



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ
ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΛΕΒΕΤΙΡΑΚΕΤΑΜΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ»

ΠΗΝΕΛΟΠΗ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
AND BIOTECHNOLOGY
MASTER PROGRAM IN
«TOXICOLOGY»



MASTER THESIS

“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR THE
THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF LEVETIRACETAM IN HUMAN
BLOOD SERUM”

PINELOPI ANTONIOU

LARISSA 2021

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Ευτυχία Ασπροδίνη (επιβλέπουσα), Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας
2. Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Ηλίας Μπέγας, Δόκτωρ Φαρμακολογίας, μέλος ΕΤΕΠ Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Επιληψία	10
1.1.1. Γενικά	10
1.1.2. Ορισμοί	10
1.1.3. Ταξινόμηση	12
1.1.4. Αιτιολογία της νόσου	14
1.1.5. Συμπτωματολογία της νόσου	15
1.1.6. Θεραπευτική αγωγή	16
1.1.7. Βιοχημική ανάλυση - Μηχανισμοί επιληπτογένεσης (έναρξης επιληψίας) ...	17
1.2. Αντιεπιληπτικά Φάρμακα (AEDs)	18
1.2.1. Γενικά	18
1.2.2. Μηχανισμοί δράσης AEDs	21
1.3. Λεβετιρακετάμη - Levetiracetam	22
1.3.1. Γενικά	22
1.3.2. Φαρμακοκινητική	23
1.3.3. Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα	24
1.3.4. Ανεπιθύμητες ενέργειες	24
1.3.5. Εγκυμοσύνη	24
1.3.6. Δοσολογία	25
1.3.7. Ο ρόλος της LEV στην θεραπεία της επιληψίας	25
1.3.8. Μηχανισμός Δράσης LEV	26
1.4. Παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων – Therapeutic Drug Monitoring, TDM ...	27
1.4.1. Παρακολούθηση επιπέδων LEV	29
1.5. Χρωματογραφία	35
1.5.1. Γενικά	35
1.5.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography - HPLC)	37
1.5.3. Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC	41
1.5.4. Εφαρμογές της HPLC στην Κλινική Ανάλυση :.....	43
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45

2.1.	Χημικές ενώσεις και αντιδραστήρια	45
2.2.	Εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες.....	45
2.2.1.	Συσκευές.....	45
2.2.2.	Χρωματογραφικές Συνθήκες.....	46
2.3.	Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων.....	46
2.4.	Προκατεργασία δειγμάτων ορού.....	46
2.5.	Πιστοποίηση της μεθόδου	47
2.6.	Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης και εύρος ανάλυσης.....	47
2.7.	Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα.....	48
2.8.	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD).....	48
2.9.	Σταθερότητα δειγμάτων – Stability.....	49
2.10.	Δείγματα ασθενών	49
2.11.	Στατιστική ανάλυση.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		50
3.1.	Επιλογή κινητής φάσης.....	50
3.2.	Επιλογή εσωτερικού προτύπου	50
3.3.	Επιλογή μήκους κύματος.....	50
3.4.	Πιστοποίηση της μεθόδου	50
3.4.1.	Ειδικότητα	50
3.4.2.	Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης.....	56
3.4.3.	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου.....	58
3.4.4.	Ανάκτηση	59
3.4.5.	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD).....	59
3.4.6.	Έλεγχος καταλοίπων (carry-over)	59
3.4.7.	Σταθερότητα των δειγμάτων.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ		62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΠΗΓΕΣ.....		66

Συντομογραφίες

ΕΠ → Εσωτερικό Πρότυπο

AEDs → Antiepileptic Drugs, Αντιεπιληπτικά Φάρμακα

TDM → Therapeutic Drug Monitoring

LEV → Levetiracetam - Λεβετιρακετάμη

FDA → Food & Drug Administration - Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων & Φαρμάκων

EMA → European Medicine Agency - Ευρωπαϊκή Ένωση Φαρμάκων

ILAE → International League Against Epilepsy - Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας

IBE → International Bureau of Epilepsy - Διεθνές Γραφείο Επιληψίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ευτυχίας Ασπροδίνη, στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας «Τοξικολογία», κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ευτυχία Ασπροδίνη, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και την δυνατότητα ενασχόλησης με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα καθώς και για την καθοδήγηση της για την διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα απευθύνω στο μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Ηλία Μπέγα, για την βοήθεια και τον χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μεταλαμπάδευσε, προκειμένου αυτή η εργασία να φθάσει στο πέρας της με επιτυχία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω του υπόλοιπους φοιτητές του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την όμορφη παρέα και το ευχάριστο κλίμα κατά την παρουσία μου στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος για αυτό και τους αφιερώνω αυτή την διπλωματική εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεβετιρακετάμη αποτελεί αντιεπιληπτικό φάρμακο τρίτης γενιάς με άγνωστο μηχανισμό δράσης. Χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της επιληψίας είτε ως μονοθεραπεία, είτε συνδυαστικά με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, ενώ αναφέρεται ότι μπορεί να έχει θετική επίδραση και σε ψυχικές διαταραχές. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά την φαρμακοκινητική της δράση και τις αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα, κυρίως αντιεπιληπτικά.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για την παρακολούθηση των επιπέδων λεβετιρακετάμης σε ανθρώπινο ορό αίματος. Για τον ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε λυοφιλοποιημένος ανθρώπινος ορός αίματος. Τα πρότυπα ορού υπέστησαν απλή κατακρήμνιση πρωτεϊνών με μεθανόλη. Η έκλυση του φαρμάκου παρατηρήθηκε στα $17,17 \pm 0,22$ min, με στήλη C_{18} ανάστροφης φάσης και κινητή φάση ρυθμιστικού διαλύματος 25mM NaH_2PO_4 (H_2O)/ CH_3CN (955/45, v/v, pH= 4,5), διανεμημένης ισοκρατικά (1,2mL/min, 40°C). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 205nm. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης 0,9986 σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5-100,0 $\mu g/mL$. Το εύρος ανάκτησης ήταν 99,40 – 95,83% και το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) ήταν 2,5 $\mu g/mL$. Σημαντικό επίτευγμα της μεθόδου είναι ότι δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές μεταξύ της λεβετιρακετάμης και του εσωτερικού προτύπου, της 1-μεθυλοξανθίνης. Επιπλέον, ελέγχθηκαν για τυχόν αλληλεπιδράσεις με την λεβετιρακετάμη πάνω από 70 συγχορηγούμενα φάρμακα.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μια γρήγορη, εύκολη και χαμηλού κόστους χρωματογραφική μέθοδος HPLC-UV με την απαιτούμενη ευαισθησία και ειδικότητα για την παρακολούθηση των επιπέδων λεβετιρακετάμης σε ανθρώπινο ορό αίματος. Το φαρμακοκινητικό προφίλ της λεβετιρακετάμης και η απουσία αλληλεπιδράσεων με άλλα αντιεπιληπτικά, αντιψυχωσικά και άλλα συγχορηγούμενα φάρμακα καθιστά τη μέθοδο εξαιρετικό εργαλείο στην κλινική πράξη, για εξατομικευμένη και μη θεραπεία καθώς και για αποφυγή τοξικότητας.

Λέξεις κλειδιά: λεβετιρακετάμη, μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, επιληψία, αντιεπιληπτικά φάρμακα, έλεγχος επιπέδων φαρμάκων, ψυχικές διαταραχές

ABSTRACT

Levetiracetam is a third generation antiepileptic drug used in the treatment of epilepsy either as a monotherapy or in combination with other antiepileptic drugs. It has also been shown to have a positive effect on psychological disorders. The exact mechanism of action of levetiracetam is unknown; however, it seems that the drug displays a quite favorable therapeutic profile. There have been several studies on the pharmacokinetics properties of levetiracetam and its interaction with other drugs, particularly anticonvulsants.

The aim of the present study was to develop an easy, fast and low-cost high performance liquid chromatographic method, HPLC-UV, with the required sensitivity and specificity for monitoring the levels of levetiracetam in human blood serum. In addition, lyophilized human blood serum was used for quality control. Both samples were prepared by a single protein precipitation step with methanol. Chromatographic elution of levetiracetam was achieved at $17,17 \pm 0,22$ min on a reversed-phase C_{18} column using mobile phase composed of 25 mM NaH_2PO_4 (H_2O)/ CH_3CN (955/45, v/v, pH= 4,5), delivered isocratically at 1,2mL/min and 40°C). The detector was set at 205nm.

The calibration curve was linear with regression coefficient 0.9986 over the range 2.5-100.0 $\mu\text{g/mL}$. The recovery ranged from 99.40-95.83% and the limit of quantification was 2.5 $\mu\text{g/mL}$. An important achievement of the method is that no interferences were observed between levetiracetam and the internal standard, 1-methylxanthine. In addition, more than 70 co-administered drugs were tested for interactions with levetiracetam.

In conclusion, a simple, rapid, sensitive and low-cost chromatographic method was developed for the quantification of levetiracetam in human blood serum. The pharmacokinetic profile of levetiracetam and the lack of interactions with other antiepileptic, antipsychotic and other concomitantly administered drugs render the method an excellent tool in clinical practice, for the therapeutic drug monitoring and avoidance of toxicity, thus, exhibiting improved toxicity profile.

Keywords: levetiracetam, high-performance liquid chromatography, epilepsy, antiepileptic drugs, therapeutic drug monitoring, psychological disorders

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Επιληψία

1.1.1. Γενικά

Η επιληψία είναι μια χρόνια μη μεταδοτική ασθένεια του εγκεφάλου που προσβάλλει περίπου 50 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Αποτελεί την πιο συχνή νευρολογική διαταραχή παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες κρίσεις, που είναι σύντομα επεισόδια ακούσιας κίνησης που μπορεί να περιλαμβάνουν μέρος του σώματος (μερικές) ή ολόκληρο το σώμα (γενικευμένες) και ενίοτε συνοδεύονται από απώλεια συνείδησης και ελέγχου της λειτουργίας του εντέρου ή της ουροδόχου κύστης (Mbuba *et al.*, 2008; Beghi *et al.*, 2015; Beghi, 2020).

Τα επιληπτικά επεισόδια είναι αποτέλεσμα υπέρμετρων ηλεκτρικών εκφορτίσεων μιας ομάδας εγκεφαλικών κυττάρων. Οι επιληπτικές κρίσεις μπορεί να ποικίλλουν από σύντομη απώλεια προσοχής ή μυϊκές συσπάσεις έως σοβαρούς και παρατεταμένους σπασμούς. Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν επίσης να ποικίλουν σε συχνότητα, από λιγότερο από μια ανά έτος έως αρκετές ανά ημέρα. Η εμφάνιση μιας κρίσης δεν υποδηλώνει επιληψία καθώς υπολογίζεται ότι έως και το 10% των ανθρώπων παγκοσμίως μπορούν να εμφανίσουν μία κρίση κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Beghi, 2020).

Η επιληψία ορίζεται ως η ύπαρξη δύο ή περισσότερων απρόκλητων επιληπτικών κρίσεων και είναι μια κοινή χρόνια διαταραχή που απαιτεί μακροχρόνια θεραπεία με αντιεπιληπτικά φάρμακα (Abou-Khalil, 2008). Η επιληψία είναι μια από τις παλαιότερες ασθένειες στον κόσμο, με γραπτά αρχεία που χρονολογούνται από το 4000 π.Χ. Ο φόβος, η παρεξήγηση, οι διακρίσεις και το κοινωνικό στίγμα περιβάλλουν την επιληψία για αιώνες. Αυτό το στίγμα συνεχίζεται σήμερα σε πολλές χώρες και μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα ζωής των ατόμων με την ασθένεια και τις οικογένειές τους (Mbuba *et al.*, 2008; Beghi, 2020).

1.1.2. Ορισμοί

Ο όρος «επιληψία» προέρχεται από το ελληνικό ρήμα «επιλαμβάνομαι» δηλαδή «παίρνω υπό τον έλεγχο μου». Σύμφωνα με τις αντιλήψεις της αρχαιότητας, η επιληψία περιγράφεται ως η κατάληψη του ανθρώπινου σώματος από δαίμονες (θεϊκές οντότητες) και έτσι προκύπτει και η ονομασία «Ιερά Νόσος» από τον Ιπποκράτη.

Αντίστοιχα, και ο όρος επιληπτική κρίση (seizure) προέρχεται από την Ελλάδα δηλαδή «να κρατήσει». Η σύγχρονη ορολογία χρησιμοποιεί τη λέξη για οποιοδήποτε ξαφνικό και σοβαρό συμβάν όπως για παράδειγμα καρδιακό επεισόδιο (heart seizure) (Beghi *et al.*, 2015).

