

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής
"ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ"

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ.3.10.02/2002.....
Αριθ. Πρωτ.2398.....

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

"ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΦΕΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ CYP1A2 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ"

Τριμελής Επιτροπή:

Ε. Κ. Ασπροδίνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (επιβλέπουσα)

Ε. Γεωργάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Γ. Νταλέκος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΗΛΙΑΣ ΜΠΕΓΑΣ

Λάρισα Ιούλιος 2002

αρ. εισ. 5/2002



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 635/1
Ημερ. Εισ.: 31/1/2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2002
ΜΠΕ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής
"ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ"

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

"ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΦΕΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ CYP1A2 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ"

Τριμελής Επιτροπή:

Ε. Κ. Ασπροδίνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (επιβλέπουσα)

Ε. Γεωργιάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Γ. Νταλέκος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΗΛΙΑΣ ΜΠΕΓΑΣ

Λάρισα Ιούλιος 2002



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής κ. Ε. Κ. Ασπροδίνη, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. Γ. Νταλέκο, Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας, και κ. Ε. Γεωργάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας για την επίβλεψη και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Α. Μπενάκη, Ομότιμο Καθηγητή Φαρμακολογίας, τον Δρ. Α. Τσακάλωφ, τον κ. Ν. Σακελλαρίδη, Καθηγητή Φαρμακολογίας, τον κ. Θ. Κυλινδρή και τον Δρ. Σ. Λάφη για τη σημαντική συμβολή τους σε διάφορα στάδια της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υπεύθυνη του Προγράμματος Σπουδών Επιλογής «Ιατρική Βιοχημεία» κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, για το ασίγηστο ενδιαφέρον της και τη συνεχή της μέριμνα που είχαν ως αποτέλεσμα την επιτυχή έκβαση και πανθομολογούμενη καταξίωση του Προγράμματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Συντμήσεις.....	4
Περίληψη στα Αγγλικά.....	5
1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1: Γενικά.....	6
1.2: Γονίδια P450	8
1.3: Η οικογένεια του επαγόμενου από τους Πολυκυκλικούς Αρωματικούς Υδρογονάνθρακες (P.A.H.) ανθρώπινου κυτοχρώματος P450 (CYP1)-Υποοικογένεια CYP1A	10
1.4: Καφεΐνη: Γενικές ιδιότητες-απορρόφηση –κατανομή.....	12
1.5: Καφεΐνη: Μεταβολισμός και αποβολή	13
1.5.1: Σχηματισμός ουρακίλης: η αντίδραση ακετυλίωσης	14
1.5.2: Απέκκριση στα ούρα	17
1.6: Προσδιορισμός της ενεργότητας του CYP1A2 με τη χρήση της καφεΐνης	18
1.6.1: Οι κυριότερες μη-επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της ενεργότητας του CYP1A2 με τη χρήση καφεΐνης	
α) Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης	19
β) Ο προσδιορισμός του λόγου 17X/137X στο πλάσμα και στο σίελο και ο προσδιορισμός του λόγου (13X+17X+37X)/137X στο πλάσμα	20
γ) Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα	20
1.7: Ηπατική νόσος και μεταβολισμός της καφεΐνης	29
2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1: Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες	34
2.2: Όργανα και συσκευές	34
2.3: Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων	35
2.4: Διαδικασία υγρής εκχύλισης (Liquid extraction)	36
2.5: Χρωματογραφικές συνθήκες	37
3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1: Διαχωρισμός των μεταβολιτών	38
3.2: Ανάκτηση των μεταβολιτών	39

3.3: Έλεγχος χρωματογραφικού συστήματος	40
3.3.1: Γραμμική απόκριση ανιχνευτή υπεριώδους / ορατού	40
3.3.2: Έλεγχος νεκρού όγκου (dead volume)	42
3.3.3: Έλεγχος αντλίας	42
3.4: Πρότυπες καμπύλες (calibration curves)	43
3.5: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	43
3.6: Όριο ανιχνευσιμότητας – όριο ποσοτικοποίησης	44
4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1: Διαχωρισμός – Χρωματογραφικές συνθήκες	46
4.2: Προκατεργασία δείγματος ούρων – Εκχύλιση	49
4.3: Ποσοτικοποίηση	52
4.4: Κίνδυνοι-Προφυλάξεις	54
5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

CA = καφεΐνη

PX = παραξανθίνη

TB = θεοβρωμίνη

TP = θεοφυλλίνη

137X = 1,3,7-τριμεθυλο-ξανθίνη (καφεΐνη)

137U = 1,3,7-τριμεθυλο-ουρικό οξύ

13X = 1,3-διμεθυλο-ξανθίνη (θεοφυλλίνη)

17X = 1,7-διμεθυλο-ξανθίνη (παραξανθίνη)

37X = 3,7-διμεθυλο-ξανθίνη (θεοβρωμίνη)

13U = 1,3-διμεθυλο-ουρικό οξύ

17U = 1,7-διμεθυλο-ουρικό οξύ

37U = 3,7-διμεθυλο-ουρικό οξύ

1X = 1-μεθυλο-ξανθίνη

3X = 3-μεθυλο-ξανθίνη

7X = 7-μεθυλο-ξανθίνη

1U = 1-μεθυλο-ουρικό οξύ

3U = 3-μεθυλο-ουρικό οξύ

7U = 7-μεθυλο-ουρικό οξύ

AFMU = 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλουρακίλη

AAMU = 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλουρακίλη

Λ.Ε.Δ. = Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο

CYP = Κυτόχρωμα P450

NAT1, 2 = N-ακετυλο-τρανσφεράση 1 και 2

XO = οξειδάση της ξανθίνης

P.A.H. = πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

O.C. = από του στόματος αντισυλληπτικά

RP-HPLC = υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης

I.S. = Εσωτερικό πρότυπο

ABSTRACT

Caffeine metabolism via the N-3 demethylation pathway is sequentially catalyzed by cytochrome P4501A2 (CYP1A2), xanthine oxidase and N-acetyl-transferase. The activity of CYP1A2 can be estimated from the urinary metabolic ratio $\frac{\text{AFMU} + \text{1X} + \text{1U}}{\text{17U}}$ following the ingestion of caffeine. The purpose of the present study was the development of a reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous separation of caffeine and 14 of its metabolites, as well as the quantification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU), 1-methyluric acid (1U), 1-methylxanthine (1X), and 1,7-dimethyluric acid (17U).

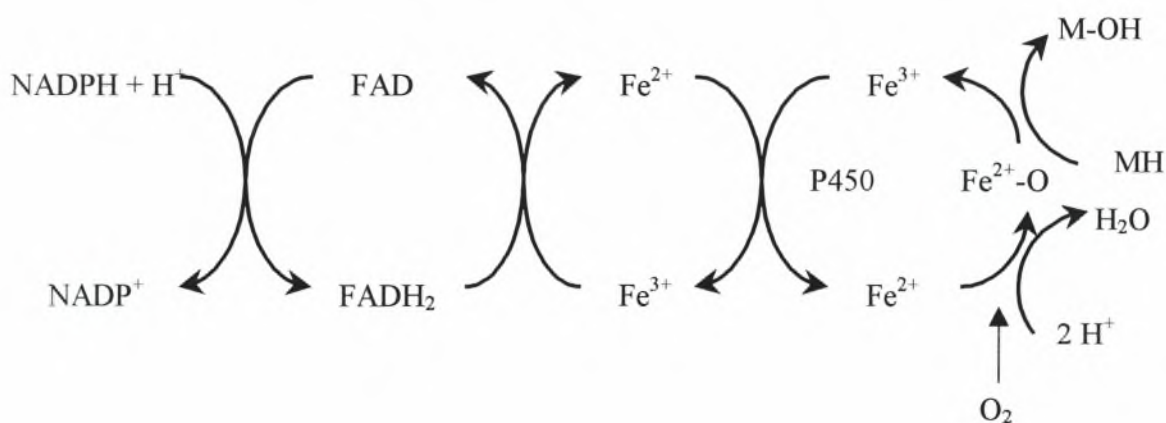
Spiked blank urine samples were extracted with chloroform/isopropanol (85/15, v/v) and the mean recoveries of AFMU, 1U, 1X, and 17U were 73.6%, 65.2%, 94.3%, and 91.7%, respectively. The analytical column, a Kromasil 100 C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm particle size, was operated at ambient temperature and the mobile phase consisted of 0.05% acetic acid, methanol, acetonitrile (92:4:4, v,v,v) delivered at a flow rate of 0.8 ml/min changing to 1.4 ml/min in 11' 30'' time. Compounds were monitored at 280 nm and 4-acetamidophenol was used as internal standard (I.S.). Calibration curves were constructed by plotting peak height ratios of the four metabolites to the I.S. versus theoretical concentrations and were linear at a range 10-400 μM . The statistical evaluation of the method was examined performing intra-day (n=3) and inter-day (n=5) measurements at low (35 μM), medium (150 μM), and high (300 μM) concentration levels. The coefficients of variation were <5.3% and <17% respectively and the accuracy within -8.4% and 14.9%. The limit of detection was 1 μM and the limit of quantification was set at 10 μM for the four metabolites.

It is concluded that the HPLC method developed in the present study is analytically reliable and may be a useful tool for assessing CYP1A2 activity. Thus, by collecting spot urine samples at a time point 8 hours following the consumption of two cups of a strong coffee (~ 200 mg caffeine), CYP1A2 activity can be determined both in healthy subjects and in patients with liver disease.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν σε διάφορα μεμβρανώδη συστατικά, συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων που εξυπηρετούν διάφορους σκοπούς. Έτσι, στις μικροσωματικές μεμβράνες, δηλαδή στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (Λ.Ε.Δ.), υπάρχουν οι λεγόμενες οξειδάσες μικτής λειτουργίας που κύριος στόχος τους είναι η υδροξυλίωση υποστρωμάτων (Γεωργάτσος, 1993). Το άτομο Οξυγόνου της ενσωματούμενης στο υπόστρωμα υδροξυλομάδας προέρχεται από το O_2 μάλλον παρά από το H_2O όπως έχει δειχθεί με τη χρήση ραδιενεργά σημασμένου O_2 και H_2O με ^{18}O . Η υδροξυλίωση απαιτεί την ενεργοποίηση του O_2 η οποία γίνεται μέσω μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην οποία το NADPH μεταφέρει τα υψηλού δυναμικού ηλεκτρόνια του σε μία φλαβοπρωτεΐνη τα οποία στη συνέχεια μεταβιβάζονται στην αδρενοδοξίνη, μία πρωτεΐνη με μη αιμικό σίδηρο. Η αδρενοδοξίνη μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στη οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος P450 το οποίο ανάγεται. Η ανηγμένη μορφή του P450 στη συνέχεια ενεργοποιεί το O_2 (Stryer, 1997; Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης μιας οξειδάσης μικτής λειτουργίας. P450 είναι το κυτόχρωμα του συστήματος και MH ο μεταβολίτης που υδροξυλιώνεται (Γεωργάτσος, 1993)

Το κυτόχρωμα P450, το οποίο ονομάζεται έτσι επειδή το σύμπλοκο του με CO απορροφά ισχυρά στα 450 nm (Γεωργάτσος, 1993), είναι μία αιμοπρωτεΐνη ενσωματωμένη στο τοίχωμα του Λ.Ε.Δ. στο οποίο εγκλωβίζονται όλες οι λιποδιαλυτές ενώσεις που το διαπερνούν λόγω της λιποειδικής φύσης των μεμβρανών του (Μισιρλή, 1999). Μερικές από τις αντιδράσεις που καταλύει το σύστημα αυτό είναι απαραίτητες για τη ζωή όπως η

μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες (Γεωργάτσος, 1993). Άλλες πάλι αντιδράσεις του συστήματος αυτού είναι σημαντικές για την αποτοξίνωση από ξένες ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) και για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων (Olson, 1997). Οι ξένες ουσίες που μεταβολίζονται γίνονται κατά κανόνα λιγότερο λιποδιαλυτές γιατί αποκτούν στο μόριό τους ιονιζόμενες ομάδες. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού οι μεταβολίτες χάνουν την ικανότητά τους να διαχέονται παθητικά μέσα από βιολογικές μεμβράνες και απεκκρίνονται περισσότερο με μηχανισμούς ενεργητικής μεταφοράς (Μισιρλή, 1999).

Οι μεταβολικές αντιδράσεις διακρίνονται σε δύο ομάδες:

Αντιδράσεις φάσης I: Αφορούν στη βιομετατροπή μιας ουσίας σε έναν περισσότερο πολικό μεταβολίτη εισάγοντας ή αποκαλύπτοντας μία λειτουργική ομάδα (όπως -OH, -NH₂, -SH). Οι οξειδώσεις είναι οι πλέον συνήθεις αντιδράσεις ακολουθούμενες από τις αναγωγές και τις υδρολύσεις. Οι οξειδώσεις, ειδικότερα, περιλαμβάνουν:

- α) υδροξυλίωση αρωματικού δακτυλίου
- β) υδροξυλίωση αλειφατικής αλυσίδας
- γ) N-, O- και S- απαλκυλίωση (απομάκρυνση μεθυλικής ή αιθυλικής ομάδας από ένα άτομο αζώτου, οξυγόνου ή θείου)
- δ) σχηματισμό αζωτοξειδίων και αζωτουδροξυλίων
- ε) σχηματισμό σουλφοξειδίων
- στ) οξειδωτική απαμίνωση
- ζ) οξειδωτική αποσουλφορυλίωση

Αντιδράσεις φάσης II: Οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τη φάση I και δεν είναι επαρκώς πολικοί για να απεκκριθούν από τους νεφρούς γίνονται περισσότερο πολικοί μετά από σύζευξη με ενδογενή υδατοδιαλυτά μόρια του οργανισμού που βρίσκονται στο ήπαρ (γλυκουρονικό, αμινοξέα, γλουταθειόνη,θειικό κλπ) (Μισιρλή, 1999).

Τα μικροσωμακά ένζυμα παρουσιάζουν το φαινόμενο της επαγωγής μετά από χορήγηση ενός μεγάλου αριθμού ουσιών. Διάφορα φάρμακα, εντομοκτόνα, προσθετικά τροφών, καρκινογόνες ενώσεις κλπ έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν το ρυθμό μεταβολισμού τους μετά από επανειλημμένη χορήγηση, ή το μεταβολισμό άλλων ουσιών ή και φυσιολογικών συστατικών του οργανισμού. Δε φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ της δομής και της ικανότητας των πολλαπλών αυτών ουσιών να επάγουν τα μικροσωμακά ένζυμα. Η μόνη τους κοινή ιδιότητα είναι η λιποδιαλυτότητά τους. Η επαγωγή οφείλεται σε πρωτεϊνική σύνθεση νέων μικροσωμακικών ενζύμων και μπορεί να παρεμποδιστεί με πουρομυκίνη (Μισιρλή, 1999). Η επαγωγή αποτελεί απάντηση στην παρουσία μιας χημικής

ουσίας η οποία μεταβολίζεται από το P450 (περισσότερο ένζυμο παράγεται για να αντεπεξέλθει σε αυτό το χημικό φορτίο). Όταν το ένζυμο επαχθεί, θα μεταβολίσει τον επαγωγικό παράγοντα περισσότερο. Επειδή το κυτόχρωμα P450 δεν είναι ειδικό για τον επαγωγέα, φάρμακα που επίσης μεταβολίζονται από το επαχθέν ένζυμο θα μεταβολιστούν επίσης ταχύτερα. Η ανοχή προς την αλκοόλη είναι ένα κοινό παράδειγμα επαγωγής του P450 καθώς η αλκοόλη μεταβολίζεται από το P450 (Olson, 1997), όπως επίσης και η αύξηση των επιπέδων του μετά από έκθεση στις χημικές ουσίες που εισπνέονται κατά τη διάρκεια του καπνίσματος τσιγάρων και πούρων (McKinnon and Evans, 2000). Αντίθετα, ορισμένα φάρμακα προκαλούν, μερικές φορές, αναστολή της δραστηριότητας του μικροσωμιακού ενζύμου με αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης φαρμάκων που μεταβολίζονται από το ίδιο ένζυμο (Neal, 2000).

1.2: Γονίδια P450

Στον άνθρωπο απαντώνται κατά προσέγγιση 50 λειτουργικά γονίδια του κυτοχρώματος P450. Παρόλη αυτή την πληθώρα γονιδίων, ο κύριος όγκος του μεταβολισμού των φαρμάκων καταλύεται από ένα μικρό σχετικά αριθμό ενζύμων P450 τα οποία ανήκουν στις οικογένειες 1, 2 και 3. Τα επικρατούντα ένζυμα του συστήματος P450 που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων είναι τα CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A4. Το ένζυμο CYP1A2 εμπλέκεται στο μεταβολισμό πολλών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων της θεοφυλλίνης, της καφεΐνης και της τακρίνης. Επιπλέον, το ανθρώπινο ένζυμο CYP1A2 ενέχεται στο μεταβολισμό μίας πληθώρας υποστρωμάτων σημαντικών από τοξικολογικής πλευράς που περιλαμβάνουν μεταλλαξιγόνα προερχόμενα από τις τροφές και προϊόντα διαδικασιών καύσης (McKinnon and Evans, 2000).

Έχει παρατηρηθεί σημαντική ποικιλότητα, όσον αφορά την ενεργότητα, μεταξύ των διαφόρων ατόμων στα επίπεδα του ανθρώπινου ενζύμου CYP1A2 σε διάφορους πληθυσμούς (Carrillo and Benitez, 1996; Carrillo and Benitez, 1994; Grant *et al.*, 1983; Kalow, 1985). Για παράδειγμα, μελέτες που χρησιμοποιούν την καφεΐνη ως πρότυπο υπόστρωμα για το CYP1A2 αποκαλύπτουν μια τρικόρυφη (trimodal) κατανομή της ενζυμικής δραστηριότητας η οποία είναι σύμφωνη με φαινοτύπους ταχέων, μέσων και βραδέων μεταβολιστών (Tang *et al.*, 1994; Butler *et al.*, 1992). Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, σε μία άλλη μελέτη, δεν υπήρξαν ενδείξεις για πολυμορφική δραστηριότητα του CYP1A2 (Welfare *et al.*, 1999). Αυτή η ποικιλότητα αντανακλάται στη φαρμακοκινητική των φαρμάκων που είναι υποστρώματα για το CYP1A2 και μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές

επιπτώσεις στο βαθμό που φάρμακα που μεταβολίζονται ή συνδέονται στο ίδιο ένζυμο έχουν υψηλό δυναμικό για φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις.

Η ποικιλότητα στα γονίδια του P450 μπορεί να προσδιοριστεί στο επίπεδο του φαινότυπου με τη διερεύνηση της ενζυμικής ενεργότητας ή στο επίπεδο του γονότυπου με τη διερεύνηση των αλληλομόρφων. Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός επιτελείται συνήθως με τη συλλογή των ούρων κατόπιν χορηγήσεως ενός κατάλληλου υποστρώματος (probe drug, όπως η καφεΐνη) και του υπολογισμού ενός σχετικού μεταβολικού λόγου (Asprodini *et al.*, 1998). Η χρήση μεταβολικών λόγων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ενός ηπατικού ενζύμου πηγάζει από την εργασία του Evans *et al.* (1960) οι οποίοι χρησιμοποίησαν το λόγο της ισονιαζίδης του πλάσματος προς τον ακετυλιωμένο μεταβολίτη της ως δείκτη του βαθμού της ακετυλίωσης. Επίσης, οι Maghoub *et al.*, (1977) χρησιμοποίησαν το λόγο της δεβριζοκίνης προς τον κυριότερο μεταβολίτη της, την 4-OH-δεβριζοκίνη, για να προσδιορίσουν τη δραστηριότητα του CYP2D6. Οι βραδείς (πτωχοί) μεταβολιστές θα έχουν, τυπικά, ένα πολύ χαμηλότερο λόγο του μεταβολίτη στα ούρα απ' ό,τι οι έντονοι (ταχείς) μεταβολιστές. Η μέθοδος των μεταβολικών λόγων δίνει μία ένδειξη για την ενζυμική δραστηριότητα αλλά δεν μπορεί να υποδείξει εάν η ποικιλότητα οφείλεται σε γενετικές ή άλλες αιτίες. Η εμφάνιση μέσα σ' έναν πληθυσμό μιας ξεκάθαρης δικόρυφης ή τρικόρυφης κατανομής των μεταβολικών λόγων, που αντανακλούν την ενζυμική δραστηριότητα, υποδεικνύει έντονα την παρουσία γενετικού πολυμορφισμού. Παρόλα αυτά, σε ατομικό επίπεδο, και άλλοι παράγοντες, όπως η διαίτα και η ταυτόχρονη φαρμακοθεραπεία, μπορούν να έχουν επίπτωση στους μεταβολικούς λόγους. Ο προσδιορισμός του γονότυπου δίνει άμεσες πληροφορίες για το ποια αλληλόμορφα του P450 είναι παρόντα, αλλά η ακριβής του ερμηνεία απαιτεί κατανόηση της σχέσης μεταξύ ενός δεδομένου γονότυπου και του αντίστοιχου φαινότυπου (McKinnon and Evans, 2000).

Παρόλη τη λεπτομερή έρευνα, όσον αφορά τον πολυμορφισμό, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια μεταβλητότητα στην κωδικοποιούσα περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου CYP1A2 εκτός από μια πρόσφατη παρατήρηση για μια σπάνια μετάλλαξη σ' έναν κινεζικό πληθυσμό (Huang *et al.*, 1999). Εάν η γενετική μεταβλητότητα αποτελεί τη βάση της παρατηρούμενης ποικιλότητας στα επίπεδα του CYP1A2, τότε αυτή μάλλον εμπλέκει ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου του CYP1A2. Πράγματι, έχουν παρατηρηθεί διάφορες αλλαγές σ' αυτές τις περιοχές του γονιδίου CYP1A2, παρόλο που η κλινική τους σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη (McKinnon and Evans, 2000). Καθόσον λοιπόν υπάρχει απουσία λειτουργικά σημαντικών γενετικών πολυμορφισμών, έχει προταθεί ότι ιδιοσυστατικοί και

περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για τη μεγάλη ποικιλότητα του ανθρώπινου CYP1A2 μεταξύ των διαφόρων ατόμων.

