και η γραφική παράσταση προκύπτει από την συσχέτιση του ποσοστού των αληθώς θετικών και των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (ευαισθησία προς 1-εξειδίκευση) ενώ μερικοί συγγραφείς συσχετίζουν γραφικά την ευαισθησία προς την εξειδίκευση, χωρίς αυτό να έχει επίπτωση στο εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC [352].

Σύμφωνα με την ανάλυση ROC, όσον αφορά τους μη καπνιστές, η διακριτική ισχύς της δοκιμασίας για την διάγνωση της μη αντιρροπούμενης, της αντιρροπούμενης και της κίρρωσης συνολικά ήταν ικανοποιητική με τιμές 0,924, 0,833 και 0,846, αντίστοιχα. Εμβαδόν της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη ROC μεγαλύτερο του 0,800 είναι ενδεικτικό δοκιμασίας με ικανοποιητικό βαθμό διάκρισης μεταξύ της κατάστασης

υγείας και της ύπαρξης νόσου, ενώ εμβαδόν μεταξύ 0,900 και 1,000 είναι χαρακτηριστικό εξαιρετικής απόδοσης [353]. Η διαγνωστική ισχύς ήταν μέτρια, όσον αφορά την ενεργό νόσο και το σύνολο των ασθενών και πτωχή για το σύνολο των μη κίρρωτικών ασθενών με τιμές 0,766, 0,736 και 0,679, αντίστοιχα, προφανώς λόγω του σημαντικού βαθμού αλληλεπικάλυψης των τιμών του μεταβολικού λόγου μεταξύ των μη κίρρωτικών ασθενών και των υγιών εθελοντών.

Η επαγωγική επίδραση του καπνίσματος στην δραστικότητα του CYP1A2 ελάττωσε την διακριτική ισχύ της δοκιμασίας μεταξύ των καπνιστών με αποτέλεσμα χαμηλές τιμές του εμβαδού κάτω από την καμπύλη ROC, εξαιρουμένης της μη αντιρροπούμενης κίρρωσης για την οποία η απόδοση της δοκιμασίας ήταν ικανοποιητική με τιμή εμβαδού 0,802. Παρόλα αυτά, η ανάλυση ROC παρουσίασε στατιστικώς σημαντικό εμβαδόν για τις καταστάσεις της κίρρωσης, ως σύνολο αντιρροπούμενης και μη αντιρροπούμενης, και την κατάσταση της ενεργού νόσου.

Στην συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ της ευαισθησίας του μεταβολικού λόγου και των συμβατικών δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας με βάση δύο οριακές τιμές, τόσο για τους μη καπνιστές όσο και για τους καπνιστές, με ταυτόχρονη αξιολόγηση της εξειδίκευσης. Η πρώτη οριακή τιμή καθορίστηκε με βάση τον τύπο «LnMA-1 TA» και παρουσίασε εξειδίκευση 85,4% και 86,0% για τις δύο αυτές κατηγορίες των εθελοντών. Η δεύτερη οριακή τιμή επιλέχθηκε με βάση την ανάλυση ROC και με την προϋπόθεση να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την προηγούμενη τιμή, εις βάρος όμως της εξειδίκευσης. Πράγματι το κόστος της αυξημένης ευαισθησίας ήταν η πτώση της εξειδίκευσης στο 70,7-72,0% και 72,1% για τους μη καπνιστές και καπνιστές, αντίστοιχα. Η επιλογή μιας οριακής τιμής με αυξημένη ευαισθησία έχει ως συνέπεια πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα, αλλά, με δεδομένο το χαμηλό κόστος και το ανώδυνο της δοκιμασίας της καφεΐνης, το όφελος από την ορθή ανίχνευση περισσότερων ασθενών αποκτά μεγαλύτερη σημασία.

Σύμφωνα με τις καθορισθείσες τιμές διαχωρισμού μεταξύ της κατάστασης υγείας και ασθενείας, η μέθοδος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, όσον αφορά τους μη καπνιστές, ήταν περισσότερο ευαίσθητη στην ανίχνευση της νόσου από κάθε μία ξεχωριστά από τις τιμές του INR, της αλβουμίνης του ορού, ή της ολικής χολερυθρίνης για τις περιπτώσεις της μη αντιρροπούμενης κίρρωσης, της αντιρροπούμενης κίρρωσης, της κίρρωσης ως σύνολο, της μη κίρρωτικής ηπατικής νόσου, της ενεργού ηπατικής

νόσου και της ηπατικής νόσου ως σύνολο. Η μέθοδος του μεταβολικού λόγου παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία ακόμη και στην περίπτωση εκείνη κατά την οποία οι τρεις αυτοί δείκτες της ηπατικής λειτουργίας ελήφθησαν σε συνδυασμό, δηλαδή εάν η τιμή ενός τουλάχιστον από αυτούς ήταν δηλωτική της νόσου σε κάθε έναν από τους εθελοντές. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι οι τιμές του INR και της αλβουμίνης του ορού, πρωτίστως, και οι τιμές της ολικής χολερυθρίνης του ορού, δευτερευόντως, θεωρούνται ως περισσότερο ευαίσθητοι δείκτες της ηπατικής λειτουργίας από τις τιμές ενζύμων όπως η αμινοτρανφεράση της αλανίνης, η αμινοτρανφεράση του ασπαραγινικού, η αλκαλική φωσφατάση και η γ -GT καθώς οι παράγοντες πήξης του αίματος και η αλβουμίνη είναι αποκλειστικά προϊόντα των ηπατοκυττάρων ενώ η χολερυθρίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ και εκκρίνεται από τα χοληφόρα τριχοειδή [157]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της συσχέτισης μεταξύ των συνήθων βιοχημικών εξετάσεων και του φυσικού λογαρίθμου των τιμών του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ στους ασθενείς, όπου παρατηρήθηκε μικρού βαθμού, πλὴν όμως στατιστικῶς σημαντική, αρνητική συσχέτιση με τις τιμές του INR και θετική συσχέτιση με τις τιμές της αλβουμίνης και της χολερυθρίνης ενώ δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση με τις τιμές των ενζύμων οι οποίες αντανάκλουν την καταστροφή των ηπατοκυττάρων και την χολόσταση. Παρατηρήθηκε, επίσης, μικρού βαθμού σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1U+1X)/17U$ των ασθενών με τον αριθμό των αιμοπεταλίων, στους κίρρωτικούς, καθώς και με τον αριθμό των λευκοκυττάρων και με την τιμή της αιμοσφαιρίνης, τόσο στους κίρρωτικούς όσο και στους μη κίρρωτικούς. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την διαπίστωση ότι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της πυλαίας υπέρτασης που αναπτύσσεται κατά την μὴ αντιρροπούμενη κίρρωση είναι η σπληνομεγαλία η οποία έχει ως επακόλουθο την συσσώρευση και καταστροφή των αιμοπεταλίων στον σπλήνα. Έχει, επίσης, γενικότερα παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων, ανάλογα με την σοβαρότητα της κίρρωσης, ενώ, πέραν του υπερσπληνισμού, έχουν ανιχνευθεί και αντισώματα κατά γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων σε κίρρωτικούς ασθενείς τα οποία ενοχοποιούνται για την θρομβοπενία της κίρρωσης. Ένα άλλο αποτέλεσμα του υπερσπληνισμού είναι, επίσης, και η μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων, ενώ κατά την πρόοδο της αντιρροπούμενης κίρρωσης παρατηρείται και μακροκυτταρική αναιμία, κυρίως στην κίρρωση αλκοολικής αιτιολογίας, λόγω της κατασταλτικής δράσης της αιθανόλης στην ερυθροποίηση και στην

ανεπάρκεια φυλλικού οξέος [156, 354].

Από τα ανωτέρω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μέθοδος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, ενώ συσχετίζεται σημαντικά με αρκετούς δείκτες που αντανακλούν την έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας κατά την πρόοδο της ηπατικής νόσου, απεικονίζει μία διαφορετική οντότητα του ήπατος και είναι περισσότερο ευαίσθητος δείκτης της μεταβολικής ικανότητας του οργάνου, τις μεταβολές της οποίας μπορεί να αποδώσει ποσοτικά πριν από την έκπτωση της βιοσυνθετικής λειτουργίας, πριν την εμφάνιση αιματολογικών διαταραχών και πριν από την καταστροφή των ηπατοκυττάρων.

Η ευαισθησία του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, αν και ήταν χαμηλότερη στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές, ήταν υψηλότερη, μεταξύ των καπνιστών, για όλες τις ομάδες των ασθενών, εξαιρουμένης της αντιρροπούμενης κίρρωσης και της κίρρωσης ως σύνολο. Στην πρώτη περίπτωση η τιμή της ολικής χολερυθρίνης του ορού και ο συνδυασμός των τριών συμβατικών δεικτών ήταν περισσότερο ευαίσθητες δοκιμασίες στην ανίχνευση της νόσου από την μέθοδο του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης. Στην δεύτερη περίπτωση, ο συνδυασμός των τριών συμβατικών δεικτών ήταν περισσότερο ευαίσθητος από την τιμή «LnΜΛ-1 ΤΑ», αλλά η οριακή τιμή αυξημένης ευαισθησίας που προέκυψε από την ανάλυση ROC είχε μεγαλύτερη ευαισθησία ακόμη και από τον συνδυασμό των τριών συμβατικών δεικτών.

Παρόλο που, όπως φαίνεται στον Πίνακα 19, η αυξημένη ευαισθησία του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, σε σχέση με τις άλλες δοκιμασίες, δεν είχε στατιστική σημαντικότητα σε όλες τις ομάδες των ασθενών, η έλλειψη αυτή οφείλεται, πιθανότατα, στον μικρό αριθμό των ανηκόντων στις αντίστοιχες ομάδες, καθώς η ισχύς των στατιστικών δοκιμασιών κυμάνθηκε από 0,074 έως 0,410. Τα μεγέθη αυτά είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με την ελάχιστη επιθυμητή στατιστική ισχύ του 0,800 και υποδηλώνουν την ύπαρξη μεγάλης πιθανότητας για την διάπραξη σφάλματος τύπου II, δηλαδή την αγνόηση μιας διαφοράς ενώ αυτή, στην πραγματικότητα, υφίσταται.