Το 2005, η Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας (ILAE: International League Against Epilepsy) και το Διεθνές Γραφείο Επιληψίας (IBE: International Bureau for Epilepsy) όρισαν την σημασία της επιληπτικής κρίσης και της επιληψίας (Fisher *et al.*, 2005):

- Επιληπτική κρίση (epileptic seizure) ορίζεται μια παροδική εμφάνιση σημείων ή/και συμπτωμάτων λόγω υπερβολικής ή/και σύγχρονης νευρωνικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο.
- Επιληψία (epilepsy) ορίζεται ως μια διαταραχή του εγκεφάλου που χαρακτηρίζεται από μια διαρκή προδιάθεση για τη δημιουργία επιληπτικών κρίσεων με τις νευροβιολογικές, γνωστικές, ψυχολογικές και κοινωνικές συνέπειες του ασθενούς. Η διάγνωση της επιληψίας προϋποθέτει τουλάχιστον ένα επεισόδιο επιληπτικής κρίσης.

Το 2014, η ILAE επαναπροσδιόρισε την επιληψία ως ασθένεια και όχι ως διαταραχή για να τονίσει τη σημασία και τον αντίκτυπο της επιληψίας, σε μια προσπάθεια να συμπεριληφθούν ειδικές καταστάσεις ασθενών. Η επιληψία συμβαίνει όταν ένα άτομο έχει επιληπτική κρίση και ο εγκέφαλός του δείχνει μια παθολογική και διαρκή τάση να υποτροπιάζει (Pack, 2019).

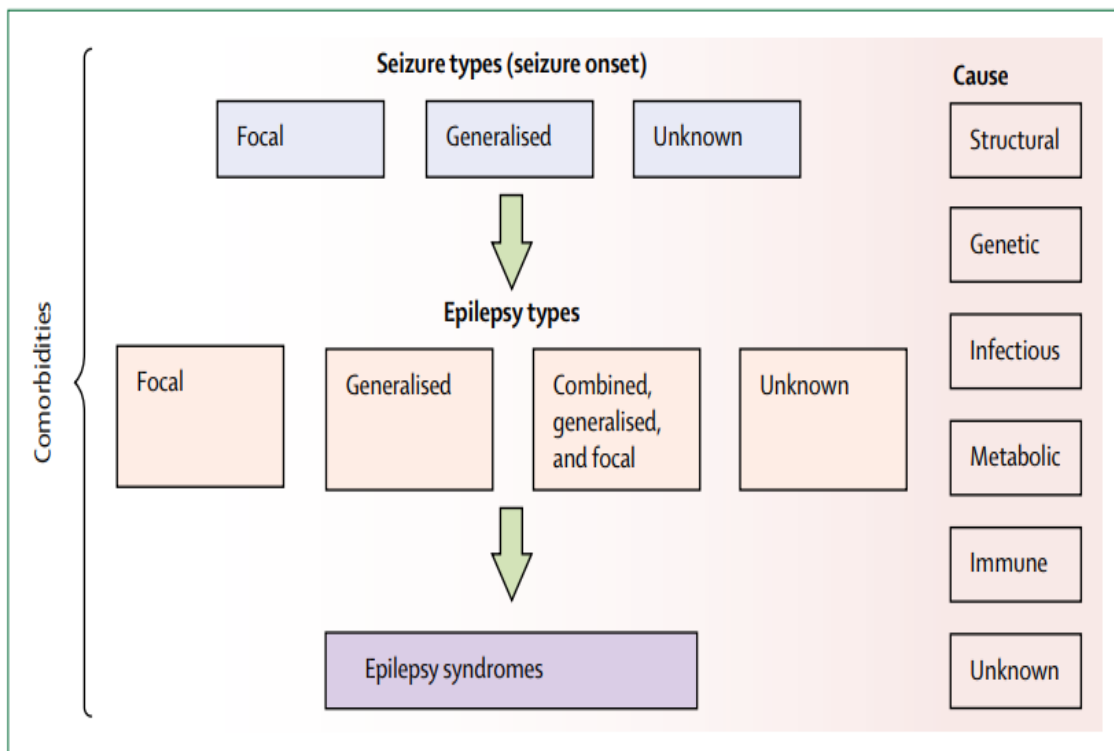
Έτσι, ο ορισμός της επιληψίας αλλάζει και ορίζεται ως μια εγκεφαλική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από (Fisher *et al.*, 2014):

1. Δύο ή περισσότερες μη προκλητές επιληπτικές κρίσεις που συμβαίνουν με χρονική διαφορά μεγαλύτερη από 24 ώρες η μία από την άλλη.
2. Μια μη προκλητή επιληπτική κρίση που συνοδεύεται από υψηλή πιθανότητα περαιτέρω κρίσεων μέσα στα επόμενα δέκα χρόνια. Η πιθανότητα πρέπει να είναι όση ο κίνδυνος επανεμφάνισης κρίσεων μετά από δύο μη προκλητές επιληπτικές κρίσεις.
3. Ήδη διαγνωσμένο επιληπτικό σύνδρομο.

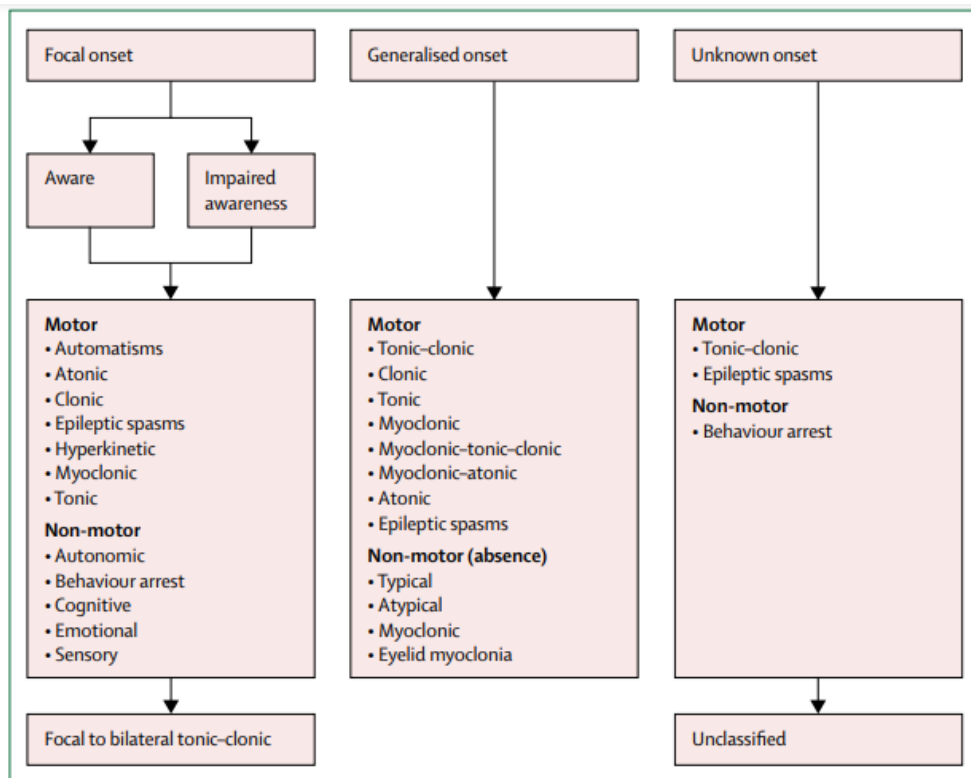
1.1.3. Ταξινόμηση

Τα άτομα που πάσχουν από επιληψία παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενα επεισόδια κάποιου τύπου επιληψίας. Ιστορικά έχουν γίνει πολλές προσπάθειες και έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες όσον αφορά την κατηγοριοποίηση των τύπων επιληψίας (Pack, 2019).

Η ταξινόμηση των επιληπτικών κρίσεων, της επιληψίας και των συνδρόμων επιληψίας δημιουργεί ένα πλαίσιο για κλινικούς ερευνητές, για ασθενείς και τις οικογένειές τους. Αυτή η ταξινόμηση έχει εξελιχθεί με την πάροδο των ετών και το 2017 η ILAE δημοσίευσε μια λειτουργική ταξινόμηση των επιληπτικών κρίσεων και των επιλησιών. Η κατανόηση αυτής της ταξινόμησης είναι σημαντική στη διάγνωση, τη θεραπεία και την κατανόηση των επιληπτικών κρίσεων και της επιληψίας, συμπεριλαμβανομένης και της συχνότητας της επιληψίας (Εικόνα 1, Εικόνα 2) (Pack, 2019).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση τύπων επιληψίας σύμφωνα με την International League Against Epilepsy (Ανατύπωση από Pack, 2019).



Εικόνα 2: Ταξινόμηση τύπων επιληπτικών κρίσεων σύμφωνα με τον International League Against Epilepsy (Ανατύπωση από Pack, 2019).

Η ταξινόμηση κάθε τύπου επιληψίας και επιληπτικών κρίσεων εξαρτάται από την εντόπιση της προσβεβλημένης περιοχής του εγκεφάλου και από το βαθμό εξάπλωσης της ηλεκτρικής δραστηριότητας σε άλλους νευρώνες (Εικόνα 1).

Μια γενική κατηγοριοποίηση είναι η εξής:

1. **Εστιακή επιληπτική κρίση (focal onset seizure):** η προσβεβλημένη περιοχή του εγκεφάλου εστιάζεται σε μια περιοχή του ενός ημισφαιρίου. Οι εστιακές επιληπτικές κρίσεις διακρίνονται σε αυτές κατά τις οποίες ο ασθενής διατηρεί τις αισθήσεις του κατά την διάρκεια του επεισοδίου (aware focal onset seizures) και σε αυτές στις οποίες συνυπάρχουν διαταραχές του επιπέδου συνείδησης (impaired awareness focal onset seizures).

Οι εστιακής έναρξης επιληπτικές κρίσεις διακρίνονται ως:

- Κινητικές (motor focal onset seizures): τονικές, κλονικές, ατονικές, μυοκλονικές, αυτοματισμοί, επιληπτικοί σπασμοί, υπερκινητικότητα
- Μη κινητικές (non motor focal onset seizures): αυτόνομες, γνωστικές, συναισθηματικές, αισθητήριες

2. **Γενικευμένη επιληπτική κρίση (generalized seizure):** υπάρχει ανώμαλη ηλεκτρική δραστηριότητα και στα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου. Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις διακρίνονται σε:

- Κινητικές (motor generalized onset seizures): τονικές-κλονικές, κλονικές, τονικές, μυοκλονικές, μυοκλονικές-τονικές-κλονικές, μυοτονικές-ατονικές, ατονικές, επιληπτικοί σπασμοί
- Μη κινητικές (non motor generalized onset seizures): τυπικές, άτυπες, μυοκλονικές, μυοκλονία βλεφάρων

Τα προηγούμενα και τα τρέχοντα συστήματα ταξινόμησης στοχεύουν στην ομαδοποίηση επιληπτικών κρίσεων σύμφωνα με την κλινική παρουσίαση και την έναρξη της εγκεφαλικής περιοχής (brain region onset) καθώς και την ομαδοποίηση επιληψιών ανάλογα με τον τύπο των επιληπτικών κρίσεων, την ηλικία έναρξης, την πιθανότητα ύφεσης, τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά (EEG) ευρήματα, τα ακτινολογικά ευρήματα και το γενετικό υπόβαθρο (Pack, 2019).

1.1.4. Αιτιολογία της νόσου

Αν και πολλοί υποκείμενοι μηχανισμοί ασθένειας μπορούν να οδηγήσουν σε επιληψία, η αιτία της νόσου παραμένει άγνωστη σε περίπου 50% των περιπτώσεων παγκοσμίως και δεν οφείλεται σε μεταδοτικότητα (Mbuba *et al.*, 2008).

Οι αιτίες της επιληψίας χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες (Εικόνα 1):

1. Δομικές
2. Γενετικές
3. Μολυσματικές
4. Μεταβολικές
5. Ανοσοποιητικές
6. Άγνωστες

Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν (Thijs *et al.*, 2019):

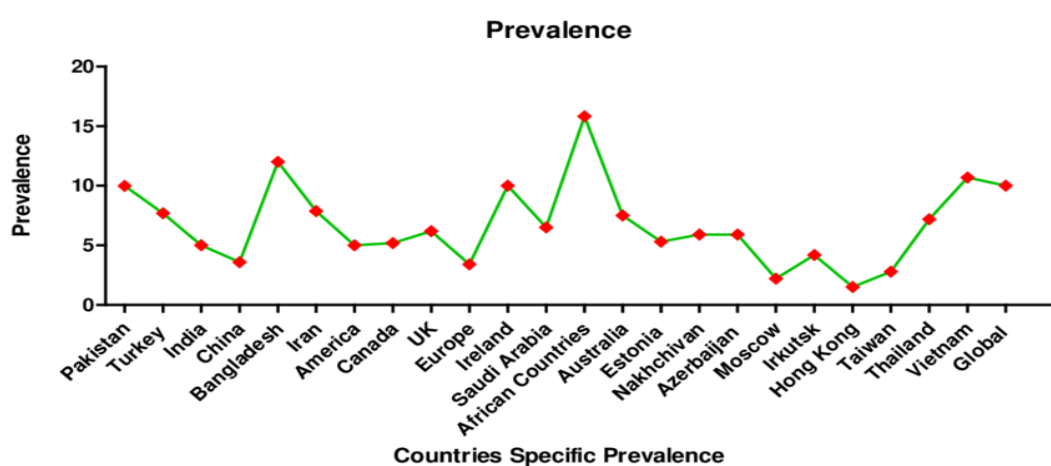
- Εγκεφαλική βλάβη από προγεννητικές ή περιγεννητικές αιτίες (π.χ. απώλεια οξυγόνου ή τραύμα κατά τη γέννηση, χαμηλό βάρος γέννησης)
- Συγγενείς ανωμαλίες ή γενετικές καταστάσεις με σχετικές εγκεφαλικές δυσπλασίες.

