



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Συσχέτιση των επιπέδων της κλοζαπίνης του ορού αίματος με την δραστηριότητα του CYP1A2 σε ασθενείς με ανθεκτική σχιζοφρένεια.

Michel Janho

Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ασπροδίνη Ευτυχία, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Επιβλέπουσα
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Παπαλιάγκα Μαρία, Επιμελετής Α Ψυχιατρικής κλινικής ΠΓΝΛ (Π/Δ 407)

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φαρμακολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Correlation between clozapine serum levels and CYP1A2 activity in patients
with treatment-refractory schizophrenia**

By

Michel Janho, MD

Three-member Supervisory Committee:

- Eftihia Asproдини, Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Matthaios Speletas, Professor of Immunology
- Maria Papaliaga, Senior Consultant Psychiatric Clinic University Hospital of Larissa

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larissa, October, 2020

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1. Η ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ..... | 8 |
| 1.2. Η ΚΛΟΖΑΠΙΝΗ..... | 9 |
| 1.3. ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450 ΚΑΙ CYP1A2 | 11 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 16 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 17 |
| 3.1. ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ | 17 |
| 3.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ | 20 |
| 3.3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ | 20 |
| 3.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ | 21 |
| 3.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ | 23 |
| 3.5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | 24 |
| 3.5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ | 26 |
| 3.6. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ..... | 27 |
| 3.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... | 31 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 33 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 44 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 52 |

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Ασπροδίνη Έφη ως Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παπαλιάγκα Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια της στην εκπλήρωση του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Ιδιαίτερα επιθυμώ να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Μπέγα, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την επιστημονική και συμβουλευτική καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας με τις εύστοχες και πολύ εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Σπελέτας Ματθαίος για την εμπιστοσύνη του στις ικανότητες μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου στην πατρίδα μου και στους φίλους μου για τη ακατάπαυστη υποστήριξη και συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η κλοζαπίνη (άτυπο αντιψυχωσικό) θεωρείται φάρμακο εκλογής στη θεραπεία της ανθεκτικής σχιζοφρένειας. Αυξομειώσεις των επιπέδων κλοζαπίνης στο αίμα ενδέχεται να επηρεάσουν την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Η δραστηριότητα του CYP1A2, κύριο ένζυμο του μεταβολισμού της κλοζαπίνης προς νορκλοζαπίνη, επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (φάρμακα, τρόφιμα, κάπνισμα). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των επιπέδων κλοζαπίνης στο αίμα ασθενών με ανθεκτική σχιζοφρένεια και της δραστηριότητας του CYP1A2 με στόχο την κατανόηση της κλινικής ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία ή τυχόν υποτροπές της νόσου.

Υλικά και μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν δώδεκα ασθενείς (ηλικία 42 ± 11 έτη, 9 άντρες, 5 καπνιστές) με διάγνωση σχιζοφρένειας κατά ICD 10 (The International Classification of Disease), υπό αγωγή με κλοζαπίνη για τουλάχιστον 6 μήνες (μέση δόση 296 ± 121 mg/d, εύρος 100-450). Η κλινική εικόνα αξιολογήθηκε με την κλίμακα PANSS (Positive And Negative Syndrome Scale) (μέση βαθμολογία 75 ± 25 , εύρος 40-117). Για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 υπολογίσθηκαν οι λόγοι των μεταβολιτών της καφεΐνης που αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου στο σίελο (1,7-διμεθυλοξανθίνη/1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 17MU/137MX) και στα ούρα (5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλουρακίλη+1-μεθλουρικό οξύ+1-μεθυλοξανθίνη/1,7-διμεθυλουρικό οξύ, AFMU+1MU+1MX)/17MU). Η συλλογή δειγμάτων ούρων και σιέλου έγινε 6 ώρες μετά τη λήψη 150mg καφεΐνης, και αίματος πριν από την πρωινή δόση του φαρμάκου. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο, της κλοζαπίνης και νορκλοζαπίνης στον ορό προσδιορίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης και ανίχνευση στο υπεριώδες (RP-HPLC-UV).

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ του μεταβολικού λόγου [νορκλοζαπίνη]/[κλοζαπίνη] και των δεικτών του CYP1A2 στα ούρα ($r_1=0,734$) και το σίελο ($r_2=0,891$) υποδηλώνοντας στατιστικώς σημαντική συμμετοχή του CYP1A2 στο μεταβολισμό της κλοζαπίνης ($p<0,05$).

Παρατηρήθηκε υψηλή αρνητική μερική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων κλοζαπίνης στον ορό και του φυσικού λογάριθμου του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στο σίελο ($r=-0,703$, $p=0,035$), με προσαρμογή για ηλικία, δείκτη μάζας σώματος και δόση του φαρμάκου.

Οι καπνιστές παρουσίασαν μεγαλύτερες μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 από τους μη καπνιστές, τόσο στα ούρα ($8,45\pm 3,46$ έναντι $4,74\pm 2,13$, t test $p=0,043$), όσο και στο σίελο ($1,09\pm 0,59$ έναντι $0,46\pm 0,22$, t test $p=0,024$).

Συμπέρασμα: Αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 μειώνει τα επίπεδα κλοζαπίνης στο αίμα. Το κάπνισμα, γνωστό για την επίδρασή τους στο CYP1A2, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην προσαρμογή της δόσης της κλοζαπίνης.

ABSTRACT

Aim: Clozapine is an atypical antipsychotic that is considered the drug of choice for treatment refractory schizophrenia. Fluctuations in serum levels of clozapine may change a patients' clinical status. The activity of CYP1A2, the main metabolic enzyme in the breakdown of clozapine to norclozapine, can be influenced by genetic and environmental factors (drugs, food, smoking). The aim of the present study is to search for a possible correlation between clozapine serum levels of patients with treatment refractory schizophrenia and the activity of CYP1A2 to have a better understanding of clinical response of patients with therapy and any possible relapse of the illness.

Method: 12 patients (age 42 ± 11 yrs, 9 males, 5 smokers) diagnosed with schizophrenia under ICD 10 criteria, under treatment with clozapine for at least 6 months (mean dose 296 ± 121 mg/d, range 100-450). The severity of the disease was assessed with PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) (mean score 75 ± 25 , range 40-117). The evaluation of CYP1A2 was measured by metabolic ratios of metabolites of caffeine in urine ($(AFMU + 1U + 1X)/17U$) and saliva ($17MU/137MX$) samples. The urine and saliva samples were collected 6 hours after ingestion of a 150 mg tablet of caffeine along with a trough blood sample. The concentrations of the metabolites of caffeine in urine and saliva, along with the concentrations of clozapine and norclozapine in serum blood were determined by reversed-phase high pressure liquid chromatography with detection by ultraviolet light (RP-HPLC-UV).

Results: a positive correlation was observed between norclozapine/clozapine ratio and the activity indices of CYP1A2 in urine ($r_1=0.734$) and in saliva ($r_2=0.891$) suggesting a statistically significant participation of CYP1A2 in the metabolism of clozapine ($p<0.05$).

A negative partial correlation between serum clozapine levels and the natural logarithm of the metabolic ratio of caffeine in saliva ($r=-0.703$, $p=0.035$) was observed controlling for age, body mass index and drug dose.

Smokers showed higher mean metabolic ratios of CYP1A2 than non-smokers in urine (8.45 ± 3.46 versus 4.74 ± 2.13 , t test $p=0.043$) and in saliva (1.09 ± 0.59 versus 0.46 ± 0.22 , t test $p=0.024$).

Conclusion: higher activity of CYP1A2 lowers serum clozapine levels. Smoking, known to affect the activity of CYP1A2, should be considered when adjusting clozapine dose.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ

Με βάση του ICD-10 (The International Classification of Disease), η σχιζοφρένεια χαρακτηρίζεται από παραλλαγές στη σκέψη και στην αντίληψη. Η συνείδηση και η νοημοσύνη συνήθως δεν επηρεάζονται, αλλά μερικά γνωστικά ελλείματα ενδέχεται να προκύψουν κατά την πάροδο της νόσου. Τα πιο σημαντικά ψυχοπαθολογικά φαινόμενα περιλαμβάνουν τον ηχώ της σκέψης, την προσθήκη ή την αφαίρεση σκέψεων, διαταραχές αντίληψης της πραγματικότητας, παραληρήματα δίωξης, ακουστικές ψευδαισθήσεις όπως φωνές που σχολιάζουν τον ασθενή σε τρίτο πρόσωπο, διαταραχές σκέψεων (χάλαση συνειρμών, περιεχόμενο σκέψης, κτλ.) και αρνητικά συμπτώματα [1]. Εμφανίζεται συνήθως στα τελευταία χρόνια της εφηβείας ή στα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής. Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια ως προς το κλινικό και βιολογικό προφίλ της έχοντας ως υπόβαθρο διάφορους γενετικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς [2,3,4].

Αποτελεί μια από τις πιο καταστροφικές κοινωνικά και οικονομικά νόσους σε παγκόσμια κλίμακα που αυξάνεται συνεχώς. Ως αντίκτυπο, οδηγεί σε περισσότερες δαπάνες στα συστήματα υγείας [5]. Το 2017 τα σταθμισμένα στην ανικανότητα έτη ζωής (Disability Adjusted Life Years, DALY) ανήλθαν στο 0,51% του συνόλου των DALY 359 νοσημάτων σε 195 χώρες [6].

Η επίπτωση υπολογίζεται στα 15,2 ανά 100.000 άτομα και ο επιπολασμός ανέρχεται στα 7,2 ανά 1.000 άτομα. Η επίπτωση αφορά περισσότερο στους άντρες από τις γυναίκες (1,4:1) στις μικρές ηλικίες (20-22), αλλά υπάρχει μεγαλύτερη επίπτωση στις γυναίκες σε μεγαλύτερες ηλικίες. Σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, άτομα με σχιζοφρένεια έχουν μεγαλύτερη θνησιμότητα (διπλάσια έως και τριπλάσια), από καρδιαγγειακά νοσήματα, μεταβολικές ασθένειες και λοιμώξεις. [7,8].

Η κλινική εικόνα κυριαρχείται από τρεις κατηγορίες συμπτωμάτων:

1. Τα θετικά συμπτώματα:

Συνήθως δεν εκδηλώνονται σε υγιή άτομα, αλλά μπορεί να εμφανίζονται, ή και να επιμένουν, κατά καιρούς σε άτομα με σχιζοφρένεια. Τα θετικά συμπτώματα περιλαμβάνουν παραισθήσεις (οπτικές, οσφρητικές, ακουστικές), παραληρήματα (καχυποψία, ιδέες μεγαλείου) και διαταραχές σκέψης (ασύνηθες περιεχόμενο σκέψης, ανοργάνωτη ομιλία, κτλ.) [9].

2. Τα αρνητικά συμπτώματα:

Εκλαμβάνονται ως κατάθλιψη τις περισσότερες φορές και περιλαμβάνουν ελλείψεις/διαταραχές στο συναίσθημα, κοινωνική απόσυρση, ανηδονία και μειωμένη ομιλία [9].

3. Τα γνωσιακά συμπτώματα (συμπτώματα αποδιοργάνωσης):

Αφορούν στην μειωμένη ικανότητα προσανατολισμού, στην αφηρημένη σκέψη, και στην ελλιπή συγκέντρωση, που ενδέχεται να εκδηλώσει ο ασθενής. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η σοβαρότητα των συμπτωμάτων αυτών ποικίλλει μεταξύ ασθενών [9].

Οι υπάρχουσες φαρμακευτικές αγωγές (αντιψυχωσικά φάρμακα) δρουν αποτελεσματικά στα θετικά συμπτώματα. Όμως, για τα αρνητικά και τα γνωσιακά συμπτώματα (συμπτώματα αποδιοργάνωσης), τα οποία αναλογούν στο 40% και 80% των ασθενών, αντίστοιχα, δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια εγκεκριμένη φαρμακευτική θεραπεία. Νέες μελέτες με χρήση κάποιων πρωτοτύπων φαρμάκων είναι υπό εξέλιξη, όμως θα χρειαστεί περισσότερος χρόνος προκειμένου να εδραιωθεί η κλινική τους χρησιμότητα και εγκυρότητα και η απόκτηση έγκρισης για την χρήση τους. Τέλος, ψυχοκοινωνικά θεραπευτικά προγράμματα (η γνωσιακή θεραπευτική ψυχοθεραπεία, η εκπαίδευση στις κοινωνικές δεξιότητες και η γνωσιακή αποκατάσταση) έχουν δείξει αρκετό όφελος, ειδικά σε συνδυασμό με μια αντιψυχωσική αγωγή [10].

Όσον αφορά στην ανθεκτική σχιζοφρένεια, οι απόψεις οδεύουν προς έναν ενιαίο ορισμό παρά την μεγάλη διακύμανση που ανευρίσκεται στη βιβλιογραφία. Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες από την ομάδα TRRIP (Treatment Response and Resistance in Psychosis Working Group) ορίζουν την ανθεκτική σχιζοφρένεια ως αποτυχία βελτίωσης των θετικών συμπτωμάτων μετά από χορήγηση δύο διαφορετικών ειδών αντιψυχωσικών φαρμάκων, στα οποία δεν συμπεριλαμβάνεται η κλοζαπίνη, για διάρκεια τουλάχιστον 6 εβδομάδων σε θεραπευτικές δόσεις με ικανοποιητική συμμόρφωση (80%) στην αγωγή [11].

1.2. Η ΚΛΟΖΑΠΙΝΗ

Η κλοζαπίνη δεν πρόκειται για ένα καινούργιο φάρμακο, αντιθέτως, η συγκεκριμένη ουσία βρέθηκε μετά από την σύνθεση του τρικυκλικού δακτυλίου το 1957, ο οποίος αποτελεί την βάση για τα αντικαταθλιπτικά και τα νευροληπτικά φάρμακα. Έτσι λοιπόν στις αρχές της δεκαετίας του 1960 χρησιμοποιήθηκε η κλοζαπίνη με καλό κλινικό αποτέλεσμα και λίγες παρενέργειες και χαρακτηρίστηκε ως το πρώτο άτυπο αντιψυχωσικό [12,13].

Τα τυπικά αντιψυχωσικά δρουν σε διάφορους οδούς στον εγκέφαλο ως ισχυροί αναστολείς των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στις μετασυναπτικές μεμβράνες του μελανοραβδωτού πυρήνα προκαλώντας ανεπιθύμητες παρενέργειες στο εξωπυραμιδικό σύστημα όπως η ακαθησία, η δυστονία και η όψιμη δυσκίνησία [14].

Τα τυπικά αντιψυχωσικά μαζί με τα άτυπα αντιψυχωσικά, ή αλλιώς πρώτης και δεύτερης γενιάς, αντίστοιχα, λειτουργούν ως ανταγωνιστές των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων στις

μετασυναπτικές μεμβράνες. Ως εκ τούτου, η καταστολή αυτή στο μεταίχμιο σύστημα μειώνει τα θετικά συμπτώματα της νόσου. Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς είναι μια κατηγορία φαρμάκων με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με τα τυπικά αντιψυχωσικά όσον αφορά στο εξωπυραμιδικό σύστημα [14].

Η επιτυχία της κλοζαπίνης, ως άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο, δεν διήρκησε πολύ καθώς στις αρχές του 1970 διαπιστώθηκαν περιπτώσεις ακοκκιοκυτταραιμίας στη Φινλανδία με επακόλουθο το θάνατο 8 ασθενών [15]. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την απόσυρση του φαρμάκου από την αγορά μέχρι τις αρχές του 1990 όταν άρχισε σταδιακά η χρήση του στη κλινική πράξη καθώς σε κλινικές δοκιμές βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότητά του στη θεραπεία της ανθεκτικής σχιζοφρένειας ήταν εξαιρετική εξαλείφοντας τα θετικά συμπτώματα και βελτιώνοντας ακόμα και τα αρνητικά συμπτώματα [16]. Πράγματι, η κλοζαπίνη είναι το μοναδικό φάρμακο που συστήνεται στη θεραπεία της ανθεκτικής σχιζοφρένειας λόγω της αποτελεσματικότητάς της [17] με 30-60% ανταπόκριση στη θεραπεία της νόσου [16,18,19]. Σε μια πρόσφατη μετανάλυση, η κλοζαπίνη συσχετίστηκε, σε σύγκριση με αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, με μειωμένη επίπτωση εισαγωγών στο νοσοκομείο, μειωμένα περιστατικά μη συμμόρφωσης στη θεραπεία και καλύτερη έκβαση της νόσου όσον αφορά το σύνολο των συμπτωμάτων [20]. Παρά το γεγονός ότι η κλοζαπίνη είναι αποτελεσματική, υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ ψυχιάτρων στη χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου [21]. Πράγματι, βρέθηκε ότι μόνο στο 30% μόνο των ασθενών με ανθεκτική σχιζοφρένεια συνταγογραφείται κλοζαπίνη [22]. Ως εκ τούτου, ενδέχεται να παρέλθει μακρύ χρονικό διάστημα μέχρι τη στιγμή που ένας ασθενής με ανθεκτική σχιζοφρένεια θα ξεκινήσει θεραπεία με κλοζαπίνη. Αποτέλεσμα αυτού είναι η επιδείνωση της νόσου και η πολυφαρμακία με την χρήση πολλών ειδών αντιψυχωσικών φαρμάκων η οποία είναι δυνητικά επικίνδυνη για τον ασθενή [23].

Το θεραπευτικό εύρος ορίζεται ως το εύρος θεραπευτικών συγκεντρώσεων ενός φαρμάκου στο αίμα. Οι συγκεντρώσεις κάτω από το κατώτερο όριο είναι λιγότερο πιθανό να επιφέρουν μια θεραπευτική απάντηση, ενώ οι συγκεντρώσεις πάνω από το ανώτερο όριο είναι πιθανό να συνοδεύονται με μικρότερη ανεκτικότητα του φαρμάκου ή και ανεπιθύμητες παρενέργειες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως αυτό το εύρος βασίζεται σε δημογραφικά στοιχεία διαφόρων πληθυσμών και ενδέχεται να μην αφορά σε όλους τους ασθενείς και επομένως να απαιτείται σε ορισμένες περιπτώσεις η εξατομίκευση της θεραπείας [24]. Το θεραπευτικό εύρος για την κλοζαπίνη προσδιορίστηκε, με βάση τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες από την ομάδα του AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie) το 2017, στα 350–600 ng/mL [24]. Διαφορετικές μελέτες υποστηρίζουν διαφορετικές κατώτερες θεραπευτικές τιμές (κατώφλι) όπως το 200 ng/mL [25], το 350 ng/mL [26], το 370 ng/mL [27] και άλλα. Ως ανώτατο όριο (600 ng/mL) αναφέρεται συγκέντρωση της κλοζαπίνης στο αίμα που αναμένεται μετά από

χορήγηση της μέγιστης δόσης του συγκεκριμένου φαρμάκου από του στόματος [24]. Προκειμένου να προληφθεί η υποτροπή της σχιζοφρένειας, το κατώφλι της κλοζαπίνης στο αίμα ορίζεται στα 200 ng/mL [28]. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεγάλες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της κλοζαπίνης στο αίμα ευνοούν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής [29]. Επίσης, συγκεντρώσεις πάνω από 250 ng/mL φέρουν την πιθανότητα εκδήλωσης ανεπιθύμητων ενεργειών [30]. Συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες της κλοζαπίνης περιλαμβάνουν καταστολή, τρόμο, σιελόρροια, ζάλη, πονοκέφαλο, υπόταση, συγκοπή, ξηροστομία, δυσκοιλιότητα και αύξηση του βάρους σώματος. Ασυνήθεις αλλά δυνητικά θανατηφόρες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν σοβαρή λευκοπενία, ακοκκιοκυτταραιμία, ορθοστατική υπόταση και συγκοπή, πτώσεις, σπασμοί, καρδιομυοπάθεια, επιμήκυνση του QT, μεταβολικό σύνδρομο (σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία, αύξηση σωματικού βάρους) και το κακώθες νευροληπτικό σύνδρομο [31].