Σε κάθε περίπτωση, ο δείκτης της μεταβολικής λειτουργίας του CYP1A2, συνδυαζόμενος με τους δείκτες INR, της αλβουμίνης του ορού και της ολικής χολερυθρίνης του ορού, βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό την ευαισθησία στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου, τόσο στους μη καπνιστές όσο και στους καπνιστές. Είναι, πάντως, αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι το κάπνισμα, εκτός από την επαγωγή του CYP1A2, φαίνεται να αυξάνει την συγκέντρωση διαφόρων παραγόντων της πήξης στο πλάσμα των

καπνιστών, σε σχέση με τους μη καπνιστές. Συγκεκριμένα, σε μία εκτεταμένη μελέτη (2964 συμμετέχοντες) διαπιστώθηκε ότι οι παράγοντες VIIa, VIIc, το αντιγόνο του παράγοντα VII, το πεπτίδιο ενεργοποίησης του IX, το πεπτίδιο ενεργοποίησης του X και το ινωδογόνο ήταν σημαντικά αυξημένα στους υγιείς καπνιστές [355]. Η διαπίστωση αυτή καθιστά το κάπνισμα έναν παράγοντα που μειώνει την ευαισθησία στην ανίχνευση της ηπατικής νόσου όχι μόνον του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης αλλά, πιθανώς, και την ευαισθησία του δείκτη INR στους ασθενείς που είναι καπνιστές.

Παρόλη την, στατιστικώς σημαντική, διαφορά μεταξύ των ενδιάμεσων τιμών του μεταβολικού λόγου η οποία παρατηρήθηκε μεταξύ των πασχόντων από χρόνια, μη κίρρωτική, νόσο και από αντιρροπούμενη κίρρωση αφενός, καθώς και των πασχόντων από μη αντιρροπούμενη και αντιρροπούμενη κίρρωση, αφετέρου, στην κατηγορία των μη καπνιστών, η ύπαρξη ενός αξιοσημείωτου βαθμού αλληλεπικάλυψης των επιμέρους τιμών απέτρεψε τον καθορισμό ενός σημείου διαχωρισμού το οποίο θα είχε ικανοποιητική εξειδίκευση και ευαισθησία στον διαχωρισμό των ομάδων των πασχόντων αυτών.

Η καφεΐνη απέτελεσε το φάρμακο-δείκτη και σε μία πρώιμη μελέτη η οποία διερεύνησε την καταλληλότητα της ολονύκτιας κάθαρσης του φαρμάκου από την σίελο ως μιας δυναμικής δοκιμασίας της ηπατικής λειτουργίας. Σύμφωνα με την διαδικασία αυτή, η ευαισθησία προσδιορίστηκε, για πρώτη φορά, με τον καθορισμό ενός σημείου διαχωρισμού το οποίο προέκυψε ως η διαφορά της μέσης τιμής της κάθαρσης και μιας τυπικής απόκλισης των τιμών του πειραματικού πληθυσμού [195]. Στην ανωτέρω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ένας αυτοματοποιημένος ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός της καφεΐνης στη σίελο, η τιμή διαχωρισμού που υπολογίστηκε ήταν 1,07 ml/min/kg και η ευαισθησία της στην ανίχνευση της ενεργού ηπατικής νόσου ήταν 79%. Στη μελέτη αυτή, όμως, συμμετείχαν 56 ασθενείς με ενεργό νόσο (29 κίρρωτικοί και 27 μη κίρρωτικοί), μόνον, και 26 υγιείς ως ομάδα ελέγχου χωρίς να υπάρξει ταξινόμηση αυτών σε σχέση με το κάπνισμα. Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ανοσοπροσδιορισμός της καφεΐνης σε δείγματα ορού 41 ηπατοπαθών (28 κίρρωτικών και 13 μη κίρρωτικών) και 14 υγιών και η τιμή διαχωρισμού μεταξύ της υγείας και της ασθένειας καθορίστηκε στα 0,86 ml/min/kg, όπως υπολογίστηκε με την ανωτέρω μαθηματική έκφραση. Σύμφωνα με την τιμή αυτή, η ευαισθησία της κάθαρσης της καφεΐνης από τον ορό ήταν 89% αλλά και στην περίπτωση αυτή δεν υπήρξε διαχωρισμός μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών [351]. Στην παρούσα εργασία, όταν η τιμή διαχωρισμού μεταξύ της κατάστασης υγείας

και ασθενείας προσδιορίστηκε με την αυτή, όπως προηγουμένως, μαθηματική έκφραση έδωσε ως αποτέλεσμα μία ευαισθησία της τάξης του 62,6% στην ανίχνευση της ενεργού ηπατικής νόσου, στην υποομάδα των μη καπνιστών, και μόνον 31,5% στην υποομάδα των καπνιστών. Παρόλο που τα μεγέθη αυτά φανερώνουν μικρότερη ευαισθησία της μεθόδου του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στα ούρα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα παρακάτω:

α) η σύγκριση των τιμών του μεταβολικού λόγου στους υγιείς και τους ασθενείς έγινε ανάλογα με την παρουσία ή μη του καπνίσματος έτσι ώστε η δραστηριότητα του CYP1A2 να μην επηρεαστεί από την επαγωγική επίδραση του παράγοντα αυτού

β) όσον αφορά στους μη καπνιστές, το δείγμα των πασχόντων με ενεργό νόσο απετελείτο από 80 κίρρωτικούς και 118 μη κίρρωτικούς ασθενείς, γεγονός που το καθιστά περισσότερο αντιπροσωπευτικό από τα προηγούμενα δείγματα

γ) σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες μελέτες, ο αριθμός των κίρρωτικών στην παρούσα εργασία ήταν μικρότερος από αυτόν των μη κίρρωτικών, με τους τελευταίους να βρίσκονται σε λιγότερο ανεπτυγμένο στάδιο της νόσου και ως εκ τούτου να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης οι οποίες, όπως είναι αναμενόμενο, μειώνουν την συνολική ευαισθησία της μεθόδου για την κατηγορία των ασθενών με ενεργό νόσο

δ) η ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού της καφεΐνης στον σίελο απαιτεί δύο μετρήσεις, κατά την κατάκλιση και κατά την πρωϊνή έγερση, σε αντίθεση με την μέθοδο του μεταβολικού λόγου στα ούρα, όπου απαιτείται μία, μόνον, μέτρηση

ε) η ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού της καφεΐνης στο αίμα απαιτεί δύο δειγματοληψίες, καθιστώντας την διαδικασία αυτή αρκετά επεμβατική, σε αντίθεση με την μέθοδο του μεταβολικού λόγου στα ούρα η οποία είναι εντελώς μη επεμβατική

Η κάθαρση της καφεΐνης από την σίελο προσδιορίστηκε, επίσης, μέσω της μέτρησης του κλάσματος της μοριακής συγκέντρωσης της παραξανθίνης (17X) προς την συγκέντρωση της καφεΐνης (137X).σε μία μεγάλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 786 υγιείς εθελοντές. Οι συγγραφείς, σε αντίθεση με την απόλυτη τιμή διαχωρισμού, πρότειναν ως εύρος αναφοράς της κάθαρσης το 95% διάστημα εμπιστοσύνης των επιμέρους τιμών των εθελοντών το οποίο προκύπτει ως αποτέλεσμα μίας εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης στην οποία υπεισέρχονται ως συντελεστές διάφοροι παράγοντες, οι περισσότεροι σημαντικοί εκ των οποίων είναι το κάπνισμα, το φύλο, η πρόσληψη καφεΐνης και η χρήση των από τού στόματος αντισυλληπτικών. Οι συγγραφείς

παρατήρησαν ότι εξειδίκευση της μεθόδου, με βάση αυτό το εύρος αναφοράς, ήταν 96,6%, ενώ η τιμή διαχωρισμού των 0,86 ml/min/kg η οποία προτάθηκε ανωτέρω παρουσίασε μία εξειδίκευση της τάξεως του 83%, όταν εφαρμόστηκε στον ίδιο πληθυσμό [45]. Από τις μεθόδους αυτές, με βάση τον σίελο, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι απόλυτες τιμές διαχωρισμού μεταξύ υγείας και ασθενείας, όπως υπολογίστηκαν σε δείγματα πληθυσμών με αδρή ταξινόμηση των συμμετεχόντων, παρουσίασαν μία σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των μελετών ενώ μία λεπτομερής φαινοτυπική ανάλυση ενός υγιούς πληθυσμού δεν συνοδεύτηκε από κλινικές μελέτες οι οποίες θα επικύρωναν το προτεινόμενο εύρος αναφοράς.

Η ανωτέρω αναφερθείσα μέθοδος ανοσοπροσδιορισμού της καφεΐνης στην σίελο χρησιμοποιήθηκε σε μία πιό πρόσφατη μελέτη κατά την οποία μετρήθηκε η συγκέντρωση της καφεΐνης σε ένα μόνον δείγμα, 12 ώρες μετά την κατανάλωσή της. Το δείγμα του πληθυσμού αποτελείται από 36 υγιείς εθελοντές και 95 ηπατοπαθείς με αντιρροπούμενη κίρρωση, HCV και πιθανολογούμενης NASH αιτιολογίας, εκ των οποίων κανείς δεν ήταν καπνιστής. Η ευαισθησία της διαδικασίας προσδιορίστηκε με την ανάλυση της καμπύλης ROC και ανήλθε στο 84,2% ενώ η εξειδίκευση ήταν 97,2% [196]. Παρόλο που στην μελέτη αποφεύχθηκε η σύγχυση που θα προκαλούσε η συμμετοχή καπνιζόντων, η ομάδα ελέγχου ήταν αρκετά περορισμένη ενώ η ομάδα των ασθενών περιελάμβανε 2 μόνον κατηγορίες ασθενών. Στην παρούσα μελέτη, η ευαισθησία στην ανίχνευση της αντιρροπούμενης κίρρωσης στους μη καπνιστές ήταν 75,0-77,9% ενόσω η κατηγορία αυτή αποτελείται από 38 ασθενείς HBV αιτιολογίας, 13 ασθενείς HCV αιτιολογίας, 9 ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, 6 ασθενείς με αλκοολική νόσο του ήπατος και 2 ασθενείς με PBC. Είναι πιθανόν ότι η αιτιολογία της νόσου έχει διαφορική επίδραση στην σοβαρότητα της ηπατικής δυσλειτουργίας και, κατά συνέπεια, στην συνολική ευαισθησία της λειτουργικής δοκιμασίας.