1.3: Η οικογένεια του επαγόμενου από τους Πολυκυκλικούς Αρωματικούς Υδρογονάνθρακες (P.A.H.) ανθρώπινου κυτοχρώματος P450 (CYP1)-Υποοικογένεια CYP1A

Η υποοικογένεια του ανθρώπινου, επαγόμενου από τους PAHs, κυτοχρώματος CYP1A αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα ισοένζυμα CYP1A1 και CYP1A2. Παρόλο που υπάρχει μία φαινομενική εκλεκτικότητα για κάποιες ενώσεις, και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις (Tassaneeyakul *et al.*, 1993). Το CYP1A1 εκφράζεται κυρίως σε εξωηπατικούς ιστούς ενώ, αντίθετα, το CYP1A2 είναι ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ σε ποσοστό περίπου 15% του συνολικού περιεχομένου σε CYP (Shimada *et al.*, 1994). Το ανθρώπινο CYP1A2, μαζί με το CYP1A1, ενεργοποιούν μεταβολικά ένα μεγάλο αριθμό προκαρκινικών ουσιών προς ενεργά ενδιάμεσα τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κυτταρικά πυρηνόφιλα και να πυροδοτήσουν τελικά την καρκινογένεση (Guenegerich *et al.*, 1990). Επιπλέον, το ανθρώπινο CYP1A2 είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό διαφόρων, κλινικά σημαντικών, φαρμάκων. Προς το παρόν, η ρύθμιση της έκφρασης του CYP1A2 δεν έχει τόσο καλά χαρακτηριστεί όπως αυτή για το CYP1A1. Το κάπνισμα έχει μία δόσοεξαρτώμενη επαγωγική δράση στο CYP1A2 (Carrillo and Benitez., 1996; Kalow and Tang, 1991a; Catteau *et al.*, 1995). Η επαγωγή του CYP1A2 από τους PAHs είναι κυρίως μεταγραφική και εμπλέκει τον υποδοχέα Ah όπως επίσης και άλλους άγνωστους παράγοντες (Waxman, 1999). Η διαδικασία αυτή αρχίζει με τη σύνδεση ενός κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Ah) ή υποδοχέα διοξίνης και μετατόπιση μέσα στον πυρήνα. Η μεταγραφική διαδικασία περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων: ετεροδιμερισμό, εξαρτώμενο από το συνδέτη, μεταξύ του υποδοχέα Ah και μιας πρωτεΐνης πυρηνικής μετατοπίσεως και αλληλεπίδραση του ετεροδιμερούς με έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξеноβιοτικά (xenobiotic-responsive enhancer). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του CYP1A2, σύνθεση του κατάλληλου mRNA και *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2.

Το CYP1A2 μπορεί επίσης να επαχθεί από κρέας ψημένο στα κάρβουνα (Sinha *et al.*, 1994; Sinha and Rothman, 1999) και από υψηλή πρόσληψη σταυρανθών (cruciferous) λαχανικών όπως είναι τα μπρόκολα και τα λαχανάκια Βρυξελλών (Brussels sprouts) (Vistisen *et al.*, 1991; Vistisen *et al.*, 1992).

Η επαγωγή του CYP1A2 φαίνεται επίσης ότι σχετίζεται με μεγάλη διαιτητική κατανάλωση καφεΐνης και προκαλείται είτε από την καφεΐνη είτε από άλλα συστατικά του καφέ (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999; LeMarchand *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 1994).

Παραδόξως, ο δείκτης σωματικής μάζας δείχθηκε ότι είναι πηγή ποικιλότητας του CYP1A2 και ως εκ τούτου, η κάθαρση τη καφεΐνης είναι μεγαλύτερη στα λεπτά άτομα σε σύγκριση με τα παχύσαρκα (στη βάση ml/min/kg σωματικού βάρους) (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999). Η επαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μείωση των φαρμακολογικών δράσεων η οποία προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό του φαρμάκου ή να δημιουργήσει μία ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης (toxification and detoxification) (Waxman, 1999; Lin and Lu, 1998; Smith *et al.*, 1998). Πράγματι, δεν είναι ξεκάθαρο 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 (Guengerich *et al.*, 1990; Waxman, 1999; Lin and Lu, 1998; Smith *et al.* 1998).

Αντίστροφα, ο χυμός γκρεΐφρουτ και τα συστατικά του (Fuhr *et al.*, 1993), το αλκοόλ (Le Marchand *et al.*, 1997; Rizzo *et al.*, 1997) όπως επίσης και η ηπατική νόσος (Denaro *et al.*, 1996) έχουν ανασταλτική δράση στο CYP1A2.

Διάφοροι συγγραφείς (Carrillo and Benitez, 1996; Tantcheva-Poór *et al.*, 1999; Relling *et al.*, 1992; Krul and Hageman, 1998) έχουν βρει διαφορές της δραστηριότητας του CYP1A2 ανάμεσα στα δύο φύλα (σε υγιείς εθελοντές) με τις γυναίκες να έχουν χαμηλότερες τιμές. Επιπλέον, βρέθηκε ότι γυναίκες που δεν είναι καπνίστριες βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο τοξικότητας από καφεΐνη (Carrillo and Benitez, 1996). Πέραν τούτου, άλλοι παράγοντες που είναι ειδικοί για το φύλο, όπως η φάση του εμμηνορρυσιακού (menstrual) κύκλου (Lane *et al.*, 1992; Aldridge *et al.*, 1981) και η εγκυμοσύνη (Aldridge *et al.*, 1981) φαίνεται να επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική των υποστρωμάτων του CYP1A2 (Πίνακας 1).

Παρόλη την απουσία ενός καθορισμένου γενετικού πολυμορφισμού του CYP1A2, οι ενεργότητες του CYP1A2 στα διάφορα άτομα μετρώνται, προς το παρόν, με φαινοτυπική ανάλυση. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εξεύρεση ενός αξιόπιστου φαρμάκου-ανιχνευτή (probe drug) το οποίο να μπορεί να μετρήσει την ενεργότητα του CYP1A2. Η καφεΐνη έχει γίνει δημοφιλής ως ένα *in vivo* μεταβολικό φάρμακο-ανιχνευτής για τα ανθρώπινα ένζυμα που μεταβολίζουν τα ξενοβιοτικά. Η NAT2 και η οξειδάση της ζανθίνης μπορούν επίσης να προσδιοριστούν με τη χρήση αυτού του ανιχνευτή *in vivo* (Carrillo and Benitez, 1994; Kalow and Tang, 1993).

Πίνακας 1. Μη φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι αναφέρεται ότι επιδρούν στη μεταβολική δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 (CYP) στους ανθρώπους. (Carrillo and Benitez, 2000)

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 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	↓
Ειδικοί του φύλου	
Εμμηνορρυσιακός κύκλος?	↓ (ωχρινική φάση)
Εγκυμοσύνη	↓
Κάπνισμα	↑

?=όχι πλήρως ξεκαθαρισμένο: ↑ = αύξηση; ↓ = μείωση; ↔ = καμία επίδραση

1.4: Καφεΐνη: Γενικές ιδιότητες-απορρόφηση –κατανομή

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμέθυλοξανθίνη) είναι το φάρμακο με τη μεγαλύτερη κατανάλωση μεταξύ των ανθρώπων και η πρόσληψή της έχει γίνει μέρος των διαιτητικών συνηθειών σε τέτοιο βαθμό ώστε η χρήση της γενικώς να θεωρείται ασφαλής. Η καφεΐνη είναι δημοφιλής επειδή η δράση της σχετίζεται με τη 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, η καφεΐνη όταν καταναλώνεται σε μακροπρόθεσμη βάση ενοχοποιείται για διάφορες

κλινικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, διαταραχές της αναπαραγωγής, οστεοπόρωση, καρκινογένεση, ψυχιατρικές διαταραχές και προδιάθεση για κατάχρηση φαρμάκων (Carrillo and Benitez, 2000).

Η καφεΐνη, όταν χορηγείται από το στόμα, απορροφάται ταχέως και πλήρως από το γαστρεντερικό σωλήνα (Blanchard and Sawers, 1983) και η μέγιστη συγκέντρωση της (C_{max}) επιτυγχάνεται σε μια ώρα περίπου (Carrillo *et al.*, 2000) χωρίς να συμβαίνει σημαντική μετατροπή πρώτης διόδου. 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 (Bonati *et al.*, 1984). Έτσι, δεν παρατηρείται συσσώρευση της καφεΐνης σε κάποια όργανα και ιστούς και η παρουσία της ανιχνεύεται σε όλα τα σωματικά υγρά. Εισέρχεται στο σίελο, στο σπέρμα, στο μητρικό γάλα και στη χολή. Πράγματι, ο προσδιορισμός της καφεΐνης στο σίελο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μια έγκυρη και μη επεμβατική εναλλακτική μέθοδος παρακολούθησης των συγκεντρώσεων της καφεΐνης σε σχέση με τον προσδιορισμό της στον ορό (Zylber-Katz *et al.*, 1984; Fuhr and Rost, 1994).

1.5: Καφεΐνη: Μεταβολισμός και αποβολή

Ο μεταβολισμός της καφεΐνης παρουσιάζει μεγάλη περιπλοκότητα εξαιτίας της συμμετοχής ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων και ενδιάμεσων προϊόντων (Εικόνα 2). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 25 μεταβολίτες στον άνθρωπο (Somani and Gupta, 1988). *In vivo* (Carrillo *et al.*, 2000; Lelo *et al.*, 1986; Carrillo and Benitez, 1994) και *in vitro* (Gu *et al.*, 1992) μελέτες έδειξαν ότι η καφεΐνη αποβάλλεται κυρίως μέσω N-3 απομεθυλίωσης προς 17X (παραξανθίνη; Εικόνα 3). Όταν λαμβάνονται υπ' όψιν μόνον οι μεταβολικές οδοί της απομεθυλίωσης, τότε η παραπάνω αντίδραση ευθύνεται, κατά προσέγγιση, για το 84% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Ο σχηματισμός της 37X (θεοβρωμίνη) (N-1 απομεθυλίωση) και της 13X (θεοφυλλίνη) (N-7 απομεθυλίωση) ευθύνονται, κατά προσέγγιση, για το 11% και 5% αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίωσεων της καφεΐνης (Lelo *et al.*, 1986; Gu *et al.*, 1992).

Η ηπατική N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται ειδικά από το CYP1A2 (Gu *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 1989; Berthou *et al.*, 1991). Επιπρόσθετα, το CYP1A2 συμμετέχει επίσης στις N-1 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 στη δραστηριότητα του CYP1A2

και αποδίδεται στην καταλυτική δράση του CYP2E1, του CYP που επάγεται από την αιθανόλη (Gu *et al.*, 1992).

Κάθε μία από τις τρεις διμεθυλο-ξανθίνες (17X, 13X, 37X) μπορεί να απομεθυλωθεί περαιτέρω προς μονομεθυλο-ξανθίνες (1X, 7X, 3X) (Birkett *et al.*, 1985; Gu *et al.*, 1992; Lelo *et al.*, 1989). Η 17X ειδικότερα, υδροξυλιώνεται προς 17U και απομεθυλιώνεται προς 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 1U από την οξειδάση της ξανθίνης με τη συμμετοχή του CYP1A2 (Grant *et al.*, 1986; εικόνα 2).

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 (Kalow and Tang, 1993).

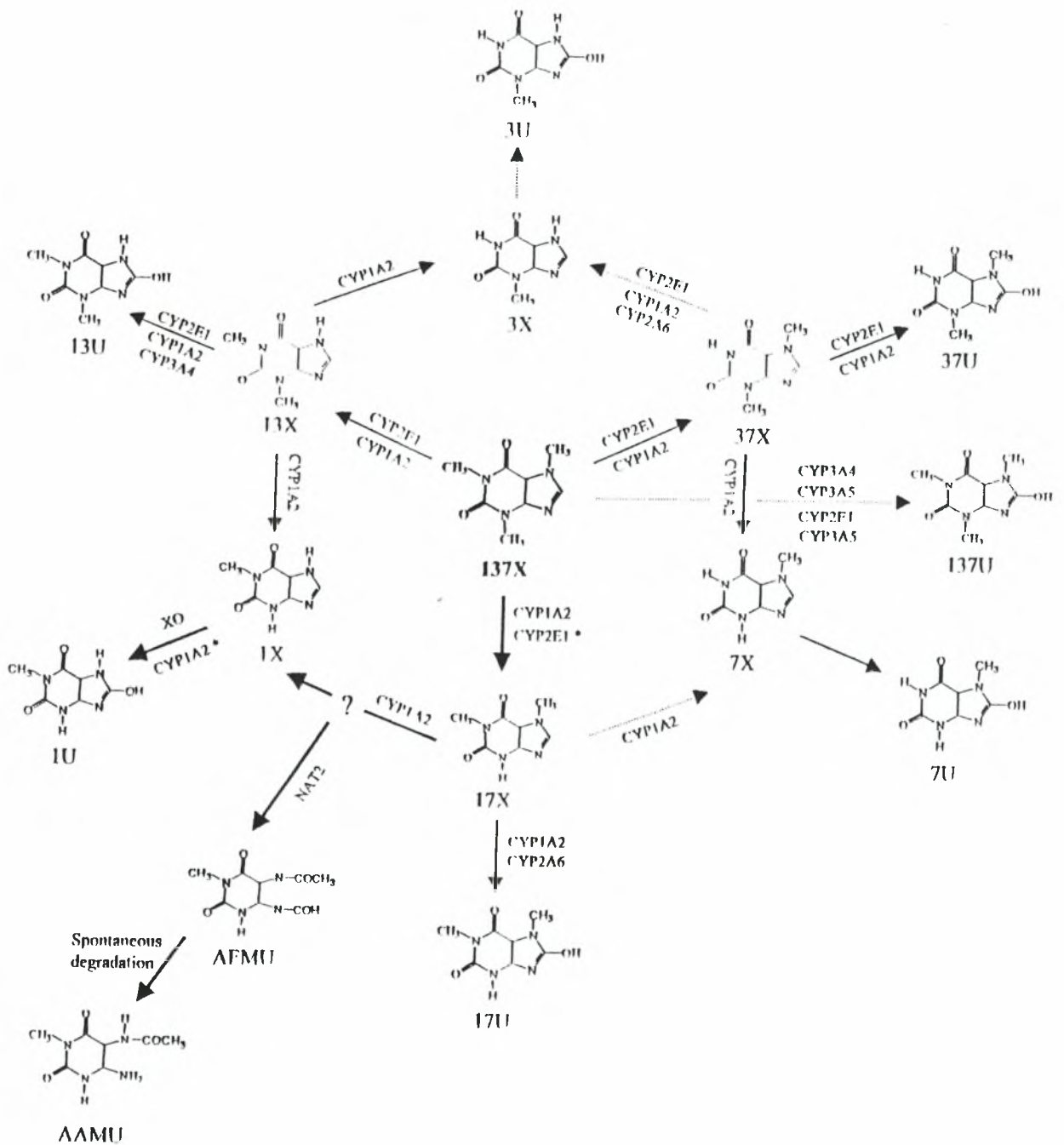
Σ' αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι το CYP1A2 είναι σε θέση να καταλύει πρακτικώς όλες τις οξειδωτικές αντιδράσεις της καφεΐνης και των μεταβολιτών της (Gu *et al.*, 1992) παρόλο που αυτό συμβαίνει, σχεδόν πάντα, σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα (εκτός από την N-3 απομεθυλίωση της CA και την N-7 απομεθυλίωση της PX). 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 οξειδάση της ξανθίνης με τη συμμετοχή του CYP1A2 (Grant *et al.*, 1986).

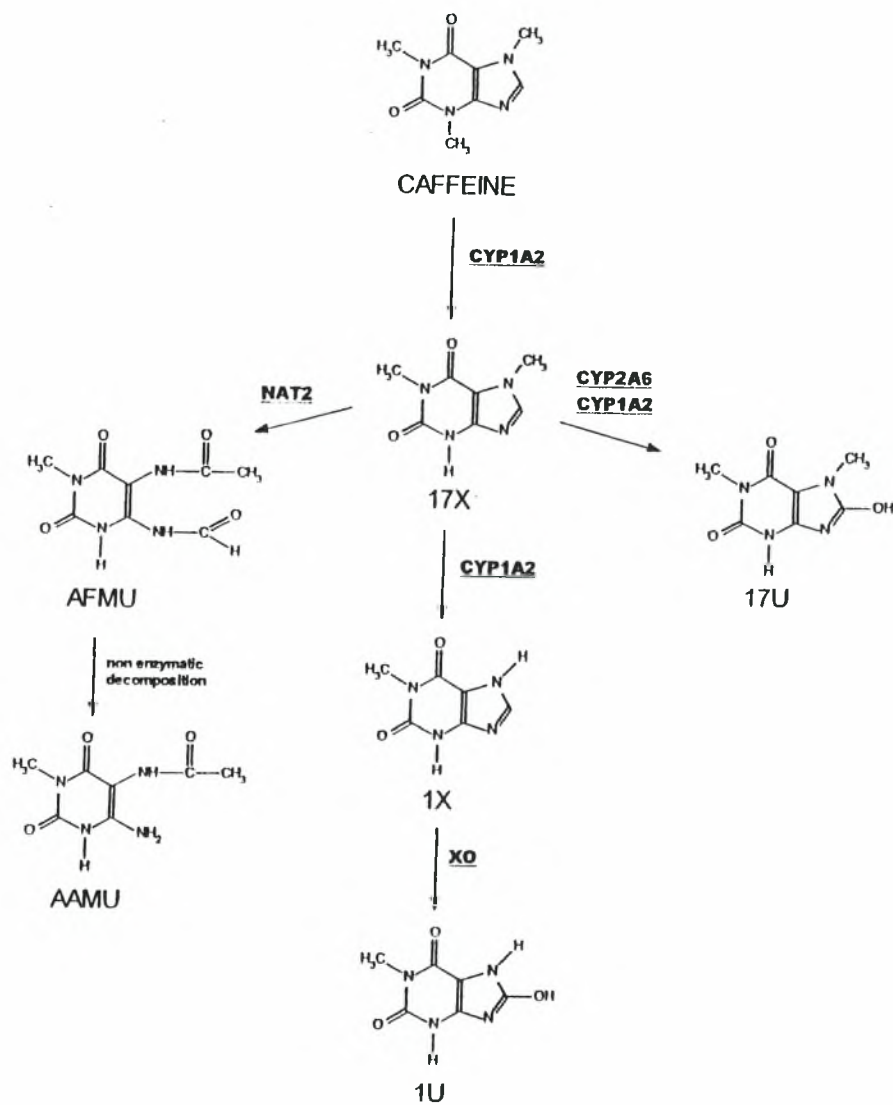
2) το CYP2A6 είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U με σημαντική συμμετοχή του CYP1A2 η οποία επηρεάζει την ερμηνεία των δεδομένων που χρησιμοποιούν το 17U ως μεταβολικό δείκτη (Gu *et al.*, 1992).

1.5.1: Σχηματισμός ουρακίλης: η αντίδραση ακετυλίωσης

Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα προϊόντα μεταβολισμού της CA με ανοιχτό δακτύλιο αλλά μόνο το AFMU, το οποίο προέρχεται από την οδό της 17X είναι ποσοτικώς σημαντικό στα ούρα μετά από πρόσληψη CA (Grant *et al.* 1983; Lelo *et al.*, 1986; εικόνα 3). Η 7-απομεθυλίωση της 17X συνεχίζει μέσω σχηματισμού ενός ασταθούς ενδιάμεσου με ανοιχτό δακτύλιο το οποίο είτε σταθεροποιείται με ακετυλίωση ως AFMU είτε 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-ακετυλο-τρανσφεράση το οποίο αναφέρεται ως



Εικόνα 2. Μεταβολικοί 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 κανονός 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 στη μεταβολική οδό.



Εικόνα 3. Κύριες μεταβολικές οδοί του μεταβολισμού της καφεΐνης στον άνθρωπο.

NAT2 για να διακρίνεται από το NAT1 που έχει ταυτοποιηθεί ξεχωριστά (Kalow and Tang, 1993).

Το AFMU μπορεί αυθόρμητα να αποβάλει τη φορμυλο-ομάδα και να δώσει 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλουρακίλη (AAMU). Η μετατροπή είναι γενικώς βραδεία αλλά επιταχύνεται με αύξηση του pH (Tang *et al.*, 1983). Κλινικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι αυτή η μετατροπή συμβαίνει σε σημαντικό βαθμό μέσα στην ουροδόχο κύστη σε μερικά κατ' εξαίρεση άτομα, αλλά δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτό συμβαίνει εξαιτίας του υψηλού pH των ούρων ή εξαιτίας διαφόρων συστατικών των ούρων που ενισχύουν τη δράση του pH (Kalow and Tang, 1993).