- Σοβαρός τραυματισμός στο κεφάλι
- Ένα εγκεφαλικό που περιορίζει την ποσότητα οξυγόνου στον εγκέφαλο.
- Λοίμωξη του εγκεφάλου όπως μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα ή νευροκυστερίωση,
- Ορισμένα γενετικά σύνδρομα
- Όγκο στον εγκέφαλο

1.1.5. Συμπτωματολογία της νόσου

Τα χαρακτηριστικά των επιληπτικών κρίσεων ποικίλλουν και εξαρτώνται από την περιοχή έναρξης της διαταραχής στον εγκέφαλο και την έκταση εξάπλωσής της. Εμφανίζονται προσωρινά συμπτώματα, όπως απώλεια συνείδησης και διαταραχές της κίνησης, της αίσθησης (συμπεριλαμβανομένης της όρασης, της ακοής και της γεύσης), της διάθεσης ή άλλων γνωστικών λειτουργιών (Beghi, 2020).

Τα άτομα με επιληψία τείνουν να έχουν περισσότερα σωματικά προβλήματα (όπως κατάγματα και μώλωπες από τραυματισμούς που σχετίζονται με επιληπτικές κρίσεις), καθώς και υψηλότερα ποσοστά ψυχολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του άγχους και της κατάθλιψης. Ομοίως, ο κίνδυνος πρόωρου θανάτου σε άτομα με επιληψία είναι έως και τρεις φορές υψηλότερος από ό, τι στον γενικό πληθυσμό, με τα υψηλότερα ποσοστά πρόωρης θνησιμότητας να βρίσκονται σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος και σε αγροτικές περιοχές (Mbuba *et al.*, 2008; GBD 2016 Epilepsy Collaborators, 2019; Thijs *et al.*, 2019; Beghi, 2020) (Εικόνα 3).



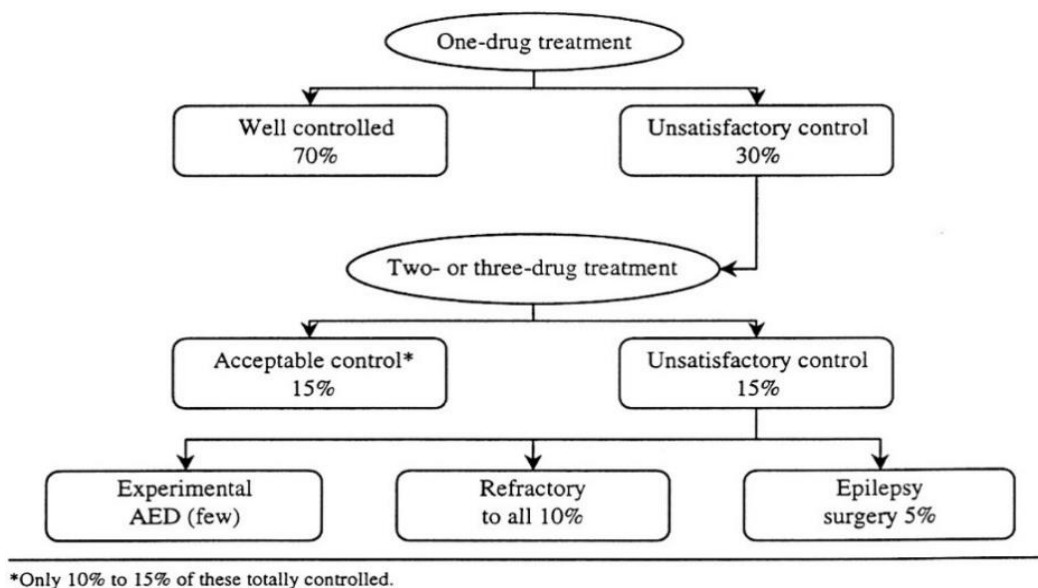
Εικόνα 3: Επικράτηση επιληψίας σε διάφορες χώρες του κόσμου (Ανατύπωση από Shakirullah *et al.*, 2014).

1.1.6. Θεραπευτική αγωγή

Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να ελεγχθούν. Έως και το 70% των ατόμων με επιληψία θα μπορούσαν να ζήσουν χωρίς επιληπτικές κρίσεις με την κατάλληλη χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων (Antiepileptic Drugs, AEDs). Συχνά διατίθεται θεραπεία χαμηλού κόστους καθημερινής φαρμακευτικής αγωγής. Η διακοπή του αντιεπιληπτικού φαρμάκου μπορεί να εξεταστεί μετά από 2 χρόνια χωρίς επιληπτικές κρίσεις λαμβάνοντας υπόψη σχετικούς κλινικούς, κοινωνικούς και προσωπικούς παράγοντες (Beghi, 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τρία τέταρτα των ατόμων με επιληψία που ζουν σε χώρες χαμηλού εισοδήματος δεν λαμβάνουν τη θεραπεία που χρειάζονται (Beghi, 2020) (Εικόνα 3).

Η διάγνωση και θεραπεία των περισσότερων ατόμων με επιληψία είναι δυνατή στο επίπεδο της πρωτοβάθμιας υγειονομικής περίθαλψης χωρίς τη χρήση εξελιγμένου εξοπλισμού. Επιπλέον, η χειρουργική επέμβαση μπορεί να είναι επωφελής για ασθενείς που ανταποκρίνονται ελάχιστα στις θεραπείες με φάρμακα, όπου γίνεται αφαίρεση του παθολογικού ιστού (Manford, 2017).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει σημαντική πρόοδος ως προς τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της επιληψίας και των επιληπτικών κρίσεων. Παρόλα αυτά η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που προκαλούν επιληπτογένεση παραμένει περιορισμένη. Υπολογίζεται ότι ποσοστό της τάξης 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στην φαρμακευτική αντιμετώπιση (Ali, 2018)(Εικόνα 4).

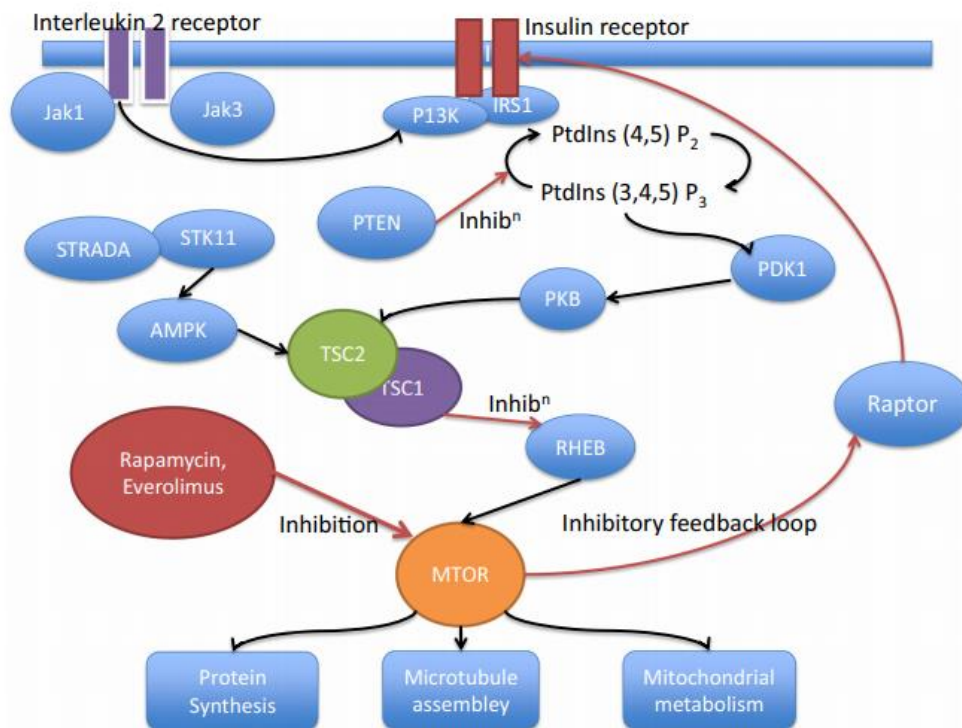


Εικόνα 4: Διάγραμμα αντιμετώπισης της επιληψίας (Ανατύπωση από Mattson, 1998).

1.1.7. Βιοχημική ανάλυση - Μηχανισμοί επιληπτογένεσης (έναρξης επιληψίας)

Δεν υπάρχει συγκεκριμένο πρότυπο μηχανισμού που οδηγεί σε επιληψία ή σε επιληπτική κρίση καθώς, λόγω του διαφορετικού σημείου που επηρεάζεται στον εγκέφαλο, προκύπτει και η ταξινόμηση τους. Κατά την επιληψία συμβαίνουν διάφορες αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, φλεγμονή, παραγωγή πρωτεϊνών και αλλαγές στη συνδεσιμότητα, οι οποίες μπορεί να είναι όλοι στόχοι για φάρμακα για την καταστολή της επιληπτογένεσης (Manford, 2017). Τα διάφορα βιοχημικά μονοπάτια της επιληψίας χρησιμοποιούνται και για την ανάπτυξη αντιεπιληπτικών φαρμάκων.

Μία από τις πλέον μελετημένες οδούς συνδέεται με το μονοπάτι της ραπαμυκίνης (mTOR). Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι αναστολή της πρωτεΐνης mTOR, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την πρωτεϊνική σύνθεση, οδηγεί σε μείωση των επιληπτικών κρίσεων έως και 40% (Εικόνα 5) (Sosanya *et al.*, 2015; Manford, 2017).



Εικόνα 5: Διάγραμμα βιοχημικών μονοπατιών επιληπτογένεσης που συνδέονται με την πρωτεΐνη mTOR (Ανατύπωση από Manford, 2017).

1.2. Αντιεπιληπτικά Φάρμακα (AEDs)

1.2.1. Γενικά

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα είναι γνωστά και ως αντισπασμωδικά και χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση επιληπτικών κρίσεων και όχι μόνο.

Η χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι η κύρια μέθοδος για τον μετριασμό των συμπτωμάτων και τη διαχείριση των ασθενειών. Τα AEDs είναι μια διαφορετική ομάδα ενώσεων με ιστορία που ξεκινά από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Από ιστορική άποψη, το βρωμιούχο κάλιο ήταν η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικά για επαναλαμβανόμενες κρίσεις. Αδειοδοτήθηκε το 1857 και αν και αποτελεσματικό έναντι της επιληψίας, προκαλούσε διαταραχές συμπεριφοράς (Shorvon, 2009). Παρόλα αυτά, αν και δεν αποτελεί πρότυπο φάρμακο για την αντιμετώπιση επιληπτικών κρίσεων, πολλές παραδοσιακές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης και της φαινυτοΐνης και της φαινοβαρβιτάλης, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα (Fisher *et al.*, 2014).

Τα AEDs μπορούν να χορηγηθούν ως μονοθεραπεία ή συνδυαστικά με άλλα AEDs, με συνολικό στόχο την πρόληψη των επιληπτικών κρίσεων, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τις πιθανές παρενέργειες (Εικόνα 4). Η θεραπεία με συνδυασμό AEDs απαιτεί αξιολόγηση για πιθανές παρενέργειες και συχνά γίνεται χορήγηση εκτός της επίσημης ετικέτας (off label) για τη θεραπεία νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών καθώς χρησιμοποιούνται και ως σταθεροποιητές συναισθήματος (Kaufman, 2011). Παραδείγματα αποτελούν οι ημικρανίες, η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή, η κατάθλιψη και ο νευροπαθητικός πόνος (Knezevic and Marzinke, 2018). Μειονέκτημα της συνδυαστικής θεραπείας AEDs είναι οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ή/και ακόμα και με φάρμακα που συγχωρηγούνται ταυτόχρονα για άλλη νόσο του ασθενούς (Patsalos, 2013a; b).

Η διαδικασία για την έγκριση νέων AEDs περιλαμβάνει την ένδειξη ότι το φάρμακο μειώνει τις επιληπτικές κρίσεις ή ότι είναι αποτελεσματικότερο από κάποια ήδη προϋπάρχουσα θεραπεία. Για την έγκριση τους από τον FDA απαιτείται διεξαγωγή δοκιμών τους σε μονοθεραπείες με την χρήση placebo και από τον EMA απαιτείται διεξαγωγή δοκιμών με άλλα φάρμακα. Η πλειονότητα των νέων φαρμάκων παίρνει έγκριση αρχικά ως συνδυαστική θεραπεία (Manford, 2017).