Οι διάφορες από τις ανωτέρω μεθοδολογίες, εξάλλου, αντιμετωπίζουν μερικά τεχνικά προβλήματα τα οποία ενδέχεται να επηρεάζουν την απόδοση των δοκιμασιών που χρησιμοποιούν την καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτη. Αναφέρεται, ειδικότερα, ότι η τεχνική του ανοσοπροσδιορισμού της καφεΐνης στο πλάσμα των υγιών εθελοντών παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την παραξανθίνη σε έκταση της τάξης του 28% [195]. Στον βαθμό που η συγκέντρωση της παραξανθίνης στο πλάσμα διαφοροποιείται ανάλογα με το στάδιο της ηπατικής νόσου [159], ο ανοσοπροσδιορισμός

της καφεΐνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαφόρου βαθμού σφάλμα στην εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2. Επιπλέον, αναφέρεται ότι ο προσδιορισμός της καφεΐνης και της παραξανθίνης στον σίελο με την τεχνική της HPLC παρουσιάζει χαμηλή επαναληψιμότητα, ειδικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, εξαιτίας των διαφορετικών τεχνικών χαρακτηριστικών των στηλών της HPLC καθώς και εξαιτίας προβλημάτων που προέρχονται από την αστάθεια στην ρευστότητα των διαφορετικών δειγμάτων σιέλου. Παρόλο που η εις διπλούν ανάλυση των δειγμάτων βελτιώνει την επαναληψιμότητα, η διακύμανση της διαδικασίας είναι της τάξης του 10% με συνεπακόλουθη επιμήκυνση του χρόνου της ανάλυσης [45]. Η τεχνική της HPLC η οποία εφαρμόστηκε στην ανάλυση των ούρων στην παρούσα εργασία παρουσίασε μεταξύ σειρών (inter-day) διακύμανση της τάξης του 6,0% χωρίς να υπάρχει ανάγκη για ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν. Αντίθετα με ότι συμβαίνει με την σίελο, όμως, τα δείγματα των ούρων είναι απαραίτητο να υποστούν προκατεργασία η οποία μπορεί να διαρκέσει έως και 20'. Τυχόν χαμηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα δεν δημιουργούν μείζον πρόβλημα καθώς το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου είναι αρκούντως χαμηλό, της τάξης του 5 μM για τους υπ' όψιν μεταβολίτες. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση μερικών δειγμάτων ασθενών (17/342, 5%) απαιτήθηκε μία δευτερεύουσα προσυγκέντρωση καθώς η αρχικά προσδιορισθείσα συγκέντρωση ενός ή περισσότερων μεταβολιτών της καφεΐνης ήταν κάτω από αυτό το όριο.

Ένα άλλο μειονέκτημα των μεθοδολογιών που εφαρμόζονται με βάση τον σίελο είναι η σημαντική διακύμανση που υπάρχει στην κατανομή της καφεΐνης μέσα στο βιολογικό αυτό υγρό. Η καφεΐνη στο αίμα είναι, εν μέρει, συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες πλάσματος, γεγονός που περιορίζει την διάχυσή της στον σίελο. Ως εκ τούτου η διάχυση αυτή μπορεί να επηρεαστεί από την λειτουργία των παρωτίδων ή από μεταβολές στην σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Στην σοβαρή ηπατική νόσο και την επακολουθούσα υποαλβουναϊμία, κατά συνέπεια, υπάρχει το ενδεχόμενο για μεγαλύτερη διάχυση της καφεΐνης μέσα στον σίελο απ' ότι σε περισσότερο πρώιμα στάδια της ηπατικής νόσου. Η μεταβολή αυτή μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια των μεθόδων που χρησιμοποιούν τον σίελο στην εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 activity [221]. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα δεν επηρεάζεται από νεφρικούς παράγοντες καθώς η τιμή του προκύπτει από τις συγκεντρώσεις των τελικών, πολικών, μεταβολιτών της καφεΐνης οι οποίοι απεκκρίνονται

χωρίς να υφίστανται σωληναριακή επαναρρόφηση [56, 203].

Άλλες, ποσοτικές, μη επεμβατικές δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργίας περιλαμβάνουν τις δοκιμασίες αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{13}C και ^{14}C -καφεΐνης [173, 190, 192, 193], τις δοκιμασίες αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{13}C και ^{14}C -αμινοπυρίνης [163, 169, 170] και την δοκιμασία αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{13}C -μεθακετίνης [356] κατά τις οποίες προσδιορίζεται το εκπνεόμενο ραδιοεπισημασμένο CO_2 μετά από την από του στόματος χορήγηση των προαναφερθέντων ουσιών. Οι δοκιμασίες αυτές μπορούν, με επιτυχία, να κάνουν διάκριση μεταξύ υγιών ατόμων και ηπατοπαθών με διάφορου βαθμού βλάβη του ήπατος. Επιπλέον, η δοκιμασία αναπνοής της ραδιοεπισημασμένης με ^{13}C -μεθακετίνης, με δύο μόνο μετρήσεις σε ένα διάστημα 15', είχε την δυνατότητα να επισημάνει την παρουσία της κίρρωσης με ευαισθησία και εξειδίκευση 92,6% και 94,1% αντίστοιχα [357]. Στην τελευταία αυτή μελέτη, όμως, δεν υπήρχαν πληροφορίες για τις καπνιστικές συνήθειες των συμμετεχόντων παρόλο που η μεθακετίνη είναι υπόστρωμα για το CYP1A2 [27] και, κατά συνέπεια, ο μεταβολισμός της επηρεάζεται από την επαγωγή του ενζύμου αυτού, στην περίπτωση κατά την οποία ο συμμετέχων στην δοκιμασία είναι καπνιστής. Ο μεταβολισμός της μεθακετίνης, εξάλλου, σε αντίθεση με την καφεΐνη, εξαρτάται από την αιματική ροή καθώς η ουσία αυτή εμφανίζει υψηλή ηπατική εξαγωγή. Είναι πιθανόν, ο παράγων αυτός να επηρεάζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αναπνοής της μεθακετίνης καθώς δεν είναι αποσαφηνισμένο σε ποιό βαθμό οι μεταβολές της ηπατικής αιματικής ροής σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις μπορούν να συσχετιστούν με την δραστηριότητα του CYP1A2. Παρόλα τα πιθανά πλεονεκτήματά τους, όμως, οι δοκιμασίες αναπνοής έχουν περιορισμένη αποδοχή στην κλινική πράξη επειδή για την εφαρμογή τους απαιτούνται δαπανηρές ραδιοεπισημασμένες ουσίες σε συνδυασμό με ακριβό και εξεζητημένο εξοπλισμό ενώ οι εξεταζόμενοι οφείλουν να παραμένουν σε ήσυχη και χαμηλής δραστηριότητας κατάσταση κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

2.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η αναπτυχθείσα, κατά την παρούσα εργασία, μέθοδος RP-HPLC για την ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα αποτελεί ένα εύχρηστο και αξιόπιστο εργαλείο για την *in vivo* εκτίμηση της δραστηριότητας των μεταβολικών ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 και XO σε υγιείς και ηπατοπαθείς. Τα δύο πρώτα από τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στην μεταβολική ενεργοποίηση περιβαλλοντικών καρκινογόνων και ο προσδιορισμός της δραστηριότητάς τους, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό του φαινότυπου της N-ακετυλίωσης, μπορεί να συνεισφέρει αποτελεσματικά σε επιδημιολογικές μελέτες προδιάθεσης και πρόληψης του καρκίνου. Επιπλέον, η δοκιμασία της καφεΐνης, με μία μόνον δειγματοληψία ούρων, αποτελεί μία μη επεμβατική, ανώδυνη, απλοή και αξιόπιστη διαδικασία για τον έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας. Η μέτρηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τον έγκυρο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U παρουσιάζει ικανοποιητική εξειδίκευση και μεγαλύτερη ευαισθησία από τις συμβατικές λειτουργικές δοκιμασίες του ήπατος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, παράλληλα με αυτές, για την επιτυχέστερη διάγνωση και την πλησιέστερη παρακολούθηση της εξέλιξης της χρόνιας ηπατικής νόσου. Με βάση τον δείκτη αυτόν της ηπατικής λειτουργίας μπορεί να γίνεται προσαρμογή της δοσολογίας των φαρμάκων εκείνων των οποίων η αποβολή εξαρτάται, κυρίως, από τον οξειδωτικό μεταβολισμό με σκοπό την αποφυγή της εμφάνισης ανεπιθύμητων αντιδράσεων στους ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο.

2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Stryer L.** Βιοχημεία. 2η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997: 617, 673-674.
2. **Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR.** Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 1998, 28:1129-1165.
3. **Omura T, Sato R.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964, 239:2370-2378.
4. **Nerbert DW, Russell DW.** Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* 2002, 360:1155-1162.
5. **Μισιρλή Ε.** Τοξικολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 1999:
6. **Parke DV, Ioannides C.** Role of mixed-function oxidases in the formation of biological reactive intermediates. *Adv Exp Med Biol* 1981, 136, Pt A:23-38.
7. **Γεωργιάτσος ΙΓ.** Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 4η Έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1993: 110-111.
8. **Olson J.** Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997: 7.
9. **McKinnon RA, Nerbert DW.** Possible role of cytochromes P450 in lupus erythematosus and related disorders. *Lupus* 1994, 3:473-478.
10. **Waxman DJ.** P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Bioph* 1999, 69:11-23.
11. **Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF.** Human cytochrome P450A2. In Ryder W (ed) *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. IARC Sci Publ no 148. International Agency for Research in Cancer, Lyon, 1999:173-195.
12. **Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP.** Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 270:414-423.
13. **Ikeya K, Jaiswal AK, Owens RA, Jones JE, Nebert DW, Kimura S.** Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous genes and differences in liver 1A2m RNA expression. *Mol Endocrinol* 1989, 3:1399-1408.
14. **Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T.** Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)* 1999, 125:803-808
15. **Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ.** Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* 2001, 11:1-6.
16. **Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar F.F.** Human cytochrome P-450pa (P-450A2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:7696-7700.
17. **Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, et al.** Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P450A2 Activity in Humans. *Cancer Res* 1994, 54:6154-6159.
18. **Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV, Gonzalez FJ.** Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:4790-4793.
19. **Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL.** Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P450A2 and P450A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res* 1994, 54:101-108.
20. **Berthou F, Flinois J-P, Ratanasavanh D, Beaune P, Riche C, Guillouzo A.** Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Disp* 1991, 19:561-567.
21. **Gu L, Gonzales FJ, Kalow W, Tang BK.** Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 1992, 2:73-77.
22. **Campbell ME, Grant DM, Inaba T, Kalow W.** Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes. *Drug Metabol Disp* 1987, 15:237-249.