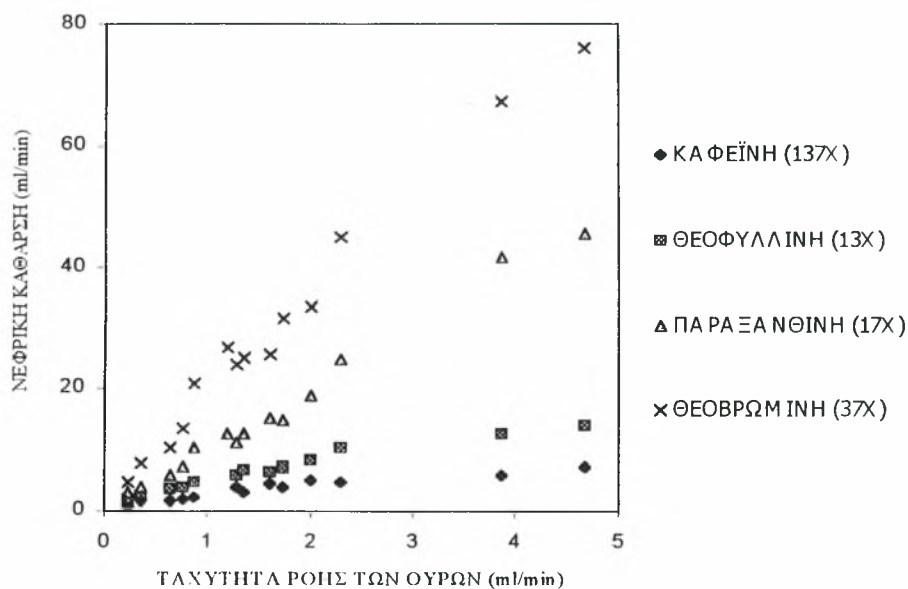
1.5.2: Απέκκριση στα ούρα

Οι κυριότεροι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα είναι το 1U, η AFMU, η 1X, το 17U και η 17X. Μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-2%) της χορηγούμενης δόσης στον άνθρωπο απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα (Bonati *et al.*, 1982; Carrillo and Benitez, 1994).

Νεφρικοί παράγοντες, όπως η ταχύτητα ροής των ούρων, παράλληλα με τη μεταβολική ποικιλότητα, παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της τύχης της καφεΐνης και κάποιων από τους μεταβολίτες της *in vivo*. Εξάρτηση από τη ροή σημαίνει ότι η ποσότητα των υγρών που λαμβάνονται από ένα άτομο μπορεί να επηρεάσει τη νεφρική απέκκριση των μεθυλοξανθινών, δεν υπάρχει όμως συγκεκριμένος κανόνας που να ερμηνεύει την εμπλοκή της ενεργού σωληναριακής απέκκρισης σε συνάρτηση με τη διήθηση και τη διάχυση στο νεφρό (Kalow and Tang, 1993). Συγκεκριμένα, η νεφρική κάθαρση της καφεΐνης αυξάνεται κατά 3,4 φορές όταν η ταχύτητα ροής των ούρων αυξάνεται από 0,6 σε 3,2 ml/min (Kalow and Tang, 1993). **Γι' αυτό το λόγο, η συγκέντρωση της καφεΐνης στα ούρα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε διαφοροποιήσεις του χρόνου συλλογής του δείγματος των ούρων.**

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 μ' αυτά που καταναλώνουν τακτικά μεγάλες ποσότητες (Carrillo *et al.*, 2000). Τα νεογέννητα αποβάλλουν την καφεΐνη με πολύ αργό ρυθμό παρουσιάζοντας χρόνους ημισείας ζωής με μέσο όρο τις 100 ώρες (Benowitz, 1990).

Οι 17X, 13X και 37X φαίνεται ότι έχουν ομοιότητες όσον αφορά τη νεφρική απέκκριση. Η απέκκρισή τους εξαρτάται από τη ροή των ούρων και η νεφρική τους κάθαρση είναι υψηλότερη απ' αυτή της καφεΐνης (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Συσχέτιση ανάμεσα στην ταχύτητα της ροής των ούρων και τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και των τριών διμεθυλο-ξανθινών σε ένα άτομο μετά από μεμονωμένη δόση καφεΐνης (Tang-Liu *et al.*, 1983).

Οι μονο-μεθυλοξανθίνες 3X, 7X, τα ουρικά οξέα και οι ουρακίλες δύσκολα μπορούν να μετρηθούν στο αίμα ή στο πλάσμα εξαιτίας των χαμηλών τους συγκεντρώσεων, αλλά μπορούν εύκολα να μετρηθούν στα ούρα. Έχουν προσδιοριστεί οι νεφρικές καθάρσεις των 3X, 1U και 13U και δείχθηκε ότι ξεπερνούν κατά πολύ τις ταχύτητες πειραματικής διήθησης (GFR) αποδεικνύοντας έτσι ότι υπάρχει επιπρόσθετη αποβολή μέσω σωληναριακής απέκκρισης (Tang-Liu *et al.*, 1983). Η νεφρική κάθαρση αυτών των ενώσεων είναι τόσο ταχεία που κάθε ατομική διαφορά είναι ασήμαντη σε σύγκριση με άλλες διαδικασίες που αφορούν την CA. Οι μεταβολίτες αυτοί, μόλις σχηματίζονται, αποβάλλονται αμέσως στα ούρα και γι' αυτό το λόγο είναι πολύ καλοί δείκτες των μεταβολικών διαδικασιών (Kalow and Tang, 1983).

1.6: Προσδιορισμός της ενεργότητας του CYP1A2 με τη χρήση της καφεΐνης

Το CYP1A2 απαντάται στο ήπαρ αλλά όχι στα κύτταρα του αίματος (Ikeya *et al.*, 1989). Γι' αυτό το λόγο ο προσδιορισμός της ενζυμικής του παρουσίας με τη 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. Καθώς υπάρχει έλλειψη δειγμάτων βιοψίας ήπατος για συγκριτικές μελέτες, ο ποσοτικός προσδιορισμός της μερικής κάθαρσης της CA μέσω σχηματισμού της

17X αποτελεί το πρότυπο όταν πρόκειται να αναπτυχθούν απλοποιημένες μέθοδοι για την εκτίμηση της ενεργότητας του CYP1A2. Η μερική κάθαρση της 17X με τη χρήση CA μπορεί να υπολογιστεί είτε από δεδομένα των εμβαδών κάτω από την καμπύλη χρόνου-συγκέντρωσης (AUC) μετά από χορήγηση μεμονωμένης δόσης CA (Bonati *et al.*, 1982), είτε από μελέτες σταθερής κατάστασης (steady state) CA και μετρήσεις κάθαρσης των 17X, 37X και 13X στο πλάσμα (Lelo *et al.*, 1986).

Μετρήσεις της συστηματικής κάθαρσης της CA μπορούν να χρησιμεύσουν ως βολικό πρότυπο για περαιτέρω ανάπτυξη μεθόδων. Επειδή ο σχηματισμός της 17X ευθύνεται, κατά μέσον όρο, για το 80% και πλέον της κάθαρσης της CA από το πλάσμα (Lelo *et al.*, 1986), η συνολική συμμετοχή του CYP1A2 στο μεταβολισμό της CA ευθύνεται για το περισσότερο από το 95% της κάθαρσης της CA από το αίμα, στη μεγάλη πλειοψηφία των ατόμων.

1.6.1: Οι κυριότερες μη-επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της ενεργότητας του CYP1A2 με τη χρήση καφεΐνης

α) Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης

Χορηγείται μια ακριβής δόση CA με επισημασμένο ^{13}C άτομο στην 3-μεθυλική ομάδα του μορίου και μετράται η δίωρη σωρευτική εκπονή ραδιοεπισημασμένου CO_2 (Lambert *et al.*, 1986; Lambert *et al.*, 1990). Έρευνες σε αρουραίους έχουν δείξει την κατά βάση εγκυρότητα της δοκιμασίας αναπνοής της CA (Wietholz *et al.*, 1981). Έχει σημασία ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων της αναπνοής προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση της μέτρησης από την 3-απομεθυλίωση της 37X και της 13X. Τα άτομα πρέπει να βρίσκονται σε ηρεμία για να επιτευχθεί μια σταθερή βασική κατάσταση. Έχειδειχθεί ότι η ραδιοσήμανση με ^{13}C και ^{14}C δίνει τα ίδια αποτελέσματα (Kotake *et al.*, 1982). Επιπλέον, η σωρευτική δοκιμασία αναπνοής έδειξε εξαιρετική συσχέτιση ($r=0,9$) με τη συστηματική κάθαρση της CA, επισημαίνοντας έτσι την εγκυρότητα της μεθόδου. (Renner *et al.*, 1984). Η δοκιμασία αναπνοής της CA έχει δείξει υψηλές τιμές του CYP1A2 στους καπνιστές (Wietholtz *et al.*, 1981), στα παιδιά (Lambert *et al.*, 1986) και σε άτομα που εκτέθηκαν σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (Lambert *et al.*, 1990). Χαμηλές τιμές του CYP1A2 συναντώνται σε ασθενείς με διάφορες μορφές ηπατικής ασθένειας (Renner *et al.*, 1984), σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά και σε γυναίκες που είναι έγκυες (Kalow and Tang, 1993).

Μειονέκτημα της δοκιμασίας αυτής είναι η ανάγκη για ραδιοεπισημασμένη CA και η ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό για τη μέτρηση του ραδιοεπισημασμένου CO₂ στον εκπνεόμενο αέρα.

β) Ο προσδιορισμός του λόγου $\frac{17X}{137X}$ στο πλάσμα και στο σίελο και ο προσδιορισμός του λόγου $\frac{13X + 17X + 37X}{137X}$ στο πλάσμα

Η εγκυρότητα του λόγου $\frac{17X}{137X}$ στο πλάσμα και στο σίελο όσον αφορά την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 εξετάστηκε από τους Fuhr and Rost (1994) 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 $\frac{17X}{137X}$ στο πλάσμα και στο σίελο προσδιορίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), κατά προτίμηση 5-7 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης. Βρέθηκε ότι οι λόγοι αυτοί συσχετίζονται καλύτερα από τις άλλες μεθόδους με τη 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 το φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2. Ο λόγος αυτός υπολογιζόμενος στο σίελο, ως μια μη επεμβατική μέθοδος, είναι καταλληλότερος για επιδημιολογικές μελέτες.

Παρομοίως, ο λόγος $\frac{13X + 17X + 37X}{137X}$ στο πλάσμα, παρουσιάζει σημαντική (r=0,905) συσχέτιση με την κάθαρση της καφεΐνης 4 ώρες μετά τη χορήγησή της σε 15 ασθενείς με χολολιθίαση, σε 10 ασθενείς με κίρρωση και σε 10 υγιείς (Tanaka *et al.*, 1992). Παρόλο που για τον προσδιορισμό της τιμής του παραπάνω λόγου απαιτείται η λήψη αίματος, η μέθοδος μπορεί να χαρακτηριστεί ως ελάχιστα επεμβατική καθώς είναι επαρκές ένα μεμονωμένο δείγμα, 2 ή 4 ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση καφεΐνης.

γ) Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα

Έξι τουλάχιστον μεταβολικοί λόγοι της CA έχουν προταθεί ως δείκτες για τη δραστηριότητα του CYP1A2:

$$1) \frac{AFMU + 1X + 1U}{17U} \quad (\text{Campbell } et al., 1987b)$$

- 2) $\frac{17X + 17U}{137X}$ (Butler *et al.*, 1992)
- 3) $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17X}$ (Grant *et al.*, 1987)
- 4) $\frac{17X}{137X}$ (Kadlubar *et al.*, 1990)
- 5) $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$ (Notarianni *et al.*, 1995)
- 6) $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U}{137X}$ (Carrillo *et al.*, 2000)

Όλοι οι παραπάνω μεταβολικοί λόγοι έχουν ως βάση τις αντιδράσεις απομεθυλίωσης της CA. Οι διάφοροι μεταβολικοί λόγοι συσχετίζουν συγκεντρώσεις των μεταβολιτών μεταξύ τους και έτσι, κατά βάση, είναι ανεξάρτητοι της συνολικής ανάκτησής τους στα ούρα (Grant *et al.*, 1983).

Παρακάτω γίνεται λεπτομερής εξέταση των λόγων αυτών.

1) $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$. Η δοκιμασία συνίσταται στη μέτρηση στα ούρα των μεταβολιτών

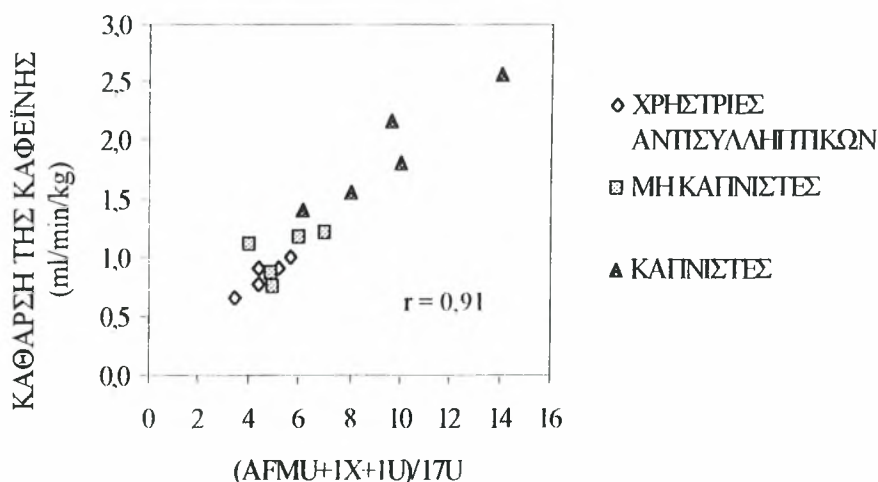
AFMU (ή AAMU), 1X, 1U και 17U σε ένα χρονικό σημείο 8 ωρών τουλάχιστον μετά τη λήψη της CA, ή σε ολονύχτια ούρα. Ο λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ χρησιμοποιείται ως δείκτης

της δραστηριότητας του CYP1A2 (Campbel *et al.*, 1987b; Kalow and Tang 1991a,; Kalow and Tang 1991b). Ο αριθμητής αντιπροσωπεύει όλους τους μεταβολίτες που παράγονται μέσω του CYP1A2 από την 17X δια της οδού της 7-απομεθυλίωσης. Ο παρονομαστής 17U παρουσιάζει με αξιόπιστο τρόπο τη μικρότερη μεταβλητότητα απ' όλους τους μεταβολίτες της CA στα ούρα, μετά από χορήγηση καθορισμένης δόσης CA (Grant *et al.*, 1983). Έτσι, το 17U στην εξίσωση χρησιμεύει για να αντισταθμίσει τις αποκλίσεις που οφείλονται στις διαφορετικές δοσολογίες της CA και στη μη πλήρη συλλογή των ούρων (Kalow and Tang 1991b). Παρόλα αυτά η 8-υδροξυλίωση της 17X, η οποία δίνει 17U είναι μια αντίδραση που καταλύεται από τουλάχιστον δύο ένζυμα, το CYP2A6 και το CYP1A2 (Gu *et al.*, 1992). Η συμβολή του CYP1A2 είναι κάπως μικρότερη απ' αυτή του CYP2A6 και είναι πιθανή κάποια συμβολή από άλλα ένζυμα. Επειδή όμως το 17U χρησιμοποιείται στον παρονομαστή, το CYP1A2 το οποίο είναι ξεκάθαρα προσδιοριστικό του αριθμητή, είναι επίσης μερικώς προσδιοριστικό και του παρονομαστή. Εξαιτίας αυτού, το εύρος της μεταβλητότητας του μεταβολικού λόγου της CA εμφανίζεται να είναι μικρότερο από το εύρος της μεταβλητότητας της δραστηριότητας του CYP1A2 μέσα στο ήπαρ. Αυτό σημαίνει



ότι πρέπει να συμβαίνει μια παραμόρφωση της πραγματικής μεταβλητότητας της δραστηριότητας CYP1A2 η οποία μειώνει τη διασπορά ειδικά των υψηλών τιμών. Αυτή η εξομάλυνση της μεταβλητότητας των τιμών δεν φαίνεται να επιδρά στη συγκριτική κατάταξη των ατόμων όσον αφορά τη δραστηριότητα του CYP1A2 (Kalow and Tang, 1993). Για παράδειγμα, παρόλο που μια τιμή ενός μεταβολικού λόγου της CA πάνω από το μέσο όρο δηλώνει μία δραστηριότητα του CYP1A2 πάνω από το μέσο όρο, η διαφορά αυτού του μεταβολικού λόγου από το μέσο όρο αντανακλά τις σχετικές μάλλον παρά τις απόλυτες τιμές.

Για τον έλεγχο της εγκυρότητας αυτού του μεταβολικού λόγου, έγινε μελέτη συσχέτισης του τόσο με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης, όσο και με τη δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) αυτού του λόγου με την κάθαρση ήταν 0,91 (Campbell *et al.*, 1987b; Εικόνα 5) ή 0,82 (Kalow and Tang, 1993), και με τη δοκιμασία αναπνοής ήταν 0,74 (Lambert *et al.*, 1990). Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι ο μεταβολικός αυτός λόγος, η δοκιμασία αναπνοής και η συστηματική κάθαρση της CA παρουσιάζουν παρομοίου μεγέθους μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων (Kalow and Tang, 1993).



Εικόνα 5. Συσχέτιση ανάμεσα στο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U και την κάθαρση της καφεΐνης (Campbell *et al.*, 1987b).

Χορήγηση δόσης 1 ή 2 mg/kg CA βελτιστοποιεί την ακρίβεια των μετρήσεων του μεταβολικού λόγου της CA. Ωστόσο, προκειμένου για επιδημιολογικές μελέτες, η συνήθης

δόση της CA κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4 φλιτζανιών καφέ την ημέρα της δοκιμασίας (Kalow and Tang, 1991b)

Επιπλέον, επειδή αυτός ο μεταβολικός λόγος της CA χρησιμοποιεί μόνο τελικά μεταβολικά προϊόντα του μεταβολισμού της CA, ο χρόνος συλλογής των ούρων είναι σχετικά άνευ σημασίας, αρκεί να υφίσταται επαρκές χρονικό διάστημα μεταξύ της λήψης της CA και της συλλογής των ούρων ώστε να γίνουν αξιόπιστες μετρήσεις των μεταβολιτών.

Παρόλο που ο λόγος $\frac{AFMU + IU + IX}{17U}$ συσχετίζεται καλώς με την κάθαρση της CA

μετά από χορήγηση μεμονωμένων δόσεων CA, είναι πιθανόν ότι όταν το CYP1A2 επάγεται σε μεγάλο βαθμό, τότε αυτός ο λόγος χάνει την ευαισθησία του (Campbell *et al.*, 1987a). Γι' αυτό το λόγο μπορεί να μην αποτελεί καλό δείκτη για τους καπνιστές. Επειδή ο μεταβολισμός της CA είναι δοσοεξαρτώμενος (Denaro *et al.*, 1990), κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση της επίδρασης του μεγέθους της δόσης καθώς και της χορήγησης πολλαπλών δόσεων CA πάνω σε αυτό το λόγο.

Η δραστηριότητα του CYP1A2, όπως εκφράζεται μέσω αυτού του μεταβολικού λόγου της CA, εμφανίζεται, ορθώς, αυξημένη στους καπνιστές (Kalow and Tang, 1991a; Catteau *et al.*, 1995; Rasmussen and Brosen, 1996), στα παιδιά (Campbell *et al.*, 1987b) και σε άτομα επιβαρυνμένα με πολυβρωμιωμένα διφαινόλια (Lambert *et al.*, 1990). Επίσης, η δραστηριότητα του CYP1A2 εμφανίζεται, ορθώς, μειωμένη σε έγκυες (Bologna *et al.*, 1991), σε γυναίκες με χρήση Ο.Σ. (Campbell *et al.*, 1987b; Rasmussen and Brosen, 1996) και σε άτομα που παίρνουν σιμετιδίνη (Shaw-Stiffel *et al.*, 1988). Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ του αριθμού των τσιγάρων, των επιπέδων κοτινίνης και της δραστηριότητας του CYP1A2 (Kalow and Tang, 1991a).

2) $\frac{17X + 17U}{137X}$. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της δραστηριότητας του

CYP1A2 (Butler *et al.*, 1992) με μέτρηση των συγκεντρώσεων 17X, 17U και της CA σε δείγμα ούρων που λήφθηκε 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης CA. Σε άλλες

μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί και ο λόγος $\frac{17X}{137X}$ (Kadlubar *et al.*, 1990). 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 CA. Η νεφρική απέκκριση της CA εξαρτάται από τη ροή των ούρων όπως επίσης και η απέκκριση των διμεθυλοξανθινών όπως η 17X. Στο λόγο $\frac{17X}{137X}$ 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 CA και την 17X (Εικόνα 5). Αυτοί οι παράγοντες ενδέχεται να είναι αμελητέοι αν οι συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων στα ούρα συμβαδίζουν με αυτές στο πλάσμα. Αυτό έχει δειχθεί για την CA αλλά όχι για την 17X. Πάντως, σε κάθε περίπτωση, η νεφρική μεταφορά των ξανθινών απαιτεί περαιτέρω έρευνα καθώς η νεφρική κάθαρση των διμεθυλοξανθινών φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων εθνικοτήτων (Kalow, 1985).

3) $\frac{AFMU + IU + IX}{17X}$ Ο λόγος αυτός αντιπροσωπεύει τη δραστηριότητα 7-

απομεθυλάσης της 17X την οποία παρουσιάζει το CYP1A2 καθώς στον αριθμητή εμφανίζονται τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από την αρχική 7-απομεθυλίωση της PX και στον παρονομαστή η αρχική ένωση. Ο λόγος όμως αυτός παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα στους ενήλικες (εύρος τιμών από 0,89 έως 25,54-σχεδόν 3000%) και αυτό ίσως εξηγείται, εν μέρει, από την επίδραση της ροής των ούρων στην απέκκριση της παραξανθίνης (PX-17X; Grant *et al.*, 1983).