Οι μεταβολικές οδοί της κλοζαπίνης περιλαμβάνουν: 1) την σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, 2) την οξειδωση προς οξειδίο της κλοζαπίνης και 3) την απομεθυλίωση προς νορκλοζαπίνη. Η κύρια μεταβολική οδός για την απομεθυλίωση οφείλεται, κατά μεγάλο μέρος (70%), στο κυτόχρωμα P450-1A2 (CYP1A2) [32], ενώ σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι και άλλα ένζυμα είναι υπεύθυνα για την απομεθυλίωση της κλοζαπίνης όπως το κυτόχρωμα P450 CYP2C19, το CYP3A4, και το CYP2D6 αλλά και σε μικρότερο βαθμό τα CYP2C19, CYP3A4 και CYP2D6 [33].

1.3. ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450 ΚΑΙ CYP1A2

Το κυτόχρωμα P450 (CYP) αποτελεί μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, των οποίων η δραστηριότητα περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Έχει αναφερθεί ότι τα υποστρώματα του CYP ενδέχεται να προσδεθούν σε περισσότερα από ένα ενεργά σημεία του ενζύμου [34]. Το 1955 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η παρουσία ενζυματικών συστημάτων σε ηπατικά κύτταρα κονίκλων τα οποία οδήγησαν σε οξειδωση ξενοβιοτικών ουσιών [35]. Τα ενζυματικά αυτά συστήματα ταυτοποιήθηκαν επισήμως μέσω της απορρόφησης του φωτός στα 450 nm κατόπιν έγχυσης μονοξειδίου του άνθρακα σε παρασκεύασμα ηπατικών κυττάρων σε ποντικούς [36] και επομένως πήραν την ονομασία κυτόχρωμα P450. Δομικά, είναι αιμοπρωτεΐνες αποτελούμενες από 400 έως 500 αμινοξέα και μια μονάδα αίμης στην ενεργή περιοχή του ενζύμου [37].

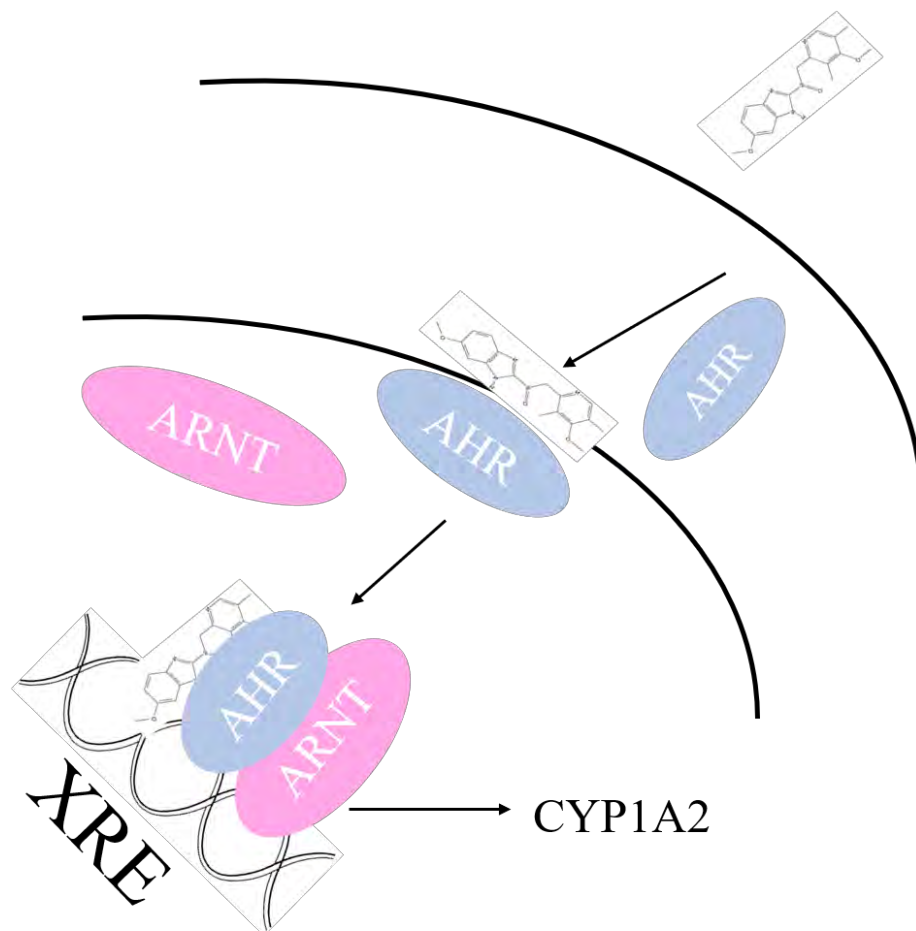
Το σύστημα του κυτοχρώματος είναι υπεύθυνο για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού ενός μεγάλου φάσματος δομικώς διαφορετικών υποστρωμάτων και για την κατάλυση πολλών σημαντικών ενδογενών βιοχημικών διεργασιών στα θηλαστικά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την μεταφορά ηλεκτρονίων που προέρχονται από το NADPH [38].

Η οικογένεια του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP1 αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική βασική (constitutive) έκφραση καθώς και ιστοειδική επαγωγιμότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων του CYP1A1 και του CYP1B1 παρουσιάζει ομοιότητα 72% και 40% με το CYP1A2, αντίστοιχα. Ενώ το CYP1A1 και το CYP1A2 έχουν ευρύτερη εξειδίκευση υποστρωμάτων σε σχέση με το CYP1B1, τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν σημαντικές αλληλεπικαλύψεις των υποστρωμάτων τους [39]. Το CYP1A2 απαντάται μόνο στο ήπαρ, ενώ τα υπόλοιπα ισοένζυμα της ίδιας οικογένειας απαντώνται και σε άλλους ιστούς [39]. Το CYP1A2 είναι ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ σε ποσοστό υψηλότερο του 10% του συνολικού περιεχομένου σε CYP [40].

Οι οικογένειες του κυτοχρώματος 1-4 αφορούν στον μεταβολισμό διαφόρων φαρμάκων και ξενοβιοτικών ουσιών κατά την φάση I από τον οποίο μπορούν να προκύψουν ενεργοποιημένοι μεταβολίτες ή καρκινογόνες ουσίες. Τα προϊόντα αυτά του μεταβολισμού, εάν δεν προχωρήσουν στη τελική φάση II του μεταβολισμού τους, ενδέχεται να αλληλοεπιδράσουν με μακρομόρια συστατικά του κυττάρου όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες και να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες [37,41,42]. Συγκεκριμένα, το CYP1A2 ενεργοποιεί προκαρκινογόνα συστατικά του περιβάλλοντος και των τροφών [43] προς καρκινογόνες ενώσεις όπως τις αρωματικές αμίνες, τις νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, τις N-ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες απαντώνται στο κρέας που ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) οι οποίοι περιέχονται στο πετρέλαιο, στο κάρβουνο, στα αέρια των εξατμίσεων, στον καπνό του τσιγάρου, στα κρέατα που ψήνονται στα κάρβουνα [44,45] και την αφλατοξίνη B1 [46]. Παράλληλα, είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό φαρμάκων όπως η καφεΐνη [47], η τριαμετένη, η ολανζαπίνη, η μελατονίνη, η φλουταμίδα, η κλοζαπίνη, η ροπιβακαΐνη, η θεοφυλλίνη και η τακρίνη [48]. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στον μεταβολισμό της 17-β-οιστραδιόλης προς 2-OH και 4-OH μεταβολίτες [49]. Η λειτουργία του CYP1A2 επάγεται και αναστέλλεται από διάφορους χημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ φαινοτυπικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η λειτουργικότητά του ρυθμίζεται από δύο, τουλάχιστον, μηχανισμούς: έναν ο οποίος ελέγχει τα βασικά (constitutive) επίπεδα έκφρασης και έναν δεύτερο ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγιμότητα [45,50,51,52,53].

Η επαγωγή του CYP1A2 είναι κυρίως μεταγραφική και εξαρτάται από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων, AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), όπως επίσης και από άλλους άγνωστους παράγοντες. Η διαδικασία της επαγωγής ξεκινά με τη σύνδεση ενός κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα AhR μέσα στο κυτταρόπλασμα και μετατόπιση του ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσα στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερές με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT). Στην συνέχεια, το διμερές AhR-ARNT αλληλοεπιδρά με

έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξενοβιοτικά (Xenobiotic Response Element XRE) στην 5' περιοχή με συνέπεια την αύξηση μεταγραφής του γονιδίου του CYP1A2, την σύνθεση του κατάλληλου mRNA και την *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 (Σχήμα 1) [54]. Η επαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των φαρμακολογικών δράσεων η οποία προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων, ή μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης (ανεπιθύμητες ενέργειες). Πράγματι, δεν έχει διευκρινιστεί εάν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα AhR συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου από την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων ή παρουσιάζει όφελος μέσω μιας πιο ταχείας αποβολής εν δυνάμει επικίνδυνων χημικών ουσιών [55].



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της επαγωγής του CYP1A2 μέσω του AhR υποδοχέα.

Η επαγωγή του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί ως συνέπεια του καπνίσματος [56], της κατανάλωσης κρέατος ψημένου στα κάρβουνα ή μαγειρεμένου σε υψηλές θερμοκρασίες [57], της κατανάλωσης σταυρανθών λαχανικών όπως τα κουνουπίδια, τα μπρόκολα, τα λαχανάκια Βρυξελλών [58] και της χρήσης διαφόρων φαρμάκων που θα αναλυθούν περαιτέρω στη συζήτηση. *In vivo* αναστολείς του CYP1A2 είναι ο χυμός του γκρέϊπ-φρούτ [59], το αλκοόλ [60], τα αντισυλληπτικά [61] και η θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα [62]. Επίσης, το CYP1A2 αναστέλλεται από την παρουσία οιστρογόνων κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο [63] και την απουσία οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση [64]. Η αναστολή αυτή είναι αντιστρεπτή και ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα συναγωνισμού για την ενεργό περιοχή του ενζύμου.

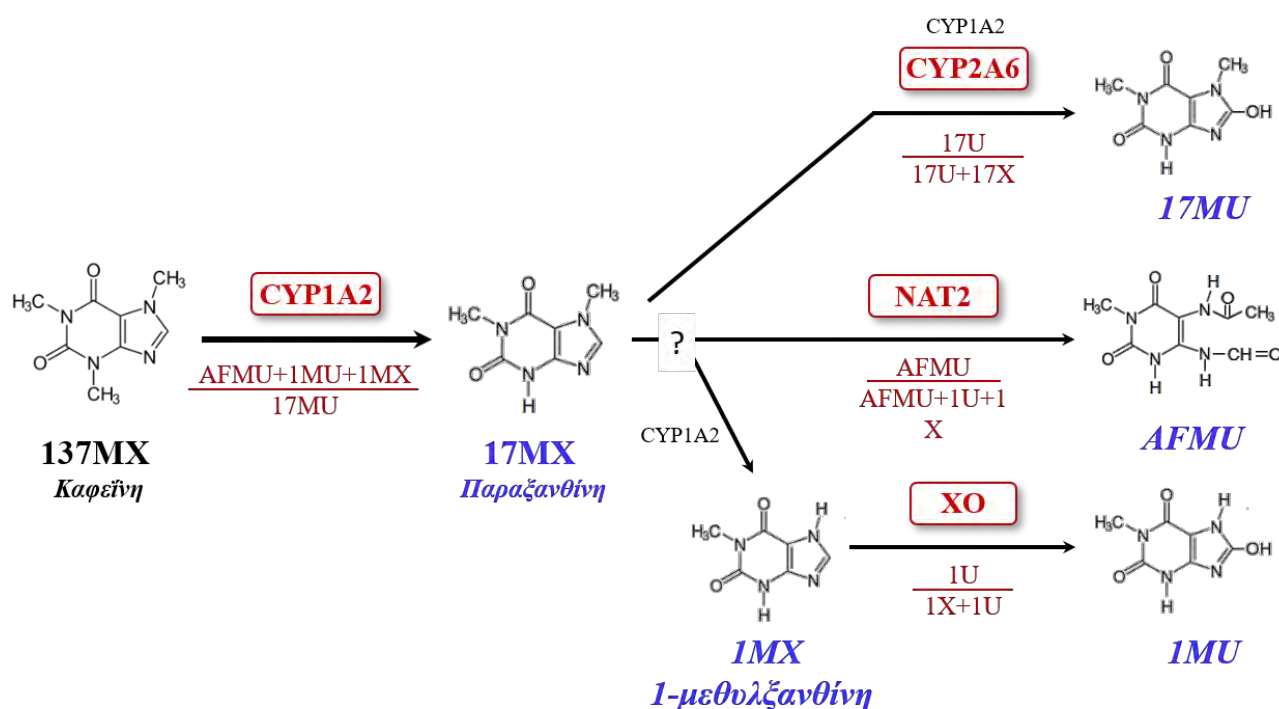
Η λειτουργικότητα του CYP1A2 παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων, αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου του ανθρώπινου CYP1A2 και του μεταβολικού φαινότυπου του ενζύμου αυτού [65]. Παρόλο που έχουν περιγραφεί περισσότερα από 80 σημεία πολυμορφισμού εντός και πλησίον του γονιδίου στον άνθρωπο, 19 από αυτά παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο του ενζύμου με σχετική αυξομείωση της δραστηριότητάς του [66]. Υπάρχουν, όμως, 2 σημειακές μεταλλάξεις με τελικό αλληλίο το CYP1A2*1C [67], που παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2, και το CYP1A2*1F [68], που παρουσιάζει αυξημένη επιρρέπεια στην επαγωγή του CYP1A2.

Επιδημιολογικά, αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου [51], της ουροδόχου κύστης [69] και του πνεύμονα [70,71], ενώ μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων [72]. Επιπρόσθετα, η καταστολή του CYP1A2 μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη πρόοδο του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [73]. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι η μετατροπή της 17β-οιστραδιόλης σε 2-υδροξυ-οιστραδιόλη από το CYP1A2, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε 2-μεθοξυ-οιστραδιόλη από το κατεχόλη-Ο-μεθυλτρανσφεράση (Catechol-O-Methyl-Transferase, COMT) [40], αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος μέσω απόπτωσης [40].

Η καφεΐνη χρησιμοποιείται επιτυχώς ως φάρμακο δείκτης για την ταυτόχρονη ανίχνευση της φαινοτυπικής δραστηριότητας του CYP1A2, CYP2A6, XO (οξειδάση της ξανθίνης) και του NAT2 (N-ακετυλοτρανσφεράση 2). Η ευρεία χρήση της οφείλεται στη μεγάλη κατανάλωσή της παγκοσμίως, στην διαθεσιμότητά της στην αγορά και στην ευχερή βιοδιαθεσιμότητα μετά από την από του στόματος κατανάλωσή της [56,74,75,76,77]. Ως εκ τούτου, η καφεΐνη αποτελεί έναν από τους πιο συνηθισμένους φάρμακο-δείκτες στην κλινική έρευνα [63,64,78,79,80].

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη 137MX) μεταβολίζεται επί το πλείστον από το CYP1A2

μέσω 3N-απομεθυλίωσης σε παραξανθίνη (1,7-διμεθυλοξανθίνη 17MX) [81]. Η τελευταία μετατρέπεται σε 1,7 διμεθυλοουρικό οξύ (17MU) από το CYP2A6 και σε 1-μεθυλοξανθίνη (1MX) από το CYP1A2. Η 1-μεθυλοξανθίνη προχωράει σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια με την βοήθεια του XO και του NAT2 [47,82] (Σχήμα 2). Η ασφάλεια, η διαθεσιμότητα και η ευκολία στην χορήγηση της καφεΐνης συνέβαλαν στην μελέτη της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών (CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2) σε ερευνητικά πρωτόκολλα με μεγάλους πληθυσμούς [77,83].



Σχήμα 2. Η 3N-απομεθυλίωση της καφεΐνης στο ανθρώπινο ήπαρ. Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη 137MX) απομεθυλιώνεται προς παραξανθίνη (1,7-διμεθυλοξανθίνη 17MX) μέσω του CYP1A2. Η παραξανθίνη οξειδώνεται προς 1,7 διμεθυλοουρικό οξύ (17MU) από το CYP2A6 ή απομεθυλιώνεται προς 1-μεθυλοξανθίνη (1MX) το οποίο οξειδώνεται στην πορεία σε 1-μεθυλοουρικό οξύ (1MU) μέσω του XO. Η παραξανθίνη, επίσης, ακετυλιώνεται προς 5-ακετυλοαμινο-δακετυλαμινο-6φορμυλαμινο-3μεθυλοουρακίλη (AFMU) μέσω του NAT2 μετά από την διάσπαση του C8–N9 δεσμού. Οι μεταβολίτες της καφεΐνης που χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό των μεταβολικών λόγων των ενζύμων εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Τα ένζυμα και οι μεταβολικοί λόγοι τους στα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα [83,84].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να συσχετιστούν τα επίπεδα της κλοζαπίνης στο αίμα ασθενών με ανθεκτική σχιζοφρένεια με την δραστηριότητα του CYP1A2. Στην παρούσα εργασία η καφεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο-δείκτης (probe-drug) για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 καθώς προσφέρει αξιοπιστία και μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια. Μετά από κατανάλωση μίας ποσότητας καφεΐνης υπολογίζονται οι ποσότητες των μεταβολιτών της στα ούρα και σίελο. Διάφοροι λόγοι (κλάσματα) των μεταβολιτών αυτών έχει βρεθεί ότι αντικατοπτρίζουν την δραστηριότητα του CYP1A2 [56,85].