- 23. Spaldin V, Madden S, Adams DA., Edwards RJ, Davies DS, Park B.K.** Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity *in vitro* use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab Dispos* 1995, 23:929-934.
- 24. Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, et al.** Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-4501A2 and P-4503A4 in human liver. *Mol Pharmacol* 1993, 43:827-832.
- 25. Sharer JE, Wrighton SA.** Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the *in vitro* oxidation of antipyrine. *Drug Metab Dispos* 1996, 24:487-494.
- 26. Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, Llerena A, Alm C, Bondesson U, et al.** Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol* 1994, 38:471-473.
- 27. Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS.** A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 1988, 26:363-372.
- 28. Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, Black M.** Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Arch Biochem Biophys* 1989, 271:270-283.
- 29. Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP, Shimada T.** Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 1998, 11:659-665.
- 30. Facciola G, Hidestrand M, von Bahr C, Tybring G.** Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 2001, 56:881-888.
- 31. Smith AG, Davies R, Dalton DP, Miller ML, Judah D, Riley J, et al.** Intrinsic hepatic phenotype associated with the CYP1A2 gene as shown by cDNA expression microarray analysis of the knockout mouse. *EHP Toxicogenomics* 2003, 111:855-861.
- 32. Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, et al.** Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 1992, 2:116-127.
- 33. Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jansen M, et al.** Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, 3:675-682.
- 34. Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M, et al.** Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: the case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 207(2 Suppl):43-51.
- 35. Lin JH, Lu AYH.** Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 1998, 35:361-390.
- 36. Kalow W, Tang B-K.** Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1991, 49:44-48.
- 37. Catteau A, Bechtel YC, Poisson N, Bechtel PR.** A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 1995, 47:423-430.
- 38. Carrillo JA, Benitez J.** CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1996, 41:605-608.
- 39. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK.** *In vivo* evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomed Chromatogr* 2007, 21:190-200.
- 40. Sinha R, Caporaso N.** Heterocyclic amines, cytochrome P4501A2, and N-acetyltransferase: issues involved in incorporating putative genetic susceptibility markers into epidemiological studies. *Ann Epidemiol* 1997, 7:350-356.
- 41. Sinha R, Rothman N.** Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters* 1999, 143:189-194.
- 42. Vistisen K, Loft S, Poulsen HE.** Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv Exp Med Biol* 1991, 283:407-411.
- 43. Vistisen K, Poulsen HE, Loft S.** Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* 1992, 13:1561-1568.
- 44. Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV.** Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 1997, 7:11-19.

- 45. Tantcheva-Poór I, Zaigler M, Rietbrock S, Fuhr U.** Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 1999, 9:131-144.
- 46. Brosen K, Skjielbo E, Rasmussen BB., Poulsen HE, Loft S.** Fluvoxamine is potent inhibitor of cytochrome P4501A2. *Biochem Pharmacol* 1993, 45:1211-1214.
- 47. Rasmussen BB, Nielsen TL, Brosen K.** Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1998, 83:240-245.
- 48. Sesardic D, Boobis AR, Murray BP, Murray S, Segura J, de la Torre R, et al.** Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *Br J Clin Pharmacol* 1990, 29:651-663
- 49. Loi C-M, Parker BM, Cusack BJ, Vestal RE.** Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on the theofylline metabolism in male nonsmokers. *Br J Clin Pharmacol* 1993, 36:195-200.
- 50. Joers R, Richter E.** Mexiletine and caffeine elimination. *N Engl J Med* 1987, 317:117.
- 51. Fuhr U, Woodcock BG, Siewert M.** Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol* 1992, 42:463-464.
- 52. Bendriss EK, Bechtel Y, Bendriss A, Humbert P, Paintaud G, Magnette J, et al.** Inhibition of caffeine metabolism by 5-methoxypsoralen in patients with psoriasis. *Br J Clin Pharmacol* 1996, 41:421-424.
- 53. Fuhr U, Anders EM, Mahr G, Sörgel F, Staib AH.** Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36:942-948.
- 54. Fuhr U, Kummert AL.** The fate of maringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clin Pharmacol Ther* 1995, 58:365-373.
- 55. Rizzo N, Hispard E, Dolbeault S, Dally S, Leverage R, Girre C.** Impact of long-term ethanol consumption on CYP1A2 activity. *Clin Pharmacol Ther* 1997, 62:505-509.
- 56. Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W.** A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1987, 42:157-165.
- 57. Kalow W, Tang B-K.** The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin Pharmacol Ther* 1993, 53:503-514.
- 58. Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA, et al.** Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol* 1999, 39:936-940.
- 59. Juan D, Worwang EM, Schoeller DA, Kotake AN, Hughes RL, Frederiksen M.C.** Effects of dietary protein on theophylline pharmacokinetics and caffeine and aminopyrine breath tests. *Clin Pharmacol Ther* 1986, 40:187-194.
- 60. Denaro CP, Wilson M, Jacob P, Benowitz N.L.** The effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. *Clin Pharmacol Therap* 1996, 59:624-635.
- 61. Bechtel YC, Haffen E, Lelouet H, Brientini MP, Paintaud G, Miguet JP, et al.** Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int J Clin Pharmacol Therap* 2000, 38:467-475.
- 62. Lelouet H, Bechtel YC, Paitaud G, Brientini MP, Miguet JP, Bechtel P.R.** Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001, 39:25-32.
- 63. Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, et al.** The effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activities in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2001, 70:121-125
- 64. Hong C-C, Tang B-K, Hammond GL, Tritchler D, Yaffe M, Boyd NF.** Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) activity and risk factors for breast cancer: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R352-R365.
- 65. Lane JD, Steege JF, Rupp SI, Kubu CM.** Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *Eur J Clin Pharmacol* 1992, 43:543-546.
- 66. Kashuba AD, Bertino JS Jr, Kearns GL, Leeder JS, James AW, Gotschall R, et al.** Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* 1998, 63:540-551.
- 67. Zaigler M, Rietbrock S, Szymanski J, Dericks-Tan JS, Staib AH, Fuhr U.** Variation of CYP1A2-dependent caffeine metabolism during menstrual cycle in healthy women. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000, 38: 235-244.

68. Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, et al. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics* 2006, 16:359-367.
69. <http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>
70. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, 3:413-421.
71. Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, et al. Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2003, 55:68-76.
72. Ghotbi R, Christensen M, Roh H-K, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 2007, 63:537-546.
73. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of C—A polymorphism in intron-1 of the cytochrome CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999, 47:445-449.
74. Han X-M, Ouyang D-S, Chen X-P, Shu Y, Jiang C-H, Tan Z-R, et al. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole *in vivo* related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 2002, 5:540-543.
75. Castorena-Torres F, Mendoza-Cantu A, de Leon MB, Cisneros B, Zapata-Perez O, Lopez-Carrillo L, et al. CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico. *Toxicol Lett* 2005, 156:331-339.
76. Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Hellman K, Pitarque M, Bertilsson L, et al. Genetic polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians affecting induction and expression: Characterization of novel haplotypes with Single-Nucleotide Polymorphisms in intron 1. *Mol Pharmacol* 2003, 64:659-669.
77. Allorge D, Chevalier D, Lo-Guidice J-M, Cauffiez C, Suard F, Baumann P, et al. Identification of a novel slice-site mutation in the CYP1A2 gene. *Br J Clin Pharmacol* 2003, 56:341-344.
78. Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, Brosten K. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 2002, 12:473-478.
79. Nishikawa A, Mori Y, Lee I-S, Tanaka T, Hirose M. Cigarette Smoking, Metabolic Activation and Carcinogenesis. *Curr Drug Metab* 2004, 5:363-373.
80. Vistisen K, Loft, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis* 2004, 25:923-929.
81. Hong C-C, Tang B-K, Rao V, Agarwal S, Martin L, Tritchler D, et al. Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R338-R351.
82. Shet MS, McPhaul M, Fisher CW, Stallings NR, Estabrook RW. Metabolism of the antiandrogenic drug (Flutamide) by human CYP1A2. *Drug Metab Dispos* 1997, 25:1298-1303.
83. Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation *in vitro*: dominance of CYP 2C19 and 3A4. *J Clin Pharmacol* 1998, 38:112-121.
84. Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 278:21-30.
85. Nielsen KK, Flinois JP, Beaune P, Brosten K. The biotransformation of clomipramine *in vitro*, identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 277:1659-1664.
86. Ring BJ, Catlow J, Lindsay TJ, Gillespie T, Roskos LK, Cerimele BJ, et al. Identification of the human cytochromes P450 responsible for the *in vitro* formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 276:658-666.
87. Dixon CM, Colthup PV, Serabjit-Singh CJ, Kerr BM, Boehlert CC, Park GR, et al. Multiple forms of cytochrome P450 are involved in the metabolism of ondansetron in humans. *Drug Metab Dispos* 1995, 23:1225-1230.
88. Wang JS, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in lidocaine N-deethylation and 3-hydroxylation on humans. *Drug Metab Dispos* 2000, 28:959-965.

- 89. Orlando R, Piccoli P, De Martin S, Padrini R, Floreani M, Palatini P.** Cytochrome P450 1A2 is a major determinant of lidocaine metabolism in vivo: effects of liver function. *Clin Pharmacol Ther* 2004, 75:80-88.
- 90. Masubuchi Y, Hosokawa S, Horie T, Suzuki T, Ohmori S, Kitada M, et al.** Cytochrome P450 isozymes involved in propranolol metabolism in human liver microsomes. The role of CYP2D6 as ring hydroxylase and CYP1A2 as *N*-desisopropylase. *Drug Metab Dispos* 1994, 22:909-915.
- 91. Yoshimoto K, Echizen H, Chiba K, Tani M, Ishizaki T.** Identification of human CYP isoforms involved in the metabolism of propranolol enantiomers--*N*-desisopropylation is mediated mainly by CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 1995, 39:421-431.
- 92. Fuhr U, Kober S, Zaigler M, Mutschler E, Spahn-Langguth H.** Rate-limiting biotransformation of triamterene is mediated by CYP1A2. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005, 43:327-334.
- 93. Limke KK, Shelton AR, Elliott ES.** Fluvoxamine interaction with warfarin. *Ann Pharmacother* 2002, 36:1890-1892.
- 94. Arlander E, Ekstrom G, Alm C, Carrillo JA, Bielenstein M, Bottiger Y, et al.** Metabolism of ropivacaine in humans is mediated by CYP1A2 and to a minor extent by CYP3A4: an interaction study with fluvoxamine and ketoconazole as in vivo inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 1998, 64:484-491.
- 95. Manyike PT, Kharasch ED, Kalthorn TF, Slattey JT.** Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 67:275-282.
- 96. Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M.** Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: Identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* 1996, 59:613-623.
- 97. Botsch S, Gautier JC, Beaune P, Eichelbaum M, Kroemer HK.** Identification and characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in *N*-dealkylation of propafenone: molecular base for interaction potential and variable disposition of active metabolites. *Mol Pharmacol* 1993, 43:120-126.
- 98. Wahllander A, Paumgartner G.** Effect of ketoconazole and terbinafine on the pharmacokinetics of caffeine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1989, 37:279-283.
- 99. Niwa T, Inoue-Yamamoto S, Shiraga T, Takagi A.** Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull* 2005, 28:1813-1816.
- 100. Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint Aubert B, Bories P, Michel H, et al.** Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1990, 99:737-747
- 101. Wietholtz H, Zysset T, Kreiten K, Kohl D, Buschsel R, Matern S.** Effect of phenytoin, carbamazepine, and valproic acid on caffeine metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1989, 36:401-406.
- 102. Wietholtz H, Zysset T, Marschall HU, Generet K, Matern S.** The influence of rifampin treatment on caffeine clearance in healthy man. *J Hepatol* 1995, 22: 8-81.
- 103. Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M.** CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 2000, 144:139-147.
- 104. Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM.** A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 282:1608-1614.
- 105. Oscarson M.** Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* 2001, 29:91-95.
- 106. Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ, Yost GS.** Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *Pharmacol Exp Ther* 1996, 276:21-29.
- 107. Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T.** Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1992, 13:1789-1794.
- 108. Camus AM., Geneste O, Honkakoski P, Berezziat JC, Henderson CJ, Wolf CR, et al.** High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* 1993, 7:268-275.
- 109. Sotaniemi EA, Rautio A, Backstrom M, Arvela P, Pelkonen O.** CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 1995, 39:71-76.