4) Ο λόγος $\frac{AFMU + IX + IU + 17X}{137X}$ όπως και ο λόγος

$\frac{AFMU + IX + IU + 17X + 17U}{137X}$ χρησιμοποιούν την 17X και τα προϊόντα της

απομεθυλίωσής της προς την CA και συμφωνούν καλύτερα με το θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο» τα οποία εμπλέκονται στον κύριο, και εξαρτώμενο από το CYP1A2, μεταβολικό δρόμο της καφεΐνης. Ο δεύτερος μάλιστα από αυτούς, σε μία μελέτη υγιών ατόμων, παρουσίασε την καλύτερη συσχέτιση με τη συνολική και τη μερική κάθαρση της CA, τόσο σε δείγματα ούρων 0-8 ωρών όσο και σε δείγματα 0-24 ωρών σε σχέση με τους λόγους $\frac{AFMU + IX + IU}{17U}$, $\frac{17U + 17X}{137X}$, και $\frac{17X}{137X}$. Ο ίδιος λόγος, επίσης έδειξε πιο

ξεκάθαρα τη διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών και τη διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών (Carrillo *et al.*, 2000). Στον παρονομαστή, όμως, αυτών των λόγων βρίσκεται ένα συστατικό που εξαρτάται από τη ροή των ούρων το οποίο ενδέχεται να αλλοιώνει την απεικόνιση της δραστηριότητας του CYP1A2.

Επειδή όλες οι δοκιμασίες έχουν ελαττώματα θα ήταν χρήσιμη μια σύγκριση με ένα γενικώς αποδεκτό πρότυπο. Περισσότερο πληροφοριακές θα ήταν απευθείας συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων δοκιμασιών δραστηριότητας του CYP1A2 σε ανθρώπους *in vivo* και της λειτουργίας του ενζύμου σε βιοψία ήπατος (που θεωρείται πρότυπη μέθοδος ελέγχου λειτουργίας του ενζύμου). Αν αυτή η πρότυπη μέτρηση δεν είναι εφικτή, τότε μια αποδεκτή υποκατάσταση συνίσταται στον υπολογισμό της μερικής μεταβολικής κάθαρσης της CA δια της οδού της 3-απομεθυλίωσης. Η συστηματική κάθαρση της CA μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως εύχρηστο πρότυπο επειδή το CYP1A2 ευθύνεται για πλέον του 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της CA στη μεγάλη πλειοψηφία των ατόμων.

Πράγματι, σε μελέτη υγιών ατόμων (20 άνδρες – 19 γυναίκες, 8 γυναίκες με O.C.) έγινε μέτρηση της συστηματικής κάθαρσης της CA συγκεντρώσεων της CA στο πλάσμα και υπολογισμός των κλασμάτων $PCUR = \frac{17X + 17U}{137X}$ και $CMR = \frac{AFMU + 1U + 1X}{17U}$ με HPLC

(PCUR: Paraxanthine Caffeine Urinary Ratio; CMR: Caffeine Metabolic Ratio; Tang *et al.*, 1994). Ο λόγος PCUR μετρήθηκε σε δείγματα ούρων 4-5 ώρες μετά τη λήψη CA, δηλαδή σε ένα χρονικό σημείο στο οποίο τα ποσοστά του σχηματισμού και της αποβολής της 17X είναι κατά προσέγγιση ίσα. Ο λόγος CMR μετρήθηκε σε δείγματα ούρων 16-25 ώρες μετά τη λήψη της CA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

α) Η κάθαρση της CA, CL_{CAF} και το CMR εμφανίζουν κανονική κατανομή ενώ το PCUR, όχι.

β) Υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις διασπορές των PCUR και CMR ενώ καμία απ' αυτές δεν διαφέρει απ' αυτή της CL_{CAF} .

γ) Η CL_{CAF} , CMR, PCUR συσχετίζονται σημαντικά μεταξύ τους.

CL_{CAF} και CMR $r=0,77$

CL_{CAF} " PCUR $r=0,46$

CMR " PCUR $r=0,40$

Οι συντελεστές συσχέτισης $r=0,77$ και $r=0,46$ είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικοί μεταξύ τους, δείχνοντας έτσι ότι το CMR δίνει καλύτερη εκτίμηση της κάθαρσης απ' ότι το PCUR.

δ) Η CL_{CAF} των γυναικών που χρησιμοποιούσαν O.C. ήταν σημαντικά διαφορετική από τις γυναίκες χωρίς O.C. Όταν συγκρίθηκαν οι CL_{CAF} , CMR, PCUR μεταξύ χρηστών και μη χρηστών O.C. τότε το PCUR δεν έδειξε τη στατιστικώς σημαντική διαφορά που έδειξαν οι άλλες μετρήσεις.

ε) Εξέταση της σχέσης ανάμεσα στην PCUR και τη νεφρική κάθαρση της 137X έδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση ($r=-0,47$) μεταξύ του PCUR και της νεφρικής κάθαρσης της 137X. Η συσχέτιση μεταξύ PCUR και CL_{CAF} ήταν 0,46. Έτσι φαίνεται ότι το PCUR αντανακλά όχι μόνο την ηπατική ενζυμική δραστηριότητα αλλά επίσης και τη νεφρική λειτουργία.

στ) Ξεχωριστή εξέταση στην κατανομή των ποσοστών απέκκρισης των 3 παραγόντων του PCUR (137X, 17X, 17U) έδειξε ότι μόνο η 137X είχε την ίδια κατανομή που χαρακτηρίζει το PCUR.

ζ) Παρατηρήθηκε σημαντικός συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της CA στο πλάσμα και στα ούρα με κλίση της ευθείας παλινδρόμησης 0,86. Αυτού του είδους η παρατήρηση ήταν η βάση της ανάπτυξης της δοκιμασίας PCUR. Όμως αυτή η σχέση υποδηλώνει επίσης ουσιαστική νεφρική σωληναριακή επαναρρόφιση της 137X και σχεδόν πλήρη εξίσωση μεταξύ της 137X στο πλάσμα και στα ούρα όπως περιγράφεται από τους Birket και Miners (1991). Έτσι συνάγεται ότι τα χαρακτηριστικά της κατανομής του ποσοστού απέκκρισης της 137X που παρατηρήθηκαν πρέπει να αποδοθούν στο ταχύτητα ροής των ούρων.

η) Η συγκριτικά ευρεία διασπορά και η δικόρυφη (bimodal) και τρικόρυφη (trimodal) κατανομή του log PCUR επισημάνθηκαν και από τον Butler *et al.*, (1992). Η μονοκόρυφη (unimodal) και κανονική κατανομή του log CMR συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις (Kalow and Tang, 1991a,b; Vistisen *et al.*, 1992; Catteau *et al.*, 1995).

Η εμφάνιση της CA στα ούρα (παρονομαστής στο PCUR) εξαρτάται τόσο από το μεταβολισμό όσο και από τη νεφρική λειτουργία. Η παρατήρηση ότι ένας δείκτης ενζυμικής δραστηριότητας που προσδιορίζεται στα ούρα μπορεί να διαστρεβλωθεί από τη νεφρική λειτουργία προτρέπει για συνεχή προσοχή όταν πρόκειται να αναπτυχθούν μέθοδοι που χρησιμοποιούν τους μεταβολίτες που εμφανίζονται στα ούρα. Οι νεφρικοί παράγοντες ίσως δεν είναι η μόνη αιτία της μικρής συσχέτισης και της ασυμφωνίας μεταξύ των συχνοτήτων κατανομής και CL_{CAF} και PCUR. Η εμπλοκή του CYP1A2 στην κατάλυση τόσο της 3-απομεθυλίωσης της 137X όσο και της 7-απομεθυλίωσης της 17X (PX) μπορεί επίσης εν μέρει να είναι η αιτία επειδή το CYP1A2 καταλύει τόσο το σχηματισμό όσο και το μεταβολισμό της PX. Μικρές διακυμάνσεις στο χρόνο συλλογής των ούρων μετά τη λήψη CA μπορούν να μεταβάλουν την τιμή του PCUR.

Είναι γνωστό ότι η αποβολή της CA αναστέλλεται από τα O.C. και άλλα στεροειδή (Patwardhan *et al.*, 1980; Lane *et al.*, 1992; Catteau *et al.*, 1995). Η διαφορά μεταξύ

χρηστών O.C. και μη χρηστών O.C. αναδεικνύεται από την CL_{CAF} και το CMR αλλά όχι από το PCUR. Αυτό δείχνει την περιορισμένη δυνατότητα του PCUR να αντανakλά τη δραστηριότητα του CYP1A2 κάτω από διαφορετικές περιστάσεις.

Ο Notarianni *et al.*, (1995), σε μία μελέτη 237 υγιών ατόμων, ανέφερε ότι υπάρχουν πολύ μικρές συσχετίσεις των περισσότερων λόγων μεταξύ τους και συμπέρανε ότι, στο βαθμό που οι διάφοροι λόγοι δεν επισημαίνουν το ίδιο πράγμα, κάποιιοι ίσως είναι καλύτεροι από τους άλλους στο να απεικονίζουν τη δραστηριότητα του CYP1A2. Σε μία μελέτη εξομοίωσης με τη χρήση H/Y εξετάστηκε η εγκυρότητα αυτών των λόγων με τη βοήθεια τιμών των κινητικών παραμέτρων της CA και των μεταβολιτών της που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996). Η διαδικασία εξομοίωσης συσχέτισε την επίδραση των μεταβολών της δραστηριότητας του CYP1A2 στους διάφορους μεταβολικούς λόγους της CA σε συνδυασμό με τις μεταβολές της νεφρικής κάθαρσης της CA και τη δραστηριότητα των CYP2A6 και CYP2E1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο λόγος $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17U}$ φαίνεται να συµμεταβάλλεται ευθέως με τη δραστηριότητα του CYP1A2.

Όμως μεταβάλλεται επίσης έµμεσα με τη δραστηριότητα του CYP2A6 παρόλο που είναι ανεξάρτητος από τη νεφρική κάθαρση της CA και τη δραστηριότητα του CYP2E1. Κανένας από τους λόγους δεν εξαρτάται από τις δραστηριότητες της οξειδάσης της ξανθίνης ή της NAT2. Η ευαισθησία των μεταβολικών λόγων της CA στα ούρα προς την ενδογενή δραστηριότητα του CYP1A2 προβλέπεται να αυξάνει με τη σειρά, $\frac{17X}{137X}$, $\frac{17X + 17U}{137X}$,

$\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$, $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17X}$, $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$. Έτσι, αν όλες οι άλλες

παράμετροι παραµείνουν σταθερές, οι τρεις τελευταίοι λόγοι πρέπει να είναι οι καλύτεροι υποκατάστατοι δείκτες της δραστηριότητας του CYP1A2. Οι Rost και Roots (1994) έδειξαν

πράγματι ότι ο λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ ($r=0,90$) ήταν καλύτερος από τους λόγους $\frac{17X}{137X}$

($r=0,62$) και $\frac{17X + 17U}{137X}$ ($r=0,52$) στο να επισηµάνουν την αύξηση της δραστηριότητας του

CYP1A2 κατόπιν επαγωγής με οµεπραζόλη. Το πρότυπο για τη σύγκριση ήταν η συστηματική κάθαρση της CA η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, µεσολαβείται κατά 95% από το CYP1A2 (Kalow and Tang, 1993).

Σε άλλη μελέτη (Denaro *et al.*, 1996) συµμετείχαν υγιείς µη καπνιστές που ήταν τακτικοί χρήστες CA και υγιείς καπνιστές οι οποίοι επίσης κατανάλωναν CA συστηµατικά.

Σ' αυτή τη μελέτη έγινε χρήση ραδιοεπισημασμένης CA ενδοφλέβια, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της κάθαρσης της CA, ενώ παράλληλα έγινε από του στόματος χορήγηση διαφορετικών δόσεων CA, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό διαφόρων μεταβολικών λόγων της CA στα ούρα. Η ομάδα των μη καπνιστών, σε δύο διαφορετικές συνθήκες σταθερής κατάστασης (χαμηλής και υψηλής δόσης CA), επιλέχθηκε για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών προκειμένου να δειχθεί η δοσοεξαρτώμενη κάθαρση της CA. Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι λόγοι $\frac{AAMU + IU + IX}{17U}$, $\frac{AAMU + IX + IU}{17X}$ και $\frac{17X + 17U}{137X}$ σε σχέση με

την κάθαρση της CA και με την κάθαρση της PX (17X) η οποία θεωρείται ότι είναι το καλύτερο μέτρο της δραστηριότητας του CYP1A2 (Kalow and Tang, 1993). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο λόγος $\frac{AAMU + IU + IX}{17U}$ σχετίζεται περισσότερο αξιόπιστα με

την κάθαρση της CA και την κάθαρση της PX από ότι οι άλλοι λόγοι. Μπορεί να μετρηθεί σε άτομα ενώ αυτά καταναλώνουν μεμονωμένες ή πολλαπλές δόσεις CA, σε καπνιστές και μη καπνιστές και με τη λήψη μόνο ενός μεμονωμένου (spot) δείγματος ούρων. Υψηλές δόσεις CA (12 mg/kg/ημέρα) ενδέχεται να καθιστούν τη συσχέτιση αυτή λιγότερο έγκυρη.

Ο λόγος $\frac{AFMU + IU + IX}{17U}$ αναφέρεται ότι παρουσιάζει lognormal κατανομή και συνεπώς βρίσκεται κάτω από περιβαλλοντικό έλεγχο (Kalow and Tang, 1991b; Vistisen *et al.*, 1992; Catteau *et al.*, 1995; Εικόνα 6). Ο λόγος $\frac{17X + 17U}{137X}$, όπως αναφέρεται από τον

Butler *et al.*, (1992), όταν εφαρμόστηκε σε 3 διαφορετικούς πληθυσμούς, εμφάνισε σε έντονο βαθμό μία τρικόρυφη (trimodal) κατανομή. Ο λόγος $\frac{17X}{137X}$ παρουσιάζει δικόρυφη

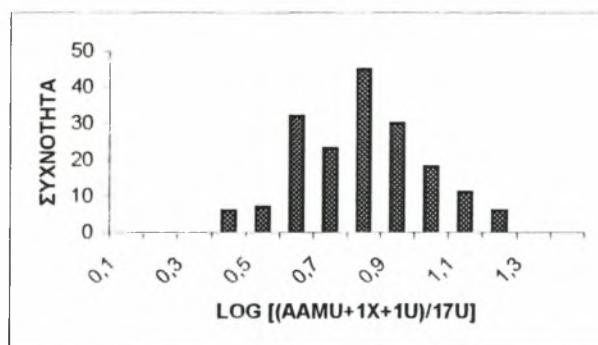
(bimodal) κατανομή με το 77% του πληθυσμού να εμφανίζονται ως αργοί μεταβολιστές (Kadlubar *et al.*, 1990). Η συχνότητα κατανομής του λογαρίθμου του λόγου $\frac{AFMU + IU + IX}{17X}$ αναφέρεται ότι είναι κεκλιμένος (skewed) παρόλο που ο διπλός

λογάριθμος έδειξε μία πιο συμμετρική κατανομή (Relling *et al.*, 1992). Στη μελέτη των 237 ατόμων του Notarianni *et al.*, (1995), οι λόγοι $\frac{AFMU + IU + IX + 17X}{137X}$, $\frac{17X + 17U}{137X}$,

$\frac{17X}{137X}$ παρουσίασαν μία lognormal κατανομή ενώ δεν υπήρξαν ενδείξεις για δικόρυφη ή

τρικόρυφη κατανομή των $\frac{AFMU + IU + IX}{17U}$ και $\frac{AFMU + IU + IX}{17X}$. Τα δεδομένα αυτά

υποδεικνύουν ότι η δραστηριότητα του CYP1A2 βρίσκεται κυρίως κάτω από περιβαλλοντικό έλεγχο. Η μη κανονική κατανομή που βρέθηκε από ορισμένους συγγραφείς υποδεικνύει είτε γενετικό έλεγχο του ενζύμου είτε ποικίλες περιβαλλοντικές επιδράσεις μέσα στον ίδιο πληθυσμό. Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι οι μεταβολικοί λόγοι, σε αντίθεση με την κατανομή του ενζύμου εντός των διαφόρων πληθυσμών, μπορούν έγκυρα να αντανakλούν τη μεταβλητότητα του ενζύμου στο ίδιο άτομο.



Εικόνα 6. Κατανομή συχνοτήτων του λογαρίθμου του δείκτη του CYP1A2 σε 178 υγιή άτομα (Kalow and Tang, 1991b).

1.7: Ηπατική νόσος και μεταβολισμός της καφεΐνης

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων σε ασθενείς με ηπατική νόσο αναστέλλεται γενικώς και το συνολικό περιεχόμενο σε κυτόχρωμα P450 είναι σημαντικά μειωμένο (Howden *et al.*, 1989). Επίσης, μειωμένη είναι και η αποβολή της καφεΐνης σ' αυτούς τους ασθενείς (Holstege *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1989) με συνέπεια η κάθαρση της καφεΐνης να χρησιμοποιείται ως μέθοδος εκτίμησης της λειτουργίας του ήπατος (Εικόνα 7) Η κάθαρση όμως της καφεΐνης όπως και η ανάκτηση των μεταβολιτών της στα ούρα δεν μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς με αντισταθμιζόμενη ηπατική νόσο από τους υγιείς (Scott *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989).

Σε αντίθεση με το τελευταίο, ο Bechtel *et al.*, (2000) παρατήρησε σημαντική μείωση του μεταβολισμού της καφεΐνης όχι μόνο στους ασθενείς με σοβαρή κίρρωση (Child B, C), αλλά και στους ασθενείς Child A. Αυτή η μειωμένη μεταβολική ικανότητα προκλήθηκε από τη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, του μοναδικού ενζύμου που εμπλέκεται στην



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτική κάθαρση της καφεΐνης σε ένα υγιές άτομο και σε ένα ασθενή με κίρρωση (Cheng *et al.*, 1990).

N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης. Η δραστηριότητα του CYP1A2 μετρήθηκε από τον έγκυρο μεταβολικό λόγο $\frac{AFMU + IX + IU}{17U}$ στα ούρα 24ώρου μετά από χορήγηση 200mg καφεΐνης

και μέτρηση των μεταβολιτών με HPLC. Οι δείκτες του CYP2A6 ($\frac{17U}{17X}$) και της οξειδάσης

της ξανθίνης ($\frac{IU}{IX}$) δεν ήταν σημαντικά διαφορετικοί στην ομάδα Child A σε σχέση με τους

υγιείς. Οι δείκτες αυτοί ήταν σημαντικά αυξημένοι στις ομάδες Child B και C. Σε σύγκριση

με τους υγιείς, ο δείκτης της NAT2 ($\frac{AFMU}{AFMU + IU + IX}$) παρέμεινε αναλλοίωτος στους

αργούς ακετυλιωτές ενώ ήταν σημαντικά μειωμένος στους ασθενείς Child B και C που ήταν

ταχείς ακετυλιωτές. Οι ίδιοι συγγραφείς παρατηρούν ότι ο μειωμένος μεταβολισμός της

καφεΐνης σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση δεν προσφέρει κάποια επιπλέον πληροφορία

για τη σοβαρότητα της νόσου σε σύγκριση με τις συνήθεις εργαστηριακές δοκιμασίες. Όμως,

η διαφορετική επίδραση της νόσου στα διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της

καφεΐνης αναμένεται να προκαλέσει μία μετατόπιση από τις κύριες μεταβολικές οδούς προς

δευτερεύουσες. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν για φάρμακα των οποίων ο μεταβολισμός

ρυθμίζεται από πολλά γονίδια (polygenic regulation type). Επειδή ο μεταβολισμός της

καφεΐνης μειώνεται σε μεγαλύτερη έκταση αν η ασθένεια είναι σοβαρή, και δεδομένης της

μεγάλης ποικιλότητας του μεταβολισμού της μεταξύ των ατόμων, η σύζευξη της δοκιμασίας

της καφεΐνης με τις συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις θα μπορούσε να βελτιώσει την

παρακολούθηση (follow up) ασθενών με αλκοολική κίρρωση.

Με την ίδια μέθοδο ο Lelouet *et al.*, (2001) ερεύνησε ασθενείς με καλώς διαπιστωμένη πρωτογενή χολική κίρρωση (PBC) ταξινομημένους σύμφωνα με την κατάταξη κατά Scheuer και υγείς ως ομάδα ελέγχου. Ο δείκτης του CYP1A2 ήταν σημαντικά μειωμένος, τόσο περισσότερο όσο οι ασθενείς ήταν ταξινομημένοι σε υψηλότερο ιστολογικό στάδιο. Αντίθετα, σε σύγκριση με τους υγείς, οι δείκτες της οξειδάσης της ξανθίνης και του CYP2A6 ήταν σημαντικά αυξημένοι, ανεξάρτητα από το ιστολογικό στάδιο. Σε σύγκριση με τους υγείς, ο δείκτης της NAT2 παρέμεινε αμετάβλητος στους αργούς ακετυλιωτές παρόλη τη σημαντική μείωση του ποσοστού αποβολής του AFMU στα ούρα 24ώρου στις ομάδες Scheuer 3 και 4. Στους ταχείς ακετυλιωτές ο δείκτης της NAT2 ήταν σημαντικά μειωμένος στις ομάδες Scheuer 3 και 4 σε συνδυασμό με το μειωμένο ποσοστό του AFMU στα ούρα. Συμπερασματικά, οι ασθενείς με PBC εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού της καφεΐνης. Αυτή η μείωση είναι τόσο πιο σημαντική όσο οι ασθενείς παρουσιάζονταν σε υψηλότερο ιστολογικό επίπεδο. Η κυριότερη αιτία αυτής της διαταραχής είναι η μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2. Η εικόνα αυτή είναι σχεδόν η ίδια με αυτή που παρατηρείται στη χρόνια ηπατική νόσο ανεξαρτήτως προελεύσεως. Αντίθετα, ο μεταβολισμός της CA κατά την PBC ήταν διαφορετικός από αυτόν που παρατηρήθηκε στην αλκοολική κίρρωση. Η δραστηριότητα του CYP2A6 ήταν αυξημένη. Η έκφραση του γενετικού πολυμορφισμού της NAT2 δεν τροποποιήθηκε.