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στη μελέτη συμμετείχαν 13 εθελοντές ασθενείς με διάγνωση ανθεκτικής σχιζοφρένειας ICD 10. Στο τέλος της μελέτης συμπεριλήφθηκαν οι 12 από τους 13 ασθενείς λόγω άρνησης συμμετοχής ενός ασθενούς μετά την αρχική του συγκατάθεση. Οι εθελοντές ασθενείς βρίσκονταν υπό παρακολούθηση στα εξωτερικά ιατρεία του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Όλοι οι εθελοντές ελάμβαναν κλοζαπίνη για διάστημα παραπάνω από 6 μήνες. Αξίζει να σημειωθεί πως την κλοζαπίνη που ελάμβαναν οι ασθενείς ήταν από την ίδια φαρμακευτική εταιρεία με την μικρότερη δόση στα 100 mg και μέγιστη στα 450 mg υπό την μορφή δισκίου των 100 mg. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιστημονικό συμβούλιο του ΠΓΝΛ (ΑΠ 51463/22/11/2019) και από την Εσωτερική Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήματος Ιατρικής (ΑΠ 65/02/12/2019).

Η συλλογή των δειγμάτων ούρων, σιέλου και αίματος έγινε μετά από ενημέρωση και προφορική συγκατάθεση των ατόμων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1) Πραγματοποιήθηκε 2 ημέρες αποχή από:

Γκρέιπφρουτ, ψητά και τηγανητά κρέατα, αλκοόλ, διάφορα βότανα και μπαχαρικά και συμπληρώματα διατροφής.

Στο πέρας της 2^{ης} ημέρας και μετά την ώρα 18:00 δεν καταναλώθηκε καφεϊνούχο ποτό ή τρόφιμο (καφές, κόκα-κόλα, κακάο, τσάι, σοκολάτα, γλυκά με σοκολάτα).

2) Το πρωί της 3^{ης} ημέρας έγινε εκκένωση της κύστης και καταναλώθηκε μία κάψουλα καφεΐνης (150 mg). Στην συνέχεια, και για 6 ώρες δεν καταναλώθηκαν ποτά ή τρόφιμα που περιείχαν καφεΐνη.

3) Στο χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά την κατανάλωση της κάψουλας καφεΐνης έγινε συλλογή δείγματος ούρων, λήφθηκε ένα δείγμα σιέλου και έγινε αιμοληψία πριν την πρώτη δόση της κλοζαπίνης της ημέρας (trough sample). Αμέσως μετά την λήψη των ούρων το δείγμα μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας όπου έγινε ρύθμιση του pH του δείγματος στην τιμή 3,5 με την προσθήκη διαλύματος HCl 6N, με σκοπό να μην διασπαστεί το AFMU [86]. Δείγματα του 1 mL αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Το αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια διαχωρισμού ορού (Vacutainer

gel SST) από την εταιρεία BD (H.P.A) και φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 5'. Δείγματα του 1 mL αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Την ημέρα της συλλογής των δειγμάτων αξιολογήθηκε, επίσης, η σοβαρότητα της νόσου σύμφωνα με τα κριτήρια αξιολόγησης PANSS (Positive And Negative Syndrome Scale) [87] το οποίο αξιολογεί τα θετικά και αρνητικά συμπτώματα της νόσου μαζί με άλλα γενικά στοιχεία και διακυμαίνεται από 30 έως 210 όπου όσο αυξάνεται το αποτέλεσμα αυξάνεται και η σοβαρότητα της νόσου.

Οι περισσότεροι εθελοντές ασθενείς ελάμβαναν και άλλες φαρμακευτικές ουσίες τόσο για την ίδια την νόσο όσο και για άλλες συν νοσηρότητες οι οποίες αναγράφονται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1 Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών/ασθενών

| Κωδικός | Ηλικία (έτη) | Φύλο | PANSS | Δόση Κλοζαπίνης (mg) | Κάπνισμα | Συγχορηγούμενα φάρμακα |
|----------------|-------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|---|
| 1 | 45 | Γ | 43 | 300 | ΝΑΙ | αλοπεριδίνη, βισοπρολόλη |
| 2 | 39 | A | 102 | 100 | ΟΧΙ | ζιπραζιδόνη |
| 3 | 43 | A | 76 | 300 | ΟΧΙ | |
| 4 | 21 | Γ | 78 | 350 | ΟΧΙ | βιπεριδένη, Αμισουλπρίδη |
| 5 | 51 | A | 105 | 300 | ΝΑΙ | βισοπρολόλη, βιταμίνη D3, αμισουλπρίδη |
| 6 | 47 | A | 40 | 400 | ΝΑΙ | ιχθυέλαιο, δαπαγλιφλοζίνη, πιογλιταζόνη, μετφορμίνη |
| 7 | 27 | A | 79 | 100 | ΝΑΙ | αριπιπραζόλη, αλοπεριδίνη |
| 8 | 49 | A | 117 | 300 | ΟΧΙ | βιπεριδένη, ομεπραζόλη, ρισπεριδόνη, αλοπουρινόλη |
| 10 | 25 | A | 66 | 450 | ΟΧΙ | βιπεριδένη, προπρανολόλη, αμισουλπρίδη, φύλλα Αιγύπτου (cassia senna) |
| 11 | 49 | A | 82 | 350 | ΝΑΙ | νεμπιβολόλη |
| 12 | 51 | Γ | 46 | 450 | ΟΧΙ | βαλπροϊκό οξύ, ζιπραζιδόνη |
| 13 | 53 | A | 69 | 150 | ΟΧΙ | μετοπρολόλη, ομεπραζόλη, αλοπεριδόλη, οξυβουτινίνη, λεβοθυροξίνη |

3.2.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η καφεΐνη χορηγήθηκε στους εθελοντές υπό την μορφή κάψουλας των 150 mg που παρασκευάστηκε από ένα φαρμακείο στην πόλη της Λάρισας.

Η προμήθεια των προτύπων μεταβολιτών της καφεΐνης (137MX), 17MX, 1MU, 37MX και της 4-ακεταμιδοφαινόλης (παρακεταμόλη) η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ) στην ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και το σίελο, έγινε από την εταιρεία Sigma (Γερμανία) και της καφεΐνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137MX) από τη εταιρεία Fluka (Γερμανία). Η προμήθεια του 17MU έγινε από την εταιρεία Cayman chemical company (Η.Π.Α). Η προμήθεια του μεταβολίτη 1MX έγινε από την εταιρεία TCI (Βέλγιο), της ισοπροπανόλης από τη εταιρεία Scharlau (Ισπανία), του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης από την εταιρεία VWR chemicals (Γαλλία), του οξικού οξέος (άνυδρο) από την εταιρεία Merck (Γερμανία), του θειικού αμμωνίου από την εταιρεία CARLO ERBA (Γαλλία), του χλωροφορμίου από την εταιρεία Chem Lab (Βέλγιο) και του υδροχλωρικού οξέος ($\geq 37\%$) από την εταιρεία Honeywell (Αυστρία). Η προμήθεια της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης έγιναν από την εταιρεία Tocris (Ενωμένο Βασίλειο). Η προμήθεια της δεξτρομεθορφάνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο στην ανάλυση της κλοζαπίνης έγινε από την εταιρεία Sigma (Γερμανία). Η προμήθεια της δισοξίνου φωσφορικού νατρίου (ένυδρο) έγινε από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Η προμήθεια του διαιθυλαιθέρα έγινε από την εταιρεία Honeywell (Γερμανία)

Το AFMU, καθαρότητας 98%, ήταν ευγενική χορηγία του καθηγητή W.Pfleiderer (Πανεπιστήμιο Konstanz, Γερμανία). Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC, ενώ το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειικό αμμώνιο ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Σε όλα τα στάδια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.3.ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Οι συσκευές χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της περιλάμβαναν: αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη) και βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7012 (Rheodyne, ΗΠΑ) στην οποία ήταν συνδεδεμένοι βρόχοι σταθερού όγκου 20 μL , στην ανάλυση των ούρων και του ορού αίματος, και 50 μL , στην περίπτωση της ανάλυσης του σιέλου. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm , μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm (Dr. Maisch GmbH, Γερμανία). Η Θερμοκρασία της στήλης διατηρούνταν σταθερή με τη χρήση θερμοστατουμένου κλιβάνου (Lab Alliance, Η.Π.Α).

Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με τη χρήση ηλεκτρικού απαερωτή (ERC, Ιαπωνία), ο οποίος είναι συνδεδεμένος στην διαδρομή της κινητής φάσης (εν σειρά). Η πρόσληψη των αναλογικών σημάτων και η ανάλυση των ψηφιακών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Clarity (Τσεχία).

3.4.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

1. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2007) [56]. Συνοπτικά:

Η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 92/4/5. Η κινητή φάση διοχετευόταν με ταχύτητα 0,7 mL/min , από 0 έως 5' και με ταχύτητα 1,1 mL/min από 5' έως 20'. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 280 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

2. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της καφεΐνης και της 17MX στο σίελο:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης και 17MX στο σίελο έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2015) [85]. Συνοπτικά:

Η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 80/20/2. Η κινητή φάση είχε ταχύτητα 1 mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 273 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

3. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό του αίματος:

Η ανάλυση της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό του αίματος έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Μπέγας κ.ά. (2014) [88].

Η κινητή φάση για την ανάλυση της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό του αίματος αποτελούνταν από μίγμα 50mM NaH₂PO₄ H₂O και ακετονιτρίλιο σε αναλογίες όγκων 72/28 με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Η ανίχνευση έγινε σε μήκος κύματος 215 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 50° C.

Η μέθοδος ελέγχθηκε για παρεμβολές από τυχόν συγχορηγούμενα φάρμακα που αναγράφονται στον **πίνακα 2**. Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες που αναγράφονται παραπάνω ελέγχθηκαν κάτω από τις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες χωρίς να διαπιστωθεί η ύπαρξη παρεμβολής στα χρονικά σημεία έκλουσης της κλοζαπίνης, της νορκλοζαπίνης και του εσωτερικού προτύπου.

Πίνακας 2: Κατηγορίες φαρμάκων που ελέγχθηκαν για τυχόν παρεμβολές στην χρωματογραφική ανάλυση της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης.

| Αντιεπιληπτικά | Αντικαταθλιπτικά | Αντιψυχωσικά | Διάφορα |
|--|--|-------------------------|-----------------------|
| <i>Αιθοσουξιμίδη</i> | Σιταλοπράμη | Αλοπεριδόλη | Ακεταμινοφαίνη |
| <i>Καρβαμαζεπίνη</i> | Φλουξετίνη | <i>Αριπιπραζόλη</i> | <i>Ατορβαστατίνη</i> |
| <i>Βαλπροϊκό οξύ</i> | Σερτραλίνη | <i>Κλοζαπίνη</i> | Θεοφυλλίνη |
| <i>Φαινοτοΐνη</i> | <i>Δεσιπραμίνη</i> | <i>Κουετιαπίνη</i> | Καφεΐνη |
| <i>N-ακετυλο προκαΐναμίδη (NAPA)</i> | <i>Νορτριπτολίνη</i> | Λίθιο | Κορτιζόλη |
| <i>Φαινοβαρβιτάλη</i> | <i>Ανίχνευση τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών</i> | <i>Ολανζαπίνη</i> | Κυκλοσπορίνη |
| | <i>Ιμιπραμίνη</i> | <i>Παλιπεριδόνη</i> | <i>Λεβοσετιριζίνη</i> |
| | | <i>Ρισπεριδόνη</i> | Μεθοτρεξάτη |
| | | Χλωροπρομαζίνη | Οιστριόλη |
| | | | <i>Παντοπραζόλη</i> |
| Βενζοδιαζεπίνες | Αντιαρρυθμικά | Αντιβιοτικά | <i>Πρεδνιζολόνη</i> |
| <i>Αλπραζολάμη</i> | <i>Αμιωδαρόνη</i> | <i>Αμικασίνη</i> | Προπρανολόλη |
| <i>Διαζεπάμη</i> | <i>Διγοξίνη</i> | <i>Χλωροαμφαινεκόλη</i> | <i>Ρανιτιδίνη</i> |
| <i>Λοραζεπάμη</i> | <i>Δισοπυραμίδη</i> | <i>Γενταμυκίνη</i> | Σαλικυλικά |
| | <i>Κινιδίνη</i> | <i>Τομπραμυκίνη</i> | TSH |
| | <i>Λιδοκαΐνη</i> | <i>Βανκομυκίνη</i> | T3 |
| | | <i>Νετιμιμικίνη</i> | T4 |

Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα φάρμακα που περιέχονται στο σκεύασμα Lyrhockek TDM της εταιρείας BioRad (Greece).

3.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες πρότυπες ουσίες οι οποίες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό Gibertini (Gibertini Elettronica s.r.l. – Μιλάνο, Ιταλία) ευαισθησίας 0,1 mg και κατόπιν διαλύθηκαν στην κατάλληλη ποσότητα διαλύτη.

1. Πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα:

Παρασκευάστηκε διάλυμα 17MX συγκέντρωσης 5 mM σε υπερκαθαρό νερό, ενώ τα διαλύματα των 17MU, 1MX και 1MU, ίδιας συγκέντρωσης, σε 5 mM NaOH. Τα διαλύματα του AFMU (5 mM) και του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 1mM) παρασκευάστηκαν σε 0,1% οξικό οξύ. Όλα τα πυκνά διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μίγμα των ανωτέρω μεταβολιτών σε συγκέντρωση 800 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης με συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM και δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου με συγκεντρώσεις 30 και 300 μM σε ούρα υγιούς ατόμου το οποίο έκανε αποχή από μεθυλοξανθίνες για δύο τουλάχιστον ημέρες.

2. Πρότυπα διαλύματα της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο σίελο:

Παρασκευάστηκαν διαλύματα 5mM της καφεΐνης και της 17MX σε υπερκαθαρό νερό. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη) σε συγκέντρωση 66,0 μM παρασκευάστηκε σε υπερκαθαρό νερό. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μίγμα των ανωτέρω μεταβολιτών σε συγκέντρωση 200 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων διαλυμάτων βαθμονόμησης με συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 και 20,0 μM και ποιοτικού ελέγχου με συγκεντρώσεις 1,5 και 15,0 μM σε σίελο υγιούς ατόμου το οποίο έκανε αποχή από μεθυλοξανθίνες για δυο τουλάχιστον ημέρες.

3. Πρότυπα διαλύματα της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό αίματος:

Παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα 1 mg/mL της κλοζαπίνης, της νορκλοζαπίνης και του εσωτερικού προτύπου (δεξτρομεθορφάνη) σε μεθανόλη. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε μίγμα διαλύματος εργασίας της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης σε συγκεντρώσεις 16 μg/mL με αραιώση των πυκνών διαλυμάτων με υπερκαθαρό νερό με σκοπό την παρασκευή των δειγμάτων βαθμονόμησης με συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400 και 1000 ng/mL και των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου με συγκεντρώσεις 75 και 750 ng/mL σε ορό υγιούς ατόμου. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε διάλυμα της δεξτρομεθορφάνης σε συγκέντρωση 10 μg/mL.

3.5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

1. Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων:

Σε δείγμα 200μL ούρων προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, 200 μL διαλύματος οξικού οξέος 0,1%, 200 μL διαλύματος ΕΠ (4-ακεταμιδοφαινόλη, 1mM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 6mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 4' στις 5000rpm με σκοπό την διάσπαση του δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 0,1% οξικό οξύ, αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000rpm. Τέλος, 20μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από ανάμιξη 200μL ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με 200μL των προτύπων μιγμάτων των 5 μεταβολιτών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

2. Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου

Τα δείγματα του σιέλου φυγοκεντρήθηκαν για 6' στις 5000 rpm. Στη συνέχεια λήφθηκαν 200 μL από το διαυγές υπερκείμενο στα οποία προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Κατόπιν προστέθηκαν 100 μL διαλύματος ΕΠ (4-ακεταμιδοφαινόλη, 66 μM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 4 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000 rpm. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 80/20/2 v/v) αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm. Τέλος, 50 μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη πυκνών διαλυμάτων των μεταβολιτών κατάλληλης συγκέντρωσης σε 200 μL σιέλου που δεν περιείχε μεθυλοξανθίνες και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

3. Επεξεργασία των δειγμάτων ορού αίματος

Σε δείγματα ορού αίματος των 800 μL προστέθηκαν 160 μL διαλύματος του ΕΠ (δεξτρομεθορφάνη 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και 160 μL NaOH 1M. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1,6 mL διαιθυλαιθέρας και τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά για 1', έγινε φυγοκέντρωση στις 3500rpm για 5' και τοποθετήθηκαν στους -20°C για 12-13'. Η οργανική φάση απομονώθηκε και εξατμίστηκε σε ρεύμα N_2 στους 45°C και το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 160 μL κινητής φάσης. Στη συνέχεια, 20 μL εισήχθηκαν στη χρωματογραφική στήλη υπό τις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τα διαλύματα ορού αίματος βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων κλοζαπίνης και νορκλοζαπίνης σε ορό αίματος υγιούς ατόμου που δεν ελάμβανε κάποια άλλη φαρμακευτική ουσία και επεξεργάστηκαν όπως προηγουμένως.

3.5.ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ

Πίνακας 3: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα και σίελο. Εξίσωση ελαχίστων τετραγώνων $y=ax+\beta$.

| | α | β | R^2 | Εύρος συγκεντρώσεων (μM) |
|--|----------|---------|--------|---------------------------------------|
| Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα | | | | |
| AFMU | 0,0087 | 0,0183 | 0,9989 | 10-400 |
| 1MU | 0,0048 | 0,0346 | 0,9972 | 10-400 |
| 1MX | 0,0043 | 0,0144 | 0,9997 | 10-400 |
| 17MU | 0,0042 | 0,0097 | 0,9992 | 10-400 |
| 17MX | 0,0025 | -0,0004 | 0,9997 | 10-400 |
| Μεταβολίτης καφεΐνης στον σίελο | | | | |
| 17MX | 0,1020 | -0,0032 | 0,9999 | 0,5-20,0 |
| 137MX | 0,1005 | 0,0085 | 0,9998 | 0,5-20,0 |

Πίνακας 4 Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό αίματος. Εξίσωση ελαχίστων τετραγώνων $y=ax+\beta$.

| Κλοζαπίνη και νορκλοζαπίνη στον ορό αίματος | | | | |
|--|----------|---------|--------|-----------------------------|
| | α | β | R^2 | Εύρος συγκεντρώσεων (ng/mL) |
| Κλοζαπίνη | 0,0024 | -0,0065 | 0,9938 | 50-1000 |
| Νορκλοζαπίνη | 0,0022 | -0,0053 | 0,9965 | 50-1000 |

3.6.ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

- **Ούρα**

Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο διάλυμα αποτελούμενο από τους πέντε υπό εξέταση μεταβολίτες και του ΕΠ σε χαμηλές (30 μM) και υψηλές (300 μM) συγκεντρώσεις για κάθε μεταβολίτη. Τα δείγματα των ούρων των εθελοντών ασθενών αναλύθηκαν χρωματογραφικά εντός της αυτής ημέρας. Πριν την έναρξη και μετά το πέρας της ανάλυσης των δειγμάτων, αναλύθηκαν δυο δείγματα ποιοτικού ελέγχου υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης.