- 110. Benowitz NL, Peng M, Jacob III P.** Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2003, 74:468-474.
- 111. Pavek P, Dvorak Z.** Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metabol* 2008, 9:129-143.
- 112. Kirby GM, Wolf CR, Neal GE, Judah DJ, Henderson CJ, Srivatanakul P, et al.** In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis* 1993, 14:2613-2620.
- 113. Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF, Lang NP.** CYP2A6 activity by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11:377-383
- 114. Kirby GM, Batist G, Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA.** Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis. *Toxicol Pathol* 1996, 24:458-467.
- 115. Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ.** The CYP2A gene subfamily: species differences, regulation, catalytic activities and role in chemical carcinogenesis. *Pharmacogenetics* 1995, 5:S123-S128.
- 116. He X-Y, Shen J, Hu W-Y, Ding X, Lu AYH, Hong J-Y.** Identification of Val117 and Arg372 as critical amino acid residues for the activity difference between human CYP2A6 and CYP2A13 in coumarin 7-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 2004, 427:143-153.
- 117. Sweeny C, Coles BF, Nowell S, Lang NP, Kadlubar FF.** Novel markers of susceptibility to carcinogens in diet: associations with colorectal cancer. *Toxicology* 2002, 181-182:83-87.
- 118. Harrison R.** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002, 33:774-797.
- 119. Guerciolini R, Szumlanski C, Weinshilboum RM.** Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther* 1991, 50:663-672.
- 120. Levartovsky D, Lagziel A, Sperling O, Liberman U, Yaron M, Hosoya T, et al.** XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: A second report. *Kidney International*, 2000, 57:2215-2220.
- 121. Stirpe F, Ravaioli M, Battelli M-G, Musiani S, Grazi G-L.** Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *The American Journal of Gastroenterology* 2002, 97:2079-2085.
- 122. Kooij A, Schijns M, Frederiks WM, Van Noorden CJ, James J.** Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues-a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992, 63:17-23.
- 123. Aranda R, Domenech E, Rus A-D, Real JT, Sastre J, Vina J, et al.** Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* 2007, 41:1195-1200.
- 124. Kalow W.** Variability of Caffeine Metabolism in Humans. *Arzneimittel Forschung* 1985, 35:319-324.
- 125. Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M.** Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians. *Eur J Clin Pharmacol* 2003, 59:533-536.
- 126. Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, et al.** A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin Pharmacol Ther* 2002, 72:200-208.
- 127. Carrillo JA, Benitez J.** Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin Pharmacol Ther* 1994, 55:293-304.
- 128. Kalow W, Tang B-K.** Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* 1991, 50:508-519.
- 129. Simpson PJ, Lucchesi BR.** Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1987, 110:13-30.
- 130. Kato M, Morikawa A, Kimura H, Shimizu T, Nakano M, Kuroume T.** Effects of antiasthma drugs on superoxide anion generation from human polymorphonuclear leukocytes or hypoxanthine-xanthine oxidase system. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991, 96:128-133.
- 131. Saugstad OD.** Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 1996, 98:103-107.
- 132. Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Maeda H.** Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* 1989, 244: 974-976.
- 133. Grant DM, Tang BK, Campbell ME, Kalow W.** Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br J Clin Pharmacol* 1986, 21:454-458.

- 134. Renton KW, Knickle LC.** Regulation of hepatic cytochrome P450 during infectious disease. *Can J Physiol Pharmacol* 1990, 68:777-781.
- 135. Li H, Cui H, Liu X, Zweier JL.** Xanthine Oxidase Catalyzes Anaerobic Transformation of Organic Nitrates to Nitric Oxide and Nitrosothiols. *J Biol Chem* 2005, 280:16594-16600.
- 136. Atmane N, Dairou J, Paul A, Dupret J-M, Rodrigues-Lima F.** Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *J Biol Chem* 2003, 278:35086-35092.
- 137. Boukouvala S, Sim E.** Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005, 96:343-351.
- 138. Mitchell KR, Warshawsky D.** Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol Lett* 2003, 139:11-23.
- 139. Evans DA.** N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* 1989, 42:157-234.
- 140. Weber WW, Hein DW.** N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 1985, 37:25-79.
- 141. Grant DM, Tang BK, Kalow W.** Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite. *Clin Pharmacol Ther* 1983, 33:355-359.
- 142. Okumura K, Tomoko K, Chikazawa S, Komada F, Iwakawa S, Tanigawara Y.** Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1997, 61:509-517.
- 143. Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R, et al.** Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, 8:683-692.
- 144. Rihs H-P, John A, Scherenberg M, Seidel A, Bruning T.** Concordance between the deduced acetylation status generated by high-speed Real-time PCR based NAT2 genotyping of seven single nucleotide polymorphisms and human NAT2 phenotypes determined by a caffeine assay. *Clin Chim Acta* 2007, 379:240-243.
- 145. Mashimo M, Suzuki T, Abe M, Deguchi T.** Molecular genotyping of N-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Hum Genet* 1992, 90:139-143.
- 146. Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, et al.** Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res* 1997, 376:61-70.
- 147. Levy M, Caraco Y, Geisslinger G.** Drug acetylation in liver disease. *Clin Pharmacokinet* 1998, 34:219-226.
- 148. Risch A, Wallace DM, Bathers S, Sim E.** Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet* 1995, 4:231-236.
- 149. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, et al.** Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9:461-467.
- 150. Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, Wu X.** Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res* 2005, 581:97-104.
- 151. Hein DW.** N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene* 2006, 25:1649-1658.
- 152. Moslehi R, Chatterjee N, Church TR, Chen J, Yeager M, Wissfeld J, et al.** Cigarette smoking, N-acetyltransferase genes and the risk of advanced colorectal adenoma. *Pharmacogenomics* 2006, 7:819-829.
- 153. Hein DW.** N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2000, 112-113:349-356.
- 154. Lilla C, Verla-Tebit E, Risch A, Jager B, Hoffmeister M, Brenner H, et al.** Effect of NAT1 and NAT2 genetic polymorphisms on colorectal cancer risk associated with exposure to tobacco smoke and meat consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15:99-107.
- 155. Γεωργιάτσος ΠΓ, Αρζόγλου ΠΙ.** Αρχές Κλινικής Χημείας, Εκδόσεις Γιαχουόδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1999: 199-202.
- 156. Νταλέκος ΓΝ, Σταθάκης Ν.** Νοσήματα του ήπατος, των χοληφόρων οδών και του παγκρέατος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Λάρισα, 2001: 4-5, 71-72.
- 157. Marshall W.** Κλινική Βιοχημεία. 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1998: 8-11, 99, 101-103
- 158. Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Zorf S, Gailer B, Hahn EG, et al.** Inducibility of microsomal liver function may differentiate cirrhotic patients with maintained compared with severely compromised liver reserve. *J Gastroenterol Hepatol* 2003, 18:445-449.

- 159. Scott NR, Stambuk D, Chakraborty J, Marks V, Morgan MY.** The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. *Br J Clin Pharmacol* 1989, 27:205-213.
- 160. Shrestha R, McKinley C, Showalter R, Wilner K, Marsano L, Vivian B, et al.** Quantitative liver function tests define the functional severity of liver disease in early stage cirrhosis. *Liver Transpl Surg* 1997, 3:166-173.
- 161. Morgan DJ, McLean AJ.** Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in patients with liver disease. *Clin Pharmacokinet* 1995, 29:370-391.
- 162. Tygstrup N, Andersen PK, Thomsen BL.** Prognostic evaluation in alcoholic cirrhosis. *Acta Med Scand* 1985, 703:149-156.
- 163. Giannini EG, Fasoli A, Borro P, Botta F, Malfati F, Fumagalli A, et al.** ¹³C-galactose breath test and ¹³C-aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005, 3:279-285.
- 164. Howden CW, Birnie GG, Brodie MJ.** Drug metabolism in liver disease. *Pharmac Ther* 1989, 40:439-474.
- 165. Nxumalo J, Teranaka M, Schrenk WG.** Hepatic blood flow measurement. *Arch Surg* 1978, 113:169-172.
- 166. Zeeh J, Lange H, Bosch J, Pohl S, Loesgen H, Eggers R, et al.** Steady-state extrarenal sorbitol clearance as a measure of hepatic plasma flow. *Gastroenterology* 1988, 95:749-759.
- 167. Ferraris R, Colombatti G, Fiorentini MT.** Diagnostic value of serum bile acids and routine liver function tests in hepato-biliary diseases: sensitivity, specificity and predictive value. *Dig Dis Sci* 1983, 28:129-136.
- 168. Teunissen MW, Spoelstra P, Koch CW, Weeda B, van Duyn W, Janssens AR, et al.** Antipyrine clearance and metabolite formation in patients with alcoholic cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol* 1984, 18: 07-715.
- 169. Bircher J, Kupfer A, Gikalov I, Preisig R.** Aminopyrine demethylation measured by breath analysis in cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 1976, 20:484-492.
- 170. Fasoli A, Giannini E, Botta F, Romagnoli P, Risso D, Celle G, et al.** ¹³CO₂ excretion in breath of normal subjects and cirrhotic patients after ¹³C-aminopyrine oral load. Comparison with MEGX test in functional differentiation between chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000, 47:234-238.
- 171. Oellerich M, Armstrong VW.** The MEGX test: a tool for the real-time assessment of hepatic function. *Ther Drug Monit* 2001, 23:81-92.
- 172. Desmond PV, Patwardhan RV, Johnson RF, Schenker S.** Impaired elimination of caffeine in cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1980, 25:193-197.
- 173. Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, Hay D.** The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev Pharmacol Ther* 1986, 9:375-388.
- 174. Lambert GH, Schoeller DA, Humphrey HEB, Kotake AN, Lietz H, Campbell M, et al.** The Caffeine Breath Test and Caffeine Urinary Metabolite Ratios in the Michigan Cohort Exposed to Polybrominated Biphenyls: A Preliminary Study. *Envir Health Persp* 1990, 89:175-181.
- 175. Carrillo JA, Benitez J.** Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions between dietary caffeine and medications. *Clin Pharmacokinet* 2000, 39:127-153.
- 176. Blanchard J, Sawers SJ.** The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1983, 24:93-98.
- 177. Bonati M, Garattini S.** Interspecies comparison of caffeine disposition. In: Dews PB (ed) *Caffeine, perspectives from recent research*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984: 48-54.
- 178. Carrillo JA, Christensen M, Ramos SI, Alm C, Dahl M-L, Benitez J, et al.** Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therap Drug Monitor* 2000, 22:409-417.
- 179. Berthou F, Ratanasavanh D, Riche C, Picart D, Voirin T, Guillouzo A.** Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica* 1989, 19:401-417.
- 180. Somani SM, Gupta P.** Caffeine: a new look at an age-old drug. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1988, *Toxicol.* 26: 521-533.
- 181. Lelo A, Miners JO, Robson RA Birkett DJ.** Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br J Clin Pharmacol* 1986, 22:183-186.