Σε άλλη μελέτη (Ullrich *et al.*, 1992) στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με κίρρωση (Child A=5, Child C=2) εξετάστηκε το προφίλ της απέκκρισης της καφεΐνης και 14 από τους μεταβολίτες της με HPLC και βρέθηκε ότι τα προφίλ αυτά ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στους υγείς και στους κίρρωτικούς. Τα ευρήματα αυτά επισημαίνουν την ελαττωματική αποδόμηση της καφεΐνης.

Σε διαφορετική μελέτη (Rodopoulos *et al.*, 1995) συμμετείχαν ασθενείς με αλκοολική ηπατική κίρρωση διαπιστωμένη με βιοψία στους οποίους χορηγήθηκε καφεΐνη. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο χρόνος ημισείας ζωής ($T_{1/2}$) της καφεΐνης ήταν περισσότερο παρατεταμένος στους κίρρωτικούς ασθενείς έναντι των υγιών με τις υψηλότερες τιμές να ανευρίσκονται μεταξύ αυτών με σοβαρή νόσηση και κλινικώς μη αντισταθμιζόμενη ηπατική λειτουργία. Ο $T_{1/2}$ της καφεΐνης στους ασθενείς με ήπια κίρρωση έδειξε κάποια αλληλεπικάλυψη με τον $T_{1/2}$ των υγιών ατόμων, επισημαίνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις δυσκολίες της χρησιμοποίησης της αποβολής της καφεΐνης ως διακριτικό στοιχείο της ηπατικής βλάβης. Το ποσοστό των μεταβολιτών της οδού της PX στα ούρα ήταν χαμηλότερο στους ασθενείς από ότι στους υγείς. Στους ασθενείς η N-3-απομεθυλίωση και η N-7-απομεθυλίωση ήταν χαμηλότερες και η N-1-απομεθυλίωση υψηλότερη από ότι στους

υγιείς. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο αυξημένος $T\frac{1}{2}$ στους ασθενείς δεν οφείλεται μόνον στο μειωμένο αριθμό των λειτουργικών ηπατοκυττάρων, γιατί τότε θα ήταν αναμενόμενη μία παράλληλη και συμμετρική μείωση σε όλα τα στάδια της βιομετατροπής της καφεΐνης, αλλά οφείλεται κυρίως στη μείωση της ικανότητας της N-3- και N-7- απομεθυλίωσης δηλαδή στη μειωμένη μεταβολική ικανότητα των ηπατοκυττάρων και συνεπώς στη μειωμένης λειτουργικότητας του υπεύθυνου για τις αντιδράσεις αυτές ενζύμου CYP1A2.

Οι Denago *et al.*, (1996) χορήγησαν καφεΐνη σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση, χολική κίρρωση και ηπατίτιδα Β και C, και διαπίστωσαν ότι η κάθαρση της καφεΐνης ήταν μειωμένη στα άτομα αυτά σε σχέση με τους υγιείς. Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης, επηρεάστηκαν από την ηπατική νόσο. Συγκεκριμένα, ο λόγος $\frac{AAMU + IX + IU}{17U}$ βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος στους υγιείς σε σχέση με τους ασθενείς με κίρρωση. Όταν όμως η τιμή του λόγου αυτού μετρήθηκε σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά από αυτή των υγιών. Δεν υπήρξε επίσης συσχέτιση του λόγου αυτού με την κατάταξη κατά Child-Pugh όπως είχε δειχθεί σε άλλες μελέτες (Holstege *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1989). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ανωτέρω λόγος επηρεάζεται από την ηπατική νόσο και αντανακλά τη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε άτομα με κίρρωση. Η μέτρηση αυτού του λόγου από ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων αντανακλά την κάθαρση της καφεΐνης σε άτομα με κίρρωση και μπορεί να είναι χρήσιμη ως δοκιμασία ελέγχου του ήπατος. Παρόλη τη μεγάλη ποικιλότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των ατόμων, η δοκιμασία μπορεί να επαναληφθεί με ευκολία στον ίδιο ασθενή και με αυτόν τον τρόπο να γίνει παρακολούθηση (monitoring) της μείωσης της δραστηριότητας του CYP1A2 στους ασθενείς με προοδευτική εξασθένηση της ηπατικής λειτουργίας. Παρόλο όμως που ο μέσος όρος αυτού του λόγου μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς με κίρρωση από τα υγιή άτομα, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική δοκιμασία για έναν μεμονωμένο ασθενή εξαιτίας του μεγάλου βαθμού αλληλεπικάλυψης στις παρατηρούμενες τιμές.

Το μεταβολικό προφίλ της καφεΐνης καθώς και η κάθαρσή της από το σίελο εξετάστηκε επίσης σε παιδιατρικούς ασθενείς με ηπατική νόσο. Οι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα μετρήθηκαν με HPLC με σκοπό τον προσδιορισμό του λόγου $\frac{AFMU + IX + IU}{17U}$. Βρέθηκε ότι τόσο η κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο όσο και ο ανωτέρω μεταβολικός λόγος ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς (El-Yazigi *et al.*, 1999).

Η κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο απετέλεσε και αντικείμενο έρευνας των Lewis and Rector (1992) οι οποίοι μέτρησαν την κάθαρση της καφεΐνης στο σίελο ασθενών με κίρρωση σε δείγματα νηστείας, χωρίς χορηγούμενη δόση καφεΐνης, με συλλογή δύο μόνο δειγμάτων και μέτρηση των συγκεντρώσεων της καφεΐνης με HPLC. Ο ηπατικός μεταβολισμός της καφεΐνης παρουσιάστηκε πολύ εξασθενημένος σε νοσοκομειακούς ασθενείς με επιπλοκές ηπατικής νόσου. Σε αυτή τη μελέτη, αλλά και σε άλλες, παρόλο που παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην κάθαρση της καφεΐνης και σε κλινικούς δείκτες της σοβαρότητας της ηπατικής νόσου, η κλίμακα Child-Pugh προβλέπει τη θνησιμότητα το ίδιο καλά ή και καλύτερα από ότι η κάθαρση. Όμως, εν δυνάμει χρήσεις για ποσοτική μέτρηση της ηπατικής λειτουργίας περιλαμβάνουν όχι μόνο την πρόβλεψη της επιβίωσης, αλλά επίσης υπολογισμό της σοβαρότητας της μεταβολικής βλάβης, με σκοπό τη χορήγηση κατάλληλων φαρμάκων, περιγραφή της προόδου της ασθένειας, εξέταση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και υπολογισμό του ιδανικού χρόνου για μεταμόσχευση ήπατος. Η αξία της κάθαρσης της καφεΐνης για αυτές τις χρήσεις πρέπει βέβαια να ελεγχθεί, αλλά η εγκυρότητα των απλοποιημένων μετρήσεων της αποβολής της καφεΐνης και η ευκολία με την οποία μπορούν να εκτελεστούν σε σοβαρά ασθενούντες καθιστά την καφεΐνη μία ουσιαστική της ηπατικής λειτουργίας με μεγάλο πρακτικό πλεονέκτημα.

Πίνακας 2. Ταξινόμηση της βαρύτητας της κίρρωσης κατά Child – Pugh

	ΣΤΑΔΙΟ Α (Ελάχιστη-ήπια νόσος)	ΣΤΑΔΙΟ Β (Μέτρια νόσος)	ΣΤΑΔΙΟ C (Προχωρημένη νόσος)
Χολερυθρίνη ορού	<2,0 mg/dl	2,0 – 3,0 mg/dl	>3,0 mg/dl
Λευκωματίνη ορού	>3,5 g/dl	2,8 – 3,5 g/dl	<2,8 g/dl
Χρόνος προθρομβίνης (παράταση σε sec)	<4	4 - 6	>6
Ασκίτης	Δεν υπάρχει	Εύκολα ελεγχόμενος	Δύσκολα ελεγχόμενος
Ηπατική εγκεφαλοπάθεια	Απούσα	Στάδιο 1 ή 2	Στάδιο 3 ή 4

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1: Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Η προμήθεια των προτύπων ουσιών 1X, 7X, 3X, 37X, 17X, 1U, 13U, 17U, 137U, 7U, 3U και της 4-ακεταμιδοφαινόλης έγινε από τη Sigma (Steinheim, Γερμανία). Η προμήθεια της 13X έγινε από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Η προμήθεια της CA και του 37U έγινε από τη Fluka (Ελβετία). Το AFMU ήταν ευγενική προσφορά του Κου R.Foumeaux (Centre Recherche Nestle – Laussane, Ελβετία) και ήταν καθαρότητας >98%.

Το ακετόνιτριλιο, η μεθανόλη, το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειικό αμμώνιο αποκτήθηκαν από τη Riedel – de Haen (Seelze, Γερμανία). Η ισοπροπανόλη αποκτήθηκε από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

Για την παραγωγή υπερκαθαρού ύδατος (αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) χρησιμοποιήθηκε ιοντοανταλλακτική στήλη η οποία ήταν εν σειρά συνδεδεμένη με συσκευή αντίστροφης ώσμωσης.

2.2: Όργανα και συσκευές

Η προετοιμασία των δειγμάτων και η διαδικασία της χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των παρακάτω οργάνων και συσκευών:

- α) Μικροσύριγγα εγχύσεως δείγματος Hamilton, 100 μl (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Ελβετία)
- β) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7010 (Alltech Associates Inc., Deerfield IL, ΗΠΑ)
- γ) Ενσωματωμένος βρόχος (loop) σταθερού όγκου δείγματος, 20 μl
- δ) Αντλία Marathon III (Rigas Labs, Θεσ/νίκη)
- ε) Ανιχνευτής υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσ/νίκη).
- στ) Απαερωτής κινητής φάσης (Alltech on-line degasser system)
- ζ) Φίλτρο κινητής φάσης (Alltech metal-free mobile phase inlet filter)
- η) Τριχοειδείς σωλήνες PEEK (Poly Ether Ether Ketone) μεταφοράς της κινητής φάσης από την αντλία στη χρωματογραφική στήλη 1/16'' x 0,020'' (εξωτ. Διάμετρος X εσωτ. Διάμετρος) (Alltech – PEEK tubing)

- θ) Τριχοειδείς σωλήνες PEEK μεταφοράς της κινητής φάσης από την χρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή $-1/16'' \times 0,005''$ (εξωτ. Διάμετρος X εσωτ. Διάμετρος) (Alltech – PEEK tubing)
- ι) Βαλβίδα αλλαγής κινητής φάσης – Hamilton
- ια) Συνθετικοί σωλήνες μεταφοράς της κινητής φάσης από το δοχείο έως την αντλία διπλού τοιχώματος, $1/8'' \times 1,5\text{mm}$ (εξωτ. διάμετρος x εσωτ. διάμετρος) οι οποίοι αποτρέπουν την επαναδιάλυση του ατμοσφαιρικού αέρα στην απαερωμένη κινητή φάση (Alltech, NO-OX tubing)
- ιβ) Φυγόκεντρος TDX σταθερής ταχύτητας 11226 rpm (ABBOTT Diagnostics Products GmbH, Γερμανία)
- ιγ) Φυγόκεντρος Runne Heildeberg, Mod. 80-2 μεταβλητής ταχύτητας (Runne Heildeberg, Γερμανία)
- ιδ) Στήλη χρωματογραφίας Kromasil 100, C18, διαμέτρου σωματιδίων 5 μm , διαστάσεων 250 x 4,6 mm (μήκος x εσωτ. Διάμετρος) (Rigas Labs)
- ιε) Προστήλη (guard column) Nucleosil C18 100 A, 7,5 x 4,6 mm, 5 μm , (Macherey-Nagel Packings-Alltech)
- ιστ) Φίλτρα διηθήσεως 0,45 μM (Alltech syringe filters)
- ιζ) Συσκευή παρασκευής υπερκαθαρού νερού USF – IONPURE (USF/Seral, Ransbach-Baumbach, Γερμανία)
- ιη) Κωνικά φιαλίδια εξαερώσεως δείγματος 3,0 ml (Alltech mini-vials)
- ιθ) Θερμαντική συσκευή εξαερώσεως δείγματος, MULTI-BLOK Heater (LAB-LINE Instruments, Melrose Park IL, ΗΠΑ)
- κ) Προσωπικός υπολογιστής ART computers
- κα) Λογισμικό πρόγραμμα καταγραφής των χρωματογραφημάτων Chrom & Spec (Rigas Labs)
- κβ) Αναλυτικός ζυγός – Gibertini (Gibertini Elettronica SRL, Milano, Ιταλία)
- κγ) Πεχαμετρικός χάρτης, pH 0-14– Riedel- de Haen
- κδ) Συσκευή αναδέυσεως δειγμάτων (Vortex)

2.3: Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα (stock solutions) 2 mM κατόπιν ζυγίσεως των προτύπων ουσιών και διαλυτοποιήσεώς τους όπως παρακάτω:

- α) CA, 137U, 13X, 17X, 13U σε υπερκαθαρό νερό (Nyeki et al, 2001)

β) 37X, 17U, 37U, 3U σε 2,5mM NaOH (Nyeki *et al.*, 2001)

γ) 1X, 3X, 7X, 1U, 7U σε 5mM NaOH >>

δ) AFMU σε υπερκαθαρό νερό

Τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν με NaOH αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά φιαλίδια για την αποφυγή διαλύσεως του γυαλιού από το αλκαλικό διάλυμα (Γεωργάτσος και Αρζόγλου 1999).

ε) 4-ακεταμιδοφαινόλη 10 mM σε υπερκαθαρό νερό, για τη χρήση της ως εσωτερικού προτύπου.

Όλα τα πρότυπα διαλύματα, πλην των AFMU και 13U φυλάχτηκαν στους 4°C. Τα πρότυπα διαλύματα του AFMU και 13U φυλάχτηκαν στους -20°C.

Για τη μελέτη του CYP1A2, μόνο οι AFMU, 1U, 1X και 17U ήταν απαραίτητο να ποσοτικοποιηθούν στα ούρα. Γι' αυτό το λόγο προετοιμάστηκαν πρότυπα μίγματα 500μM των 4 ουσιών από τα αρχικά πρότυπα (stock) διαλύματα. Το AFMU προστέθηκε εκ των υστέρων αφού έγινε προσαρμογή του μίγματος σε pH ~ 3,5, με οξικό οξύ, καθώς το AFMU είναι ασταθές σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Τα μίγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης (calibration) με ανάμιξη με ούρα ατόμου που απείχε από μεθυλοξανθίνες για 10 ημέρες.

2.4: Διαδικασία υγρής εκχύλισης (Liquid extraction)

Κατ' αρχήν συλλέχτηκε ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων (spot urine sample) υγιούς ενήλικου ατόμου το οποίο απείχε από μεθυλοξανθίνες και φάρμακα για 10 ημέρες. Τα ούρα αυτά προσαρμόστηκαν σε pH ~ 3,5 με 1 N HCl. Δείγματα (aliquots) 1 ml από τα ούρα αυτά φυλάχτηκαν στους -20°C.

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης, ελήφθησαν 200 μl από τα ούρα αυτά στα οποία προστέθηκαν 120 mg θειικό αμμώνιο για την κατακρήμνιση των τυχόν ενυπαρχουσών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl από τα πρότυπα μίγματα των 4 μεταβολιτών σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM και 16μl 4-ακεταμιδοφαινόλης, συγκεντρώσεως 10 mM.

Τα μίγματα αυτά αναδεύτηκαν ισχυρά για 30' σε γυάλινο φιαλίδιο με πώμα και φυγοκεντρήθηκαν για 3' στις 11226 rpm. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 6 ml μίγματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης (85:15, v/v) (Grant *et al.*, 1983) και έγινε ισχυρή ανάδευση για 1'. Ο διαχωρισμός των φάσεων έγινε σε διαχωριστική χοάνη, η οργανική φάση μεταφέρθηκε

σε γυάλινο κωνικά φιαλίδιο και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού στους 45°C με ήπιο ρεύμα αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα ανασυστήθηκε με 200 μl κινητής φάσης, αναδεύτηκε ισχυρά για 15'' και διήθησε με τη χρήση πλαστικής σύριγγας 1 ml και φίλτρα σύριγγας 0,45 μM. 20 μl από το δείγμα αυτό εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται προκειμένου να εξεταστούν ούρα ατόμων στα οποία έχει χορηγηθεί από του στόματος CA, με τη διαφορά ότι αντί για πρότυπα μίγματα των 4 μεταβολιτών προστίθενται 200 μl υπερκαθαρού ύδατος.

2.5: Χρωματογραφικές συνθήκες

Για το διαχωρισμό της CA και 14 από τους κύριους και δευτερεύοντες μεταβολίτες της χρησιμοποιήθηκαν 2 κινητές φάσεις:

α) Η κινητή φάση A αποτελείται από 0,05% οξικό οξύ, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο σε αναλογίες 92:4:4 (v/v/v) (pH ~ 3,5).

β) Η κινητή φάση B αποτελείται από 0,05% οξικό οξύ και μεθανόλη σε αναλογίες 60:40 (v/v).

Η θερμοκρασία ήταν θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C). Η ταχύτητα ροής και η διαδοχική σειρά των κινητών φάσεων ρυθμίστηκαν χειροκίνητα όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 2.

Το μήκος κύματος του ανιχνευτή τοποθετήθηκε στα 280 nm. Η πίεση κυμάνθηκε από 1200 έως 2100 psi

Πίνακας 3. Πρόγραμμα ροής για τη χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της.

Χρόνος (min)	Ταχύτητα ροής (ml/min)	Κινητή φάση
0	0,8	A
11,5	1,4	A
20	1,0	B

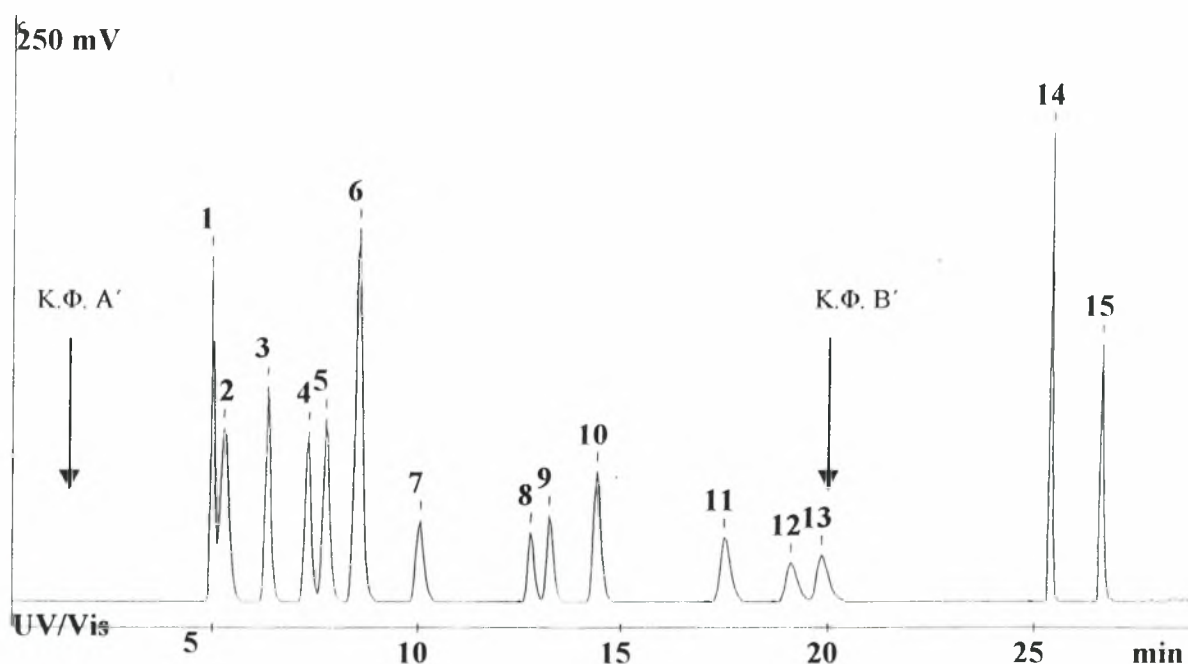
Σημ. Κινητή φάση A: 0,05%, οξικό οξύ: μεθανόλη: ακετονιτρίλιο (92:4:4, v/v/v)

Κινητή φάση B: 0,05%, οξικό οξύ: μεθανόλη (60:40, v/v)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1: Διαχωρισμός των μεταβολιτών

Κάτω από τις ανωτέρω περιγραφείσες συνθήκες επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των 4 απαραίτητων για τον προσδιορισμό της λειτουργίας του CYP1A2 μεταβολιτών της CA, καθώς και του εσωτερικού προτύπου. Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες της CA διαχωρίστηκαν επίσης πλην της 37U και 3X οι οποίοι όμως δεν υπεισέρχονται σε κανέναν ενζυμικό προσδιορισμό (Εικόνα 7). Η ταυτοποίηση της σειράς έκλουσης των ουσιών έγινε με έγχυση κάθε μιας ξεχωριστά και καταγραφή του χρόνου κατακράτησής της. Απαιτήθηκαν περίπου 30' για την ανάλυση προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η CA και ο μεταβολίτες της είχαν διέλθει από το χρωματογραφικό σύστημα. Οι χρόνοι κατακράτησης (retention times) ήταν 5,25', 7,73', 10,03', 17,48' και 14,37' για τα AFMU, 1U, 1X, 17U και 4-ακεταμιδοφαινόλη αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Χρωματογράφημα HPLC προτύπου μίγματος της καφεΐνης (CA) και 14 μεταβολιτών της σε συγκεντρώσεις 100μM και του εσωτερικού προτύπου (I.S.) σε συγκέντρωση 800μM. 1=3U, 2=AFMU, 3=7U, 4=7X, 5=1U, 6=3X+37U, 7=1X, 8=13U, 9=37X, 10=I.S., 11=17U, 12=17X, 13=13X, 14=137U, 15=CA. Κ.Φ. Α'=κινητή φάση Α', Κ.Φ. Β'=κινητή φάση Β', όπως περιγράφονται στον πίνακα 3.