- **Σίελος**

Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) με την ανάμιξη σιέλου ελευθέρου από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο μείγμα 17MX και 137MX και του ΕΠ σε χαμηλές (1,5 μM) και υψηλές (15,0 μM) συγκεντρώσεις. Τα δείγματα του σιέλου αναλύθηκαν χρωματογραφικά εντός της αυτής ημέρας. Πριν την έναρξη και μετά το πέρας της ανάλυσης των δειγμάτων, αναλύθηκαν δυο δείγματα ποιοτικού ελέγχου υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης.

- **Ορός αίματος**

Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) με την ανάμιξη ορού αίματος υγιούς ατόμου με ένα πρότυπο κλοζαπίνης/νορκλοζαπίνης και του ΕΠ σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις. Τα δείγματα του ορού αναλύθηκαν χρωματογραφικά εντός της αυτής ημέρας. Πριν την έναρξη και μετά το πέρας της ανάλυσης των δειγμάτων, αναλύθηκαν δυο δείγματα ποιοτικού ελέγχου υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης.

Πίνακας 5: Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα των μετρήσεων (n=2) στα ούρα.

| | Προσθεθείσα συγκέντρωση (μM) | Μέση μετρηθείσα συγκέντρωση (μM) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) | Προσθεθείσα συγκέντρωση (μM) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (μM) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------|--|---|--|---------------------------|--|
| Μεταβολίτες καφεΐνης στα ούρα | | | | | | | | |
| AFMU | 30,00 | 26,83 | -10,58 | 8,73 | 300,00 | 300,80 | 0,26 | 5,13 |
| 1MU | 30,00 | 29,93 | -0,25 | 6,31 | 300,00 | 305,82 | 1,94 | 5,26 |
| 1MX | 30,00 | 30,51 | 1,68 | 2,62 | 300,00 | 294,85 | -1,72 | 1,60 |
| 17MU | 30,00 | 29,66 | -1,15 | 2,07 | 300,00 | 290,51 | -3,17 | 9,21 |
| 17MX | 30,00 | 32,20 | 7,32 | 6,30 | 300,00 | 305,19 | 1,73 | 5,66 |

Πίνακας 6: Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα των μετρήσεων (n=2) στο σίελο.

| | Προσθεθείσα συγκέντρωση (μM) | Μέση μετρηθείσα συγκέντρωση (μM) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) | Προσθεθείσα συγκέντρωση (μM) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (μM) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) |
|---------------------------------------|---|---|---------------------------|--|---|--|---------------------------|--|
| Μεταβολίτες καφεΐνης στο σίελο | | | | | | | | |
| 17MX | 1,50 | 1,60 | 6,67 | 7,07 | 15,00 | 14,93 | -0,50 | 6,30 |
| 137MX | 1,50 | 1,53 | 2,00 | 3,70 | 15,00 | 15,12 | 0,80 | 8,61 |

Πίνακας 7: Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα των μετρήσεων (n=2) στο ορό αίματος.

| | Προσθεθείσα συγκέντρωση (ng/mL) | Μέση μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/mL) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) | Προσθεθείσα συγκέντρωση (ng/mL) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/mL) | Σφάλμα (bias%) | Συντελεστής διακύμανσης (CV%) |
|--------------|--|--|---------------------------|--|--|---|---------------------------|--|
| Κλοζαπίνη | 75 | 73,83 | -1,56 | 4,29 | 750 | 732,26 | -2,37 | 3,27 |
| Νορκλοζαπίνη | 75 | 78,60 | 4,79 | 4,15 | 750 | 777,41 | 3,65 | 2,62 |

3.7.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν με τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και τον σίελο.

Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

Η κανονικότητα των παραμέτρων ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Οι συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων παραμέτρων στη μελέτη έγιναν με τη χρήση του παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης r του Pearson και του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman.

Η συσχέτιση μεταξύ του φυσικού λογάριθμου του CYP1A2 και των επιπέδων κλοζαπίνης στον ορό αίματος έγινε με τη μέθοδο της μερικής συσχέτισης (partial correlation test). Η μέθοδος συσχετίζει τις δύο υπόψη μεταβλητές με προσαρμογή για την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) και την δόση της κλοζαπίνης.

Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των δεικτών CYP1A2 μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών ελέγχθηκαν με την δοκιμασία t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent samples t-test).

Για την διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την έκβαση της ασθένειας έγινε γραμμική παλινδρόμηση με εξαρτημένη μεταβλητή το PANNS και ανεξάρτητες μεταβλητές την συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό, την ηλικία, το BMI, την ηλικία έναρξης της ασθένειας, το φύλο, τη δόση της κλοζαπίνης και το μεταβολικό λόγο του CYP1A2 στα ούρα.

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης backwards η οποία τοποθετεί όλες τις μεταβλητές στο μοντέλο και σταδιακά αφαιρεί μεταβλητές που δεν έχουν στατιστικώς σημαντική επίπτωση. Εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού των παρατηρήσεων και του αυξημένου αριθμού των ανεξάρτητων μεταβλητών υπάρχει ο κίνδυνος της "υπερπροσαρμογής" (overfitting) της γραμμικής παλινδρόμησης η οποία έχει ως συνέπεια το συγκεκριμένο μοντέλο να μην είναι ικανό να κάνει ασφαλή πρόβλεψη σε άλλα άτομα, άλλων σχετικών ερευνών [89]. Για να περιοριστεί αυτό το φαινόμενο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υπολογισμού του προβλεπόμενου συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης (R^2 predicted), ο οποίος δίνει ένα ακριβέστερο μέτρο της προβλεπτικής ικανότητας της γραμμικής παλινδρόμησης. Ο συντελεστής αυτός υπολογίζεται από τον τύπο [90,91]:

$$R^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\text{SST}}$$

PRESS=predicted sum of squares, SST=total sum of squares.

Όσον αφορά τους συντελεστές της γραμμικής παλινδρόμησης, ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι 2 άτομα ανά μεταβλητή (subjects per variable, spv), σε μια ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, επαρκούν για να αποδώσουν τους συντελεστές της παλινδρόμησης με σφάλμα μικρότερο του 10% [92]. Η συνθήκη αυτή τηρήθηκε, όσον αφορά το PANSS καθώς, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για 12 συμμετέχοντες στη μελέτη εισήχθησαν στο μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης 6 μεταβλητές.

Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό λογισμικό SPSS 25.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 8 αναγράφονται οι τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο που αντανakλούν την δραστηριότητα του CYP1A2. Ο μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στα ούρα εκφράζεται ως (AFMU+1MU+1MX)/17MU και του σιέλου ως 17MU/137MX.

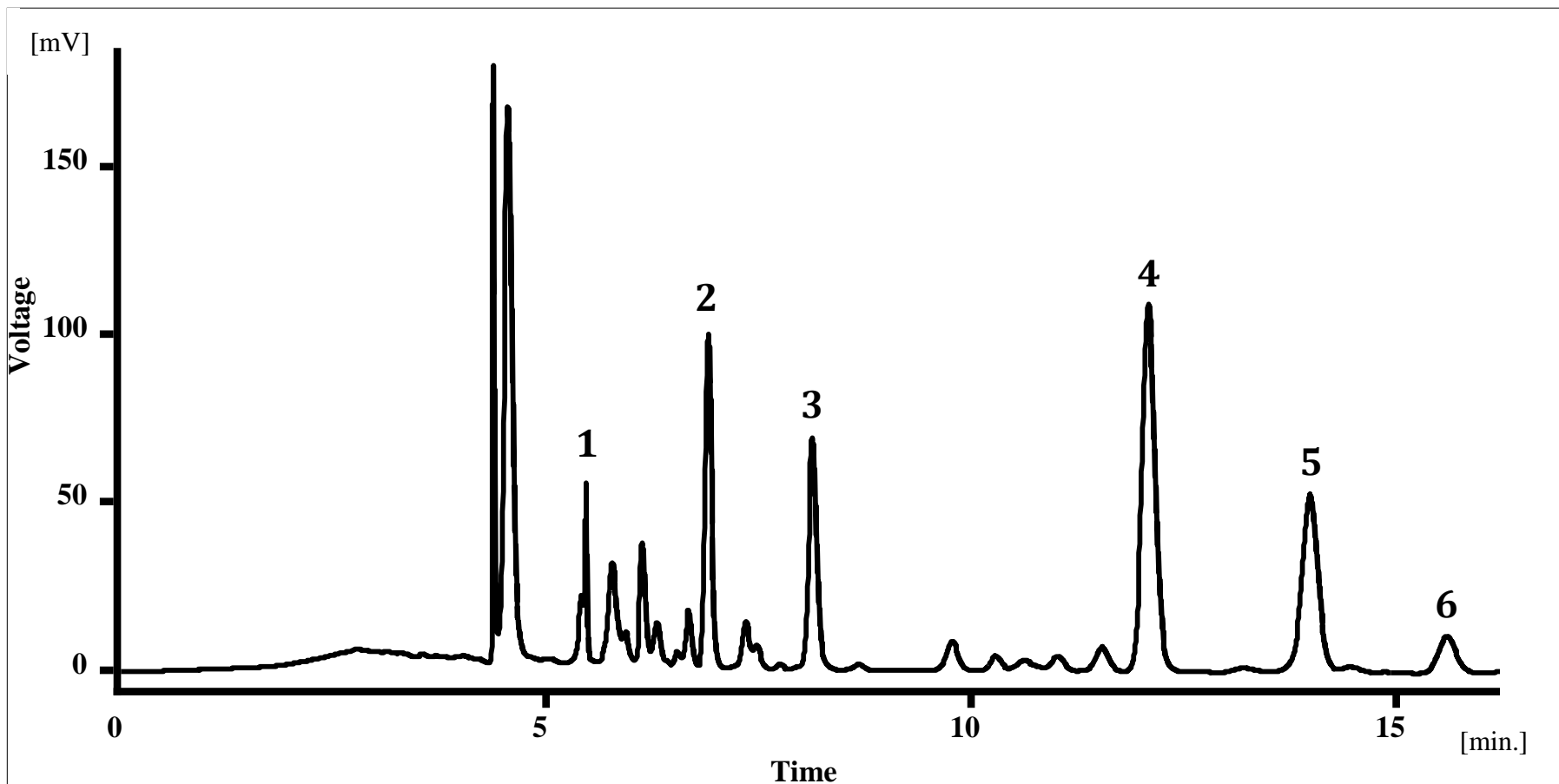
Στον πίνακα 9 αναγράφονται οι συγκεντρώσεις της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό των εθελοντών πριν από την πρώτη δόση της ημέρας. Επίσης αναγράφεται και ο μεταβολικός λόγος [κλοζαπίνης]/[νορκλοζαπίνης].

Πίνακας 8: Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο που αντανakλούν τη δραστηριότητα του CYP1A2.

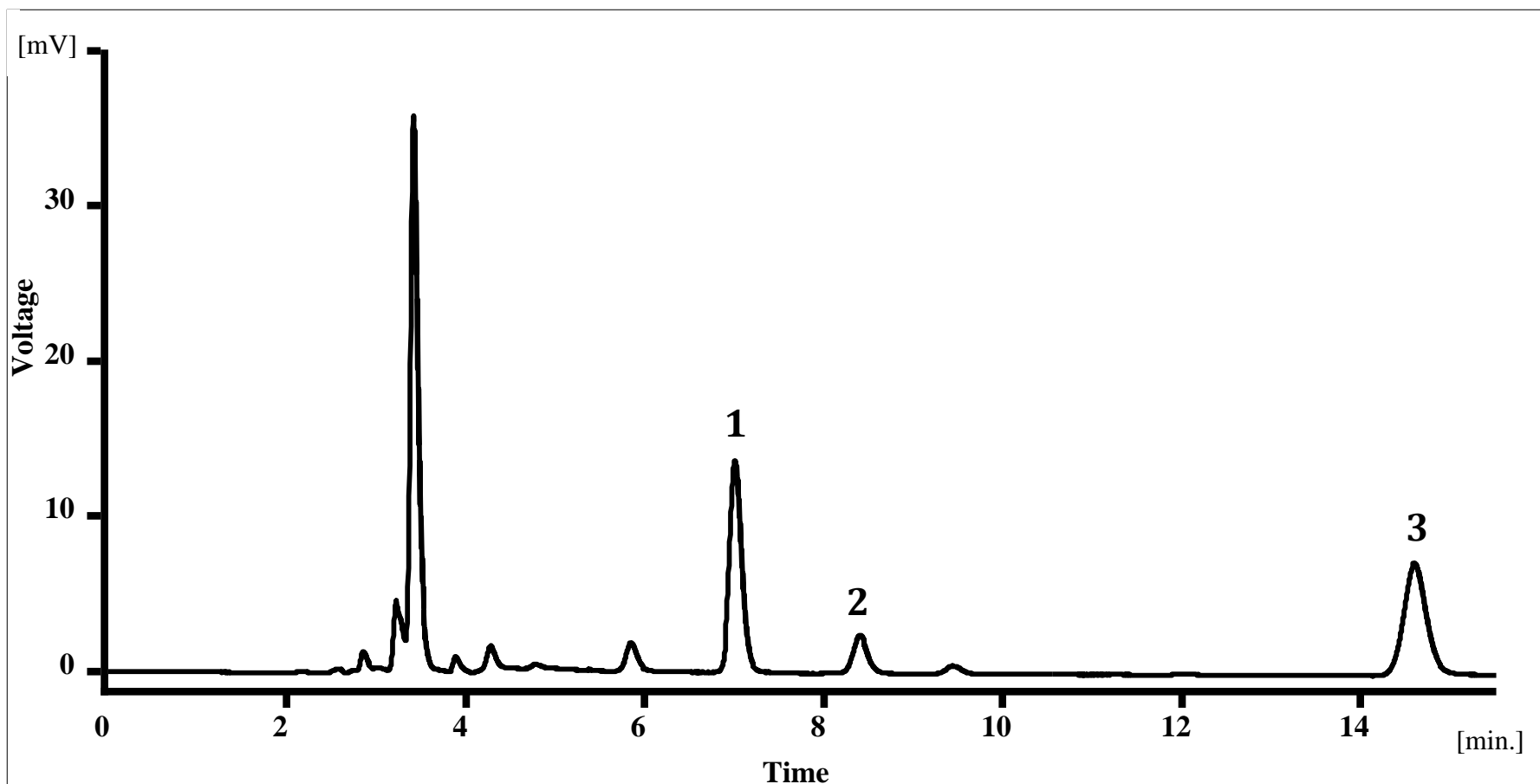
| Κωδικός | Κάπνισμα | Ούρα | | Σίελος | |
|---------|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Δείκτης CYP1A2 | Δείκτης CYP1A2 | Δείκτης CYP1A2 | Δείκτης CYP1A2 |
| 1 | Ναι | 13,93 | | 1,96 | |
| 2 | Όχι | 7,75 | | 0,76 | |
| 3 | Όχι | 3,32 | | 0,29 | |
| 4 | Όχι | 3,15 | | 0,29 | |
| 5 | Ναι | 5,57 | | 0,78 | |
| 6 | Ναι | 9,66 | | 1,43 | |
| 7 | Ναι | 5,95 | | 0,72 | |
| 8 | Όχι | 6,35 | | 0,53 | |
| 10 | Όχι | 4,02 | | 0,40 | |
| 11 | Ναι | 7,13 | | 0,57 | |
| 12 | Όχι | 2,14 | | 0,22 | |
| 13 | Όχι | 6,58 | | 0,72 | |

Πίνακας 9: Τιμές της κλοζαπίνης και της νορκλοζαπίνης στον ορό αίματος.

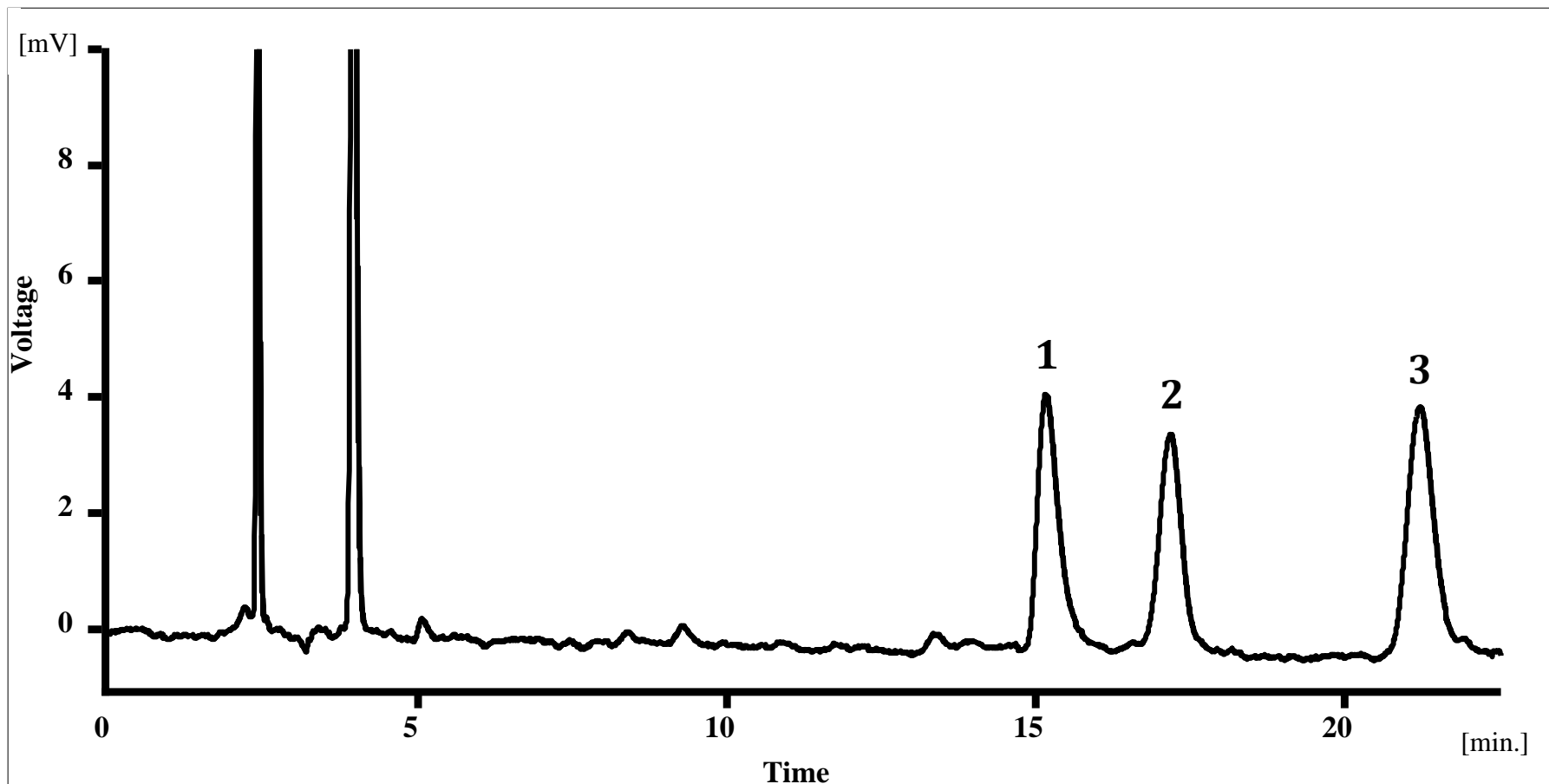
| Κωδικός | Κλοζαπίνη (ng/mL) | Νορκλοζαπίνη (ng/mL) | Λόγος κλοζαπίνης/ νορκλοζαπίνης | Λόγος νορκλοζαπίνης/ κλοζαπίνης |
|----------------|------------------------------|---------------------------------|--|--|
| 1 | 222,52 | 159,79 | 1,39 | 0,72 |
| 2 | 59,37 | 50,05 | 1,19 | 0,84 |
| 3 | 378,36 | 142,50 | 2,66 | 0,38 |
| 4 | 736,31 | 239,20 | 3,08 | 0,32 |
| 5 | 361,47 | 252,20 | 1,43 | 0,70 |
| 6 | 175,1 | 175,01 | 1,00 | 1,00 |
| 7 | 98,65 | 59,54 | 1,66 | 0,60 |
| 8 | 516,22 | 86,60 | 5,96 | 0,17 |
| 10 | 704,60 | 275,96 | 2,55 | 0,39 |
| 11 | 59,93 | 31,77 | 1,89 | 0,53 |
| 12 | 1102,87 | 334,96 | 3,29 | 0,30 |
| 13 | 197,64 | 109,34 | 1,81 | 0,55 |



Σχήμα 2: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα δείγματος ούρων εθελοντή ασθενούς 6 ώρες μετά από την κατανάλωση της καφεΐνης. Μεταβολικός λόγος του CYP1A2: 3,17. **Κορυφές/Συγκεντρώσεις (μΜ):** (1) AFMU:29,07; (2) 1MU:182,12; (3) 1MX:143,39; (4) Εσωτερικό Πρότυπο; (5) 17MU:112,59; (6) 17MX:40,38.