- 182. Birkett DJ, Dahlqvist R, Miners JO, Lelo A, Billing B.** Comparison of theophylline and theobromine metabolism in man. *Drug Metab Dispos* 1985, 13:725-728.
- 183. Lelo A, Kjellen G, Birkett DJ, Miners JO.** Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther* 1989, 248:315-319.
- 184. Tang BK, Grant DM, Kalow W.** Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab Dispos* 1983, 11:218-220.
- 185. Arnaud MJ.** Products of metabolism of caffeine. In: Dews PB (ed) *Caffeine, perspectives from recent research*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984: 3-38.
- 186. Bonati M, Latini R, Galleti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S.** Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther* 1982, 32:98-106.
- 187. Scott NR, Stambuk D, Chakabrot J, Marks V, Morgan MY.** Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. *Clin Sci* 1988, 74:377-384
- 188. Tang-Liu DD, Williams RL, Riegelman S.** Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1983, 224:180-185.
- 189. Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT.** Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 1996, 6:121-149.
- 190. Park GJ-H, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, LeCouteur DG, Ngu M.C.** Validity of the ¹³C-caffeine breath test as a non-invasive, quantitative test of liver function. *Hepatology* 2003, 38:1227-1236.
- 191. Wietholz H, Voegelin M, Arnaud MJ, Bircher J, Preisig R.** Assessment of the cytochrome P-448 dependent liver enzyme system by a caffeine breath test. *Eur J Clin Pharmacol* 1981, 21:53-59.
- 192. Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker A, Schaffer DD, Josephs H.** The caffeine CO₂ breath test: Dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 1982, 32:261-269.
- 193. Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, Arnaud MJ, Preisig R.** Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Function. *Hepatology* 1984,4:38-46.
- 194. Rost KL, Brosicke H, Brockmoller J, Scheffler M, Helge H, Roots I.** Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole: evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992, 52:170-180.
- 195. Jost G, Wahllander A, von Mandach U, Preisig R.** Overnight salivary caffeine clearance: a liver function test suitable for routine use. *Hepatology* 1987, 7:338-344.
- 196. Tarantino G, Conca P, Capone D, Gentile A, Polichetti G, Basile V.** Reliability of total overnight salivary caffeine assessment (TOSCA) for liver function evaluation in compensated cirrhotic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2006, 62:605-612.
- 197. Fuhr U, Rost KL.** Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 1994, 4:109-116.
- 198. Tanaka E, Ishikawa A, Yamamoto Y, Osada A, Tsuji K, Fukao K, et al.** A simple useful method for the determination of hepatic function in patients with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992, 30:336-341.
- 199. Grant DM, Campbell ME, Tang BK, Kalow W.** Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem Pharmacol* 1987, 36:1251-1260.
- 200. Kadlubar FF, Talaska G, Butler MA, Teitel CH, Massengill JP, Lang NP.** Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. In: M.I. Mendelsohn and R.J. Albertini (eds) *Mutation and the environment, Part B*. John Wiley, New York, 1990: 107-114.
- 201. Notarianni LJ, Oliver SE, Dodrocky P, Bennett PN, Silverman BW.** Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *Br J Clin Pharmacol* 1995, 39:65-69.
- 202. Grant DM, Tang BK, Kalow W.** Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1983, 33:591-602.
- 203. Sinues B, Saenz M-A, Lanuza J, Bernal M-L, Faulo A, Juste J-L, et al.** Five caffeine metabolite ratios to measure tobacco-induced CYP1A2 activity and their relationships with urinary mutagenicity and urine flow. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, 8:159-166.
- 204. Rasmussen BB, Brosen K.** Determination of Urinary Metabolites of Caffeine for the Assessment of Cytochrome P4501A2, Xanthine Oxidase, and N-Acetyltransferase Activity in Humans. *Therap Drug Monit* 1996, 18:254-262.

- 205. Nordmark A, Lundgren S, Cnattingius S, Rane A.** Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *J Clin Pharmacol* 1999, 47:397-402.
- 206. Tang BK, Zhou Y, Kadar D, Kalow W.** Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* 1994, 4:117-124.
- 207. Bologna M, Tang B, Klein J, Tesoro A, Koren G.** Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women. *J Pharmacol Exp Ther* 1991, 257:735-740.
- 208. Landi MT, Zocchetti C, Bernucci I, Kadlubar FF, Tennenbaum S, Skipper P, et al.** Cytochrome P4501A2: enzyme induction and genetic control in determining 4-aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, 5:693-698.
- 209. Pasanen M, Rannala Z, Tooming A, Sotaniemi EA, Pelkonen O, Rautio A.** Hepatitis A impairs the function of human hepatic CYP2A6 in vivo. *Toxicology* 1997, 123:177-187.
- 210. Kimura M, Yamazaki H, Fujieda M, Kiyotani K, Honda G, Saruwatari J, et al.** CYP2A6 is a principal enzyme involved in hydroxylation of 1,7-dimethylxanthine, a main caffeine metabolite, in humans. *Drug Metab Dispos* 2005, 33:1361-1366.
- 211. Rodopoulos N, Wisen O, Norman A.** Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1995, 55:229-242.
- 212. Krul C, Hageman G.** Analysis of caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998, 709:27-34.
- 213. Grant DM, Tang BK, Kalow W.** A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1984, 17:459-464.
- 214. Tang BK, Kadar D, Kalow W.** An alternative test for acetylator phenotyping with caffeine. *Clin Pharmacol Ther* 1987, 42:509-513.
- 215. Relling MV, Lin J-S, Ayers GD, Evans WE.** Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther* 1992, 52:643-658.
- 216. Tang B-K, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W.** Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* 1991, 49:648-657.
- 217. Bendriss EK, Bechtel YC, Paintaud G, Brientini MP, Manton G, Miguet JP, et al.** Acetylation polymorphism expression in patients before and after liver transplantation: influence of host/graft genotypes. *Pharmacogenetics* 1998, 8:201-209.
- 218. Boobies AR, Brodie MJ, Kahn GC, Fletcher DR, Saunders JH, Davies D.S.** Monooxygenase activity of human liver in microsomal fractions of needle biopsy specimens. *Br J Clin Pharmacol* 1980, 9:11-19.
- 219. George J, Murray M, Byth K, Farrell GC.** Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology* 1995, 21:120-128.
- 220. Joeres R, Brachtel D, Gallenkamp H, Hofstetter G, Klinker H, Zilly W, et al.** Caffeine elimination in cirrhotic and non-cirrhotic liver disease of different etiology. *Z Gastroenterol* 1993, 31 Suppl 2:56-61.
- 221. Lewis FW, Rector WR Jr.** Caffeine clearance in cirrhosis. The value of simplified determinations of liver metabolic capacity. *J Hepatol* 1992, 14:157-162.
- 222. El-Yazigi A, Shabib S, al-Rawithi S, Yusuf A, Legayada ES, al-Humidan A.** Salivary clearance and urinary metabolic pattern of caffeine in healthy children and in pediatric patients with hepatocellular diseases. *J Clin Pharmacol* 1999, 39:366-372.
- 223. Cheng WS, Murphy TL, Smith MT, Cooksley WG, Halliday JW, Powell LW.** Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: Relevance as a test of quantitative liver function. *Clin Pharmacol Ther* 1990, 47:516-524.
- 224. Holstege A, Staiger M, Haag K, Gerok W.** Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis. *Klin Wochenschr* 1989, 67:6-15.
- 225. Baker A, Girling A, Worthington D, Ballantine N, Smith S, Tarlow M, et al.** The prognostic significance of caffeine half-life in saliva in children with chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995, 20:196-201.
- 226. Martin H, Moore K, Bosmans E, Davies S, Burroughs A, Dhillon A, et al.** Xanthine oxidoreductase activity in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:1214-1223.
- 227. Meyer VR.** Practical high-performance liquid chromatography. 2nd ed. John Wiley & sons, Chichester, 1994, reprinted 1996: 1, 26.