Οι συντελεστές διαχωρισμού (resolution factors) για τις ουσίες ενδιαφέροντος και το εσωτερικό πρότυπο ήταν από 1,11 μέχρι 8,69 επισημαίνοντας τον ικανοποιητικό τους διαχωρισμό.

Κάποιες ακαθαρσίες εμφανίστηκαν στο χρωματογράφημα των ούρων ελεύθερων από μεθυλοξανθίνες οι οποίες πιθανώς είναι ξανθίνες και ουρικά οξέα που προέρχονται από τη διάσπαση ενδογενών ενώσεων (Rasmussen and Brosen, 1996). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές παρεμβολές από το βιολογικό υπόστρωμα (matrix) (Εικόνα 8α).

Στό εικόνα 8β εμφανίζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα ούρων ατόμου που κατανάλωσε 2 φλιτζάνια δυνατού καφέ (~200 mg CA) μετά από 10 ημέρες αποχής από τροφές και ποτά που περιέχουν μεθυλοξανθίνες.

Πίνακας 4. Χρόνοι κατακράτησης και συντελεστές διαχωρισμού της καφεΐνης και των μεταβολιτών της

A/A	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ (min)	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (n, n+1)
1	3U	4,95	1,11
2	AFMU	5,25	3,34
3	7U	6,30	4,10
4	7X	7,29	1,68
5	1U	7,73	2,70
6	3X+37U	8,50	4,73
7	1X	10,03	8,69
8	13U	12,75	1,64
9	37X	13,22	3,65
10	1S.	14,37	7,83
11	17U	17,47	3,36
12	17X	19,09	1,45
13	13X	19,85	17,10
14	137U	25,36	10,09
15	137X (CA)	26,63	---

3.2: Ανάκτηση των μεταβολιτών

Οι απόλυτες ανακτήσεις των μεταβολιτών υπολογίστηκαν εις τριπλούν, σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις, συγκρίνοντας το ύψος των κορυφών, μετά από εκχύλιση των 4 μεταβολιτών από ούρα προκαθορισμένων συγκεντρώσεων (spiked urine samples), με το ύψος

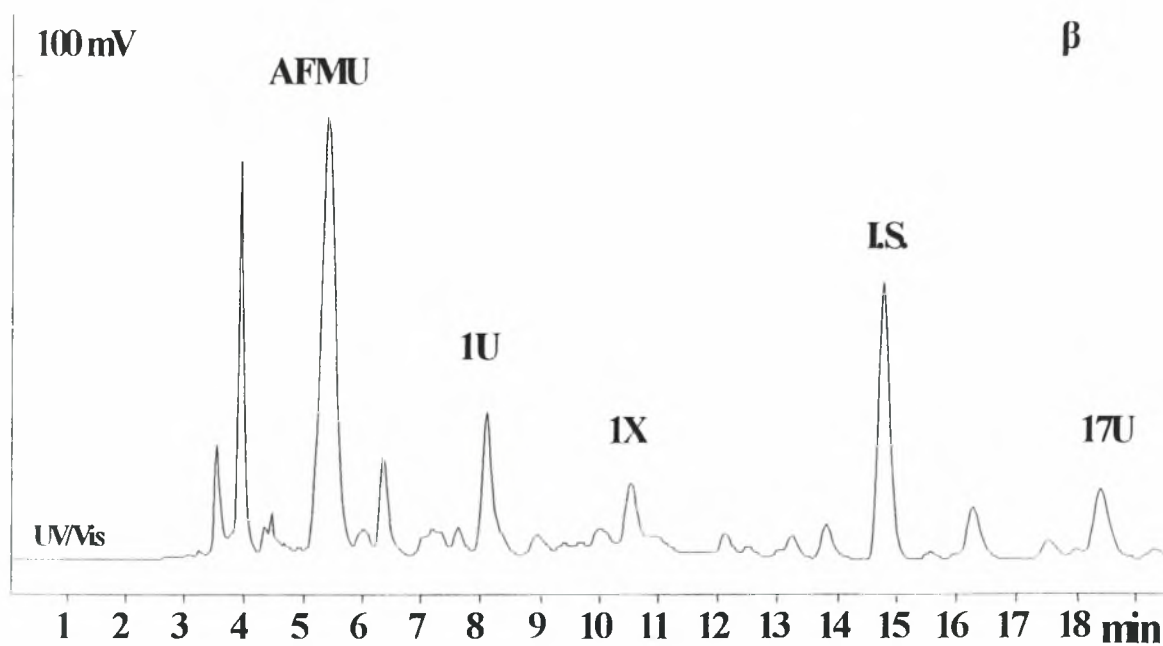
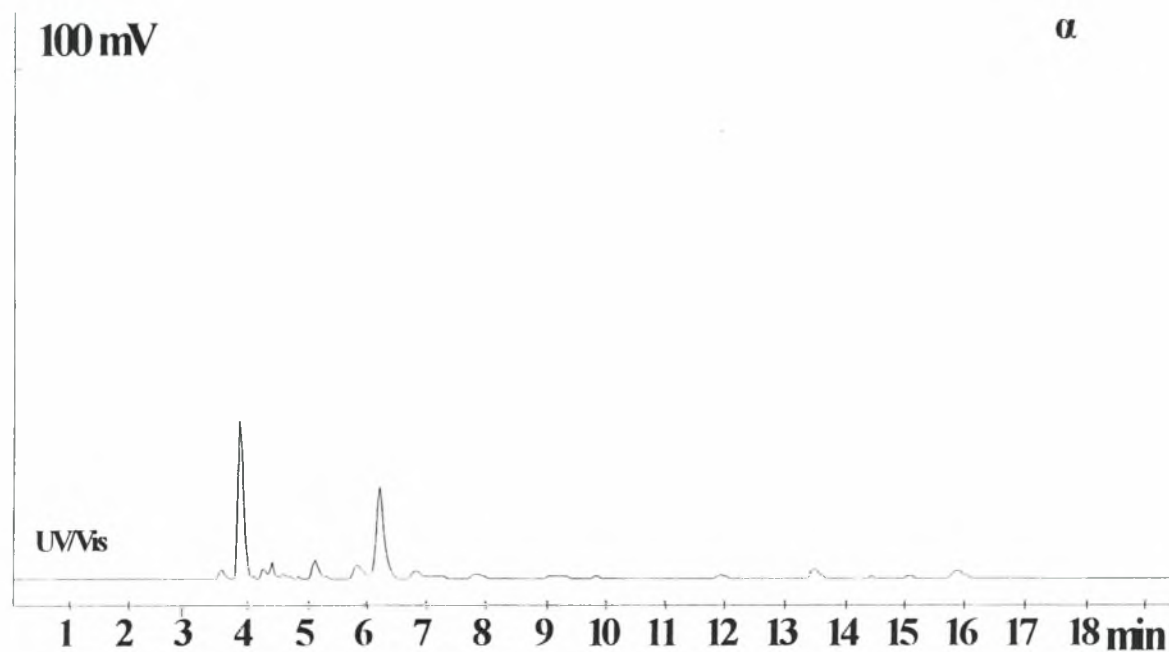
των αντίστοιχων κορυφών μετά από έγχυση προτύπου μίγματος των ουσιών στις ίδιες συγκεντρώσεις.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων ήταν 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM και οι ανακτήσεις ήταν 73,6% (61,8-90,6), 65,2% (52,2-84,1), 94,3% (83-109,7) και 91,7% (83,5-106,1) για τα AFMU, 1U, 1X και 17U αντίστοιχα, αποδιδόμενες ως μέσοι όροι και εύρη τιμών για τα 6 επίπεδα συγκεντρώσεων. Η ανάκτηση του εσωτερικού προτύπου ήταν 91,6%.

3.3: Έλεγχος χρωματογραφικού συστήματος

3.3.1: Γραμμική απόκριση ανιχνευτή υπεριώδους / ορατού

Η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή υπεριώδους / ορατού εξετάστηκε εις διπλούν σε επίπεδα συγκεντρώσεων 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM των τεσσάρων μεταβολιτών σε πρότυπα διαλύματα. Οι καμπύλες που συσχέτισαν το λόγο των υψών των κορυφών των μεταβολιτών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου με τη συγκέντρωση των ουσιών ήταν ευθείες γραμμές με συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης (r^2) 0.9979, 0.9993, 0.9996 και 0.9998 για τα AFMU, 1U, 1X και 17U αντίστοιχα.



Εικόνα 8. α: Χρωματογράφημα HPLC ούρων ατόμου που απείχε από μεθυλοξανθίνες για 10 ημέρες, κατόπιν κατεργασίας με υγρά εκχύλιση. β: Χρωματογράφημα HPLC ούρων του ίδιου ατόμου, 8 ώρες μετά από κατανάλωση 2 φλιτζανιών δυνατού καφέ (~200mg CA). Οι μεταβολίτες που απαιτούνται για την εκτίμηση της λειτουργίας του CYP1A2 επισημαίνονται ως: AFMU=147,8 μ M, 1U=65,4 μ M, IX=44,5 μ M, I.S., 17U=54,3 μ M.

3.3.2: Έλεγχος νεκρού όγκου (dead volume)

Ο νεκρός όγκος μιας ισοκρατικής διάταξης είναι 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 προσαρμογέων τους (fittings) και της κυψελίδας του ανιχνευτή. Ο νεκρός όγκος πρέπει να ελαχιστοποιείται για να αποφεύγεται, όσον το δυνατόν, η διάχυση του δείγματος και συνεπώς να μειώνεται η διεύρυνση των κορυφών (Kromidas, 2000).

Στην προκειμένη περίπτωση, αφαιρέθηκαν η στήλη και η προστήλη και συνδέθηκαν οι τριχοειδείς σωλήνες μεταξύ τους με τη βοήθεια ενός συνδετήρα (union) μηδενικού νεκρού όγκου. Η ροή τέθηκε στα 0,2 ml/min και έγινε έγχυση 17X. Η κορυφή της ουσίας εμφανίστηκε στα 0,14 min. Ο νεκρός όγκος υπολογίστηκε από τον τύπο $Vd = F \cdot t$ (ml/min)·t (min) και ήταν 28 μl, μία τιμή η οποία βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια (<60μl) (Kromidas, 2000).

3.3.3: Έλεγχος αντλίας

Ο έλεγχος της αντλίας έγινε με βάση την ακρίβεια και σταθερότητα. Η ακρίβεια μετρήθηκε με τη χρονομέτρηση της ροής μετά τη στήλη με τη χρήση ογκομετρικής φιάλης 5 ml. Ο χρόνος πλήρωσης με ροή 1 ml/min ήταν $5' 03'' \frac{83}{100}''$ παρουσιάζοντας μία απόκλιση 1,26%, μία τιμή η οποία βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια (<5%) (Kromidas, 2000).

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 στη σταθερότητα ροής κατά τη διάρκεια της έκλουσης της κορυφής της ουσίας και μετράται με το συντελεστή μεταβλητότητας (CV) των εμβαδών της κορυφής μετά από 6 τουλάχιστον εγχύσεις.

Οι ανωτέρω μετρήσεις έγιναν με την έγχυση προτύπου διαλύματος 17U με κινητή φάση 0,05% οξικό οξύ: ακετονιτρίλιο, 90:10 (v/v) με ταχύτητα ροής 1 ml/min. Τα αποτελέσματα περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Τα αποτελέσματα βρίσκονται πλησίον των τιμών 0,1 – 0,5% που θεωρούνται ικανοποιητικά για θερμοστατούμενη στήλη (Kromidas, 2000).

Πίνακας 5. Μακροχρόνια και βραχυχρόνια σταθερότητα αντλίας HPLC

<i>a/a</i>	Χρόνος κατακράτησης (min)	Εμβαδόν (mV x sec)
1	4,86	7527,661
2	4,84	7456,516
3	4,83	7497,790
4	4,88	7397,381
5	4,88	7494,616
6	4,90	7477,578
Μέσος Όρος 4,865		7457,257
C.V. 0,54%		0,59%

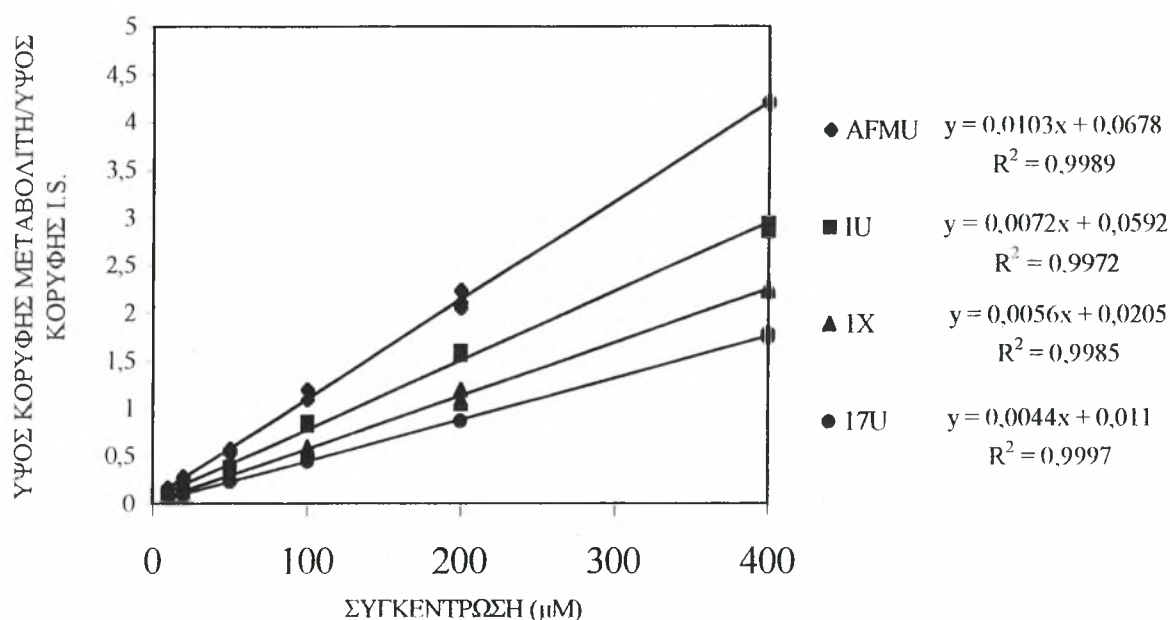
3.4: Πρότυπες καμπύλες (calibration curves)

Οι πρότυπες καμπύλες των AFMU, IU, IX και 17U κατασκευάστηκαν μετά από εκχύλιση ούρων ελεύθερων από μεθυλοξανθίνες σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις (spiked urine samples) 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM . Για κάθε συγκέντρωση έγιναν 3 προσδιορισμοί οι οποίοι συσχέτισαν το λόγο του ύψους της κορυφής των μεταβολιτών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Οι καμπύλες που προέκυψαν ήταν ευθείες γραμμές με συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης (r^2) 0.9989, 0.9972, 0.9985, 0.9997 για τα AFMU, IU, IX και 17U αντίστοιχα, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα H/Y EXCELL (Εικόνα 9).

3.5: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Για τον υπολογισμό της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου εξετάστηκαν ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών σε προκαθορισμένα επίπεδα συγκεντρώσεων (spiked) 35, 150 και 300 μM τα οποία υπέστησαν κατεργασία όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο της εκχύλισης. Έγιναν 3 προσδιορισμοί σε μία ημέρα (intra-day) και προσδιορισμοί σε 5 συνεχόμενες ημέρες (inter-day). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ AFMU, 1U, 1X, 17U



Εικόνα 9. Πρότυπες καμπύλες και εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των AFMU, 1U, 1X, και 17U, μετά από υγρά εκχύλιση ούρων προκαθορισμένων συγκεντρώσεων (spiked).

3.6: Όριο ανιχνευσιμότητας – όριο ποσοτικού προσδιορισμού

Συγκεντρώσεις 1 μM των 4 μεταβολιτών έδωσαν λόγο σήματος προς το θόρυβο της βασικής γραμμής (baseline) μεγαλύτερο του 3. Έτσι το επίπεδο συγκέντρωσης του 1 μM ορίστηκε ως όριο ανιχνευσιμότητας.

Το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού καθορίστηκε ως το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης (10 μM).

Όνομαστική Συγκ (μM)	AFMU			IU			IX			I7U		
	Προσδιορισθείσα			Προσδιορισθείσα			Προσδιορισθείσα			Προσδιορισθείσα		
	Μ.Ο.±SEM	CV(%)	απόκλ.(%)	Μ.Ο.±SEM	CV(%)	απόκλ.(%)	Μ.Ο.±SEM	CV(%)	απόκλ.(%)	Μ.Ο.±SEM	CV(%)	απόκλ.(%)
intra-day												
n=3												
35	34,9±0,8	4,2	-0,3	39,6±1,1	4,7	13,1	37,5±0,5	2,2	7,1	36,7±0,3	1,4	4,9
150	154,3±4,7	5,3	2,9	149,1±4,7	5,4	-0,6	145,2±0,8	0,9	-3,2	150,8±1,4	1,6	0,5
300	305,5±6,7	3,8	1,8	293,9±5,3	3,1	-2,0	288,2±7,9	4,7	-3,9	296,5±7,4	4,3	-1,2
inter-day												
n=5												
35	32,3±1,5	10,3	-7,7	35,5±2,2	14,0	1,4	33,6±0,7	4,6	-4,0	33,3±0,9	5,7	-4,8
150	144,8±3,9	6,0	-3,5	146,0±4,3	6,6	-2,7	141,3±2,6	4,2	-5,8	142,0±2,6	4,1	-5,3
300	290,3±12,2	9,4	-3,2	304,2±23,2	17,0	1,4	283,3±11,7	9,2	-5,6	283,0±8,7	6,8	-5,7

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1: Διαχωρισμός – Χρωματογραφικές συνθήκες

Η παρούσα εργασία περιγράφει μια μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης – ανάστροφης φάσης (reversed – phase HPLC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων από τους μεταβολίτες της CA στα ανθρώπινα ούρα. Ο διαχωρισμός της CA και 14 από τους κύριους και δευτερεύοντες μεταβολίτες της επιτεύχθηκε με τη χρήση της στήλης Kromasil 100-C18 με στατική φάση αποτελούμενη από πηκτή (gel) πυριτικών των οποίων οι ομάδες Si-OH έχουν ως υποκαταστάτες αλυσίδες υδρογονανθράκων με 18 άτομα άνθρακα. Η διάμετρος των σωματιδίων του πυριτίου ήταν 5μM και οι διαστάσεις της στήλης ήταν 250 x 4,6 mm. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 0,05% οξικό οξύ, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο σε κατ' όγκον αναλογίες 92:4:4.

Η κινητή αυτή φάση αποτελεί μια τροποποίηση της κινητής φάσης των Grant *et al.* (1983) οι οποίοι χρησιμοποίησαν 0,05% οξικό οξύ και μεθανόλη σε αναλογίες 88:12 (v/v). Διάφορα όμως μίγματα 0,05% οξικού οξέος και μεθανόλης που δοκιμάστηκαν σε διάφορες αναλογίες, όπως και αντικατάσταση της μεθανόλης με ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρησιμοποιηθείσα στήλη.

Οι παραπάνω συνδυασμοί έδωσαν είτε ανεπαρκή διαχωρισμό είτε παρεμβολή των κορυφών με ενδογενείς κορυφές. Τελικώς προτιμήθηκε η χρησιμοποίηση δύο οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) στην κινητή φάση η οποία, στην προκειμένη περίπτωση, απέδωσε ικανοποιητικό διαχωρισμό.

Η προσθήκη ενός τρίτου συστατικού στην κινητή φάση δεν είναι ασυνήθης και σε ορισμένες περιπτώσεις βελτιώνει το διαχωρισμό (Meyer, 1996; Krul and Hageman, 1998).

Ο μικρότερος συντελεστής διαχωρισμού που παρατηρήθηκε ήταν 1,1 μεταξύ των κορυφών του 3U και του AFMU. Ο συντελεστής διαχωρισμού εκφράζει το μέγεθος του διαχωρισμού μεταξύ δυο διαδοχικών κορυφών. Συντελεστής ίσος με 1 υποδεικνύει την ξεκάθαρη παρουσία 2 ουσιών. Ο βέλτιστος συντελεστής πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,25 και 1,5. Προκειμένου για ποσοτική ανάλυση, απαιτείται ένας συντελεστής 1,25 (Meyer, 1996). Στον παρόντα διαχωρισμό όμως, ο συντελεστής 1,11 που παρατηρήθηκε θεωρείται ικανοποιητικός καθώς το 3U αντιπροσωπεύει πολύ μικρό ποσοστό των μεταβολιτών της CA στα ούρα. Συγκεκριμένα το 3U δεν ανιχνεύθηκε σε 68 υγιείς (Grant *et al.*, 1983) και στους 11 από τους 13 ασθενείς με ηπατική νόσο (Rodopoulos *et al.*, 1995). Ενώ ήταν από 3-5% της ποσότητας των μεταβολιτών στα ούρα σε 11 υγιείς (Rodopoulos *et al.*, 1995).