Έτσι απαιτείται να προσδιοριστεί η αλληλεπίδραση τους με άλλα AEDs ή μη-AEDs. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους (Patsalos, 2013a):

1. με τη διερεύνηση ενός συγκεκριμένου συνδυασμού φαρμάκων σε εθελοντές και ασθενείς
2. με τη χρήση πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών δεδομένων που προέρχονται από τις κλινικές δοκιμές Φάσης II και Φάσης III του φαρμάκου
3. με την ταυτοποίηση των υπεύθυνων ενζύμων που ευθύνονται για τον ηπατικό μεταβολισμό των AEDs έτσι ώστε να γίνεται πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετά, περίπου 27, AEDs που έχουν εγκριθεί από το FDA, με την πιο πρόσφατη ουσία, την μπιριβαρακετάμη, να έχει εγκριθεί το 2016 (Patsalos, 2013a, p. 1; Knezevic and Marzinke, 2018; Johannessen Landmark *et al.*, 2020; Patsalos and Bourgeois, 2018) (Πίνακας1).

Υπάρχουν τρεις γενιές AEDs με βάση την έγκρισή τους από το FDA. Τα AEDs τρίτης γενιάς δρουν μέσω ποικίλων μηχανισμών και εμφανίζουν βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα, χαμηλότερη δέσμευση σε πρωτεΐνες του πλάσματος (με κάποιες εξαιρέσεις) και λιγότερες αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 1). Τα AEDs τρίτης γενιάς αρχικά αδειοδοτήθηκαν ως συνδυαστική θεραπεία με άλλα AEDs, αλλά αξίζει να σημειωθεί ότι πολλά από αυτά είναι αποτελεσματικά και σε μονοθεραπείες πρώτης γραμμής (Patsalos, 2013a; Knezevic and Marzinke, 2018).

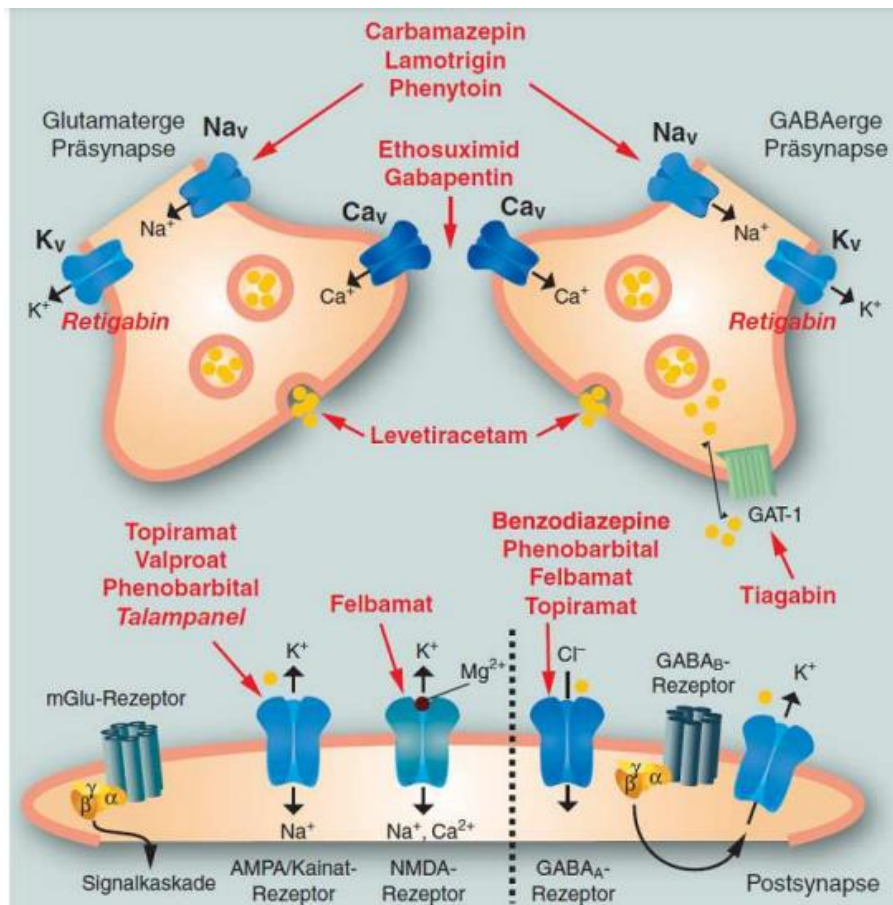
ΓΕΝΙΑ	ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
1 ^Η	Βρωμιούχο άλας	1857
	Φαινοβαρβιτάλη	1912
	Φαινυτοΐνη	1936
	Ακεταζολαμίδη	1941
	Τριμεθαδίωνη	1945
	Μεφαινυτοΐνη	1948
	Παραμεθαδίωνη	1949
	Φαινασεμίδη	1950
	Κορτικοστεροειδή/ ACTH	1951
	Φαινοσουξιμίδη	1952
	Πριμιδόνη	1954
	Αιθοτοΐνη	1957
	Αιθοσουξιμίδη	1960
2 ^Η	Χλωροδιαζεποξείδη	1958
	Διαζεπάμη	1959
	Sulthiame	1960
	Καρβαμαζεπίνη	1963
	Βαλπροϊκό οξύ	1974
	Κλοναζεπάμη	1974
	Κλοβαζάμη	1982
3 ^Η	Βιγαπατρίνη	1989
	Λαμοτριγίνη	1991
	Φελβαμάτη	1993
	Γκαμπαπεντίνη	1993
	Τοπιραμάτη	1995
	Τιαγκαμπίνη	1998
	Λεβετιρακετάμη	1999
	Οξυκαρβαζεπίνη	2000
	Πρεγκαμπαλίνη	2004
	Ζονισαμίδη	2005
	Στιριπεντόλη	2007
	Ρουφιναμίδη	2007
	Λακωσαμίδη	2008
	Οξική εσλικαρβαζεπίνη	2009
	Εβερόλιμους	2009
Ρετιγκαμπίνη	2011	
Περαμπανέλη	2012	
Μπριβαρακετάμη	2016	

Πίνακας 1: Κατάταξη αντιεπιληπτικών φαρμάκων και διαχωρισμός τους στις τρεις γενιές (Τροποποίηση ανατύπωσης από Golyala and Kwan, 2017).

1.2.2. Μηχανισμοί δράσης AEDs

Συνήθως τα AEDs δρουν με ένα από τους παρακάτω μηχανισμούς (Εικόνα 6):

1. Απενεργοποίηση των τασοεξαρτώμενων καναλιών Na^+ για περιορισμό της επαναλαμβανόμενης διέγερσης των νευρώνων
2. Ενίσχυση της δράσης του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA
3. Πολλαπλοί και άγνωστοι προς το παρόν μηχανισμοί



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων στόχων των AEDs (Ανατύπωση από Hildenbrand, 2012).

Επίσης, στους μοριακούς στόχους των AEDs περιλαμβάνονται υποδοχείς, πρωτεΐνες μεταφοράς, η αμινοτρανσφεράση του GABA καθώς και τασοεξαρτώμενοι διάυλοι Ca^{2+} και πρωτεΐνες των συναπτικών κυστιδίων.

Οι επιληπτικές κρίσεις που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με AEDs θεωρούνται ανθεκτικές και αντιμετωπίζονται με κετογόνο δίαιτα, διέγερση του κόλπου, διέγερση του εγκεφάλου ή με χειρουργική επέμβαση (Knezevic and Marzinke, 2018).

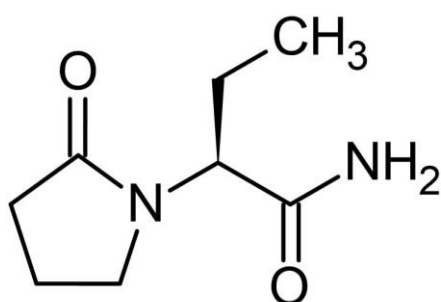
1.3. Λεβετιρακετάμη - Levetiracetam

1.3.1. Γενικά

Η λεβετιρακετάμη αποτελεί ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο 3^{ης} γενιάς και χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση της επιληψίας. Το Δεκέμβριο του 1999, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) ενέκριναν την λεβετιρακετάμη ως αποτελεσματική ουσία για την αντιμετώπιση της επιληψίας.

Πίνακας 2: Στοιχεία Λεβετιρακετάμης

Χημική Ονομασία	(S)-alpha-ethyl-2 oxo-1-pyrrolidine acetamide
Χημικός Τύπος	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂
Εμπορική Ονομασία	Ceumid, Keppra
Μοριακή Μάζα	170.21 g/mol
Σημείο Τήξης	118-119 °C
pKa	16,09



Εικόνα 7: Χημική δομή της λεβετιρακετάμης (Ανατύπωση από Contin et al., 2008).

Η λεβετιρακετάμη είναι μια λευκή έως υπόλευκη κρυσταλλική σκόνη με ελαφριά οσμή και πικρή γεύση. Είναι διαλυτή στο νερό (104,0g/100ml) και ελεύθερα διαλυτό σε χλωροφόρμιο (65,3g/100ml), σε μεθανόλη (53,6g/100ml), σε αιθανόλη (16,5g/100ml) και ελάχιστα διαλυτό σε ακετονιτρίλιο (5,7g/100ml) (Patsalos, 2013a, p. 1; Patsalos and Bourgeois, 2018).

1.3.2. Φαρμακοκινητική

Η λεβετιρακετάμη έχει ένα ευνοϊκό φαρμακοκινητικό προφίλ, το οποίο περιλαμβάνει ταχεία απορρόφηση, εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα, γραμμική φαρμακοκινητική, ελάχιστη δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος και απεκκρίνεται από τα νεφρά. Το φαρμακοκινητικό προφίλ είναι συγκρίσιμο μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών με επιληψία (Wright *et al.*, 2013).

Απορρόφηση

Η λεβετιρακετάμη απορροφάται ταχέως και σχεδόν πλήρως (>95%) μετά τη χορήγηση από το στόμα. Η βιοδιαθεσιμότητα όταν λαμβάνεται από το στόμα είναι κοντά στο 100% και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται 1 ώρα μετά τη χορήγηση. Ο χρόνος επίτευξης σταθερής κατάστασης (time to steady state) είναι 1-2 ημέρες. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (C_{max}) είναι 31 και 43 μg/ml μετά από μία εφάπαξ δόση 1000mg ή επαναλαμβανόμενη δόση 1000mg δύο φορές ημερησίως (2x500mg), αντίστοιχα. Ο βαθμός απορρόφησης είναι ανεξάρτητος από τη δόση και όταν λαμβάνεται με τροφή, η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα της λεβετιρακετάμης δεν επηρεάζεται (Abou-Khalil, 2008).

Κατανομή

Ο όγκος κατανομής της LEV είναι 0,5 έως 0,7 L/kg, τιμή κοντά στον όγκο κατανομής του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού νερού. Ούτε η λεβετιρακετάμη, αλλά ούτε και ο μεταβολίτης της, ucb L057, συνδέονται σημαντικά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (<10%), επομένως ο κίνδυνος αλληλεπιδράσεων σύνδεσης με πρωτεΐνες είναι αμελητέος.

Μεταβολισμός

Η λεβετιρακετάμη μεταβολίζεται ελάχιστα από το ήπαρ. Η κύρια οδός μεταβολισμού είναι η ενζυμική υδρόλυση της ομάδας ακεταμίνης, παράγοντας ένα απαμινωμένο μεταβολίτη ο οποίος δεν μεταβολίζεται από το ηπατικό κυτόχρωμα P450 και έτσι, δεν εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με άλλα AEDs ή μη- AEDs που μεταβολίζονται στο ήπαρ. Οι μεταβολίτες της λεβετιρακετάμης δεν είναι φαρμακολογικά δραστικοί (Pucci *et al.*, 2004; Patsalos and Bourgeois, 2018).

Απέκκριση

Η κύρια οδός απέκκρισης είναι μέσω των ούρων. Περίπου το 93% της δόσης απεκκρίνεται εντός 24 ωρών, με το 66% της δόσης να απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα και το 24% να απεκκρίνεται στα ούρα στους κύριους μεταβολίτες της. Η απέκκριση μέσω περιττωμάτων αντιπροσωπεύει το 0,3% της δόσης (Patsalos and Bourgeois, 2018).

1.3.3. Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί καμία δυσμενής περίπτωση αλληλεπίδρασης της λεβετιρακετάμης με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, αλλά και ούτε με μη αντιεπιληπτικά φάρμακα (δεν επηρεάζεται η δράση της ούτε και η δράση άλλων φαρμάκων) (Abou-Khalil, 2008; Patsalos, 2013a, b, p. 2; Wright *et al.*, 2013; Patsalos and Bourgeois, 2018).

1.3.4. Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, ΚΝΣ, και περιλαμβάνουν: υπνηλία, αδυναμία και ζάλη. Άλλες επιδράσεις στο ΚΝΣ που αναφέρονται είναι ευερεθιστότητα, διέγερση, επιθετική συμπεριφορά, κατάθλιψη, αναπνευστική δυσλειτουργία και κόμα σε υπερδοσολογία. Τα ίδια αποτελέσματα αναφέρονται για όλες τις ηλικιακές ομάδες.

Τα προβλήματα συμπεριφοράς εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς που έχουν υποκείμενη συμπεριφορά ή γνωστικά προβλήματα και δεν σχετίζονται με τη δόση (Patsalos, 2013a, p. 1; Patsalos *et al.*, 2018).