Σχήμα 3: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα δείγματος σιέλου εθελοντή ασθενούς 6 ώρες μετά από την κατανάλωση της καφεΐνης. Μεταβολικός λόγος του CYP1A2: 0,22. **Κορυφές/Συγκεντρώσεις (μM):** (1) Εσωτερικό Πρότυπο; (2) 17MX:2,15; (3) 137MX:9,94.



Σχήμα 4: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα ορού αίματος εθελοντή/ασθενούς που λαμβάνει 450 mg ημερησίως κλοζαπίνης.

Κορυφές/Συγκεντρώσεις (ng/mL): (1) Εσωτερικό Πρότυπο; (2) Νορκλοζαπίνη:275,76; (3) Κλοζαπίνη:704,60.

Πίνακας 10: Έλεγχος προσαρμογής των μεταβλητών στην κανονική κατανομή.

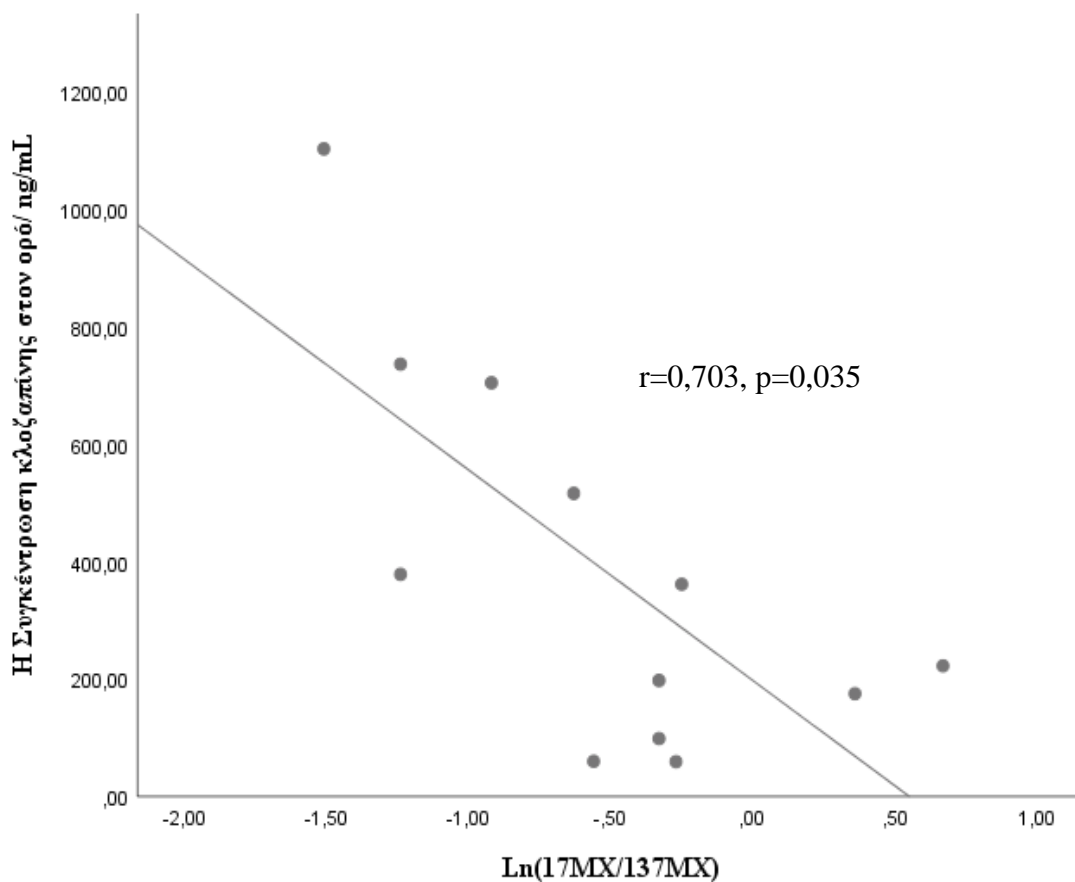
| Μεταβλητή | p* |
|---|-------|
| Ο Μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στα ούρα (CYP1A2-Urine) | 0,282 |
| Ο Μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στο σίελο (CYP1A2-Saliva) | 0,018 |
| Ο Φυσικός λογάριθμος του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στο σίελο (CYP1A2-Saliva) | 0,742 |
| Η Συγκέντρωση της κλοζαπίνης στο αίμα [Κλοζαπίνη] | 0,108 |
| Η Συγκέντρωση της νορκλοζαπίνης στο αίμα [Νορκλοζαπίνη] | 0,627 |
| Το PANSS | 0,571 |
| Η Ημερήσια δόση της κλοζαπίνης από το στόματος (Dose) | 0,105 |
| Η Ηλικία | 0,009 |
| Ο Δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index) | 0,425 |
| Ο Μεταβολικός λόγος [Νορκλοζαπίνη]/[Κλοζαπίνη] | 0,953 |
| Ο Μεταβολικός λόγος [Κλοζαπίνη]/[Νορκλοζαπίνη] | 0,014 |
| Η Διάρκεια της νόσου | 0,420 |
| Η Ηλικία έναρξης της νόσου | 0,042 |

* δοκιμασία κανονικότητας Shapiro-Wilk

Παρατηρήθηκε υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη του CYP1A2 στα ούρα και του φυσικού λογάριθμου του CYP1A2 στο σίελο ($r=0,943$, $p<0,01$ Pearson correlation test).

Παρατηρήθηκε υψηλή θετική συσχέτιση των δεικτών του CYP1A2 τόσο στα ούρα όσο και στο σίελο με το μεταβολικό λόγο [Νορκλοζαπίνη]/[Κλοζαπίνη], $r_1=0,734$, $r_2=0,891$, $p<0,01$ αντίστοιχα. (Spearman's rho correlation test).

Παρατηρήθηκε υψηλή αρνητική μερική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων κλοζαπίνης στον ορό και φυσικού λογάριθμου του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στο σίελο ($r=-0,703$, $p=0,035$), με προσαρμογή για την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος και την δόση του φαρμάκου (**Σχήμα 5**).



Σχήμα 5: Συσχέτιση μεταξύ δραστηριότητας του CYP1A2 και των συγκεντρώσεων της κλοζπίνης στον ορό των ασθενών.

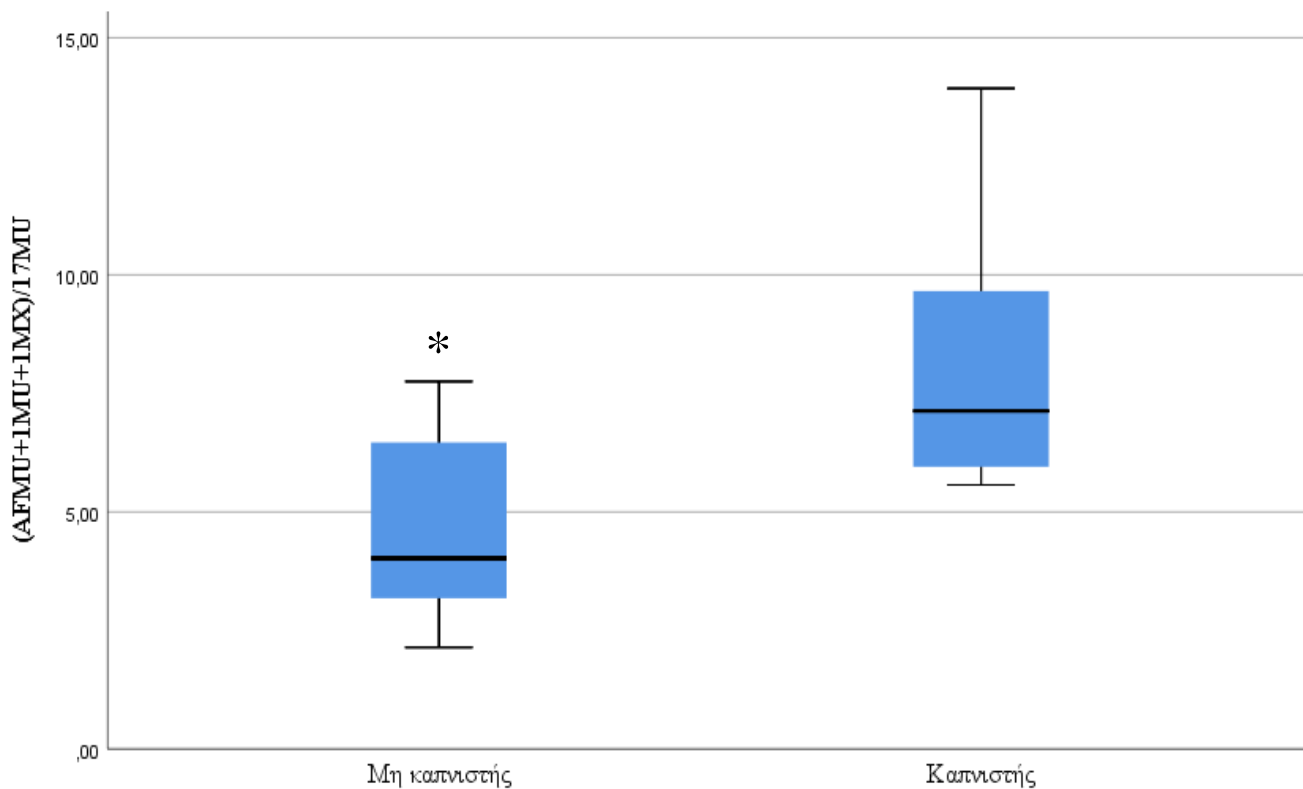
Οι καπνιστές παρουσίασαν μεγαλύτερες μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 από τους μη καπνιστές, τόσο στα ούρα ($8,45 \pm 3,46$ έναντι $4,74 \pm 2,13$, t test $p=0,043$), όσο και στο σίελο ($1,09 \pm 0,59$ έναντι $0,46 \pm 0,22$, t test $p=0,024$, **Σχήματα 6 και 7**).

Οι καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές παρουσίασαν , στατιστικώς σημαντική, διαφορά στις μέσες τιμές της συγκέντρωσης της κλοζαπίνης στον ορό $183,53 \pm 118,04$ έναντι $527,91 \pm 355$ αντίστοιχα , με προσαρμογή για τη δόση ($p=0,018$, **Σχήμα 8**).

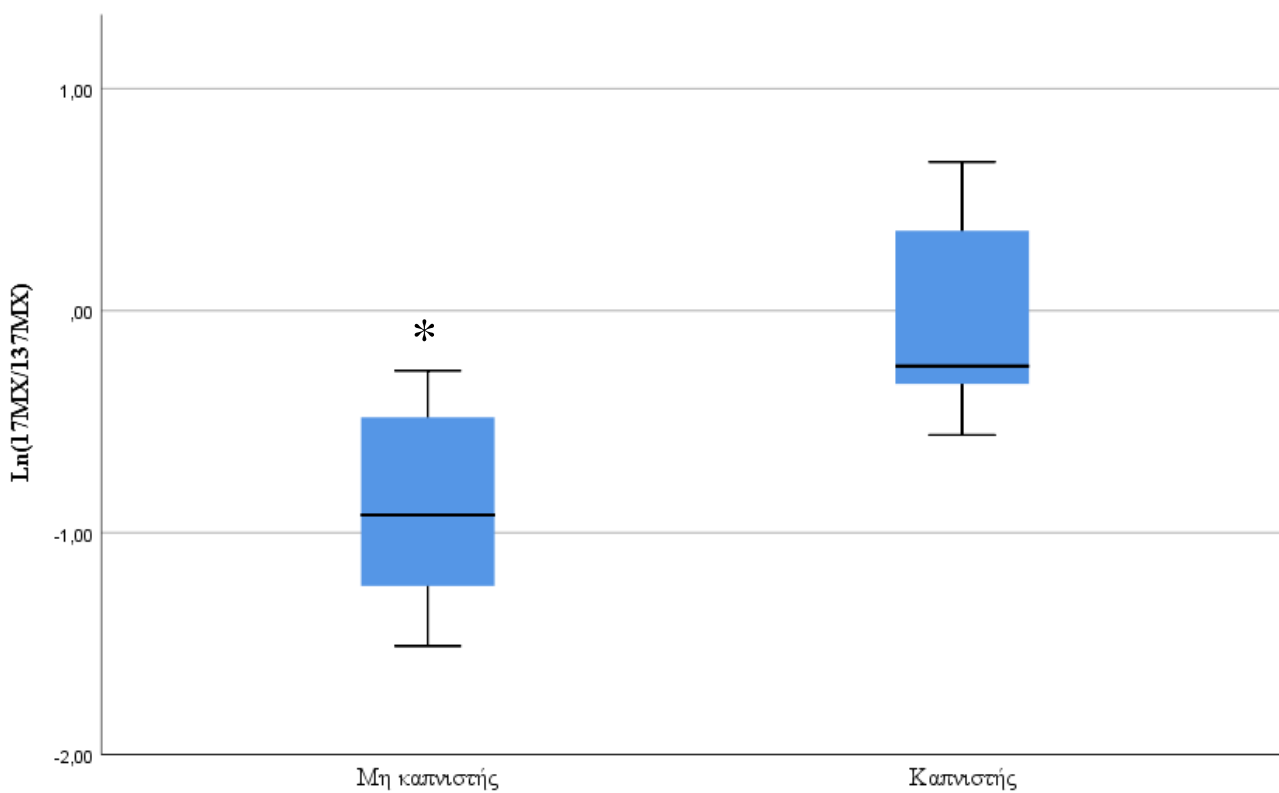
Η εφαρμογή της μεθόδου της γραμμικής παλινδρόμησης για το PANSS έδειξε ότι στατιστικώς σημαντικοί παράγοντες για την πρόβλεψη του μεγέθους του PANSS είναι η συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό και η ηλικία έναρξης της ασθένειας (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης των κριτηρίων κατά PANSS

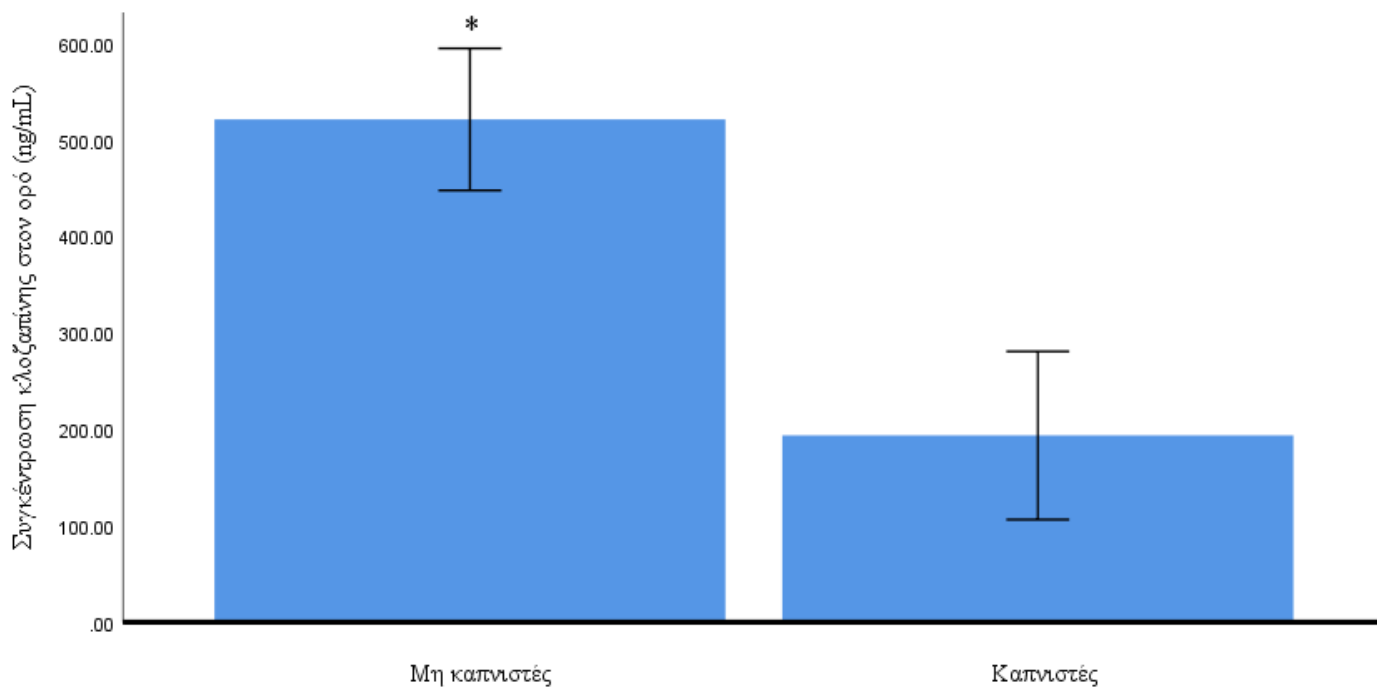
| Παράμετρος | Συντελεστής | Τυπικό σφάλμα | t | p |
|---------------------------------|-------------|---------------|--------|---------|
| Σταθερά (constant) | 164,445 | 20,222 | 8,132 | <0,0001 |
| Συγκέντρωση κλοζαπίνης στον ορό | -0.038 | 0,015 | -2,553 | 0,031 |
| Ηλικία έναρξης της νόσου | -3,321 | 0,753 | -4,407 | 0,002 |



Σχήμα 6: Η δραστηριότητα του CYP1A2 σε καπνιστές και μη καπνιστές με βάση τον μεταβολικό δείκτη της καφεΐνης στα ούρα. * $p=0,043$.