Μετά την έκλουση της 13X και προκειμένου να εκλουσθούν ταχύτερα το 137U και η CA (137X) χρησιμοποιήθηκε και η κινητή φάση 0,05% οξικό οξύ, / μεθανόλη σε κατ' όγκον αναλογία 60:40, καθώς οι ουσίες αυτές έχουν ισχυρότερο υδρόφοβο χαρακτήρα και κατακρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση των C18 υδρογονανθράκων λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Σε αναλύσεις ρουτίνας όμως, στις οποίες απαιτείται η ποσοτικοποίηση μόνο των AFMU, 1U, 1X και 17U, αυτό το στάδιο παραλείπεται και η στήλη καθαρίζεται με έγχυση 100% ακετονιτρίλιου μετά από κάθε χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος των προς εξέταση ούρων (Kromidas, 2000).

Οι πιο πολικοί μεταβολίτες διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά με ταχύτητα ροής $U=0,8$ ml/min μέσα σε χρόνο 11' περίπου. Από το σημείο των 11' 30'' η ταχύτητα αυξήθηκε χειροκίνητα σε 1,4 ml/min προκειμένου να εκλουσθούν ταχύτερα οι περισσότερο υδρόφοβοι μεταβολίτες. Η ταχύτητα αυτή επιλέχθηκε ως η βέλτιστη δυνατή ώστε να αποφευχθεί η μεγάλη αύξηση της πίεσης η οποία μπορεί να αλλοιώσει την ομοιογένεια της στατικής φάσης μέσα στη στήλη. Για τον ίδιο λόγο, στο χρονικό σημείο εισόδου της δεύτερης κινητής φάσης ($t=20'$) η ταχύτητα ροής προσαρμόστηκε στο 1 ml/min. Ο χρόνος που απαιτείται για την έκλουση των 4 ενδιαφερομένων μεταβολιτών είναι περίπου 18' και απαιτούνται επιπλέον 5' περίπου για τον καθαρισμό της στήλης με 100% ακετονιτρίλιο πριν την επόμενη έγχυση.

Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο (Dobrocky *et al.*, 1994; Krul and Hageman, 1998; Baud- Camus *et al.*, 2001; Nyeki *et al.*, 2001), η μεθανόλη (Grant *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1987β; Rasmussen and Broesen, 1996; Nordmark *et al.*, 1999; Georga *et al.*, 2001; Bendriss *et al.*, 2000), το τετραϋδροφουράνιο (Krul and Hageman, 1998; Caubet *et al.*, 2002) σε διάφορες αναλογίες με οξικό οξύ ή όξινα ρυθμιστικά διαλύματα σε pH 3-4.

Διαφοροποιήσεις υπάρχουν και στον τρόπο έκλουσης των μεταβολιτών ο οποίος γίνεται είτε ισοκρατικά (Rasmussen and Broesen, 1996; Grant *et al.*, 1983; Krul and Hageman, 1998), είτε με βαθμιδωτή έκλουση (Dobrocky *et al.*, 1994, Nordmark *et al.*, 1999; Baud-Camus *et al.*, 2001; Nyeki *et al.*, 2001; Georga *et al.*, 2001; Caubet *et al.*, 2002).

Καθώς οι μεταβολίτες της CA καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος πολικότητας, η βαθμιδωτή έκλουση των πιο υδρόφοβων μορίων καθιστά ταχύτερο το διαχωρισμό. Επίσης παρέχει πιο οξείες κορυφές βελτιώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το διαχωρισμό και μειώνοντας τυχόν αλληλεπικαλύψεις με ενδογενείς κορυφές οι οποίες συμβαίνουν λόγω διεύρυνσης των κορυφών που εκλούνται βραδύτερα. Προκειμένου όμως το σύστημα να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση απαιτείται ένα χρονικό διάστημα 10' τουλάχιστον με



ροή της αρχικής κινητής φάσης πριν την επόμενη έγχυση (Bendriiss *et al.*, 2000; Georga *et al.*, 2001).

Όσον αφορά την ανάλυση και τον προσδιορισμό του AFMU ειδικότερα, υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις. Το AFMU, ένας ακετυλιωμένος μεταβολίτης της CA, ανιχνεύτηκε, απομονώθηκε και καθαρίστηκε από τα ανθρώπινα ούρα μετά από του στόματος χορήγηση CA (Tang *et al.*, 1983). Το AFMU είναι ασταθές σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποβάλλει αυθόρμητα μία φορμιλο-ομάδα με συνέπεια να αποσυντίθεται προς AAMU (5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλ-ουρακίλη). Το AFMU είναι αρκετά σταθερό σε στερεά μορφή, σε παγωμένα και οξινοσμένα ούρα. (Tang *et al.*, 1983), καθώς και σε παγωμένο υδατικό διάλυμα σύμφωνα με τον προμηθευτή της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Προκειμένου να αντιμετωπισθεί η αστάθεια του AFMU, αναφέρονται μέθοδοι κατά τις οποίες αυτό μετατρέπεται σε AAMU κάτω από βασικές συνθήκες (pH=10) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και γίνεται ξεχωριστός προσδιορισμός του AFMU σε διαφορετικές χρωματογραφικές στήλες (Tang *et al.*, 1991; Baud-Camus *et al.*, 2001) καθώς το AAMU δεν εκχylίζεται στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες.

Ταυτόχρονος προσδιορισμός του AAMU μαζί με τους άλλους μεταβολίτες της CA αναφέρεται σε μία μέθοδο με απευθείας έγχυση των ούρων σε C18 – στήλη ανάστροφης φάσης (Dobrocky *et al.*, 1994), με τον κίνδυνο όμως να υπάρξουν παρεμβολές από ενδογενείς ουσίες. Έχει αναφερθεί επίσης ταυτόχρονος προσδιορισμός του AAMU και AFMU μαζί με τα 1X, 1U και 17U με τη χρησιμοποίηση χρωματογραφικής στήλης με υλικό πλήρωσης Polyamine II και μικρή προκατεργασία του δείγματος των ούρων χωρίς υγρή εκχύλιση (Nyeki *et al.*, 2001).

Υπάρχουν επίσης μέθοδοι διαχωρισμού των μεταβολιτών της CA χωρίς τον προσδιορισμό του AFMU ή του AAMU καθώς παραπέμπουν σε χρήση μεταβολικών λόγων της CA που δεν χρησιμοποιούν τις ουσίες αυτές (Georga *et al.*, 2001; Caubet *et al.*, 2002).

Η ανίχνευση των μεταβολιτών της CA γίνεται συνήθως με τη χρήση ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού σε διάφορα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν ισχυρά η CA και οι μεταβολίτες της. Αναφέρονται ανιχνεύσεις στα 280 nm (Grant *et al.*, 1983; Bendriiss *et al.*, 2000; Nyeki *et al.*, 2001; Krul and Hageman, 1998; Nordmark *et al.*, 1999), στα 273 nm (Rasmussen and Brosen, 1996; Baud-Camus *et al.*, 2001), στα 275 nm (Georga *et al.*, 2001), στα 260 nm (Nyeki *et al.*, 2000) στα 270 nm για τις ξανθίνες και στα 290 nm για τα ουρικά οξέα (Caubet *et al.*, 2002). Η ανίχνευση του AAMU γίνεται στα 260 nm (Nyeki *et al.*, 2001) ή στα 263 nm (Tang *et al.*, 1991). Υπάρχει επίσης μέθοδος κατά την οποία γίνεται ανίχνευση

των μεταβολιτών της CA με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (UV diode array – DAD) (Caubet *et al.*, 2002) και με φασματογράφο μάζας (Baud-Camus *et al.*, 2001).

Η θερμοκρασία της ανάλυσης είναι συνήθως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ενώ σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιείται θερμοστατούμενη στήλη στους 23°C (Caubet *et al.*, 2002), στους 30°C (Rasmussen and Brosen, 1996), στους 3°C (Nordmark *et al.*, 1999).

Η απαέρωση της κινητής φάσης θεωρείται απαραίτητη καθώς έτσι αποτρέπονται φαινόμενα “θορύβου” και μετάπτωσης της βασικής γραμμής όπως επίσης και διακυμάνσεις της πίεσης (Kromidas, 2000). Στην παρούσα εργασία αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός on-line απαερωτικού συστήματος το οποίο απομακρύνει το διαλυμένο στην κινητή φάση αέρα με τη δημιουργία κενού.

Πέραν των χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης της CA και των μεταβολιτών της αναφέρεται και ανάλυση με τη χρήση μικκυλιακής ηλεκτροκινητικής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (MECC) η οποία προσφέρει υψηλότερη αποτελεσματικότητα (10⁶ θεωρητικές πλάκες), μικρότερο χρόνο ανάλυσης, μικρότερο όγκο δείγματος και χαμηλό κόστος (Zhao and Lunte, 1997).

Στη παραπάνω μέθοδο όμως, αναφέρεται ανάλυση μόνο των CA, 37X, 137U, 17X και 13X.

4.2: Προκατεργασία δείγματος ούρων – Εκχύλιση

Στα δείγματα των ούρων που λαμβάνονται προς ανάλυση γίνεται προσαρμογή του pH σε τιμή 3,5 με HCl το οποίο χρησιμεύει ως συντηρητικό, γενικώς, και ειδικότερα αποτρέπει την μερική αποδόμηση του AFMU προς ΛAMU. Το pH των ούρων, σε υγιή άτομα μπορεί να κυμανθεί από 4,8 έως 7,8 συνήθως όμως βρίσκεται μεταξύ 5,0 και 6,5. Το pH των ούρων επηρεάζεται σημαντικά από τις τροφές καθώς ο μεταβολισμός των λιπών, για παράδειγμα, παράγει πιο όξινα ούρα από το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Οι πρωτεΐνες, επίσης, αποδίδουν όξινα ούρα. Όταν τα ούρα παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα εκτός του οργανισμού, μετατρέπονται σε αλκαλικά από τη δράση μικροβίων που μετατρέπουν την ουρία σε αμμωνία (Γεωργάτσος και Αρζόγλου, 1999). Στα ούρα, επίσης, περιέχεται και μία πληθώρα στερεών συστατικών (κύτταρα, κρύσταλλοι, ιζήματα διαφόρων αλάτων κ.ά) και χημικών ενώσεων (ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, κετονοσώματα, ορμόνες κ.ά) για τα οποία γίνεται προσπάθεια να απομακρυνθούν μέσω φυγοκέντρησης και εκχύλισης.

Στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των μεταβολιτών της CA από τα ούρα όπως αυτή περιγράφεται στην εργασία των Grant *et al.*, (1983) με τη χρήση

6 ml μίγματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης σε κατ' όγκον αναλογία 85/15. Επίσης χρησιμοποιήθηκε θεικό αμμώνιο για την κατακρήμνιση των τυχόν ενυπαρχουσών πρωτεϊνών. Σ' αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι στα φυσιολογικά ούρα θεωρείται γενικώς ότι δεν περιέχονται πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα όμως, αποβάλλονται 20-80 mg την ημέρα, που μπορεί να φτάσουν μέχρι και 500 mg χωρίς οργανική βλάβη των νεφρών. Σε βλάβες του ουροποιητικού συστήματος μπορεί να εμφανιστεί πρωτεϊνουρία μέχρι του ποσού των 50 g/l. Μεταξύ των πρωτεϊνών που ανευρίσκονται στα φυσιολογικά ούρα είναι και διάφορα ένζυμα όπως αμυλάση, πλασμίνη, όξινη φωσφατάση, ριβονουκλεάση, ουροπεψίνη κ.ά. Κατά ένα ποσοστό, τα ένζυμα αυτά οφείλονται στα κυτταρικά στοιχεία των ούρων ή σε διάφορα όργανα που είναι μέρη ή έχουν σχέση με το ουροποιητικό σύστημα (Γεωργάτσος και Αρζόγλου, 1999).

Τα ποσοστά ανάκτησης των 4 μεταβολιτών της CA ήταν κατά μέσο όρο 73,6%, 65,2%, 94,3% και 91,7% για τα AFMU, IU, IX και 17U αντίστοιχα. Η σχετικώς χαμηλή ανάκτηση του IU σχετίζεται πιθανώς με τη μειωμένη διαλυτότητα του IU σε όξινα διαλύματα και συνεπώς με τη μειωμένη διαλυτότητά του στην κινητή φάση κατά την ανασύσταση του στερεού υπολείμματος. Με τη χρήση των ανωτέρω οργανικών διαλυτών, με την ίδια αναλογία, οι Bendriss *et al* (2000) αναφέρουν ανακτήσεις που κυμαίνονται από 77-85% για το AFMU, 44-52% για το IU, 96-105% για το IX και 103-107% για το 17U σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι η ανάκτηση του IU μπορεί να αυξηθεί με την αύξηση της αναλογίας της ισοπροπανόλης στο μίγμα της εκχύλισης. Αλλά παρατηρούν ότι μ' αυτόν τον τρόπο εκχυλίζονται ανεπιθύμητες προσμίξεις ταυτόχρονα με τους μεταβολίτες της CA.

Οι Grant *et al.*, (1983) στην ανωτέρω αναφερόμενη εργασία, χρησιμοποίησαν 100% χλωροφόρμιο για την εκχύλιση του AFMU προκειμένου να αποφύγουν την ταυτόχρονη εκχύλιση διαφόρων ανεπιθύμητων προσμίξεων και αναφέρουν ανάκτηση του AFMU από 60,6-84,8%.

Οι Krul και Hageman (1998) χρησιμοποιούν 6 ml χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη σε κατ' όγκο αναλογία 4:1 και αναφέρουν ανακτήσεις των 4 μεταβολιτών μεγαλύτερες του 90%.

Προς αποφυγή της χρήσης του τοξικού χλωροφορμίου, οι Rasmussen και Brosen (1996) χρησιμοποίησαν 5 ml από το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα/ισοπροπανόλης σε αναλογία 93:7 κατά βάρος με χρόνο ανάδευσης 10' ενώ τα μίγματα με χλωροφόρμιο απαιτούν συντομότερη ανάδευση (30''-60''). Οι μέσες ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν μ' αυτή τη μέθοδο εκχύλισης ήταν 62%, 79%, 94% και 90% για τα AFMU, IU, IX και 17U αντίστοιχα.

Έχουν επίσης αναπτυχθεί μέθοδοι στερεάς εκχύλισης του βιολογικού δείγματος (Solid phase extraction – SPE) οι οποίες ελαχιστοποιούν τη χρήση των οργανικών διαλυτών με αντίστοιχη μείωση του κόστους και της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Με τη μέθοδο της στερεάς εκχύλισης οι Caubet *et al.*, (2002) αναφέρουν ανακτήσεις 86%, 98% και 95% για τα 1U, 1X και 17U αντίστοιχα. Οι Baud-Camus *et al.*, (2001) χρησιμοποιούν τη στερεά εκχύλιση για το 1U και 1X μόνον και αναφέρουν ανακτήσεις που κυμαίνονται από 93,2-106,8% για το 1U και 93,6-106,3% για το 1X. Οι Georga *et al* (2001) αφού ελέγχουν διάφορα υλικά στερεάς εκχύλισης προκρίνουν τη στήλη NEXUS με ανακτήσεις 90,4%, 92,5% και 92% για τα 1U, 1X και 17U αντίστοιχα. Δεν υπέπεσε στην αντίληψή μας μέθοδος στερεάς εκχύλισης για την ανάκτηση του AFMU.

Όλες οι μέθοδοι υγράς και στερεάς εκχύλισης προβλέπουν και άλλα στάδια κατεργασίας των ούρων όπως είναι η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, η φυγοκέντρωση ή διήθηση, ο διαχωρισμός των φάσεων (υγρά εκχύλιση), η εξαέρωση της οργανικής φάσης και η ανασύσταση του στερεού υπολείμματος, η αναδιάλυσή του με ανάδευση και ενδεχομένως η διήθηση ή η φυγοκέντρωσή του πριν την έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Όλες αυτές οι διαδικασίες απαιτούν σημαντική κατανάλωση χρόνου υλικών και διαλυτών. Γι' αυτό το λόγο έχει γίνει προσπάθεια για την ανάπτυξη μεθόδων που ελαχιστοποιούν την προκατεργασία του δείγματος των ούρων με σκοπό την απευθείας έγχυση στη χρωματογραφική στήλη, χωρίς εκχύλιση των μεταβολιτών της CA. Έτσι, οι Dobrocky *et al* (1994) ανέπτυξαν ταχεία μέθοδο για τις αναλύσεις ρουτίνας της CA και των μεταβολιτών της που απαιτεί μόνο αραίωση, φυγοκέντρωση και κατευθείαν έγχυση στη χρωματογραφική στήλη αναστροφής φάσης C18. Δεν αναφέρεται όμως η διάρκεια αντοχής της στήλης κάτω απ' αυτές τις συνθήκες.

Κάτω από το ίδιο πρίσμα, αναφέρεται μέθοδος απευθείας έγχυσης δείγματος ούρων σε χρωματογραφική στήλη με υλικό πληρώσεως το Silicalite το οποίο είναι μοριακό κόσκινο. Οι ανακτήσεις των μεταβολιτών ήταν μεγαλύτερες του 90% χωρίς όμως να γίνεται προσδιορισμός του AFMU ή του AAMU (Ambrose and Fritz, 1998).

Μέθοδος που παρακάμπτει την εκχύλιση των ούρων αναφέρεται επίσης από τους Nyeki *et al.*, (2001) κατά την οποία χρησιμοποιείται ως υλικό πληρώσεως της χρωματογραφικής στήλης ή Polyamine II. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή απαιτείται μόνο αραίωση του δείγματος των ούρων σε H₂O και σε διάφορους οργανικούς διαλύτες, ανάδευση και φυγοκέντρωση. Έτσι προσδιορίζονται όλοι οι ενδιαφερόμενοι μεταβολίτες της CA καθώς και το AAMU, ταυτόχρονα. Ο χρόνος όμως ανάλυσης διαρκεί 45' καθώς απαιτούνται 17 min για την επαναφορά (re equilibration) του συστήματος στην αρχική του κατάσταση, πριν

την επόμενη έγχυση επειδή χρησιμοποιείται βαθμιδωτή έκλυση. Η αντοχή της στήλης προσδιορίστηκε ως δυνατότητα ανάλυσης περισσότερων των 100 δειγμάτων.

4.3: Ποσοτικοποίηση

Μια από τις προϋποθέσεις της ακριβούς ποσοτικής ανάλυσης είναι και η σωστή τεχνική εισαγωγής του δείγματος στη βαλβίδα έγχυσης (injection valve). Στην προκειμένη περίπτωση εφαρμόστηκε η τεχνική της εισαγωγής όγκου δείγματος πενταπλασίου (100 μ l) του όγκου της αγκύλης (loop) σταθερού όγκου (20 μ l) καθώς και παραμονή της μικροσύριγγας πάνω στη βαλβίδα. Οι παραπάνω χειρισμοί εξασφαλίζουν, ο μιν πρώτος, την ακριβή πλήρωση της αγκύλης και ο δεύτερος την απομόνωση της αγκύλης από το εξωτερικό περιβάλλον (Meyer, 1997).

Η ποσοτικοποίηση των 4 μεταβολιτών της CA έγινε με την χρήση πρότυπης καμπύλης (calibration curve) για κάθε ένα μεταβολίτη ξεχωριστά όπως περιγράφεται στην παράγραφο της μεθόδου. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις που κάλυψαν μια περιοχή από 10-400 μ M με γνώμονα την εργασία των Rasmussen και Brosen (1996), καθώς στην εργασία αυτή γίνεται και πληθυσμιακός έλεγχος 277 εθελοντών στον οποίον τα ούρα βρέθηκαν συγκεντρώσεις από 2,1 μ M έως 744 μ M για τους διάφορους μεταβολίτες.

Οι πρότυπες καμπύλες συσχέτισαν το λόγο του ύψους της κορυφής κάθε μεταβολίτη προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου με τη συγκέντρωση. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση του ύψους της κορυφής στην ποσοτικοποίηση είναι η σταθερότητα του παράγοντα K' (capacity factor) του οποίου η τιμή δίνεται από τον τύπο $K'=(t_r-t_0)/t_0$ (t_r =χρόνος κατακράτησης ουσίας, t_0 =χρόνος διέλευσης κινητής φάσης). Ο K' είναι ανεξάρτητος από το μήκος της στήλης, την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, ενώ εξαρτάται από τη σύσταση της κινητής φάσης. Κάτω από ισοκρατικές συνθήκες, όσο αργότερα εκλύεται μια κορυφή τόσο πιο διευρυμένη είναι, δηλαδή τόσο μεγαλύτερο K' έχει. Ως συνέπεια, το ύψος της ελαττώνεται, αν η ποσότητα της ουσίας παραμένει σταθερή. Αυτό σημαίνει ότι το ύψος της κορυφής εξαρτάται από τη σύσταση της κινητής φάσης η οποία θα πρέπει να επιδεικνύει μεγάλη σταθερότητα (Meyer, 1997). Το ύψος της κορυφής επηρεάζεται λιγότερο από επικαλυπτόμενες ή παρακείμενες κορυφές απ'ότι το εμβαδόν κορυφής (Meyer, 1996).