1.3.5. Εγκυμοσύνη

Μελέτες έχουν δείξει ότι η λεβετιρακετάμη δεν επηρεάζει την δράση αντισυλληπτικών φαρμάκων (Patsalos and Bourgeois, 2018). Επιπλέον, σε μονοθεραπεία της κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης εμφανίζει χαμηλό κίνδυνο για συγγενείς δυσπλασίες (minichromosome maintenance protein, MCM) και υψηλό κίνδυνο εμφάνισης MCM όταν λαμβάνεται ως μέρος μιας συνδιαστικής θεραπείας (Καρκαλούσος Π., 2015).

Η λεβετιρακετάμη θεωρείται ασφαλέστερη από το βαλπροϊκό οξύ για γυναίκες με επιληψία σε αναπαραγωγική ηλικία ((Καρκαλούσος Π., 2015). Ωστόσο, τα βρέφη που θηλάζουν παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις LEV, υποδηλώνοντας ότι ο θηλασμός δεν αντενδείκνυται (Abou-Khalil, 2008; Mawhinney *et al.*, 2013).

1.3.6. Δοσολογία

Η δοσολογία εξαρτάται από την ηλικιακή ομάδα, τη μορφή της ουσίας (δισκίο ή πόσιμο διάλυμα) και τη νεφρική λειτουργία του ασθενούς. Η συνήθης δοσολογία για ενήλικες είναι 1000-3000mg/ημέρα και για παιδιά 30-40 mg/kg/ημέρα (Patsalos, 2013a; b; Patsalos and Bourgeois, 2018).

Το FDA ενέκρινε την ένεση LEV 500mg/5ml (100mg/ml) το 2006, ως εναλλακτική λύση όταν η στοματική χορήγηση δεν είναι προσωρινά δυνατή. Σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία, οι προσαρμογές της δόσης και οι συμπληρωματικές δόσεις πρέπει να χορηγούνται μετά από αιμοκάθαρση για να αντισταθμιστεί η απώλεια κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης (Wright *et al.*, 2013).

1.3.7. Ο ρόλος της LEV στην θεραπεία της επιληψίας

Η λεβετιρακετάμη είναι ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο ευρέος φάσματος και αντιπροσωπεύει θεραπεία πρώτης γραμμής ή δεύτερης γραμμής σε γενικευμένη επιληψία (γενικευμένες μυοκλονικές επιληπτικές κρίσεις) και σε εστιακές επιληπτικές κρίσεις. Είναι επίσης ικανή να αντικαταστήσει το βαλπροϊκό οξύ στη θεραπεία της νεανικής μυοκλονικής επιληψίας και της ιδιοπαθούς γενικευμένης επιληψίας. Επειδή η λεβετιρακετάμη σχετίζεται με ένα σχετικά καλό προφίλ ασφάλειας και τοξικότητας, δεν προκαλεί σημαντικές δυσμενείς επιπτώσεις, έχει απλά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά και έχει χαμηλή τάση να αλληλοεπιδρά με άλλα φάρμακα καθιστά την κλινική χρήση της απλή και εύκολη (Abou-Khalil, 2008; Patsalos and Bourgeois, 2018).

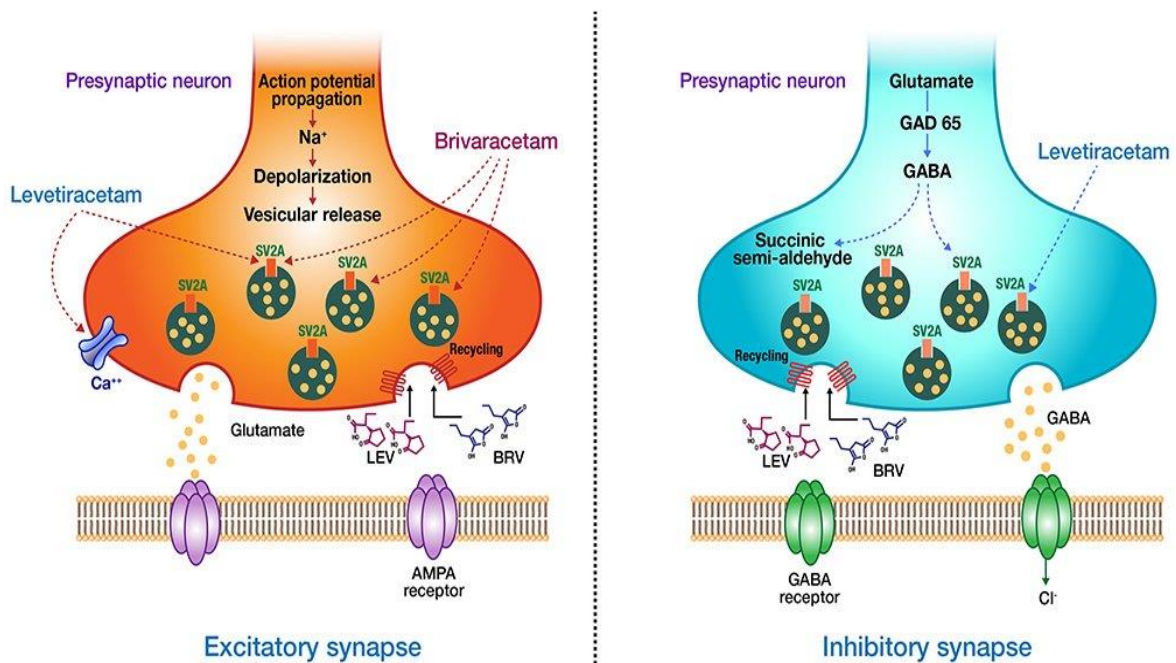
Η LEV έχει εγκριθεί για τη θεραπεία επιληπτικών κρίσεων σε ασθενείς ηλικίας 1 μηνός και άνω (Feyissa, 2019). Η LEV χρησιμοποιείται επίσης σε συνδυασμό με άλλα AEDs για τη θεραπεία μυοκλονικών, εστιακών επιληπτικών κρίσεων ή τονωτικών κλονικών κρίσεων σε παιδιά και ενήλικες (Contin *et al.*, 2008).

Υπάρχουν επίσης αυξανόμενες ενδείξεις ότι το LEV έχει πιθανά οφέλη για άλλες ψυχιατρικές και νευρολογικές καταστάσεις όπως το σύνδρομο Tourette, το σύνδρομο Lennox - Gastaut, ο αυτισμός, η διπολική διαταραχή, η σχιζοφρένεια και οι διαταραχές του άγχους (Wiffen *et al.*, 2014; Endres *et al.*, 2017).

1.3.8. Μηχανισμός Δράσης LEV

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ασκεί η λεβετιρακετάμη τα αντιεπιληπτικά της αποτελέσματα είναι ασαφής, αλλά πιστεύεται ότι είναι μοναδικός μεταξύ άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (Patsalos and Bourgeois, 2018).

Οι τρέχουσες γνώσεις δείχνουν ότι η δέσμευση της λεβετιρακετάμης στη συναπτική πρωτεΐνη κυστιδίων 2A (Synaptic Vesicle 2A, SV2A) είναι βασικός παράγοντας της δράσης της (Εικόνα 8). Η ειδική επίδραση της δέσμευσης LEV στο SV2A φαίνεται να είναι η μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης κυστιδίων (Abou-Khalil, 2008). Η SV2A είναι μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη με τη μεμβράνη που βρίσκεται σε συναπτικά κυστίδια και είναι παρούσα σε όλο το ΚΝΣ, η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στην εξωκυττάρωση των συναπτικών κυστιδίων και στη διαμόρφωση της συναπτικής μετάδοσης αυξάνοντας την διαθέσιμη ποσότητα εκκριτικών κυστιδίων που διατίθενται για νευρομεταβίβαση. Η διέγερση του προ-συναπτικού SV2A από τη λεβετιρακετάμη μπορεί να αναστέλλει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, αλλά αυτή η δράση δεν φαίνεται να επηρεάζει την φυσιολογική νευροδιαβίβαση. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η λεβετιρακετάμη ρυθμίζει αποκλειστικά τη λειτουργία του SV2A μόνο υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες.



Εικόνα 8: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της λεβετιρακετάμης (Ανατύπωση από Feyissa, 2019).

Η λεβετιρακετάμη έχει επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζει έμμεσα την νευροδιαβίβαση μέσω του GABAεργικού συστήματος (παρά το γεγονός ότι δεν έχει άμεση επίδραση στους υποδοχείς GABA). Επιπλέον, η λεβετιρακετάμη έχει δειχθεί ότι αναστέλλει *in vitro* τα κανάλια ασβεστίου τύπου N. Ο τρόπος, ή ακόμα και αν, αυτές οι δράσεις εμπλέκονται στην αντιεπιληπτική της δράση, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Feyissa, 2019; Patsalos and Bourgeois, 2018).

Προς το παρόν, οι μηχανισμοί δράσης δεν έχουν ακόμη βοηθήσει στον προσδιορισμό ενός συγκεκριμένου προφίλ κλινικής αποτελεσματικότητας για την LEV (Abou-Khalil, 2008).

1.4. Παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων – Therapeutic Drug Monitoring, TDM

Η σημασία της παρακολούθησης των συγκεντρώσεων AEDs στο αίμα έχει αναγνωριστεί για αρκετές δεκαετίες. Οι AEDs έχουν ένα στενό θεραπευτικό παράθυρο και εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ ατόμων σε σχέση με τη φαρμακοκινητική. Μια πρόκληση της θεραπείας AEDs είναι ότι η κλινική αποτελεσματικότητά τους είναι μεταβλητή, ακόμη και μεταξύ των ασθενών με τις ίδιες συγκεντρώσεις φαρμάκων στον ορό. Σημαντικό εργαλείο για το πρόβλημα αυτό καθώς και σε μια προσπάθεια εξατομικευμένης θεραπείας είναι η παρακολούθηση επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων (TDM) (Krasowski, 2010; Manford, 2017; Patsalos *et al.*, 2018).

Κατά τη μετάβαση από την παιδική ηλικία, την εφηβεία, την εγκυμοσύνη, την ενηλικίωση και πέρα από τα γηρατειά, παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη φυσιολογία και την παθολογία, όπως ηπατική και νεφρική λειτουργία, ουραιμία και άλλες ασθένειες που συμβάλλουν σε αλλαγές στα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των AEDs (Johannessen Landmark *et al.*, 2020).

Η παρακολούθηση των επιπέδων φαρμάκου (TDM) είναι η διαδικασία μέτρησης των AEDs στο πλάσμα/ορό ή στο σάλιο (μη διεγερμένο) σε καθορισμένα διαστήματα για τη διατήρηση μιας σταθερής συγκέντρωσης στην κυκλοφορία του αίματος ενός ασθενούς, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ατομική δοσολογία (ατομική θεραπευτική αντιμετώπιση – εξατομικευμένη θεραπεία) (Johannessen Landmark *et al.*, 2020).

Το TDM είναι μια ρεαλιστική προσέγγιση στην αντιμετώπιση της επιληψίας, δεδομένου ότι η δόση και η συγκέντρωση του AED μπορεί να προσαρμοστεί για την βελτίωση του κλινικού αποτελέσματος (Patsalos *et al.*, 2018).

Οι οδηγίες σχετικά με τη χρήση του TDM για AEDs δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά από την ILAE το 1993 και ενημερώθηκαν το 2008. Η ILAE υπογράμμισε την προσεκτική εφαρμογή του TDM και τη χρήση των αποτελεσμάτων του TDM εντός του ευρύτερου κλινικού πλαισίου για να καθοδηγήσει τις αλλαγές δοσολογίας. Συγκεκριμένα, συνέστησε τον καθορισμό ενός συγκεκριμένου αποτελεσματικού εύρους για τον ασθενή, που ονομάζεται θεραπευτικό εύρος, μετά την έναρξη της θεραπείας με AEDs και την αξιολόγηση των συγκεντρώσεων του φαρμάκου κάθε 6-12 μήνες ή όταν δικαιολογούνται αλλαγές στην κλινική εικόνα του ασθενούς (Manford, 2017).

Η αντιεπιληπτική θεραπεία χρησιμοποιείται συνήθως σε όλη την ζωή του ασθενούς, επομένως, το TDM απαιτείται για την αποφυγή των κινδύνων οξείας και χρόνιας τοξικότητας. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης στον ορό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί επίσης να βοηθήσει στη σωστή προσαρμογή της δόσης.