Σχήμα 7: Η δραστηριότητα του CYP1A2 σε καπνιστές και μη καπνιστές με βάση τον μεταβολικό δείκτη της καφεΐνης στο σίελο. * $p=0,024$



Σχήμα 8: Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της κλοζαπίνης στον ορό σε καπνιστές και μη καπνιστές, προσαρμοσμένες για τη δόση. Οι γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα ($\pm 1SE$).

* $p=0,018$

Πρέπει να σημειωθεί ότι η ηλικία και η διάρκεια της νόσου παρουσίασαν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους (Spearman $r=0,830$, $p=0,001$) και η διάρκεια της νόσου αφαιρέθηκε για λόγους συγγραμικότητας (collinearity). Το αυτό συνέβη με τους δείκτες του CYP1A2 στα ούρα και το σίελο (Spearman $r=0,853$, $p=0,001$) με συνέπεια να αφαιρεθεί ο δείκτης στο σίελο λόγω μη κανονικής κατανομής. Παρομοίως, σημαντική συσχέτιση παρουσίασαν η δόση της κλοζαπίνης και η συγκέντρωση στον ορό (Pearson $r=0,661$, $p=0,019$) με συνέπεια να εισαχθεί στο μοντέλο η συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό, ως περισσότερο αντιπροσωπευτικό μέγεθος σχετιζόμενο με τη θεραπεία.

Όσον αφορά τους συντελεστές της γραμμικής παλινδρόμησης, έχει αναφερθεί ότι 2 άτομα ανά μεταβλητή (subjects per variable, spv), σε μια ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, επαρκούν για να αποδώσουν τους συντελεστές της παλινδρόμησης με σφάλμα μικρότερο του 10% [92]. Η συνθήκη αυτή τηρήθηκε, όσον αφορά το PANSS καθώς όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για 12 συμμετέχοντες στη μελέτη εισήχθησαν στο μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης 6 μεταβλητές

Οι αρνητικοί συντελεστές των μεγεθών αυτών υποδηλώνουν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της κλοζαπίνης στον ορό και της ηλικίας έναρξης της ασθένειας το PANSS μειώνεται, επισημαίνοντας την ευνοϊκότερη έκβαση της ασθένειας.

Ο προσαρμοσμένος συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης (R^2 adjusted) ήταν 0,626. Ο προβλεπόμενος συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης (R^2 predicted) ήταν 0,523 ή 52,3% υποδηλώνοντας ότι οι παράγοντες αυτοί επεξηγούν το 52,3% της διακύμανσης του PANSS ενώ το υπόλοιπο οφείλεται σε άλλους, άγνωστους παράγοντες.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κλοζαπίνη, παρά το γεγονός ότι αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία της σχιζοφρένειας, δεν χρησιμοποιείται αρκετά στη κλινική πράξη [22]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου, όπως αυτή της ακοκκιοκυτταραιμίας, ή/και στην ανάγκη εξατομίκευσης της δόσης στον ασθενή, κάτι το οποίο απαιτεί αρκετό χρόνο και συχνό εργαστηριακό έλεγχο.

Το CYP1A2 ευθύνεται για το 70% του μεταβολισμού της κλοζαπίνης [32]. Η δραστηριότητα του CYP1A2 μπορεί να εκτιμηθεί φαινοτυπικά μέσω ενός φαρμάκου-δείκτη όπως είναι η καφεΐνη [56,85]. Η καφεΐνη αποτελεί κατάλληλο φάρμακο-δείκτη (probe drug) για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 καθώς έχει δειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση των μεταβολιτών της καφεΐνης με την δραστηριότητα του ενζύμου σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς, καθώς επίσης και μεταβολή της δραστηριότητας αυτής σε περίπτωση επαγωγής ή αναστολής του ενζύμου-στόχου ακόμα και σε κατάσταση ηπατικής ανεπάρκειας [93]. Το μόνο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η καφεΐνη ως διουρητικός παράγοντας συμβάλλει στην επιτάχυνση της αποβολής της από τους νεφρούς [48]. Αυτή η μικρή επίδραση της ροής των ούρων στον υπολογισμό του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στα ούρα δεν επισκιάζει την αξιοπιστία της μεθόδου. Αντίθετα με τον υπολογισμό του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στα ούρα, ο υπολογισμός του μεταβολικού λόγου στον σίελο δεν υπόκειται σε τέτοιο είδους παράγοντες [94].

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ούρα και ο σίελος ως βιολογικά υποστρώματα ανίχνευσης των μεταβολιτών της καφεΐνης. Η συλλογή τους έλαβε μέρος 6 ώρες ακριβώς μετά τη λήψη της καφεΐνης [56,85]. Ανεξάρτητα από το βιολογικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ο μεταβολικού λόγου της καφεΐνης, η εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 είναι έγκυρη και ακριβής. Αυτό φαίνεται και από την υψηλή θετική συσχέτιση των δύο δεικτών του συγκεκριμένου ενζύμου στα ούρα και στο σίελο ($r=0,943$, $p<0,01$) όπως αναφέρεται και στην παρούσα μελέτη. Επομένως, η ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου μπορεί να γίνει, ενδεχομένως, με την χρήση του ενός από τα δυο βιολογικά υποστρώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη, η συλλογή των δειγμάτων ούρων έγινε με μεγαλύτερη δυσκολία με την συγκεκριμένη ομάδα των ασθενών, σε σχέση με την συλλογή των δειγμάτων σιέλου, λόγω της φτωχής συμμόρφωσης των ασθενών στο συγκεκριμένο χρονικό περιθώριο καθώς και την αναγκαία χρήση του υποστηρικτικού περιβάλλοντος για την εκτέλεση της. Από την άλλη, δεν αντιμετωπίστηκαν ιδιαίτερα εμπόδια στη συλλογή δειγμάτων σιέλου, καθώς η μέθοδος

αυτή ευνοείται από την υπερπαραγωγή σιέλου που παρουσιάζουν οι ασθενείς ως ανεπιθύμητη παρενέργεια της κλοζαπίνης [95].

Όπως αναφέρθηκε και στο σκοπό της μελέτης, αναζητήθηκε μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της κλοζαπίνης στον ορό των ασθενών με την δραστηριότητα του CYP1A2. Βρέθηκε υψηλή μερική αρνητική συσχέτιση, μεταξύ των επιπέδων της κλοζαπίνης με τον φυσικό λογάριθμο του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 στο σίελο. Αυτό υποδηλώνει τη σημαντική επίδραση του CYP1A2 στα επίπεδα κλοζαπίνης στον ορό. Ως εκ τούτου, παράγοντες που αναστέλλουν ή επάγουν την δραστηριότητα του CYP1A2 μπορούν να επηρεάσουν επίπεδα της κλοζαπίνης στον ορό και δυνητικά στη κλινική πορεία του. Αξίζει να σημειωθεί πως η συσχέτιση υποβλήθηκε σε προσαρμογή για την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος και την δόση του φαρμάκου όπως αναλύεται παρακάτω.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα κλοζαπίνης στο αίμα με την πάροδο της ηλικίας [96,97]. Σε μια μελέτη με μεγάλο δείγμα ασθενών, κάθε επιπλέον έτος σε έναν ασθενή υπό αγωγή με κλοζαπίνη αύξησε τα επίπεδα της κλοζαπίνης στο αίμα κατά 1% [97]. Η πιθανή υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι η δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας. Οι απόψεις στη βιβλιογραφία δίστανται περί της επίδρασης της ηλικίας [98] και ως εκ τούτου χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Με την αύξηση του σωματικού βάρους πάνω από 80kg, αυξάνονται τα επίπεδα της κλοζαπίνης κατά 5% [99]. Έχει προταθεί επίσης ότι στην μέτρηση επιπέδων κλοζαπίνης θα πρέπει να συνεκτιμάται το ποσοστό λίπους του ασθενούς [100].

Εκτός αυτών των μεταβλητών, το φύλο ενδέχεται να επηρεάζει τα επίπεδα της κλοζαπίνης. Στις γυναίκες βρέθηκαν μεγαλύτερα επίπεδα κλοζαπίνης στον ορό σε σχέση με τους άντρες σε παρόμοια δοσολογικά σχήματα [96,97,101,102]. Λόγω του μικρού αριθμού εθελοντών στην παρούσα μελέτη, δεν ήταν δυνατή η διερεύνηση πιθανής διαφοροποίησης της δραστηριότητας του CYP1A2 μεταξύ των δύο φύλων. Παρόλα αυτά, σε προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της δραστηριότητας ενζύμων, πλέον του CYP1A2, που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της κλοζαπίνης μεταξύ ανδρών και γυναικών. Έτσι, οι γυναίκες χαρακτηρίζονται με μεγαλύτερη δραστηριότητα του CYP3A4 και μειωμένη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της φλουροουρακίλης και των αντιδράσεων σύζευξης σε σχέση με τους άνδρες [101].

Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες της ομάδας του AGNP επισημαίνουν τη χρησιμότητα του μεταβολικού λόγου της συγκέντρωσης του κυρίου μεταβολίτη ενός ψυχιατρικού φαρμάκου προς την συγκέντρωσή του στο αίμα (Metabolite Parent compound Ratio, MPR) με την προϋπόθεση ότι ο μεταβολίτης διαθέτει διαφορετική φαρμακοδυναμική δράση με την μητρική

ουσία. Σε περίπτωση που ο μεταβολίτης διαθέτει την ίδια φαρμακοδυναμική δράση με την μητρική ουσία τότε στην προσαρμογή της δόσης κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων φαρμάκου στο αίμα συνυπολογίζεται το άθροισμα του μεταβολίτη και της μητρικής ουσίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολικός λόγος MPR δεν χρησιμοποιείται για φάρμακα τα οποία δεν καταλύονται από τα ένζυμα της φάσης I του συστήματος P450 [24]. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε υψηλή θετική συσχέτιση των δεικτών του CYP1A2 τόσο στα ούρα ($r_1=0,734$) όσο και στο σίελο ($r_2=0,891$) με το μεταβολικό λόγο [Νορκλοζαπίνη]/[Κλοζαπίνη] ($p<0,01$). Επομένως, η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει ότι ο μεταβολικός λόγος [Νορκλοζαπίνη]/[Κλοζαπίνη] έχει την δυνατότητα να αντικατοπτρίζει την δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2.

Επιπλέον, ο αντίστροφος λόγος δηλαδή ο λόγος [Κλοζαπίνης]/[Νορκλοζαπίνης] μελετήθηκε σε μια μετανάλυση που περιλάμβανε 24.796 ασθενείς από το 1993 έως το 2007. Στην μελέτη αυτή βρέθηκε ότι οι τιμές του λόγου κάτω από 0,5 υποδηλώνουν μη συμμόρφωση του ασθενούς τις τελευταίες 24 ώρες ή αποτελούν ένδειξη αλλαγής του δοσολογικού σχήματος του φαρμάκου. Αντιθέτως, τιμές του λόγου πάνω από 3,0 υποδηλώνουν την ελλιπή απορρόφηση της κλοζαπίνης, ή τον κορεσμό του μεταβολισμού της λόγω της υψηλής χορηγούμενης δόσης ή ακόμα την αναστολή του CYP1A2 από κάποιο παράγοντα (π.χ: συγχορηγούμενα φάρμακα)[99]. Οι απόψεις δίστανται στη χρήση αυτού του λόγου ως μέτρου εκτίμησης της φαινοτυπικής δραστηριότητας του CYP1A2 και προτείνεται η χρήση του για την κατά προσέγγιση εκτίμηση του μεταβολισμού της κλοζαπίνης. Έτσι, οι Couchman et al., 2010, αναφέρουν πως ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο εκτίμησης του μεταβολισμού της κλοζαπίνης [99], ενώ αντίθετα οι Schoretsanitis et al., 2019 αναφέρουν στην ανασκόπηση τους πως ο λόγος δεν αποτελεί μέτρο εκτίμησης της δραστηριότητας του CYP1A2 και δεν συσχετίζεται με την κλινική απάντηση του ασθενούς. Ειδικότερα, αναφέρουν πως στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει ενιαίος ορισμός του λόγου, ή των μονάδων που χρησιμοποιούνται. Σε κάθε περίπτωση, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε υψηλή αρνητική συσχέτιση των δεικτών του CYP1A2 στα ούρα και στο σίελο με το μεταβολικό λόγο [Κλοζαπίνη]/[Νορκλοζαπίνη], ($r_1=-0,734$, $r_2=-0,891$, αντίστοιχα; $p<0,01$ Spearman's rho correlation test). Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις τα κλινικά και τα πειραματικά ευρήματα δεν επεξηγούν την μεταβολισμό της κλοζαπίνης από το CYP1A2 γεγονός που εγείρει την πιθανότητα μεταβολισμού της κλοζαπίνης και από άλλες οδούς όπως προτάθηκε από τους Chetty et al, 2007. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται σε αυτόν τον τομέα [103].

Το κάπνισμα είναι γνωστό ότι επάγει την δραστηριότητα του CYP1A2 [104]. Θεωρείται πως τα συστατικά του καπνού, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, και όχι η νικοτίνη ευθύνονται για την επαγωγή του ενζύμου. Το μέγεθος της επαγωγής αυξάνεται με το μέγεθος του καπνίσματος. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι κατανάλωση περισσότερων από 10

τσιγάρων την ημέρα αυξάνει την δραστηριότητα του CYP1A2 κατά 1,7 φορές [105]. Η αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 μειώνεται κατά 20% και κατά 36% μετά από δύο και επτά μέρες διακοπής καπνίσματος, αντίστοιχα [105]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ασθενείς υπό θεραπεία με κλοζαπίνη έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες (επιληπτικές κρίσεις) μετά από διακοπή του καπνίσματος χωρίς αλλαγή της δοσολογίας της κλοζαπίνης [106,107]. Εφόσον λοιπόν η κατανάλωση πλέον των 10 τσιγάρων την ημέρα επηρεάζει την δραστηριότητα του CYP1A2 [48] θα πρέπει ο παράγοντας αυτός να λαμβάνεται υπόψη κατά την χορήγηση της κλοζαπίνης. Η επαγωγική δράση του καπνίσματος στην δραστηριότητα του CYP1A2 επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη καθώς συμμετείχαν 5 καπνιστές με 30 μέσο όρο τσιγάρων την ημέρα. Πράγματι, οι καπνιστές παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερες μέσες τιμές των δεικτών του CYP1A2 τόσο στα ούρα όσο και στο σίελο κάτι το οποίο συμφωνεί με την βιβλιογραφία όπως αναφέρεται παραπάνω..

Ο μεταβολικός λόγος [νορκλοζαπίνη]/[κλοζαπίνη] παρουσίασε μεγαλύτερες μέσες τιμές στους καπνιστές από τους μη καπνιστές ($0,71 \pm 0,18$ έναντι $0,42 \pm 0,22$, $p=0,035$), κάτι το οποίο συνηγορεί υπέρ του μεγαλύτερου μεταβολισμού της κλοζαπίνης στους καπνιστές λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του CYP1A2 και ενισχύει την άποψη ότι ο λόγος [νορκλοζαπίνη]/[κλοζαπίνη] μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο εκτίμησης της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2.

Πέρα από το κάπνισμα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν την δραστηριότητα του CYP1A2 όπως κάποια τρόφιμα, το φύλο, ο δείκτης μάζας σώματος και φάρμακα. Το τελευταίο παίζει σημαντικό ρόλο στην παρούσα μελέτη λόγω της συγχορήγησης φαρμάκων σε όλους τους συμμετέχοντες. Παραδείγματα φαρμάκων που επάγουν το CYP1A2 περιλαμβάνουν:

1. την ομεπραζόλη και βρέθηκε ότι η αντικατάσταση της από παντοπραζόλη, ένα φάρμακο με ίδια θεραπευτική δράση, δεν επηρεάζει την δραστηριότητα του CYP1A2 σε μια μελέτη με μη καπνιστές όπου η αντικατάσταση αυτή οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα κλοζαπίνης στο αίμα των συμμετεχόντων [108].
2. την καρβαμαζεπίνη η οποία θεωρείται ως ένας δυνατός επαγωγέα ευρέος φάσματος των CYP ενζύμων συμπεριλαμβανομένων το CYP1A2 και το CYP3A4 που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της κλοζαπίνης [109]. Σε μια μελέτη, μειώθηκαν τα επίπεδα της κλοζαπίνης κατά 46,8% λόγω της συγχορήγησης της καρβαμαζεπίνης [110]. Είναι σημαντική αυτή η επίδραση λόγω της χρήσης αντιεπιληπτικών ουσιών σε ασθενείς υπό αγωγή με κλοζαπίνη που εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις ως ανεπιθύμητη παρενέργεια της κλοζαπίνης.

3. την φαινοβαρβιτάλη, όπου μετά από μια μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων κλοζαπίνης κατά 56% κατόπιν διακοπής της φαινοβαρβιτάλης [111].
4. την ριφαμπικίνη με μείωση των επιπέδων της κλοζαπίνης κατά την συγχορηγήση της [112].