- 228. Dorsey JG, Dill KA.** The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Chem Rev* 1989, 89:331-346.
- 229. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL.** Practical HPLC method development, 2nd edition, John Wiley & sons, New York, 1997: 181-182, 235.
- 230. Bendriss E, Markoglou N, Wainer IW.** Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *J Chromatogr B* 2000, 746:331-338.
- 231. Georga KA, Samanidou VF, Papadoyannis IN.** Use of solid phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *J Chromatogr B* 2001, 59:209-218.
- 232. Caubet M-S, Elbast W, Dubuc M-C, Brazier J-L.** Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *J Pharm Biomed Anal* 2002, 27:261-270.
- 233. Schneider H, Ma L, Glatt H.** Extractionless method for the determination of urinary caffeine using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2003, 789:227-237.
- 234. Baud-Camus F, Marquet P, Soursac M, Davrinche C, Farinotti R.** Determination of *N*-acetylation phenotype using caffeine as a metabolic probe and high-performance liquid chromatography with either ultraviolet detection or electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2001, 760:55-63.
- 235. Dobrocky P, Bennett PN, Notarianni LJ.** Rapid method for routine determination of caffeine and its metabolites by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1994, 652:104-108.
- 236. Nyeki A, Biollaz J, Kesslerling UW, Decosterd LA.** Extractionless method for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary caffeine metabolites for *N*-acetyltransferase 2, cytochrome P4501A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J Chromatogr B* 2001, 755:73-84.
- 237. Ambrose DL, Fritz JS.** High-performance liquid chromatographic determination of drugs and metabolites in human serum and urine using direct injection and a unique molecular sieve. *J Chromatogr B*. 1998, 709:89-96.
- 238. Kromidas S.** Practical problem solving in HPLC. Wiley-VCH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2000: 31-32, 36-40.
- 239. Ζεφουρίδης ΓΚ.** Διατροφή του ανθρώπου. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1998: 11.
- 240. Chan DC, Watts GF, Barret PHR, Burke V.** Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men. *Q J Med* 2003, 96:441-447.
- 241. Wong P, Villeneuve G, Tessier V, Banerjee K, Nedev H, Jean-Claude BJ, et al.** Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine. *J Pharm Biom Anal* 2002, 28:693-700.
- 242. Dawson-Saunders B, Trapp RG.** Basic and clinical biostatistics. 2nd Second ed. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 1994: 131.
- 243. Τρακατέλης Α.** Βιοχημεία, Τόμος Β', Μέρος 1^ο, Θεσσαλονίκη, 1992: 39.
- 244. Horsti J, Uppa H, Vilpo JA.** Poor agreement among prothrombin time International Normalized Ratio methods: comparison of seven commercial reagents. *Clin Chem* 2005, 51:553-560.
- 245.** http://en.wikipedia.org/wiki/international_normalized_ratio#laboratory_measurement. Prothrombin time.
- 246. Schrenk D, Brockmeier D, Morike K, Bock KW, Eichelbaum M.** A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort of healthy Caucasian volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1998, 53:361-367.
- 247. McQuilkin SC, Nierenberg DW, Bresnick E.** Analysis of within-subject variation of caffeine metabolism when used to determine cytochrome P4501A2 and *N*-acetyltransferase-2 activities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4:139-146.
- 248. Le Marchand L, Sivaraman L, Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Lau AF, et al.** Predictors of *N*-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, 5:449-455.
- 249. Simon T, Becquemont L, Hamon B, Nouyrigat E, Chodjama Y, Poirier JM, et al.** Variability of cytochrome P4501A2 activity over time in young and elderly healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2001, 52:601-604.

- 250. Welfare MR, Aitkin M, Bassendine MF, Dally AK.** Detailed modeling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1999, 9:367-375.
- 251. Ou-Yang D-S, Huang S-L, Wang W, Xie H-G, Xu Z-H, Shu Y, et al.** Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. *Br J Clin Pharmacol* 2000, 49:145-151.
- 252. Scheel J, Hussong R, Schrenk D, Schmitz HJ.** Variability of the human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene. *J Hum Genet* 2002, 47:217-224.
- 253. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I.** Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: Correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* 1995, 57:581-592.
- 254. Kilbane AJ, Silbart LK, Manis M, Beitins IZ, Weber WW.** Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 1990, 47:470-477.
- 255. Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I, Benakis A.** Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998, 23:501-506.
- 256. Fuchs P, Haefeli WE, Ledermann HR, Wenk M.** Xanthine oxidase inhibition by allopurinol affects the reliability of urinary caffeine metabolic ratios as markers for N-acetyltransferase 2 and CYP1A2 activities. *Eur J Clin Pharmacol* 1999, 54:869-876.
- 257. Jetter A, Kinzig-Schippers M, Illauer M, Hermann R, Erb K, Borlak J, et al.** Phenotyping of N-acetyltransferase type 2 by caffeine from uncontrolled dietary exposure. *Eur J Clin Pharmacol* 2004, 60:17-21.
- 258. Horai Y, Ishizaki T.** N-acetylation polymorphism of dapsone in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 1988, 25:487-494.
- 259. Xie HG, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, Yan XD, et al.** Meta-analysis of phenotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics* 1997, 7:503-514.
- 260. Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB.** Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* 1995, 50:222-239.
- 261. Meibohn B, Beierle I, Derendorf H.** How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet* 2002, 41:329-342.
- 262. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM.** Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1992, 44:275-283.
- 263. Bebia Z, Buch S, Wilson J, Frye R, Romkes M, Cecchetti A, et al.** Bioequivalence revisited: Influence of age and sex on CYP enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 2004, 76:618-627.
- 264. Chung W-G, Kang J-H, Park C-S, Cho M-H, Cha Y-N.** Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase in Koreans: Determination by caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 67:258-266.
- 265. Horn EP, Tucker MA, Lambert G, Silverman D, Zimetkin D, Sinha R, et al.** A study of gender-based cytochrome P4501A2 variability: a possible mechanism for the male excess of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4:529-533.
- 266. Caubet M-S, Laplante A, Caille J, Brazier JL.** [¹³C]-aminopyrine and [¹³C]-caffeine breath test: influence of gender, cigarette smoking and oral contraceptives intake. *Isotopes Envir Health Stud* 2002, 38:71-77.
- 267. Nafzinger AN, Bertino Jr JS.** Sex related differences in theophylline pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1989, 37:97-100.
- 268. Sarkar MA, Hunt C, Guzelian PS, Karnes HT.** Characterization of human liver cytochromes P450 involved in theophylline metabolism. *Drug Metab Dispos* 1992, 20:31-37.
- 269. Pirotte J, El Allaf D.** Effect of age and sex on the N-demethylation rate of 14C-aminopyrine, studied by the breath test. *Digestion* 1983, 28:210-215.
- 270. Schnegg M, Lauterburg BH.** Quantitative liver function in the elderly assessed by galactose elimination capacity, aminopyrine demethylation and caffeine clearance. *J Hepatol* 1986, 3:164-171
- 271. Bartoli A, Xiaodong S, Gatti G, Cipolla G, Marchiselli R, Perucca E.** The influence of ethnic factors and gender on CYP1A2-mediated drug disposition: a comparative study in Caucasians and Chinese subjects using phenacetin as a marker substrate. *Ther Drug Monit* 1996, 18:586-591.
- 272. Langmack EL, Martin RJ, Pak J, Kraft M.** Serum lidocaine concentrations in asthmatics undergoing bronchoscopy. *Chest* 2000, 117:1055-1060.

- 273. Oellerich M, Schutz E, Polzien F, Ringe B, Armstrong VW, Hartmann H, et al.** Influence of gender on the monoethylglycineoxylidide test in normal subjects and liver donors. *Ther Drug Monit* 1994, 16:225-231.
- 274. Khan AY, Preskorn SH.** Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiat Pract* 2005, 11:289-301.
- 275. Rostami-Hodjegan A, Amin AM, Spencer EP, Lennard MS, Tucker GT, Flanagan RJ.** Influence of dose, cigarette smoking, age, sex, and metabolic activity on plasma clozapine concentrations: a predictive model and normograms to aid clozapine dose adjustment and to assess compliance in individual patients. *J Clin Psychopharmacol* 2004, 24:70-78.
- 276. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP, Garrone G.** Chlomipramine metabolism: model-based analysis of variability factors from drug monitoring data. *Clin Pharmacokinet* 1990, 19:241-255.
- 277. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP.** Therapeutic drug monitoring of olanzapine: the combined effect of age, gender, smoking, and comedication. *Ther Drug Monit* 2003, 25:46-53.
- 278. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM.** The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 199:193-209
- 279. Lee AJ, Mills LH, Kosh JW, Conney AH, Zhu B.T.** NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 300:838-849.
- 280. Chauret N, Gautier A, Martin J, Nicoll-Griffith DA.** *In vitro* comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and horse. *Drug Metab Dispos* 1997, 25:1130-1136.
- 281. Lemmens HJ, Burm AG, Hennis PJ, Gladines MP, Bovill J.G.** Influence of age on the pharmacokinetics of alfentanil. Gender dependence. *Clin Pharmacokinet* 1990, 19:416-22.
- 282. Yun CH, Wood AJ, Guengerich FP.** Identification of the pharmacogenetic determinants of alfentanil metabolism: cytochrome P-4503A4. An explanation of the variable elimination clearance. *Anesthesiology* 1992, 77:467-474.
- 283. Gustavson LE, Benet LZ.** Menopause: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Exp Gerontol* 1994, 29:437-444.
- 284. Harris RZ, Tsunoda SM, Mroczkowski P, Wong H, Benet LZ.** The effects of menopause and hormone replacement therapies on prednisolone and erythromycin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1996, 59:429-435.
- 285. Bell EC, Ravis WR, Chan HM, Lin YJ.** Lack of pharmacokinetic interaction between St. John's wort and prednisone. *Ann Pharmacother* 2007, 41:1819-1824.
- 286. Richardson CJ, Blocka KL, Ross SG, Verbeek RK.** Effects of age and sex on piroxicam disposition. *Clin Pharmacol Ther* 1985, 37:13-18.
- 287. Leemann TD, Transon C, Bonnabry P, Dayer P.** A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Drugs Exp Clin Res* 1993, 19:189-195.
- 288. Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE, Jacob P.** Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2006, 79:480-488.
- 289. Woodhouse K, Wynne HA.** Age-related changes in hepatic function. Implication for drug therapy. *Drugs Aging* 1992, 2:243-255.
- 290. Schmucker DL.** Liver function and phase-I drug metabolism in the elderly. *Drugs Aging* 2001, 18:837-851.
- 291. Wynne H.** Drug metabolism and ageing. *J Br Menopause Soc* 2005, 11:51-56.
- 292. Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James O.F.** The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 1989, 9:297-301.
- 293. Schmucker DL, Woodhouse KW, Wang RK, Wynne H, James OF, McManus M, et al.** Effects of age and gender on *in vitro* properties of human liver microsomal monooxygenases. *Clin Pharmacol Ther* 1990, 48:365-374.
- 294. Krahenbuhl S, Reichen J.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics in cirrhosis. *Medicine* 2002, 30:24-27.
- 295. Zeeh J, Fuchs L, Bergmann W, Antonin KH, Degel F, Bieck P, et al.** Influence of age, frailty and liver function on the pharmacokinetics of brofaromine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996, 49:387-391.
- 296. Posner J, Danhof M, Teunissen MW, Breimer DD, Whiteman PD.** The disposition of antipyrine and its metabolites in young and elderly healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1987, 24:51-55.