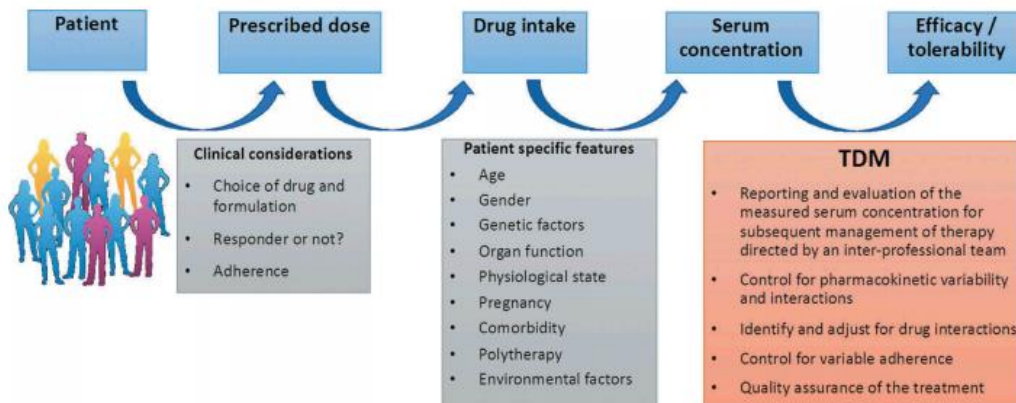
Το TDM απαιτείται για την χορήγηση AEDs για (Patsalos *et al.*, 2018) (Εικόνα 9):

1. Βελτιστοποίηση δόσης στο αρχικά συνταγογραφούμενο AED
2. Ανεξέλεγκτες επιληπτικές κρίσεις
3. Υποψία τοξικότητας
4. Εγκυμοσύνη
5. Παιδιά και ηλικιωμένους
6. Συννοσηρότητες
7. Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα
8. Αλλαγή θεραπείας σε άλλο AED και γενική υποκατάσταση

Το TDM αντιμετωπίζει προκλήσεις όπως (Krasowski, 2010; Patsalos *et al.*, 2018; Johannessen Landmark *et al.*, 2020):

1. Οι επιληπτικές κρίσεις ποικίλλουν σε ένταση και διαστήματα. Μπορεί να χρειαστεί μακροχρόνια παρατήρηση οποιασδήποτε θεραπείας για την αξιολόγηση του κλινικού οφέλους των AEDs.
2. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν από την υποκείμενη νευρολογική ασθένεια.
3. Οι απλές εργαστηριακές εξετάσεις ή διαγνωστικές διαδικασίες που μπορούν να αξιολογήσουν την κλινική αποτελεσματικότητα των AEDs και συνεπώς και την τοξικότητα τους δεν υπάρχουν.

4. Η κλινική παρατήρηση για τον εντοπισμό της ανεπαρκούς συμμόρφωσης του ασθενούς ως αιτία κακής ανταπόκρισης στη θεραπεία
5. Η ύπαρξη σημαντικής φαρμακοκινητικής μεταβλητότητας μεταξύ των AEDs απαιτεί διαφορετικές δοσολογίες σε διαφορετικούς ασθενείς.



Εικόνα 9: Παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη όταν γίνεται το TDM (Ανατύπωση από Johannessen Landmark *et al.*, 2020).

Η παρακολούθηση των επιπέδων φαρμάκων συνδέεται στενά με την ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον καθορισμό της συγκέντρωσης τόσο των ίδιων των φαρμάκων όσο και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα.

1.4.1. Παρακολούθηση επιπέδων LEV

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της λεβετιρακετάμης σε ορό ασθενών είτε όταν αυτή είναι το μόνο φάρμακο προς προσδιορισμό, είτε όταν απαιτείται ταυτόχρονος προσδιορισμός με άλλα φάρμακα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί χρωματογραφικές μέθοδοι με ανίχνευση στο υπεριώδες (HPLC-UV) ή με φασματογραφία μάζας (HPLC-MS-MS). Οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην φασματογραφία μάζας χαρακτηρίζονται από σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι η υψηλή ευαισθησία, ο μικρός χρόνος ανάλυσης και ο μικρός όγκος δείγματος. Βασικό μειονέκτημα τους είναι εξοπλισμός υψηλού κόστους καθώς και εξειδικευμένο προσωπικό.

Σε αντίθεση με την φασματογραφία μάζας, οι μέθοδοι που βασίζονται στη ανίχνευση υπεριώδους χαρακτηρίζονται καλύτερες στην παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων σε καθημερινή κλινική πράξη, καθώς παρέχουν επαρκή ευαισθησία, ειδικότητα και αξιοπιστία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμάκων. Επιπλέον, περιλαμβάνουν χαμηλού κόστους εξοπλισμό και όχι τόσο εξειδικευμένο προσωπικό.

Η λεβητιρακετάμη έχει γραμμική κινητική. Αυτό σημαίνει ότι σε οποιοδήποτε άτομο η συγκέντρωση στον ορό είναι ανάλογη με τη δόση. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της LEV στον ορό του και των αποτελεσματικών επιπέδων της LEV στον ορό παραμένει άγνωστη.

Όσον αφορά τον ευνοϊκό θεραπευτικό δείκτη, τη χαμηλή δέσμευση πρωτεϊνών στο πλάσμα και τις ελάχιστες παρενέργειες, φαίνεται ότι η τακτική παρακολούθηση του φαρμάκου δεν είναι απαραίτητη για την ασφαλή χρήση του φαρμάκου, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της LEV (Patsalos *et al.*, 2018).

Το θεραπευτικό εύρος της LEV κυμαίνεται μεταξύ 12-46 μg/ml (Patsalos, 2013a; Patsalos *et al.*, 2018; Patsalos and Bourgeois, 2018). Αυτό σημαίνει ότι εάν η συγκέντρωση του LEV είναι κάτω από 12 μg/ml στο πλάσμα του αίματος, θα είναι υποθεραπευτική και ο ασθενής μπορεί να έχει επιληπτικές κρίσεις. Η συγκέντρωση της LEV πάνω από 46 μg/ml στο πλάσμα του αίματος δεν είναι ασφαλής και ο ασθενής μπορεί να εμφανίσει σοβαρές παρενέργειες ή/και τοξικότητα (Krasowski, 2010).

Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να προσδιοριστούν τα επίπεδα πλάσματος/ορού της λεβητιρακετάμης σε ασθενείς με επιληψία, προκειμένου να προσδιοριστεί η δόση όπου εμφανίζονται λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και βέλτιστα αποτελέσματα της θεραπείας στον ασθενή (Patsalos *et al.*, 2018). Ένα απλό και γρήγορο εργαλείο για τον κατάλληλο προσδιορισμό επιπέδων λεβητιρακετάμης είναι το TDM, το οποίο όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, βοηθάει σημαντικά στην εξατομικευμένη θεραπεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι για το προσδιορισμό του TDM μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το σάλιο ως εναλλακτικό μέσο. Έχουν αναφερθεί πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του LEV στο ανθρώπινο πλάσμα και στον ορό με διαφορετικές μεθόδους HPLC, διαφορετικούς ανιχνευτές και προκατεργασία δειγμάτων (Πίνακας 3, 4).

Οι μέθοδοι HPLC πρέπει να είναι απλές, ακριβείς, αξιόπιστες και χαμηλού κόστους για την επιτυχία του TDM. Άλλες μέθοδοι όπως το GC-MS ανέφεραν ότι έχουν έλλειψη ευαισθησίας, επιλεκτικότητας, αξιοπιστίας και είναι χρονοβόρες για την προετοιμασία

του δείγματος όταν πρόκειται για μεγάλο όγκο δείγματος. Το LC-MS θεωρείται ένα χρυσό πρότυπο για τη ανάλυση καθώς είναι ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος για την ανίχνευση TDM της λεβετιρακετάμης καθώς και για την εμφάνιση τοξικότητας σε υψηλές δόσεις (Engelbrecht *et al.*, 2017).

Σημαντικό όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι ότι η λεβετιρακετάμη παρουσιάζει ελάχιστες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι η καρβαμαζεπίνη, η λαμοτριγίνη, η μεθοξυμίδη, η οξυκαρβαμαζεπίνη, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη ενισχύουν τον μεταβολισμό της, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της στο πλάσμα κατά 20%-30% (Patsalos *et al.*, 2018). Επιπλέον, φαίνεται ότι η καρβαμαζεπίνη, η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη και η πριμιδόνη ενισχύουν την απομάκρυνση της λεβετιρακετάμης και αυτό πιθανώς, εμπλέκεται στην αύξηση της νεφρικής κάθαρσης (Johannessen Landmark *et al.*, 2020). Εξαιρετικά σημαντικό στοιχείο της λεβετιρακετάμης αποτελεί το ότι εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα τοξικότητας σε σχέση με AEDs προηγούμενης γενιάς (Knezevic and Marzinke, 2018).

Πίνακας 3: Μέθοδοι προσδιορισμού της λεβετιρακετάμης με ανίχνευση στο υπεριώδες ή με χρήση φασματομετρίας μάζας που ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας μελέτης. Οι αριθμοί 1-91 αναφέρονται σε φάρμακα- ουσίες που έχουν ελεγχθεί για πιθανές χρωματογραφικές παρεμβολές.

	Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στήλη	Ανιχνεύσιμα φάρμακα	Αναλυτικό εύρος λεβετιρακετάμης- LLOQ(μg/mL)	Όγκος δείγματος (μL)	Εσωτερικό Πρότυπο	Χρόνος Ανάλυσης Λεβετιρακετάμης (min)	Προκατεργασία Δείγματος	Έλεγχος για παρεμβολές από άλλα φάρμακα *
Μέθοδοι που βασίζονται στο UV									
Παρούσα Μελέτη	Isocratic HPLC-UV	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	2,5-100,0 (2,5)	100	1-μεθυλοξανθίνη	17,17	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών (μεθανόλη)	4, 7, 9, 10, 11, 18, 19, 28, 33, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 48, 57, 60, 61, 62, 65, 66, 70, 72, 74, 77, 86, 87, 88
(Contin et al., 2008)	Isocratic HPLC-UV	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	4,0-80,0 (2,0)	500	UCB17025	13	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών (μεθανόλη)	1, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 31, 33, 36, 40, 44, 49, 53, 56, 61,66, 67, 79, 80, 82, 83, 84
(Pucci et al., 2004)		C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	5,0-100,0 (0,5)	500	Αδενοσίνη	7,3	Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)	-
(Engelbrecht et al., 2017)	Isocratic HPLC-UV	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	1,0-60,0 (1,0)	100	Γκαμπαπεντίνη	8,588	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών	36, 40, 61, 82, 83
(Baldelli et al., 2015)	Gradient HPLC-UV	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη, Λαμοτριγίνη, Ethosuximide, felbamate, rufinamide, zonisamide, MHD monohydroxycarbamazepine	2,4-96,0 (2,4)	250	Λινεζολίδη	6,5	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών (μεθανόλη)	8, 11, 13, 15, 16, 27, 31, 43, 45, 67, 69, 71, 75, 83, 85

(Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005)	Gradient HPLC-UV	Thermo Hypercarb	Λεβετιρακετάμη	1,0-75,0 (0,1)	200	χωρίς ΕΠ	6,8	Κατακρήμιση πρωτεϊνών (υπερχλωρικό οξύ, HClO ₄)	1, 15, 31, 40, 61, 67, 77, 82, 83
(Kalaria <i>et al.</i> , 2018)	Gradient HPLC-UV	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	2,0-80,0 (2,0)	500	Άνδρη Καφεΐνη	7,0	Κατακρήμιση πρωτεϊνών (ACN)	2, 3, 12, 15, 20, 38, 50, 52, 55, 63, 64, 68, 78, 81, 83
(Juenke <i>et al.</i> , 2006)	Isocratic HPLC-UV	Luna Phenyl Hexyl column (C ₁₈)	Λεβετιρακετάμη, Ζονισαμίδη	5,0-150,0 (5500)(5.5 mg/L)	500	UCB 17025	1,33	Κατακρήμιση πρωτεϊνών (HCl)	2, 5, 6, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 25, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 47, 51, 55, 57, 58, 61, 67, 73, 74, 80, 83, 84, 90
(Greiner-Sosanko <i>et al.</i> , 2007)	Gradient HPLC-UV	HP-5MS capillary column	Λεβετιρακετάμη, Λαμοτριγίνη, Οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυκαρβαζεπίνη, ζονισαμίδη	2,5-45,0 (10,0)	250	Μεπιβακαΐνη	3,8	Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο	1, 14, 15, 19, 26, 28, 31, 36, 40, 61, 67, 79, 80, 82, 83, 84, 89, 91
Μέθοδοι που βασίζονται στο MS									
(Matar, 2008)	Gradient HPLC-MS/MS	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη	1,0-40,0 (1,0)	200	Αδενοσίνη	-	Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)	19, 28, 31, 40, 61, 80, 90, 91
(Juenke <i>et al.</i> , 2011)	Gradient HPLC-MS/MS	C ₁₈	Λεβετιρακετάμη, Γκαμπαπεντίνη	0,1-0,15 (0,1)	770	3-αμινο-2-ναφθοϊκό οξύ	1,5	Κατακρήμιση πρωτεϊνών (μεθανόλη)	2, 9, 25, 28, 29, 32, 40, 46, 47, 51, 61, 67, 80, 82, 84

*Υπόμνημα στην επόμενη σελίδα, όπου αναγράφονται τα φάρμακα που ελέγχθηκαν για πιθανές παρεμβολές.