Αντιθέτως, υπάρχει μια πληθώρα φαρμάκων, επί το πλείστον ψυχιατρικά, που αναστέλλουν το CYP1A2 με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της κλοζαπίνης στο αίμα αυξάνοντας τις πιθανότητες για δυνητικές επικίνδυνες ανεπιθύμητες παρενέργειες. Αυτά περιλαμβάνουν:

1. την καφεΐνη, όπου σε μια μελέτη, με 12 υγιείς μη καπνιστές υπό αγωγή με 12,5 mg κλοζαπίνης, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα κλοζαπίνης κατά 19% κατόπιν κατανάλωσης καφεΐνης συγκεντρώσεων από 400-1000 mg [113]. Εντούτοις, η καφεΐνη ενδέχεται να προκαλέσει αναστολή στο CYP1A2 και αφετέρου να εξηγήσει τις διακυμάνσεις των επιπέδων κλοζαπίνης σε ασθενείς με συχνή κατανάλωση καφεΐνης. Από αυτό το εύρημα προκύπτει το ερώτημα εάν οι διακυμάνσεις στις δόσεις καφεΐνης προκαλούν διαφορετικού βαθμού αυξήσεις στα επίπεδα κλοζαπίνης [109].
2. την φλουβοξαμίνη [114]. Η συγκεκριμένη ουσία ανήκει στην κατηγορία των αντικαταθλιπτικών και ειδικότερα είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Έχει μελετηθεί εκτενώς η αλληλεπίδρασή του με την κλοζαπίνη λόγω της καταστολής που επιφέρει στο CYP1A2 με αποτέλεσμα να σχεδιαστούν συγκεκριμένες κατευθυντήριες οδηγίες που στοχεύουν στην προσθήκη της φλουβοξαμίνης στο θεραπευτικό σχήμα ενός ασθενούς με ανθεκτική σχιζοφρένεια [115,116,117] με τελικό στόχο τη μείωση της δόσης της κλοζαπίνης [118].
3. την σιπροφλοξασίνη [119], που ανήκει σε μια κατηγορία αντιβιοτικών (κινολόνες). Σε μια κλινική μελέτη βρέθηκαν αυξήσεις στα επίπεδα κλοζαπίνης μετά από χορήγηση σιπροφλοξασίνης σε 7 ασθενείς υπό αγωγή με την κλοζαπίνη σε σταθερή κατάσταση. Παρουσιάστηκε 29% και 31% αύξηση στα επίπεδα της κλοζαπίνης και νορκλοζαπίνης, αντίστοιχα [120] Η ύπαρξη τέτοιου είδους αλληλεπίδρασης πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περίπτωση λοίμωξης σε ασθενή με ανθεκτική σχιζοφρένεια. Πολλά μεμονωμένα περιστατικά έχουν αναφερθεί με τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις [121]. Σε ένα περιστατικό με ορχεοεπιδιδυμίτιδα παρατηρήθηκε πενταπλάσια αύξηση των επιπέδων κλοζαπίνης (από 550 ng/mL πριν την έναρξη σιπροφλοξασίνης και 2570 ng/mL 4 μέρες μετά την έναρξη της).

Η πληθώρα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται συχνά στην κλινική πράξη, και του CYP1A2 πρέπει να ληφθούν υπόψιν κάθε φορά που θα χορηγηθεί σε έναν ασθενή κλοζαπίνη. Οι αυξομειώσεις στα επίπεδα της κλοζαπίνης, δυνητικά, ενδέχεται να απορυθμίσουν έναν ασθενή με ανθεκτική σχιζοφρένεια ή να προκαλέσουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες μέχρι και θάνατο. Το τελευταίο, αν και ακούγεται ακραίο, έχει αναφερθεί

στη βιβλιογραφία με περιστατικά όπου έγινε χορήγηση σιπροφλοξασίνης, σεφτραλίνης ή και άλλων φαρμάκων και μέσω του μηχανισμού του οποίου αναφέρθηκε παραπάνω, οδήγησε σε ραγδαίες αυξήσεις των επιπέδων της κλοζαπίνης με αποτέλεσμα θανατηφόρα επιληπτική κρίση ή καρδιακή ανακοπή [122,123,124]. Η συγχορήγηση της σεφτραλίνης, εν τέλει, δεν βρέθηκε ως μείζων παράγοντας καταστολής του CYP1A2 και μάλλον ο εν προκειμένου θάνατος να οφείλονταν σε άλλους, άγνωστους, παράγοντες [125,126].

Στην παρούσα μελέτη, σε όλους τους ασθενείς υπήρχε συγχορήγηση φαρμάκων. Από τα φάρμακα που ελάμβαναν οι ασθενείς η ομεπραζόλη, το βαλπροϊκό οξύ και η ρισπεριδόνη έχουν αναφερθεί να μετέχουν στην δραστηριότητα του CYP1A2 και επακολούθως στον μεταβολισμό της κλοζαπίνης [109,127]. Στη βιβλιογραφία δίδονται οι απόψεις σχετικά με την επίδραση του βαλπροϊκού στο μεταβολισμό της κλοζαπίνης. Σε κάποιες μελέτες αναφέρονται αυξήσεις ενώ σε άλλες μειώσεις στο μεταβολισμό της κλοζαπίνης μετά την προσθήκη του βαλπροϊκού οξέος [128,129,130,131,132]. Αυτές οι αλλαγές πιθανολογείται να μην είναι κλινικά σημαντικές [133]. Ως αποτέλεσμα, τα άτυπα αντιψυχωσικά φαίνεται να μην έχουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις με το βαλπροϊκό οξύ. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη με 255 ασθενείς υπό αγωγή με κλοζαπίνη και βαλπροϊκό οξύ ανέφερε καταστολή κατά 16% του μεταβολισμού της κλοζαπίνης στους μη καπνιστές και αύξηση κατά 22% του μεταβολισμού της κλοζαπίνης στους καπνιστές [134]. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την επίδραση του καπνίσματος στο μεταβολισμό της κλοζαπίνης, κάτι το οποίο γίνεται περισσότερο έντονο κατά την προσθήκη του βαλπροϊκού οξέος [109]. Το βαλπροϊκό οξύ δεν επάγει αλλά ενδέχεται να καταστέλλει κάποια ισοένζυμα, ιδιαίτερα το CYP2C9, το οποίο δεν παίζει μεγάλο ρόλο στο μεταβολισμό των νέων αντιψυχωσικών, [135,136] και άλλα όπως το CYP3A4 και το CYP2C19 (ασθενής καταστολή) [137]. Σε ηπατικά κύτταρα βρέθηκε πως επάγει την έκφραση του CYP3A4 και κάποιες p-γλυκοπρωτεΐνες [138]. Πιθανολογείται πως η έκφραση αυτή ενδέχεται να εξηγήσει την αντιφατική και περίπλοκη επίδραση του βαλπροϊκού στα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς [109]. Από τους ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη, μια ασθενής ελάμβανε βαλπροϊκό οξύ λόγω μιας επιληπτικής κρίσης κατά τη λήψη της κλοζαπίνης στο παρελθόν και δυο ασθενείς ήταν υπό αγωγή με ομεπραζόλη. Οι υπόλοιποι ασθενείς δεν ελάμβαναν κάποιο φάρμακο το οποίο να αναφέρεται ότι επιδρά στη δραστηριότητα του CYP1A2. Η χορήγηση των φαρμάκων αυτών κρίθηκε αναγκαία κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου από την θεράποντα ιατρό.

Η ρισπεριδόνη, από την άλλη, έχει συσχετιστεί με αύξηση στις συγκεντρώσεις της κλοζαπίνης μετά από συγχορήγησης της με ρισπεριδόνη [139,140]. Σε μελέτη που περιελάμβανε 12 σχιζοφρενείς ασθενείς υπό θεραπεία με κλοζαπίνη για διάστημα μεγαλύτερο από 4 εβδομάδες, η προσθήκη της ρισπεριδόνης ήταν καλά ανεκτή και δε επηρέαζε σημαντικά τα επίπεδα της

κλοζαπίνης [141]. Επίσης, μια ακόμη μελέτη επιβεβαίωσε την έλλειψη αλληλεπίδρασης κλοζαπίνης-ρισπεριδόνης σε 18 ασθενείς υπό θεραπεία με κλοζαπίνη με προσθήκη της ρισπεριδόνης [142]. Τελικά αυτή η αλληλεπίδραση κλοζαπίνης-ρισπεριδόνης απορρίφθηκε με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν κάποιες επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες που να απαγορεύσουν την συγχρορήγηση αυτών των δύο φαρμάκων.

Η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης στην παρούσα μελέτη έδειξε πως η βαρύτητα της νόσου με βάση τα κριτήρια της κλίμακας PANSS συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την ηλικία έναρξης της νόσου και την συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό. Η ηλικία έναρξης της νόσου παρουσίασε αρνητικό συντελεστή (-3,321), κάτι που σημαίνει ότι οι νεαρότερες ηλικίες έναρξης της νόσου συσχετίζονται με μεγαλύτερες τιμές του PANSS και κατά συνέπεια δυσμενέστερη έκβαση της νόσου. Από την άλλη, η συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό παρουσίασε αρνητικό συντελεστή (-0,038) που δηλώνει την καλύτερη έκβαση της νόσου (χαμηλή τιμή του PANSS) με την αύξηση των επιπέδων της κλοζαπίνης στον ορό. Ο προβλεπόμενος συντελεστής συσχέτισης (R^2 predicted) ήταν 0,523, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διακύμανση των τιμών του PANSS εξαρτάται κατά 52,3% από αυτούς τους δυο παράγοντες, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό οφείλεται σε άλλους αγνώστους παράγοντες. Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση βρέθηκε πως οι χαμηλότερες τιμές της αρνητικής κλίμακας του PANSS πριν την έναρξη θεραπείας με κλοζαπίνη και η παρανοϊκή σχιζοφρένεια συσχετίζονται με καλύτερη κλινική ανταπόκριση. Το πρώτο πιθανώς αιτιολογείται από το γεγονός ότι η κλοζαπίνη, όπως και όλα τα άλλα αντιψυχωσικά, στοχεύει στη μείωση των θετικών συμπτωμάτων και επομένως άτομα με περισσότερα αρνητικά συμπτώματα πιθανώς να μην επωφεληθούν στον ίδιο βαθμό με ασθενείς με λιγότερα αρνητικά συμπτώματα. Στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε, επίσης, ότι σημαντικός παράγοντας για καλύτερη απόκριση στην κλοζαπίνη ήταν η νεαρότερη ηλικία των ασθενών, ενώ δεν υπήρξε σημαντική συμβολή της συγκέντρωσης της κλοζαπίνης στον ορό, της μέσης δόσης της κλοζαπίνης, της ηλικίας έναρξης της νόσου, της διάρκειας της νόσου και άλλων δημογραφικών παραγόντων όπως τα έτη εκπαίδευσης, η έγγαμη κατάσταση, το φύλο, το βάρος και το κάπνισμα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρόλο που έρχονται σε συμφωνία με τα περισσότερα συμπεράσματα της μετα-ανάλυσης, διαφέρουν όσον αφορά στα συμπεράσματα για την συγκέντρωση της κλοζαπίνης στον ορό και την ηλικία έναρξης της νόσου. Για τα επίπεδα της κλοζαπίνης στον ορό, ειδικότερα, δεν υπάρχει ομοφωνία στις μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην ανωτέρω ανάλυση. Οι Xiang et al. (2006) αναφέρουν σημαντική αρνητική συσχέτιση των επιπέδων κλοζαπίνης στον ορό και της εκατοστιαίας μείωσης της βαθμολογίας της κλίμακας BPRS 102 ασθενών [28]. Αντίθετα, οι Dettling et al. (2000) δεν ανέφεραν σημαντική διαφορά στα επίπεδα της κλοζαπίνης του ορού σε ασθενείς που αποκρίθηκαν στην θεραπεία με κλοζαπίνη σε

σχέση με αυτούς που δεν αποκρίθηκαν με κριτήριο την κλίμακα BPRS σε ένα σύνολο 34 ασθενών [143]. Επιπλέον, οι Lee et al. (2009) ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις της κλοζαπίνης στον ορό 72 ασθενών ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε αυτούς που είχαν καλή απόκριση στη θεραπεία σε σχέση με αυτούς που είχαν μέτρια ή κακή απόκριση με βάση την κλίμακα CGI-I [144]. Στην τελευταία μελέτη οι μέσες συγκεντρώσεις της κλοζαπίνης στον ορό ήταν 610,7 ng/mL, αρκετά υψηλότερες από αυτές των προηγούμενων (Xiang et al., 323,5 ng/mL; Dettling et al., 240 ng/mL; Παρούσα μελέτη, 384,4 ng/mL) το οποίο ενδέχεται να σημαίνει ότι πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο η συγκέντρωση της κλοζαπίνης δεν προσφέρει κάποια βελτίωση στην πλειονότητα των ασθενών. Από τα ανωτέρω συμπεραίνεται ότι με βάση τις διαφορετικές μεθόδους αποτίμησης της απόκρισης στην ασθένεια, και τις διαφορετικές δοσολογίες της κλοζαπίνης δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την συσχέτιση των επιπέδων της κλοζαπίνης στον ορό και της απόκρισης στη θεραπεία. Για το λόγο αυτό νέες μελέτες είναι απαραίτητες για τον καθορισμό των δοσολογιών και του θεραπευτικού εύρους των συγκεντρώσεων της κλοζαπίνης σε ασθενείς με ανθεκτική σχιζοφρένεια.

Ανακεφαλαιώνοντας, ο έλεγχος των επιπέδων της κλοζαπίνης θεωρήθηκε ως υψίστης σημασίας στη κλινική πράξη από την ομάδα του AGNP το 2017 [24], όμως, η δυνατότητα αυτή δεν είναι διαθέσιμη σε όλες τις κλινικές πρακτικές. Στην μελλοντική κλινική πράξη, η συνδυαστική χρήση των επιπέδων της κλοζαπίνης με έναν δείκτη δραστηριότητας του CYP1A2 ενδέχεται να υποστηρίξει τον κλινικό ψυχίατρο στην αύξηση ή την αλλαγή της δόσης της κλοζαπίνης σε μερικούς ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Η πρακτική αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους ασθενείς υπό το πρίσμα των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών της κλοζαπίνης σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1] **Organization. WH. The ICD- 10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. [Internet]. Geneva; 1992. Available from: <http://www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf>**
- 2] **Vita A, Barlati S, De Peri L, Deste G, Sacchetti E. Schizophrenia. Vol. 388, Lancet (London, England). England; 2016. p. 1280.**
- 3] **Hemager N, Plessen KJ, Thorup A, Christiani C, Ellersgaard D, Spang KS, et al. Assessment of Neurocognitive Functions in 7-Year-Old Children at Familial High Risk for Schizophrenia or Bipolar Disorder: The Danish High Risk and Resilience Study VIA 7. JAMA psychiatry. 2018 Aug;75(8):844–52.**
- 4] **Hadar R, Winter R, Edemann-Callesen H, Wieske F, Habelt B, Khadka N, et al. Prevention of schizophrenia deficits via non-invasive adolescent frontal cortex stimulation in rats. Mol Psychiatry. 2020 Apr;25(4):896–905.**
- 5] **He H, Liu Q, Li N, Guo L, Gao F, Bai L, et al. Trends in the incidence and DALYs of schizophrenia at the global, regional and national levels: results from the Global Burden of Disease Study 2017. Epidemiol Psychiatr Sci. 2020 Jan;29:e91.**
- 6] **Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet (London, England). 2018 Nov;392(10159):1859–1922.**
- 7] **McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. Epidemiol Rev. 2008;30(1):67–76.**
- 8] **Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess early mortality in schizophrenia. Annu Rev Clin Psychol. 2014;10:425–48.**
- 9] **U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health NI of MH. Schizophrenia [Internet]. Available from: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml>**
- 10] **Carbon M, Correll CU. Thinking and acting beyond the positive: The role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia. CNS Spectr. 2014;19(S1):38–52.**
- 11] **Howes OD, McCutcheon R, Agid O, De Bartolomeis A, Van Beveren NJM, Birnbaum ML, et al. Treatment-Resistant Schizophrenia: Treatment Response and Resistance in Psychosis (TRRIP) Working Group Consensus Guidelines on Diagnosis and Terminology. Am J Psychiatry. 2017;174(3):216–29.**
- 12] **Kerwin RW. Clozapine: back to the future for schizophrenia research. Lancet. 1995;345(8957):1063–64.**
- 13] **Hippius H. The history of clozapine. Psychopharmacology (Berl). 1989;(99):S3–5.**
- 14] **Dean L. CYP3A4 Genotypes Drug : Clozapine. 2016;(Md):1–12.**
- 15] **Idänpään-Heikkilä J, Alhava E, Olkinuora M, Palva IP. Agranulocytosis during treatment with chlozapine. Eur J Clin Pharmacol. 1977 Mar;11(3):193–98.**
- 16] **Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant**

- schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry*. 1988 Sep;45(9):789–96.
- 17] Tiihonen J, Mittendorfer-Rutz E, Majak M, Mehtälä J, Hoti F, Jedenius E, et al. Real-World Effectiveness of Antipsychotic Treatments in a Nationwide Cohort of 29 823 Patients With Schizophrenia. *JAMA Psychiatry [Internet]*. 2017 Jul 1;74(7):686–93. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.1322>
- 18] Hu RJ, Malhotra AK, Pickar D. Predicting Response to Clozapine. *CNS Drugs [Internet]*. 1999;11(4):317–26. Available from: <https://doi.org/10.2165/00023210-199911040-00007>
- 19] Meltzer HY, Bobo W V, Roy A, Jayathilake K, Chen Y, Ertugrul A, et al. A randomized, double-blind comparison of clozapine and high-dose olanzapine in treatment-resistant patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2008 Feb;69(2):274–85.
- 20] Masuda T, Misawa F, Takase M, Kane JM, Correll CU. Association With Hospitalization and All-Cause Discontinuation Among Patients With Schizophrenia on Clozapine vs Other Oral Second-Generation Antipsychotics: A Systematic Review and Meta-analysis of Cohort Studies. *JAMA Psychiatry [Internet]*. 2019 Oct 1;76(10):1052–62. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1702>
- 21] Forrester T, Siskind D, Winckel K, Wheeler A, Hollingworth S. Increasing Clozapine Dispensing Trends in Queensland, Australia 2004-2013. *Pharmacopsychiatry*. 2015;48(4–5):164–69.
- 22] Farooq S, Taylor M. Clozapine: dangerous orphan or neglected friend? *Br J Psychiatry [Internet]*. 2011 Apr 2 [cited 2020 Sep 18];198(4):247–49. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000254676/type/journal_article
- 23] Howes OD, Vergunst F, Gee S, McGuire P, Kapur S, Taylor D. Adherence to treatment guidelines in clinical practice: study of antipsychotic treatment prior to clozapine initiation. *Br J Psychiatry*. 2012 Dec;201(6):481–85.
- 24] Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*. 2018 Jan;51(1–02):9–62.
- 25] VanderZwaag C, McGee M, McEvoy JP, Freudenreich O, Wilson WH, Cooper TB. Response of patients with treatment-refractory schizophrenia to clozapine within three serum level ranges. *Am J Psychiatry*. 1996 Dec;153(12):1579–84.
- 26] Perry PJ, Miller DD, Arndt S V, Cadoret RJ. Clozapine and nortclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. 1991 Feb;148(2):231–35.
- 27] Hasegawa M, Gutierrez-Esteinou R, Way L, Meltzer HY. Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking. *J Clin Psychopharmacol*. 1993 Dec;13(6):383–90.
- 28] Xiang Y-Q, Zhang Z-J, Weng Y-Z, Zhai Y-M, Li W-B, Cai Z-J, et al. Serum concentrations of clozapine and nortclozapine in the prediction of relapse of patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2006 Apr;83(2–3):201–10.