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της μεθόδου, ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών αναμίχθηκαν με πρότυπα μίγματα των τεσσάρων μεταβολιτών μικρής (35 μ M), μεσαίας (150 μ M) και υψηλής (300 μ M) συγκέντρωσης τα οποία μετρήθηκαν σύμφωνα με την συνολική

διαδικασία της μεθόδου. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση των εξισώσεων της γραμμικής παλινδρόμησης ($y=ax+\beta$) όπου στη θέση του y τοποθετήθηκαν οι λόγοι των υψών των κορυφών των εκάστοτε μεταβολιτών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Οι προσδιορισμοί αυτοί αφορούσαν 3 συνεχόμενες μετρήσεις μέσα στην ίδια ημέρα (intra-day precision) και 1 προσδιορισμό για 5 συνεχόμενες ημέρες (inter-day precision) για κάθε μια από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των μετρήσεων και το τυπικό σφάλμα, το οποίο είναι η τυπική απόκλιση της δειγματικής κατανομής και εκφράζει την ακρίβεια των εκτιμήσεων (Αγραφιώτης, 1999). Η ακρίβεια της μεθόδου, εκφραζόμενη ως % απόκλιση από την ονομαστική τιμή της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από -7,7% έως 13,1%. Σε μία μόνο περίπτωση η ακρίβεια είχε απόκλιση πάνω από 10% δηλαδή στις μικρές συγκεντρώσεις του εντός ημέρας (intra-day) υπολογισμού του IU (13,1%). Αυτό ίσως σχετίζεται με τον μικρό αριθμό ($n=3$) των δειγμάτων που εξετάστηκαν αφ' ενός και στο πρόβλημα διαλυτότητας του IU κατά την ανασύσταση του στερεού υπολείμματος αφετέρου. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκφραζόμενη με το συντελεστή μεταβλητότητας (CV%), για την εντός-ημέρας (intra-day) και καθ' ημέραν (inter-day) επαναληψιμότητα ήταν μικρότερη ή ίση από το 10,3%, 17,0%, 9,2% και 6,8% για τα AFMU, IU, IX και 17U αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις προαναφερθείσες μεθόδους αναφέρονται ποσοστά ακριβείας και συντελεστές μεταβλητότητας στον Πίνακα 7:

Όσον αφορά τα όρια ανιχνευσιμότητας που αναφέρονται γενικώς, αυτά καθορίζονται για λόγο του σήματος της ουσίας προ το θόρυβο μεγαλύτερο του 3. Οι χαμηλότερες τιμές που αναφέρονται είναι 1 μM για τα AFMU, IU και IX και 2 μM για το 17U (Rasmussen, 1996) ή 0,3 ng για όλους τους μεταβολίτες (Georga *et al.*, 2001).

Το χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης που υπέπεσε στην αντίληψή μας ήταν το 1 ng (Georga *et al.*, 2001) ή τα 2 μM για τα AFMU και IX και 3 μM για τα IU και 17U (Rasmussen and Brosen, 1996).

Πίνακας 7: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των HPLC μεθόδων για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της καφεΐνης που απαντώνται στη βιβλιογραφία.

Ακρίβεια (%)	C.V. %	Αναφορά
-2 έως 3	2 έως 7	Rasmussen and Brosen, 1996
-12 έως 14	0,82 έως 18,57	Bendris <i>et al.</i> , 2000
-10,8 έως 11,1	1,2 έως 9,4	Nyeki <i>et al.</i> , 2001
-8,8 έως 0,4	1,9 έως 5,6 (χωρίς AFMU)	Georga <i>et al.</i> , 2001
-6,9 έως 11,1	1,1 έως 16,8 (χωρίς 17U)	Baud-Camus <i>et al.</i> , 2001
0 έως -19	0 έως 5	Caubet <i>et al.</i> , 2002
	3,5 έως 8,3	Krull and Hageman, 1998
	2,7 έως 7,5	Catheu <i>et al.</i> , 1995
	4,3 έως 8,1	Nordmark <i>et al.</i> , 1999
	3 έως 6	Dobrocky <i>et al.</i> , 1994

4.4: Κίνδυνοι-Προφυλάξεις

Το χλωροφόρμιο είναι τοξικός οργανικός διαλύτης και πρέπει να αποφεύγεται η επαφή με το δέρμα καθώς και η εισπνοή του. Γι' αυτό το λόγο οι χειρισμοί με το χλωροφόρμιο (εκχύλιση, εξαέρωση) πρέπει να γίνονται σε απαγωγό. Το ακετονιτρίλιο επίσης είναι πολύ τοξικό και τα υδατικά του διαλύματα, πριν απορριφθούν, πρέπει να αναμιγνύονται με υδροξείδιο του νατρίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να μηδενίζεται η τοξικότητά του (Meyer, 1996).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Απ' όσα εκτέθηκαν μέχρι τώρα, είναι δυνατόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα αποτελούν μια αξιόπιστη, μη-επεμβατική, αβλαβή και καλώς ανεκτή μέθοδο για την εκτίμηση της λειτουργίας του CYP1A2, τόσο σε πληθυσμιακές μελέτες όσο και σε μελέτες ασθενών με ηπατική νόσο δεδομένου ότι η καφεΐνη αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη ουσία και η χρήση της θεωρείται γενικώς ασφαλής.

Ειδικότερα, ο λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$, φαίνεται να συγκεντρώνει τα περισσότερα

πλεονεκτήματα έναντι άλλων που έχουν κατά καιρούς προταθεί, καθώς παρουσιάζει αρκετά σημαντική συσχέτιση με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης, στις συνήθεις δόσεις, και είναι ανεξάρτητος από την ταχύτητα ροής των ούρων. Ο υπολογισμός αυτού του λόγου γίνεται συνήθως με την εφάπαξ χορήγηση καφεΐνης, είτε με προκαθορισμένη δόση 200 mg, είτε με την κατανάλωση 1-4 φλιτζανιών δυνατού καφέ, τη συλλογή ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων 8, τουλάχιστον, ώρες μετά και την ανάλυση του δείγματος αυτού.

Με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης η οποία αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, έγινε δυνατός ο διαχωρισμός της καφεΐνης και των 14 κυριότερων μεταβολιτών της στα ούρα, καθώς και η ποσοτικοποίηση των AFMU, 1U, 1X και 17U με ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Η ισοκρατική διαδικασία χρωματογραφίας επιτρέπει τον προσδιορισμό των υπ' όψιν μεταβολιτών σε 20' περίπου αλλά η προκατεργασία του δείγματος των ούρων με τη μέθοδο της υγρής εκχυλίσεως και την αναγκαία χρήση σημαντικών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, αυξάνει το συνολικό χρόνο της ανάλυσης αφενός, και επιβαρύνει το κόστος και το περιβάλλον αφετέρου. Γι' αυτό το λόγο γίνεται προσπάθεια προς την κατεύθυνση της μείωσης του χρόνου και των βλαβερών συνεπειών της ανάλυσης είτε με την ανάπτυξη μεθόδων στερεάς εκχύλισης (solid phase extraction), είτε με την εφεύρεση υλικών πληρώσεως των χρωματογραφικών στηλών που επιτρέπουν την απευθείας έγχυση των ιδιαίτερα περίπλοκων βιολογικών δειγμάτων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αγραφιώτης Γ. Βιοστατιστική. pp 77-78. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 1999.
2. Aldridge A., Bailey J., and Neims A.H. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin. Perinatol.* 5(4):310-314, 1981.
3. Ambrose D.L., and Fritz J.S. 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* 709:89-96, 1998.
4. Asprodini E.K., Zifa E., Papageorgiou I., and Benakis A. Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *J. Drug Metab. Pharmacok.* 23: 501-506, 1998.
5. Baud-Camus F., Marquet P., Soursac M., Davrinche C., and 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* 760:55-63, 2001.
6. Bechtel Y.C., Haffen E., Lelouet H., Brientini M.P., Paintaud G., Miguet J.P., and Bechtel P.R. Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therap.* 38(10):467-475, 2000.
7. Bendriss E., Markoglou N., and Wainer I.W. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *J. Chromatogr. B* 746:331-338, 2000.
8. Benowitz N.L. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu. Rev. Med.* 41:277-288, 1990.
9. Berthou F., Flinois J.-P., Ratanasavanh D., Beaune P., Riche C., and 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.* 19(3):561-567, 1991.
10. Birkett D.J., Dahlqvist R., Miners J.O., Lelo A., and Billing B. Comparison of theophylline and theobromine metabolism in man. *Drug Metabol. Dispos.* 13(6):725-728, 1985.
11. Birkett D.J., and Miners J.O. Caffeine renal clearance and urine caffeine concentrations during steady-state dosing. Implications for monitoring caffeine intake during sports events. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31:405-408, 1991.
12. Blanchard J., and Sawers S.J.A. The Absolute Bioavailability of Caffeine in Man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:93-98, 1983.
13. Bologna M., Tang B., Klein J., Teroso A., and Koren G. Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257(2):735-740, 1991.
14. Bonati M., Latini R., Galletti F., Young J.F., Tognoni G., and Garattini S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1):98-106, 1982.
15. Bonati M., Latini R., Tognoni G. *et al.* Interspecies comparison of *in vivo* caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab. Rev.* 15(7):1355-1383, 1984.
16. Butler M.A., Iwasaki M., Guengerich F.P., and Kadlubar F.F. Human cytochrome P-450_{1A2} (P-450_{1A2}), 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* 86:7696-7700, 1989.

17. Butler M.A., Lang N.P., Young J.F., Caporaso N.E., Vincis P., Hayes R.B., Teitel C.H., Massengill J.P., Lawsen M.F., and Kadlubar F.F. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 2(3):116-127, 1992.
18. Campbell M.E., Grant D.M., Inaba T., and 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.* 15(2):237-249, 1987.
19. Campbell M.E., Spielberg S.P., and Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42(2):157-165, 1987.
20. Carrillo J.A. and Benitez J. Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-Acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin. Pharmacol. Therap.* 55(3) 293-304, 1994.
21. Carrillo J.A and Benitez J. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41:605-608, 1996.
22. Carrillo J.A., Christensen M., Ramos S.I., Alm C., Dahl M.-L., Benitez J., and Bertilsson L. Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therap. Drug Monitor.* 22:409-417, 2000.
23. Carrillo J.A., and Benitez J. Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions Between Dietary Caffeine and Medications. *Clin. Pharmacokinet.* 39(2):127-153, 2000.
24. Catteau A., Bechtel Y.C., Poisson N., and Bechtel P.R. A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47:423-430, 1995.
25. Caubet M.-S., Elbast W., Dubuc M.-C., and Brazier J.-L. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 27:261-270, 2002.
26. Γεωργιάτσος Ι.Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία 4η Έκδοση. pp 110-111. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1993.
27. Γεωργιάτσος Ι.Γ. και Αρζόγλου Π.Ι. Αρχές Κλινικής Χημείας. pp 31-32, 100, 230-233. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1999.
28. Cheng W.S.C., Murphy T.L., Smith M.T., Cooksley W.G.E., Halliday J.W., and Powell L.W. Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: Relevance as a test of quantitative liver function. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47(4):516-524, 1990.
29. Denaro C.P., Brown C.R., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48(3):277-285, 1990.
30. Denaro C.P., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. Validation of urine caffeine metabolite ratios with use of stable isotope-labeled caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Therap.* 59(3):284-296, 1996.
31. Denaro C.P., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. The effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. *Clin. Pharmacol. Therap.* 59(6):624-635, 1996.
32. Dobrocky P., Bennett P.N., and Notarianni L.J. Rapid method for routine determination of caffeine and its metabolites by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 652:104-108, 1994.
33. El-Yazigi A., Shabib S., Al-Rawithi S., Yusuf A., Legavada E.S., and Al-Humidan A. Salivary Clearance and Urinary Metabolic Pattern of Caffeine in Healthy Children and in Pediatric Patients with Hepatocellular Diseases. *J. Clin. Pharmacol.* 39:366-372, 1999.

34. Evans D.A.P., Manley K.A., and McKusick V.A. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med J.* 2:485-491, 1960.
35. Fuhr U., Doehmer J., Battula N., Wolfel C., Flick I., Kudla C., Keita Y., and Staib A.H. Biotransformation of methylxanthines in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isophorms. Allocation of metabolic pathways to isoforms and inhibitory effects of quinolones. *Toxicology* 82(1-3):169-189, 1993.
36. Fuhr U., and Rost K.L. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 4:109-116, 1994.
37. Georga K.A., Samanidou V.F., and Papadoyannis I.N. 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* 759:209-218, 2001.
38. Grant D.M., Tang B.K., and Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33(5):591-602, 1983.
39. Grant D.M., Tang B.K., Campbell M.E., and Kalow W. Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 21:454-458, 1986.
40. Grant D.M., Campbell M.E., Tang B.K., and Kalow W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem. Pharmacol.* 36(8):1251-1260, 1987.
41. Gu L., Gonzalez F.J., Kalow W., and Tang B.K. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2:73-77, 1992.
42. Guengerich F.P., Shimada T., Iwasaki M., Butler M.A., and Kadlubar F.F. Activation of carcinogens by human liver cytochromes P-450. *Basic Life Sci.* 53:381-396, 1990.
43. Holstege A., Staiger M., Haag K., and Gerok W. Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis. *Klin. Wochenschr.* 67(1):6-15, 1989.
44. Howden C.W., Birnie G.G., and Brodie M.J. Drug metabolism in liver disease. *Pharmacol. Ther.* 40:439-474, 1989.
45. Huang J.-D., Guo W.-C., Lai M.-D., Guo Y.L., and Lambert G.H. Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese. *Drug Metabol. Disp.* 27(1):98-101, 1999.
46. Ikeya K., Jaiswal A.K., Owens R.A., Jones J.E., Nebert D.W., and Kimura S. Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat homologous gene, and differences in liver m-RNA expression. *Mol. Endocrin.* 3:1399-1408, 1989.
47. Kadlubar F.F., Talaska G., Butler M.A., Teitel C.H., Massengill J.P., and Lang N.P. Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. In: *Mutation and the environment. Part B*, pp 107-114, Wiley-Liss, Inc., 1990.
48. Kalow W. Variability of Caffeine Metabolism in Humans. *Arzneimittel Forschung* 35(1):319-324, 1985.
49. Kalow W. and Tang B.-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 49(1):44-48, 1991.
50. Kalow W., and Tang B.-K. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50(5):508-519, 1991.
51. Kalow W., and Tang B.-K. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(5):503-514, 1993.

52. Kotake A.N., Schoeller D.A., Lambert G.H., Baker A.L., Schaffer D.D., and Josephs H. The caffeine CO₂ breath test: Dose response and route of N- demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(2):261-269, 1982.
53. Kromidas S. *Practical Problem Solving in HPLC*, pp 23, 31-32, 36-40. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
54. Krul C., and Hageman G. Analysis of caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 709:27-34, 1998.
55. Lambert G.H., Schoeller D.A., Kotake A.N., Flores C., and Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev. Pharmacol. Ther.* 9:375-388, 1986.
56. Lambert G.H., Schoeller D.A., Humphrey H.E.B., Kotake A.N., Lietz H., Campbell M., Kalow W., Spielberg S.P., and Budd M. The Caffeine Breath Test and Caffeine Urinary Metabolite Ratios in the Michigan Cohort Exposed to Polybrominated Biphenyls: A Preliminary Study. *Envir. Health Persp.* 89:175-181, 1990.
57. Lane J.D., Steege J.F., Rupp S.L., and Kuhn C.M. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43(5):543-546, 1992.
58. Lelo A., Miners J.O., Robson A., and Birkett D.J. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br. J. Pharmac.* 22:183-186, 1986.
59. Lelo A., Kjellen G., Birkett D.J., and Miners J.O., Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248:315-319, 1989.
60. Lelouet H., Bechtel Y.C., Paitaud G., Brientini M.P., Mignet J.P., and Bechtel P.R. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 39(1):25-32, 2001.
61. Le Marchand L., Franke A.A., Custer L., Wilkens L.R., and Cooney R.V. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 7:11-19, 1997.
62. Lewis F.W., and Rector W.G. Caffeine clearance in cirrhosis: The value of simplified determinations of liver metabolic capacity. *J. Hepatol.* 14:157-162, 1992.
63. Lin J.H., and Lu A.Y.H. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35(5):361-390, 1998.
64. Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., Lancaster R., and Smith R.L. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2(8038):584-586, 1977.
65. McKinnon R.A. and Evans A.M. Cytochrome P450. *Aust. J. Pharm.* 30:102-105, 2000.
66. Meyer V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, pp 24-27, 148-149, 253. John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
67. Meyer V. *Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures*, pp 50-51, 76-77, 108-109. Huthig Verlag, Heidelberg, 1997.
68. Μισιρλή Ε. Τοξικολογία, pp 19-23. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 1999.
69. Neal M.J. *Ιατρική Φαρμακολογία με μία Ματιά*. 3^η Έκδοση, pp15. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα, 2000.
70. Nordmark A., Lundgren S., Cnattingius S., and Rane A. Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47:397-402, 1999.

71. Notarianni L.J., Oliver S.E., Dobrocky P., Bennett P.N., and Silverman B.W. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39:65-69, 1995.
72. Nyeki A., Biollaz J., Kesslerling U.W., and Decosterd L.A. 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* 755:73-84, 2001.
73. Olson J. Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή. pp 7-8. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
74. Patwardhan R.V., Desmond P.V., Johnson R.F., and Schenker S. Impaired elimination of caffeine by oral contraceptive steroids. *J. Lab. Clin. Med.* 95(4):603-608, 1980.
75. Rasmussen B.B., and 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.* 18:254-262, 1996.
76. Relling M.V., Lin J.S., Ayers G.D., and Evans W.E. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(6):643-658, 1992.
77. Renner E., Wietholtz H., Huguenin P., Arnaud M.J., and Preisig R. Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Functio. *Hepatology* 4(1):38-46, 1984.
78. Rizzo N., Hispard E., Dolbeault S., Dally S., Leverge R., and Girre C. Impact of long-term ethanol consumption on CYP1A2 activity. *Clin. Pharmacol. Therap.* 62(5):505-509, 1997.
79. Rodopoulos N., Wisen O., and Norman A. Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55:229-242, 1995.
80. Rost K.L., and Roots I. Accelerated caffeine metabolism after omeprazole treatment is indicated by urinary metabolite ratios: coincidence with plasma clearance and breath test. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55(4):402-411, 1994.
81. Rostami-Hodjegan A., Nurminen S., Jackson P.R., and Tucker G.T. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 6:121-149, 1996.
82. Scott N.R., Stambuk D., Chakraborty J., Marks V., and Morgan M.Y. Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. *Clinical Science* 74:377-384, 1988.
83. Scott N.R., Stambuk D., Chakraborty J., Marks V., and Morgan M.Y. The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. *Br. J. Pharmacol.* 27:205-213, 1989.
84. Shaw-Stiffel T.A., Tang B.K., Spielberg S.P., and Shear N.H. Caffeine-A novel probe to assess drug effects on hepatic cytochrome P-450 activity. *Hepatology* 8:1385, 1988.
85. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M. *et al.* 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.* 270(1):414-423, 1994.
86. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Mark S.D., Hoover R.N., Caporaso N.E., Levander O.A., Knize M.G., Lang N.P., and Kadlubar F.F. Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines

- but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Research* 54:6154-6159, 1994.
87. Sinha R. and Rothman N. Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters* 143:189-194, 1999.
 88. Smith G., Stubbins M.J., Harries L.W., *et al.* Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 28(12):1129-1165, 1998.
 89. Somani S.M., and Gupta P. Caffeine: a new look at an age-old drug. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 26(11):521-533, 1988.
 90. Stryer L. Βιοχημεία. 2η Έκδοση, pp 617. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
 91. Tanaka E., Ishikawa A., Yamamoto Y., Osada A., Tsuji K., Fukao K., Misawa S., and Iwasaki Y. 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.* 30(9):336-341, 1992.
 92. Tang B.K., Grant D.M., Kalow W. Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab. Disp.* 11:218-220, 1983.
 93. Tang B.K., Zhou Y., Kadar D., and Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* 4(3):117-124, 1994.
 94. Tang-Liu D.D.S., Tozer T.N., and Riegelman S. Dependence of renal clearance on urine flow: A mathematical model and its application. *J. Pharm. Sci.* 72:154-158, 1983.
 95. Tang-Liu D.D.S., Williams R.L., and Riegelman S. Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224:180-185, 1983.
 96. Tancheva-Poór I., Zaigler M., Rietbrock S., and Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 9:131-144, 1999.
 97. Tassanceyakul W., Birkett D.J., Veronese M.E., McManus M.E., Tukey R.H., Quattrochi L.C., Gelboin H.V., and Miners J.O. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P4501A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265(1):401-407, 1993.
 98. Ullrich D., Compagnone D., Braudes A., Hille H., and Bircher J. Urinary caffeine metabolites in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43:167-172, 1992.
 99. Vistisen K., Loft S., and Poulsen H.E. Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283:407-411, 1991.
 100. Vistisen K., Poulsen H.E., and Loft S. Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* 13(9):1561-1568, 1992.
 101. Waxman D.J. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Bioph.* 69(1):11-23, 1999.
 102. Welfare M.R., Aitkin M., Bassendine M.F. and Daly A.K. Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* 9(6):782, 1999.
 103. Wietholz H., Voegelin M., Arnaud M.J., Bircher J., and Preisig R. Assessment of the cytochrome P-448 dependent liver enzyme system by a caffeine breath test. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 21(1):53-59, 1981.

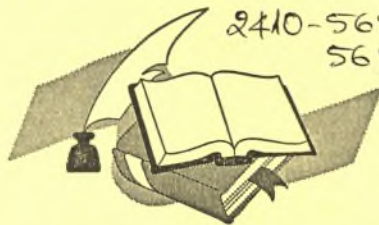
104. Zhao Y., and Lunte C.E. Determination of caffeine metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 688:265-274, 1997.
105. Zylber-Katz E., Granit L., and Levy M. Relationship between caffeine concentrations in plasma and saliva. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36(1):133-137, 1984.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 74.760-61 ΜΑΡΙΔΑ

2410-565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057250