- 297. Jorquera F, Almar M, Pozuelo M, Sansegundo D, Gonzalez-Sastre M, Gonzalez-Gallego J.** The effect of age and sex on metabolism and urinary excretion of antipyrine. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998, 53:M14-19.
- 298. Ohnishi A, Kato M, Kojima J, Ushima H, Yoneko M, Kawai H.** Differential pharmacokinetics of theophylline in elderly patients. *Drugs Aging* 2003, 20:71-84.
- 299. Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M.** Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin Pharmacol Ther* 1997, 61:331-339.
- 300. George J, Byth K, Farrell GC.** Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver. *Biochem Pharmacol* 1995, 50:727-730.
- 301. Ding YS, Trommel JS, Yan XJ, Ashley D, Watson CH.** Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. *Environ Sci Technol* 2005, 39:471-478.
- 302. Parsons WD, Neims AH.** Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1978, 24:40-45.
- 303. Caraco Y, Zylber-Katz E, Berry EM, Levy M.** Antipyrine disposition in obesity: evidence for negligible effect of obesity on hepatic oxidative metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1995, 47:525-530.
- 304. Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, et al.** Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J* 1998, 19:1814-22.
- 305. Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, Vitala K, Gelboin HV, Pasanen M.** Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000, 33:893-901.
- 306. Villeneuve JP, Thibeault MJ, Ampelas M, Fortunet-Fouin H, LaMarre L, Cote J, et al.** Drug disposition in patients with HbsAg-positive chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 1987, 32:710-714.
- 307. Frye RF, Zghetb NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, et al.** Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2006, 80:235-245.
- 308. Bastien MC, Leblond F, Pichette V, Villeneuve JP.** Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2000, 78:912-919.
- 309. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner D, Trautwein C.** Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998, 275:387-392.
- 310. Πετεινάκη Ε.** Φλεγμονή, Στο: Ιατρική Μικροβιολογία, Τόμος Α', Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα, 1998: 129-133.
- 311. Morgan ET.** Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 2001, 29:207-212.
- 312. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B et al.** Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993, 44:707-715.
- 313. Muntane-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, Maurel P.** Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1995, 2: 1143-1153.
- 314. Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, Jover R.** Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin-6 dependent. *Hepatology* 2000, 32:49-55.
- 315. Gao B.** Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2005, 2:92-100.
- 316. Morgan ET.** Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 1997, 29:1129- 1188.
- 317. George J, Liddle C, Murray M, Byth K, Farrell G.C.** Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem Pharmacol* 1995, 49:873-881.
- 318. Wang T, Kleber G, Stellaard F, Paumgartner G.** Caffeine elimination: a test of liver function. *Klin Wochenschr* 1985, 63:1124-1128.
- 319. Farrell GC, Cooksley WG, Powell LW.** Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1979, 26:483-492.
- 320. Lu Y, Cederbaum AI.** CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 2008, 44:723-738.

- 321. Bleau A-M, Maurel P, Pichette V, Leblond F, du Souich P.** Interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2003, 473:197-206.
- 322. Jodynis-Liebert J, Flieger J, Matuszewska A, Juszczak J.** Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function. *J Clin Pharmacol* 2004, 44:338-347.
- 323. Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Prawan A, Gaysornisi D, Kukongviriyapan U, Aiemsard J.** Salivary caffeine metabolic ratio in alcohol-dependent subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2004, 60:103-107.
- 324. Jorquera F, Almar M, Linares A, Olcoz JL, Rodrigo L, Gonzalez-Gallego J.** Antipyrene clearance and metabolite formation in Primary Biliary Cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2001, 46:352-359.
- 325. Donato MT, Lahoz A, Jimenez N, Perez G, Serralta A, Mir J, et al.** Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug Metab Dispos* 2006, 34:1556-1562.
- 326. Zhang WV, Ramzan I, Murray M.** Impaired microsomal oxidation of the atypical antipsychotic agent Clozapine in hepatic steatosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007, 322:770-777.
- 327. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C.** Hepatic cytochrome P4502E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998, 27:128-133.
- 328. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S.** Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 2007, 32:453-468
- 329. Paschos P, Paletas K.** Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009, 13:9-19.
- 330. Miyakawa H, Kitazawa E, Kikuchi K, Fujikawa H, Kawaguchi N, Abe K, et al.** Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* 2000, 33:23-32.
- 331. Shinoda M., Tanaka Y., Kuno T, Matsufuji T., Matsufuji S., Murakami Y., and Mizutani T.** High levels of autoantibodies against drug-metabolizing enzymes in SLA/LP-positive AIH-1 sera. *Autoimmunity* 37 (6/7): 473-480, 2004.
- 332. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, et al.** Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 1993, 104:203-216.
- 333. Robin MA, Maratrat M, Loeper J, Durand-Schneider AM, Tinel M, Ballet F, et al.** Cytochrome P4502B follows a vesicular route to the plasma membrane in cultured rat hepatocytes *Gastroenterology* 1995, 108:1110-1123.
- 334. Robin MA, Maratrat M, Le Roy M, Le Breton FP, Bonierbale E, Dansette P, et al.** Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J Clin Invest* 1996, 98:1471-1480.
- 335. Robin MA, Descatoire V, Le Roy M, Berson A, Lebreton FP, Maratrat M, et al,** Vesicular transport of newly synthesized cytochromes P4501A to the outside of rat hepatocyte plasma membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 294:1063-1069.
- 336. Raunio H, Juvonen R, Pasanen M, Pelkonen O, Paakko P, Soini Y.** Cytochrome P4502A6 (CYP2A6) expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998, 27:427-43.
- 337. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, et al.** Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003, 39:800-806.
- 338. Ghezzi P, Bianchi M, Mantovani A, Spreafico F, Salmona M.** Enhanced xanthine oxidase activity in mice treated with interferon and interferon inducers. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 119:144-149.
- 339. Terao M, Cazzaniga G, Ghezzi P, Bianchi M, Falciani F, Perani P, et al.** Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo. *Biochem J* 1992, 283:863-870.
- 340. Ziegler DW, Hutchinson HD, Kissling RE.** Induction of Xanthine Oxidase by Virus Infections in Newborn Mice. *Infec Immun* 1971, 3:237-242.
- 341. Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, et al.** Dependence on O₂-generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J Clin Invest* 1990, 85:739-745.

- 342. Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T, et al.** Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1998, 28:1578-1587.
- 343. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L.** Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990, 265:659-65.
- 344. Suzuki M, Grisham MB, Granger DN.** Leukocyte-endothelial cell adhesive interactions: role of xanthine oxidase-derived oxidants. *J Leukoc Biol* 1991, 50:488-494.
- 345. Shenkar R, Abraham E.** Plasma from hemorrhaged mice activates CREB and increases cytokine expression in lung mononuclear cells through a xanthine oxidase-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 14:198-206.
- 346. Muller MJ., Vollmar B, Friedl HP, Menger MD.** Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med* 1996, 21:189-97.
- 347. Della Corte E, Stirpe F.** Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver. Further experiments on the effects of inosine, actinomycin D and other factors. *Biochem J* 1967, 102:520-524.
- 348. Cordero OJ, Salgado FJ., Fernández-Alonso CM, Herrera C., Lluís C, Franco R, et al.** Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001, 70:920-930.
- 349. Halliwell B, Clement M-V, Longa L-H.** Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 2000, 486:10-13.
- 350. Poniachik J, Bernstein DE, Reddy KR, Jeffers LJ, Coelho-Little ME, Civantos F, et al.** The role of laparoscopy in the diagnosis of cirrhosis. *Gastroenterol Endoscop* 1996, 43:568-571.
- 351. McDonagh JE, Nathan VV, Bonavia IC, Moyle GR, Tanner AR.** Caffeine clearance by enzyme multiplied immunoassay technique: a simple, inexpensive, and useful indicator of liver function. *Gut* 1991, 32:681-684.
- 352. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD.** Principles and practical application of the receiver-operating characteristics analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000, 45:23-41.
- 353. <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm>.** The area under an ROC curve.
- 354. Witters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F, et al.** Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008, 27:1017-1029.
- 355. Miller GJ, Bauer KA, Cooper JA, Rosenberg RD.** Activation of the coagulant pathway in cigarette smokers. *Thromb Haemost* 1998, 79:549-553.
- 356. Braden B, Faust D, Sarrazin U, Zeuzem S, Dietrich CF, Caspary WF, et al.** 13C-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis C virus infection *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 21:179-185.
- 357. Schneider A, Caspary WF, Saich R, Dietrich CF, Sarrazin C, Kuker W, et al.** 13C-methacetin breath test shortened: 2-point-measurements after 15 minutes reliably indicate the presence of liver cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2007, 41:33-37.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συντομογραφίες

AAMU: 5-ακετυλάμινο-6-άμινο-3-μεθυλουρακίλη
ACLD: Αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα του ήπατος
ADA: Απαμινάση της Αδενοσίνης
AFMU: 5-ακετυλάμινο-6-φορμυλάμινο-3-μεθυλουρακίλη
AH: Αυτοάνοση Ηπατίτιδα
AhR: Υποδοχέας Αρωματικών Υδρογονανθράκων
AHXK: Αλκοολική Ηπατοπάθεια Χωρίς Κίρρωση
ALP: Αλκαλική Φωσφατάση
ALT: Αμινοτρανσφεράση της Αλανίνης,
ARNT: Πρωτεΐνη Πυρηνικής Μετατόπισης Αρωματικών Υδρογονανθράκων
AST: Αμινοτρανφεράση του Ασπαραγινικού
BMI: Δείκτης σωματικής μάζας
γ-GT= γ-γλουταμυλ-τρανφεράση
CYP1A2: κυτόχρωμα P4501A2
CYP2A6: κυτόχρωμα P4502A6
HPLC:Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
INR: International Normalized Ratio
IS: Εσωτερικό Πρότυπο
ISI: International Sensitivity Index
ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
Λ.Ε.Δ.: Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο
LFTs: Λειτουργικές Δοκιμασίες του Ήπατος
LLE: Εκχύλιση Υγρού-Υγρού
LOD: Όριο ανιχνευσιμότητας (Limit Of Detection)
LOQ: Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit Of Quantitation)
LPS: Λιποπολυσακχαρίτης
ΜΛ: Μεταβολικός Λόγος
NASH: Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα
NAT-2: N-ακετυλοτρανσφεράση-2
P.A.H: Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες
PBC: Πρωτογενής Χολική Κίρρωση
PSC: Πρωτογενής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα
ROC: Receiver Operating Characteristics
RP-HPLC: HPLC Ανάστροφης Φάσης (Reversed Phase)
TA: Τυπική Απόκλιση
WHR: Κλάσμα περιφερειών μέσης προς ισχίων (waist-to-hip ratio)
XDH: Αφυδρογόνωση της Ξανθίνης
XO: Οξειδάση της Ξανθίνης
XOR: Οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης
1U: 1-μεθυλουρικό οξύ
1X: 1-μεθυλοξανθίνη
3U: 3-μεθυλουρικό οξύ
3X: 3-μεθυλοξανθίνη
7U: 7-μεθυλουρικό οξύ
7X: 7-μεθυλοξανθίνη
137U: 1,3,7-τριμεθυλουρικό οξύ
137X: 1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, καφεΐνη
13U: 1,3-διμεθυλουρικό οξύ
13X: 1,3-διμεθυλοξανθίνη, θεοφυλλίνη
17U: 1,7-διμεθυλουρικό οξύ
17X: 1,7-διμεθυλοξανθίνη, παραξανθίνη
37U: 3,7-διμεθυλουρικό οξύ
37X: 3,7-διμεθυλοξανθίνη, θεοβρωμίνη