- 29] Stieffenhofer V, Saglam H, Schmidtmann I, Silver H, Hiemke C, Konrad A. Clozapine plasma level monitoring for prediction of rehospitalization schizophrenic outpatients. *Pharmacopsychiatry*. 2011 Mar;44(2):55–59.
- 30] Yusufi B, Mukherjee S, Flanagan R, Paton C, Dunn G, Page E, et al. Prevalence and nature of side effects during clozapine maintenance treatment and the relationship with clozapine dose and plasma concentration. *Int Clin Psychopharmacol*. 2007 Jul;22(4):238–43.
- 31] Clozapine. In Bethesda (MD); 2012.
- 32] Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, Llerena A, Alm C, Bondesson U, et al. Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol*. 1994 Nov;38(5):471–73.
- 33] Olesen O V, Linnet K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. *J Clin Pharmacol*. 2001 Aug;41(8):823–32.
- 34] Roos PH, Jakubowski N. Cytochrome p450. Vol. 392, Analytical and bioanalytical chemistry. Germany; 2008. p. 1015–17.
- 35] Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, La Du BN, Mitoma C, et al. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* (80-). 1955 Apr;121(3147):603–4.
- 36] Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1958 Jun;75(2):376–86.
- 37] Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2018;19(1):38–54.
- 38] Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Olf CRW. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Biomed Res*. 1998;1129–65.
- 39] Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. *IARC Sci Publ*. 1999;(148):173–95.
- 40] Ren J, Chen GG, Liu Y, Su X, Hu B, Leung BCS, et al. Cytochrome P450 1A2 Metabolizes 17 β -Estradiol to Suppress Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153863.
- 41] He X, Feng S. Role of Metabolic Enzymes P450 (CYP) on Activating Procarcinogen and their Polymorphisms on the Risk of Cancers. *Curr Drug Metab*. 2015;16(10):850–63.
- 42] Hollenberg PF, Kent UM, Bumpus NN. Mechanism-based inactivation of human cytochromes p450s: experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):189–205.
- 43] Ayari I, Fedeli U, Saguem S, Hidar S, Khlifi S, Pavanello S. Role of CYP1A2 polymorphisms in breast cancer risk in women. *Mol Med Rep*. 2013 Jan;7(1):280–86.
- 44] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul;270(1):414–23.
- 45] Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, et al. Pan-fried

- meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Res.* 1994 Dec;54(23):6154–59.
- 46] Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 1994 Jan;54(1):101–8.
- 47] Kot M, Daniel WA. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochem Pharmacol.* 2008 Aug;76(4):543–51.
- 48] Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: Why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(3):125–34.
- 49] Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP, Shimada T. Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol.* 1998 Jun;11(6):659–65.
- 50] Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, et al. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics.* 1992 Jun;2(3):116–27.
- 51] Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, et al. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol.* 1994 Dec;3(8):675–82.
- 52] Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol.* 1994;3(5):413–21.
- 53] Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 1999 Apr;47(4):445–49.
- 54] Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M, et al. Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: the case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep;207(2 Suppl):43–51.
- 55] Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 1998 Nov;35(5):361–90.
- 56] Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomed Chromatogr.* 2007 Feb;21(2):190–200.
- 57] Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, et al. Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology.* 1999 Jul;117(1):89–98.

- 58] Eagles SK, Gross AS, McLachlan AJ. The Effects of Cruciferous Vegetable-Enriched Diets on Drug Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis of Dietary Intervention Trials in Humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2020 Aug;108(2):212–27.
- 59] Pawelczyk T, Kłoszewska I. [Grapefruit juice interactions with psychotropic drugs: advantages and potential risk]. *Przegl Lek.* 2008;65(2):92–95.
- 60] Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney R V. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics.* 1997 Feb;7(1):11–19.
- 61] Chang S-Y, Chen C, Yang Z, Rodrigues AD. Further assessment of 17alpha-ethinyl estradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2009 Aug;37(8):1667–75.
- 62] Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA, et al. Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol.* 1999 Sep;39(9):936–40.
- 63] Asproдини E, Tsiokou V, Begas E, Kilindris T, Kouvaras E, Samara M, et al. Alterations in Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Activities across Menstrual Cycle in Healthy Volunteers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Feb;368(2):262–71.
- 64] Tsiokou V, Kilindris T, Begas E, Kouvaras E, Kouretas D, Asproдини EK. Altered activity of xenobiotic detoxifying enzymes at menopause - A cross-sectional study. *Environ Res.* 2020 Mar;182:109074.
- 65] Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin M V, Guengerich FP, Aklillu E, et al. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 May;16(5):359–67.
- 66] Pharmacogene Variation Consortium [Internet]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>
- 67] Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem.* 1999 Apr;125(4):803–8.
- 68] Sim SC. CYP1A2*1E [corrected] contains the -163C>A substitution and is highly inducible. Vol. 23, *Pharmacogenetics and genomics.* United States; 2013. p. 104–5.
- 69] Tao L, Xiang Y-B, Chan KK, Wang R, Gao Y-T, Yu MC, et al. Cytochrome P4501A2 phenotype and bladder cancer risk: The Shanghai bladder cancer study. *Int J cancer.* 2012 Mar;130(5):1174–83.
- 70] Bu Z-B, Ye M, Cheng Y, Wu W-Z. Four polymorphisms in the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and lung cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(14):5673–79.
- 71] Seow A, Zhao B, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P, et al. Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) activity and lung cancer risk: a preliminary study among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis.* 2001 Apr;22(4):673–77.
- 72] Vistisen K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, et al. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis.* 2004 Jun;25(6):923–29.
- 73] Elfaki I, Mir R, Almutairi FM, Duhier FMA. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018

Aug;19(8):2057–70.

- 74] Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I, Benakis A. Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1998;23(4):501–6.
- 75] Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmüller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet.* 1995 Sep;57(3):581–92.
- 76] Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1983 May;33(5):591–602.
- 77] Hakooz NMK. Caffeine metabolic ratios for the in vivo evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, xanthine oxidase and CYP2A6 enzymatic activities. *Curr Drug Metab.* 2009 May;10(4):329–38.
- 78] Begas E, Bounitsi M, Kilindris T, Kouvaras E, Makaritsis K, Kouretas D, et al. Effects of short-term saffron (*Crocus sativus* L.) intake on the in vivo activities of xenobiotic metabolizing enzymes in healthy volunteers. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2019 Aug;130:32–43.
- 79] Begas E, Kilindris T, Kouvaras E, Tsioutsioumi A, Kouretas D, Asproдини EK. Dietary effects of *Sideritis scardica* “mountain tea” on human in vivo activities of xenobiotic metabolizing enzymes in healthy subjects. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2018 Dec;122:38–48.
- 80] Begas E, Tsioutsouliti A, Kouvaras E, Haroutounian SA, Kasiotis KM, Kouretas D, et al. Effects of peppermint tea consumption on the activities of CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase, N-acetyltransferase-2 and UDP-glucuronosyltransferases-1A1/1A6 in healthy volunteers. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2017 Feb;100:80–89.
- 81] Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):7696–7700.
- 82] Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, Tang BK. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics.* 1992 Apr;2(2):73–77.
- 83] Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):384–411.
- 84] Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(200):33–91.
- 85] Begas E, Kouvaras E, Tsakalof AK, Bounitsi M, Asproдини EK. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomed Chromatogr.* 2015 Nov;29(11):1657–63.
- 86] Wong P, Villeneuve G, Tessier V, Banerjee K, Nedev H, Jean-Claude BJ, et al. Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine. *J Pharm Biomed Anal.* 2002 May;28(3–4):693–700.
- 87] Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for

- schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1987;13(2):261–76.
- 88] Η. Μπέγας, Κ. Φάκα, Α. Τσακάλωφ ΕΚ και ΕΑ. Προσδιορισμός του αντιψυχωσικού φαρμάκου κλοζαπίνη στον ορό ασθενών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και ανίχνευση στο υπεριώδες. In: 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας. Αθήνα; 2014.
- 89] Steyerberg EW. *Clinical Prediction Models.* New York, NY: Springer - Verlag; 2009.
- 90] Xu S. Predicted Residual Error Sum of Squares of Mixed Models: An Application for Genomic Prediction. *G3 (Bethesda).* 2017 Mar;7(3):895–909.
- 91] Allen DM. The Relationship Between Variable Selection and Data Augmentation and a Method for Prediction. *TECHNOMETRICS.* 1974;(16):125–27.
- 92] Austin PC, Steyerberg EW. The number of subjects per variable required in linear regression analyses. *J Clin Epidemiol.* 2015 Jun;68(6):627–36.
- 93] Zaigler M, Tantcheva-Poór I, Fuhr U. Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000 Jan;38(1):1–9.
- 94] Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics.* 1996 Apr;6(2):121–49.
- 95] Ekström J, Godoy T, Riva A. Clozapine: agonistic and antagonistic salivary secretory actions. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):276–80.
- 96] Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker WW, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age. *Psychopharmacology (Berl).* 1989;99 Suppl:S38-40.
- 97] Lane HY, Chang YC, Chang WH, Lin SK, Tseng YT, Jann MW. Effects of gender and age on plasma levels of clozapine and its metabolites: analyzed by critical statistics. *J Clin Psychiatry.* 1999 Jan;60(1):36–40.
- 98] Khan AY, Preskorn SH. Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiatr Pract.* 2005 Sep;11(5):289–301.
- 99] Couchman L, Morgan PE, Spencer EP, Flanagan RJ. Plasma clozapine, norclozapine, and the clozapine:norclozapine ratio in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1993-2007. *Ther Drug Monit.* 2010 Aug;32(4):438–47.
- 100] Rostami-Hodjegan A, Amin AM, Spencer EP, Lennard MS, Tucker GT, Flanagan RJ. Influence of dose, cigarette smoking, age, sex, and metabolic activity on plasma clozapine concentrations: a predictive model and nomograms to aid clozapine dose adjustment and to assess compliance in individual patients. *J Clin Psychopharmacol.* 2004 Feb;24(1):70–78.
- 101] Jann MW, Liu H-C, Wei F-C, Lin S-K, Lin S-K, Hu W-H, et al. Gender differences in plasma clozapine levels and its metabolites in schizophrenic patients. *Hum Psychopharmacol Clin Exp [Internet].* 1997 Sep 1;12(5):489–95. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1077\(199709/10\)12:5%3C489::AID-HUP911%3E3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1077(199709/10)12:5%3C489::AID-HUP911%3E3.0.CO)
- 102] Anderson SG, Livingston M, Couchman L, Smith DJ, Connolly M, Miller J, et al. Sex differences in plasma clozapine and norclozapine concentrations in clinical practice

- and in relation to body mass index and plasma glucose concentrations: a retrospective survey. *Ann Gen Psychiatry*. 2015;14:39.
- 103] Chetty M, Murray M. CYP-Mediated Clozapine Interactions: How Predictable Are They? *Curr Drug Metab*. 2007;8(4):307–13.
- 104] Tantcheva-Poór I, Zaigler M, Rietbrock S, Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics*. 1999 Apr;9(2):131–44.
- 105] Faber MS, Fuhr U. Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Aug;76(2):178–84.
- 106] Lowe EJ, Ackman ML. Impact of tobacco smoking cessation on stable clozapine or olanzapine treatment. *Ann Pharmacother*. 2010 Apr;44(4):727–32.
- 107] Chui CY, Taylor SE, Thomas D, George J. Prevalence and recognition of highly significant medication-smoking cessation interactions in a smoke-free hospital. *Drug Alcohol Depend*. 2019 Jul;200:78–81.
- 108] Andersson T. Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole. *Clin Pharmacokinet*. 1996 Jul;31(1):9–28.
- 109] Kennedy WK, Jann MW, Kutscher EC. Clinically significant drug interactions with atypical antipsychotics. *CNS Drugs*. 2013 Dec;27(12):1021–48.
- 110] Tiihonen J, Variainen H HP. Carbamazepine-induced changes in plasma levels of neuroleptics. *Pharmacopsychiatry*. 1995;(28):26–28.
- 111] Lane HY, Su KP, Chang WH, Jann MW. Elevated plasma clozapine concentrations after phenobarbital discontinuation. Vol. 59, *The Journal of clinical psychiatry*. United States; 1998. p. 131–33.
- 112] Joos AA, Frank UG, Kaschka WP. Pharmacokinetic interaction of clozapine and rifampicin in a forensic patient with an atypical mycobacterial infection. Vol. 18, *Journal of clinical psychopharmacology*. United States; 1998. p. 83–85.
- 113] Hägg S, Spigset O, Mjörndal T, Dahlqvist R. Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2000 Jan;49(1):59–63.
- 114] Hiemke C, Weigmann H, Härtter S, Dahmen N, Wetzel H, Müller H. Elevated levels of clozapine in serum after addition of fluvoxamine. Vol. 14, *Journal of clinical psychopharmacology*. United States; 1994. p. 279–81.
- 115] Silver H, Kushnir M, Kaplan A. Fluvoxamine augmentation in clozapine-resistant schizophrenia: an open pilot study. *Biol Psychiatry*. 1996 Oct;40(7):671–74.
- 116] Szegedi A, Anghelescu I, Wiesner J, Schlegel S, Weigmann H, Härtter S, et al. Addition of low-dose fluvoxamine to low-dose clozapine monotherapy in schizophrenia: drug monitoring and tolerability data from a prospective clinical trial. *Pharmacopsychiatry*. 1999 Jul;32(4):148–53.
- 117] Kuo FJ, Lane HY, Chang WH. Extrapyramidal symptoms after addition of fluvoxamine to clozapine. Vol. 18, *Journal of clinical psychopharmacology*. United States; 1998. p. 483–84.
- 118] Lu ML, Lane HY, Chen KP, Jann MW, Su MH, Chang WH. Fluvoxamine reduces the clozapine dosage needed in refractory schizophrenic patients. *J Clin Psychiatry*. 2000

Aug;61(8):594–99.

- 119] Markowitz JS, Gill HS, Devane CL, Mintzer JE. Fluoroquinolone inhibition of clozapine metabolism. Vol. 154, *The American journal of psychiatry*. United States; 1997. p. 881.
- 120] Raaska K, Neuvonen PJ. Ciprofloxacin increases serum clozapine and N-desmethylclozapine: a study in patients with schizophrenia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000 Nov;56(8):585–89.
- 121] Brouwers EEM, Söhne M, Kuipers S, van Gorp ECM, Schellens JHM, Koks CHW, et al. Ciprofloxacin strongly inhibits clozapine metabolism: two case reports. *Clin Drug Investig*. 2009;29(1):59–63.
- 122] Meyer JM, Proctor G, Cummings MA, Dardashti LJ, Stahl SM. Ciprofloxacin and Clozapine: A Potentially Fatal but Underappreciated Interaction. *Case Rep Psychiatry*. 2016;2016:5606098.
- 123] Hoehns JD, Fouts MM, Kelly MW, Tu KB. Sudden cardiac death with clozapine and sertraline combination. *Ann Pharmacother*. 2001;35(7–8):862–66.
- 124] Trenton A, Currier G, Zwemer F. Fatalities associated with therapeutic use and overdose of atypical antipsychotics. *CNS Drugs*. 2003;17(5):307–24.
- 125] Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G. Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr Drug Metab*. 2008 Jun;9(5):410–18.
- 126] Meltzer HY. Clozapine: Balancing safety with superior antipsychotic efficacy. *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2012;6(3):134–44.
- 127] Spina E, Hiemke C, de Leon J. Assessing drug-drug interactions through therapeutic drug monitoring when administering oral second-generation antipsychotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(4):407–22.
- 128] Centorrino F, Baldessarini RJ, Kando J, Frankenburg FR, Volpicelli SA, Puopolo PR, et al. Serum concentrations of clozapine and its major metabolites: effects of cotreatment with fluoxetine or valproate. *Am J Psychiatry*. 1994 Jan;151(1):123–25.
- 129] Finley P, Warner D. Potential impact of valproic acid therapy on clozapine disposition. *Biol Psychiatry*. 1994 Oct;36(7):487–88.
- 130] Costello LE, Suppes T. A clinically significant interaction between clozapine and valproate. Vol. 15, *Journal of clinical psychopharmacology*. United States; 1995. p. 139–41.
- 131] Longo LP, Salzman C. Valproic acid effects on serum concentrations of clozapine and norclozapine. Vol. 152, *The American journal of psychiatry*. United States; 1995. p. 650.
- 132] Facciola G, Avenoso A, Scordo MG, Madia AG, Ventimiglia A, Perucca E, et al. Small effects of valproic acid on the plasma concentrations of clozapine and its major metabolites in patients with schizophrenic or affective disorders. *Ther Drug Monit*. 1999 Jun;21(3):341–45.
- 133] Spina E, de Leon J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Jan;100(1):4–22.
- 134] Diaz FJ, Santoro V, Spina E, Cogollo M, Rivera TE, Botts S, et al. Estimating the size

- of the effects of co-medications on plasma clozapine concentrations using a model that controls for clozapine doses and confounding variables. *Pharmacopsychiatry*. 2008 May;41(3):81–91.
- 135] Besag FMC, Berry D. Interactions between antiepileptic and antipsychotic drugs. *Drug Saf*. 2006;29(2):95–118.
- 136] Spina E, Perucca E. Clinical significance of pharmacokinetic interactions between antiepileptic and psychotropic drugs. *Epilepsia*. 2002;43 Suppl 2:37–44.
- 137] Wen X, Wang JS, Kivistö KT, Neuvonen PJ, Backman JT. In vitro evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P450 isoforms: preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Nov;52(5):547–53.
- 138] Cervený L, Svecová L, Anzenbacherová E, Vrzał R, Staud F, Dvorak Z, et al. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos*. 2007 Jul;35(7):1032–41.
- 139] Koreen AR, Lieberman JA, Kronig M, Cooper TB. Cross-tapering clozapine and risperidone. Vol. 152, *The American journal of psychiatry*. United States; 1995. p. 1690.
- 140] Tyson SC, Devane CL, Risch SC. Pharmacokinetic interaction between risperidone and clozapine. Vol. 152, *The American journal of psychiatry*. United States; 1995. p. 1401–2.
- 141] Henderson DC, Goff DC. Risperidone as an adjunct to clozapine therapy in chronic schizophrenics. *J Clin Psychiatry*. 1996 Sep;57(9):395–97.
- 142] Raaska K, Raitasuo V, Neuvonen PJ. Therapeutic drug monitoring data: risperidone does not increase serum clozapine concentration. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002 Dec;58(9):587–91.
- 143] Dettling M, Sachse C, Brockmüller J, Schley J, Müller-Oerlinghausen B, Pickersgill I, et al. Long-term therapeutic drug monitoring of clozapine and metabolites in psychiatric in- and outpatients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Sep;152(1):80–86.
- 144] Lee S-T, Ryu S, Nam HJ, Lee S-Y, Hong KS. Determination of pharmacokinetic properties of clozapine and norclozapine in Korean schizophrenia patients. *Int Clin Psychopharmacol*. 2009 May;24(3):139–44.