1. Αιθοσουξιμίδη	24. Δοξεπίνη	47. Μεθοσουξιμίδη	70. Ρισπεριδόνη
2. Ακεταμινοφαίνη	25. Εθοτοΐνη	48. Μελοξικάμη	71. Ροσουβαστατίνη
3. Αλμπουτερόλη	26. Εποξειδίο της καρβαμαζεπίνης	49. Μονο-υδροξυ-καρβαμαζεπίνη	72. Ρουφιναμίδη
4. Αλπραζολάμη	27. Εναλαπρίλη	50. Μορφίνη	73. Σαλικυλικό
5. Αμιοδαρόνη	28. Ζονισαμίδη	51. Μεφαινυτοΐνη	74. Σερτραλίνη
6. Αμιτριπτυλίνη	29. Ιβουπροφαίνη	52. Νιμοδιπίνη	75. Σιμβαστατίνη
7. Αμοξυκιλλίνη + κλαβουλανικό	30. Ιμιπραμίνη	53. Νιτραζεπάμη	76. Σιταλοπράμη
8. Αντιμικροβιακοί παράγοντες	31. Καρβαμαζεπίνη	54. Νορ-δοξεπίνη	77. Σουλτιάμη
9. Αμφεταμίνη	32. Καφεΐνη	55. Νορεπινεφρίνη	78. Ταζομπακτάμη
10. Αριπιπραζόλη	33. Κλοβαζάμη	56. Νορ-κλοβαζάμη	79. Τιαγκαμίνη
11. Ατορβαστατίνη	34. Κλοζαπίνη	57. Νορ-κλοζαπίνη	80. Τοπιραμάτη
12. Βανκομυκίνη	35. Κλομιπραμίνη	58. Νορ-μεθοσουξιμίδη	81. Υδραλαζίνη
13. Βαρβιτουρικά	36. Κλοναζεπάμη	59. Νοτριπτυλίνη	82. Φαινοβαρβιτάλη
14. Βαλκοφαίνη	37. Κουετιαπίνη	60. Ολανζαπίνη	83. Φαινυτοΐνη
15. Βαλπροϊκό οξύ	38. Λαβηταλόλη	61. Οξυκαρβαζεπίνη	84. Φελβαμάτη
16. Βαλσαρτάνη	39. Λακোসαμίδη	62. Παλιπεριδόλη	85. Φλουβαστατίνη
17. Βιγκαπατρίνη	40. Λαμοτριγίνη	63. Παντοπραζόλη	86. Φλουοξετίνη
18. Βρωμαζεπάμη	41. Λανσοπραζόλη	64. Πιπερακιλλίνη	87. Φουροσεμίδη
19. Γκαμπαπεντίνη	42. Λικαρβαζεπίνη	65. Πιροξικάμη	88. Χλωροπρομαζίνη
20. Δεξμεδετομιδίνη	43. Λισινοπρίλη	66. Πρεγκαμπαλίνη	89. 10,11-διϋδροξυ-τρανς-10,11-διϋδρο- καρβαμαζεπίνη
21. Δεσεθλαμιοδαρόνη	44. Λοραζεπάμη	67. Πριμιδόνη	90. 10,11-εποξειδίο της καρβαμαζεπίνης
22. Δεσιπραμίνη	45. Λοσαρτάνη	68. Προποφόλη	91. 10-υδροξυκαρβαζεπίνη
23. Διαζεπάμη	46. Μεθαμφεταμίνη	69. Ραμπρίλη	

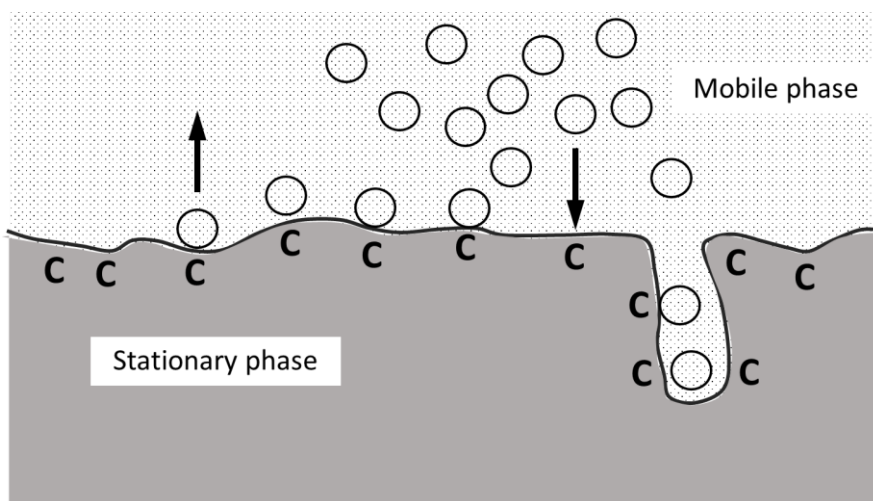
Πίνακας 4: Πίνακας φαρμάκων που ελέγχθηκαν για πιθανές παρεμβολές (υπόμνημα από Πίνακα 3).

1.5. Χρωματογραφία

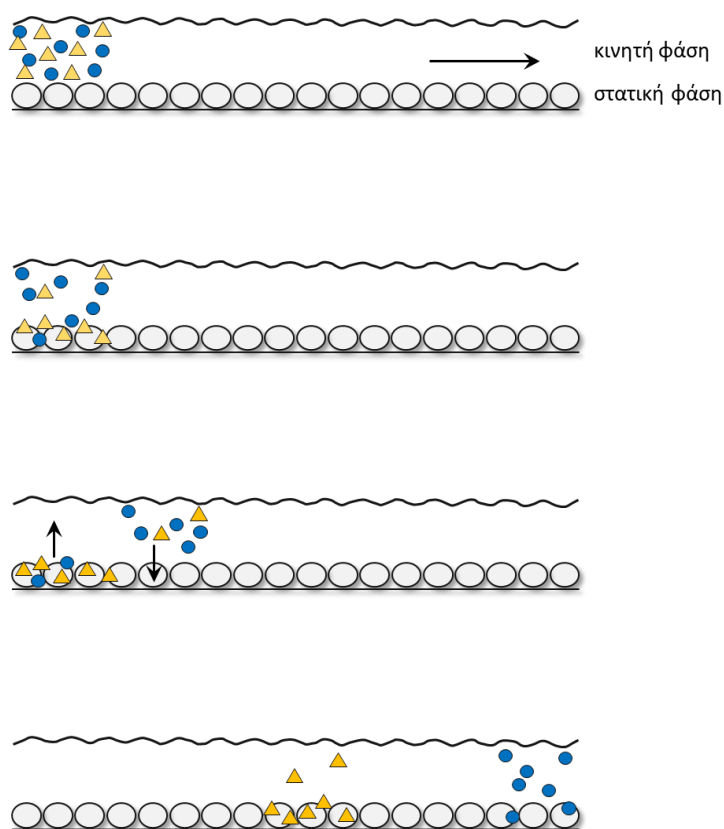
1.5.1. Γενικά

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ανακαλύφθηκε το 1903 από τον Ρώσο Michael Tswett, ο οποίος κατάφερε να διαχωρίσει τις χρωστικές των φυτών, χλωροφύλλη, ξανθοφύλλη και καροτενοειδή και ονόμασε την μέθοδο χρωματογραφία καθώς χρησιμοποίησε την μέθοδο για τον διαχωρισμό αυτών των έγχρωμων ουσιών. Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μια ομάδα αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται για τον ποιοτικό διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός μείγματος. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί στην απομόνωση των συστατικών ενός μείγματος στην φυτοχημεία, χημεία φυσικών προϊόντων, φαρμάκων κ.α.

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτερα στην αναλυτική χημεία και αποτελεί την πιο συχνή μέθοδο διαχωρισμού που χρησιμοποιείται σήμερα. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων – μιας στατικής (static phase) και μίας κινητής φάσης (mobile phase) λόγω του διαφορετικού βαθμού αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις με βάση την φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση (Εικόνα 10). Οι διαφορές των συστατικών ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά συνίστανται στο μέγεθος του μορίου, στην πτητικότητα, στο φορτίο και στην διαλυτότητά τους στις δύο φάσεις. Οι ουσίες που είναι πιο διαλυτές στην κινητή φάση, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με αυτήν με αποτέλεσμα ο χρόνος έκλουσής τους να είναι πιο γρήγορος, δηλαδή μικρότερος σε σχέση με τις ουσίες που έχουν μικρότερη συγγένεια με την κινητή φάση. Αντίθετα, οι ουσίες που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την στατική φάση κατακρατούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αυτή με αποτέλεσμα να κινούνται πιο αργά και ο χρόνος έκλουσής τους να είναι μεγαλύτερος (Εικόνα 11). Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή, πορώδης ή να αποτελείται από μικρά σωματίδια ενεργού επιφανείας και η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια.



Εικόνα 10. Φυσικοχημική βάση χρωματογραφίας (Ανατύπωση από Meyer, 2013)



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση χρωματογραφικού διαχωρισμού (Τροποποιημένη από Meyer, 2013).

Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας ανάλογα με τον τρόπο κατάταξης της με βάση είτε το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιείται, είτε τον μηχανισμό διαχωρισμού:

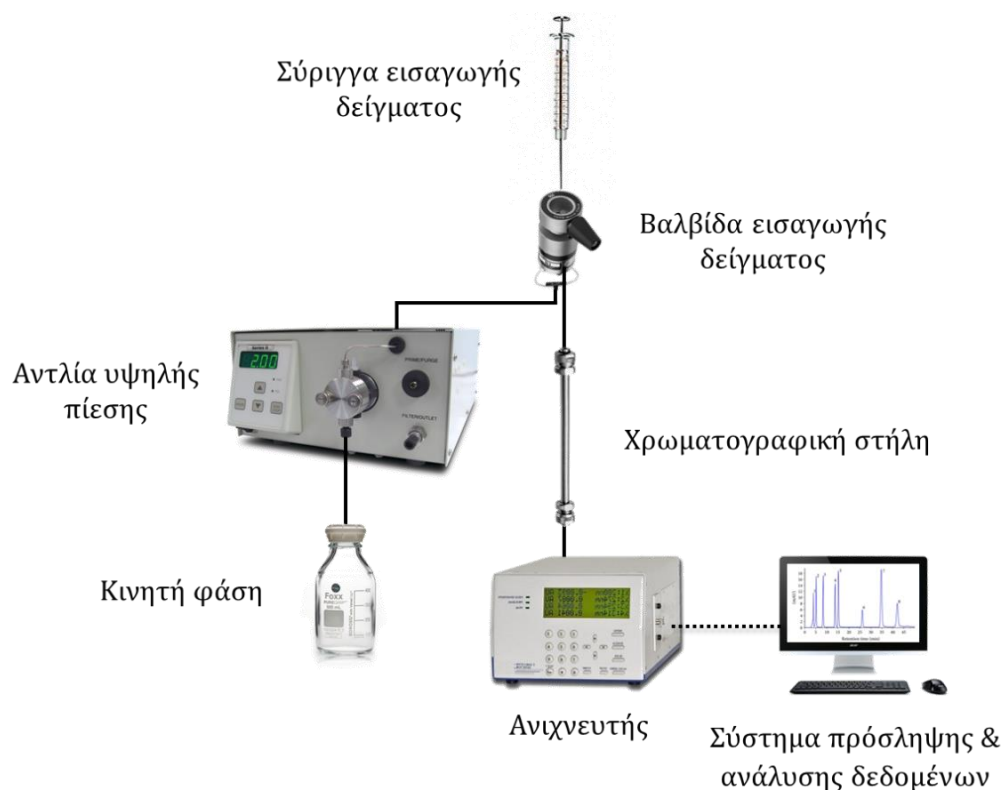
1. Κατάταξη με βάση το χρωματογραφικό σύστημα:
 - Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης διακρίνονται διάφορα είδη χρωματογραφίας:
 - Χρωματογραφία στήλης
 - Χρωματογραφία χάρτου
 - Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)
 - Ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης διακρίνονται σε:
 - Υγρή χρωματογραφία (LC)
 - Αέρια χρωματογραφία (GC)

2. Κατάταξη με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού:
 - Χρωματογραφία προσρόφησης
 - Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
 - Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή μοριακής διήθησης
 - Χρωματογραφία χημικής συγγένειας (affinity)
 - Χρωματογραφία κατανομής

1.5.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια γρήγορη διαδικασία διαχωρισμού ουσιών ενός μείγματος. Η HPLC αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με υψηλή πίεση κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης, με την βοήθεια αντλίας. Η κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης ή μείγμα διαλυτών), ενώ η στατική φάση είναι ένα στερεό, πορώδες υλικό με την μορφή μικρών σωματιδίων (διάμετρος $d \leq 5 \mu\text{m}$) τα οποία είναι τοποθετημένα σε μία στήλη με ανοξείδωτο χάλυβα. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, ο διαχωρισμός να είναι πιο αξιόπιστος και πρακτικά, να μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για τον διαχωρισμό.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών του μείγματος μεταξύ των δύο φάσεων. Στην συνέχεια, τα συστατικά του μείγματος σχηματίζουν ζώνες κατά μήκος της στήλης (Εικόνα 11) και καθώς εξέρχονται από αυτήν, ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή, ο οποίος έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τις διάφορες ουσίες με βάση κάποια φυσικοχημική τους ιδιότητα π.χ. απορρόφηση στο ορατό-υπεριώδες, ο φθορισμός, η αγωγιμότητα, η ικανότητα οξειδοαναγωγής κλπ. Με την σειρά του ο ανιχνευτής, μετατρέπει την φυσικοχημική αυτήν ιδιότητα σε ηλεκτρικό σήμα και το μεταφέρει σε μια συσκευής καταγραφής ή ένα Η/Υ όπου γίνεται η ανάλυση του σήματος (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Διάγραμμα της διάταξης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Ένα τυπικό σύστημα της HPLC περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 12:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος-βαλβίδα (injection valve): περιλαμβάνει το βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής μεταβλητού όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν την χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
2. Διαλύτες: οι διαλύτες αποτελούν την κινητή φάση, μέσω της οποίας γίνεται η μεταφορά των δειγμάτων-μειγμάτων μέσα στο χρωματογραφικό σύστημα.

3. Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου συστήματος με ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
4. Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μείγματος στα επιμέρους συστατικά του. Η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
5. Απαερωτής κενού (degasser): ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
6. Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται με φασματομετρία UV, όπου μετριέται η απορρόφηση του φωτός.

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι:

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV-Vis Detector)
- Ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD)
- Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector)
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
- Φασματογράφοι μάζας (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)
- Ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR)
- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector)
- Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector)

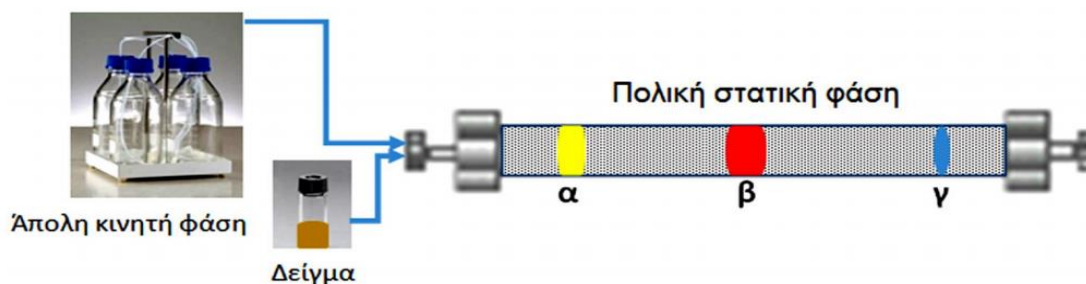
Ανάλογα με την σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής φάσης και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας υψηλής πίεσης:

1. HPLC κανονικής φάσης
2. HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)

HPLC κανονικής φάσης

Σε αυτήν την περίπτωση χρωματογραφίας η στατική φάση αποτελείται από κάποιο πολικό υλικό όπως το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3) και η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας ή και μη πολική και δεν περιλαμβάνεται νερό σε αυτήν. Έτσι, τα συστατικά που μείγματος που είναι πολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση και “καθυστερούν” να εξέλθουν από την χρωματογραφική στήλη. Οι λιγότερο πολικές ενώσεις εκλούνται σε

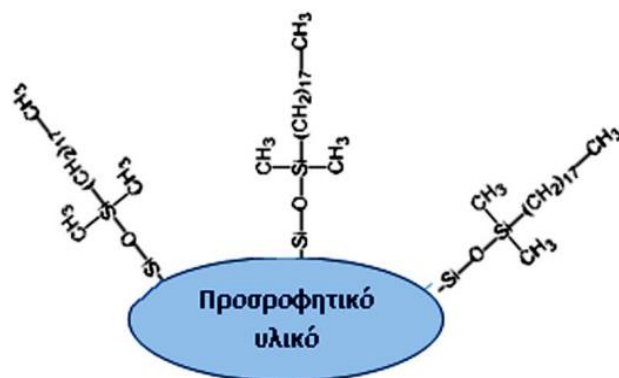
μικρότερο χρόνο σε σχέση με τις πολικές. Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται καθώς και για τον διαχωρισμό ισομερών ουσιών (Εικόνα 13).



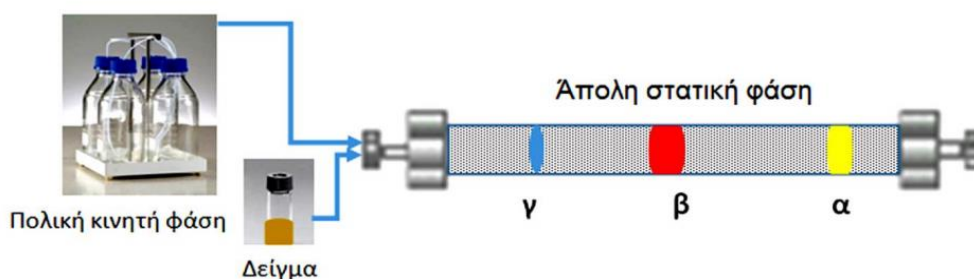
Εικόνα 13: Χρωματογραφικός διαχωρισμός με HPLC κανονικής φάσης μείγματος αποτελούμενο από 3 ενώσεις οι οποίες διαχωρίζονται με αυξανόμενη πολικότητα: κίτρινο > κόκκινο > μπλε (Ανατύπωση από βιβλίο κ. Καλλιπού).

HPLC ανάστροφης φάσης

Σε αυτήν την κατηγορία η στατική φάση είναι μη πολική, ενώ η κινητή φάση είναι πολική. Η στατική φάση τις περισσότερες φορές αποτελείται από σφαιρικά σωματίδια σιλικόνης τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση στην επιφάνεια τους με την πρόσδεση υδρογονανθρακικών αλυσίδων αποτελούμενων, συνήθως, από 8 ή 18 άτομα άνθρακα (Εικόνα 14). Περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RP-HPLC βρίσκουν οι στήλες C₁₈. Ο μηχανισμός είναι παρόμοιος με την εκχύλιση διαφόρων ενώσεων από το νερό σε έναν οργανικό διαλύτη, όπου οι περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις (μη πολικές) εκχυλίζονται εκλεκτικά στην μη πολική οργανική φάση. Οι μη πολικές ενώσεις του μείγματος κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση και καθυστερούν να εξέλθουν από την στήλη, ενώ οι πολικές ενώσεις κατακρατούνται λιγότερο ισχυρά με αποτέλεσμα να εξέρχονται πρώτες σε σειρά έκλουσης (Εικόνα 15). Η HPLC ανάστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού ουσιών για αναλυτικούς σκοπούς.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση στατικής φάσης της RP-HPLC C₁₈ (Ανατύπωση από βιβλίο κ. Καλλιπού).



Εικόνα 15: Χρωματογραφικός διαχωρισμός με HPLC ανάστροφης φάσης μείγματος αποτελούμενο από 3 ενώσεις οι οποίες διαχωρίζονται με αυξανόμενη πολικότητα: μπλε > κόκκινο > κίτρινο (Ανατύπωση από βιβλίο κ. Καλλιπού).

Επιπλέον, στην HPLC χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι έκλουσης:

1. **Ισοκρατική έκλουση (Isocratic elution):** Η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή καθ'όλη την διάρκεια της χρωματογραφίας, χωρίς να μεταβάλλεται η σύσταση της.
2. **Βαθμιαία έκλουση (Gradient elution):** Η σύσταση της κινητής φάσης δεν παραμένει σταθερή, αλλά μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας. Σε αυτήν την περίπτωση απαιτούνται δύο αντλίες. Αυτός ο τρόπος έκλουσης είναι χρήσιμος για μείγματα με μεγάλο εύρος πολικότητας.

1.5.3. Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC

Η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι τα βασικά στοιχεία για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός μείγματος.

Τα κύρια σημεία για την ανάπτυξη της μεθόδου είναι η δειγματοληψία, προετοιμασία δειγμάτων, ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, η ταυτοποίηση, η βαθμονόμηση και η ποσοτικοποίηση (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Τα κύρια βήματα για ανάπτυξη μεθόδου HPLC.

Η ανάπτυξη μιας μεθόδου βασίζεται συνήθως στην υπάρχουσα βιβλιογραφία ή στη βελτίωση υπαρχουσών μεθόδων μετά από τροποποίησή τους. Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την διαδικασία αυτή είναι:

- Κατάλληλος ανιχνευτής
- Η σύσταση της κινητής φάσης
- Το pH της κινητής φάσης
- Η χρωματογραφική στήλη
- Εσωτερικό πρότυπο για τη στήλη
- Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης μέσω του HPLC
- Ο βέλτιστος όγκος έγχυσης των προτύπων και των δειγμάτων
- Η προετοιμασία του δείγματος
- Το εύρος βαθμονόμησης για τα πρότυπα
- Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD)

1.5.4. Εφαρμογές της HPLC στην Κλινική Ανάλυση:

Τα πιο κοινά πεδία εφαρμογών της χρωματογραφίας HPLC στην κλινική ανάλυση είναι:

- Η τοξικολογική ανάλυση. Η HPLC χρησιμοποιείται συχνά στην ιατροδικαστική και στην εγκληματολογική έρευνα και ιδιαίτερα στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων (επιπέδων) ουσιών ή μεταβολιτών τους, ναρκωτικών, δηλητηρίων και φαρμάκων σε τοξικές δόσεις, στα βιολογικά υγρά.
- Η θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων (φαρμακοκινητικός έλεγχος). Ο προσδιορισμός των επιπέδων ενός φαρμάκου στον ορό έχει νόημα στην θεραπευτική παρακολούθηση της επίδρασης ή της συγκέντρωσης αυτού, με στόχο την προσαρμογή μιας μεμονωμένης δόσης του φαρμακευτικού προϊόντος.
- Η ανάλυση κλινικών αναλυτών με διαγνωστικό ενδιαφέρον, για τους οποίους οι φωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού παρουσιάζουν μικρή εκλεκτικότητα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας απλής, ταχείας, ευαίσθητης και αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου για το προσδιορισμό των επιπέδων της λεβετιρακετάμης σε ανθρώπινο ορό αίματος. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού αναπτύχθηκε χρωματογραφική μέθοδος και συγκεκριμένα μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση στο υπεριώδες (HPLC-UV). Η μέθοδος πιστοποιήθηκε ως προς την ευαισθησία, την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα και πραγματοποιήθηκε έλεγχος πιθανών παρεμβολών της λεβετιρακετάμης με άλλα συχνά συγχορηγούμενα φάρμακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Χημικές ενώσεις και αντιδραστήρια

Η προμήθεια της λεβετιρακετάμης πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Tocris Bioscience (Ηνωμένο Βασίλειο). Η προμήθεια της 1-μεθυλοξανθίνης έγινε από την εταιρεία TCI Europe (Βέλγιο).

Το ακετονιτρίλιο (ACN) και η μεθανόλη (MeOH) ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC και η προμήθεια τους έγινε από την VWR Chemicals (Γαλλία). Το δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) και το φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) ήταν αναλυτικής καθαρότητας και αποκτήθηκαν από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Σε όλη την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας HPLC (ειδικής αντίστασης 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$).

Η προμήθεια του λυοφιλοποιημένου ανθρώπινου ορού αίματος έγινε από την ROCHE DIAGNOSTICS (Ελλάδα). Η προμήθεια του λυοφιλοποιημένου ανθρώπινου ορού αίματος ελέγχου των επιπέδων φαρμάκων (Lyphocheck Therapeutic Drug Monitoring Control) έγινε από την εταιρεία Bio-Rad (Ελλάδα).

2.2. Εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες

2.2.1. Συσκευές

- Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελούταν από:
- Χρωματογραφική στήλη Kromasil 100 C_{18} , με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις 250×4,6 mm (μήκος x εσωτερική διάμετρος, Dr Maisch, Γερμανία)
- Προστήλη του αυτού υλικού πληρώσεως διαστάσεων 10×4,6 mm (MZ ANALYSENTECHNIK, Γερμανία)
- Αντλία υψηλής πίεσης τύπου Marathon III (Rigas Labs, Ελλάδα) για την διοχέτευση της κινητής φάσης εντός της χρωματογραφικής στήλης
- Ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (UV-Vis) τύπου FASMA 500 (Rigas Labs, Ελλάδα)
- Σύστημα απαέρωσης (ERC Inc., Ιαπωνία) για την απομάκρυνση του διαλελυμένου αέρα της κινητής φάσης, συνδεδεμένο σε σειρά
- Θερμοστάτη στήλης (Lab Alliance, ΗΠΑ) για την διατήρηση της χρωματογραφικής στήλης σε σταθερή θερμοκρασία
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος τύπου Rheodyne 7012 (USA) με βρόχο όγκου 20 μL

- Διάταξη διήθησης με κενό (Alltech (ΗΠΑ) και τη χρήση φίλτρου με μέγεθος πόρων 0,2 μm.
- Η εξάτμιση των δειγμάτων επιτεύχθηκε με την χρήση της συσκευής συμπύκνωσης δειγμάτων TECHNE (Sample Concentrator, Ηνωμένο Βασίλειο).
- Ανακινητής δειγμάτων (vortex)

2.2.2. Χρωματογραφικές Συνθήκες

- Σύσταση κινητής φάσης: μείγμα $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 25mM και ακετονιτριλίου σε αναλογία όγκων 955/45, pH=4,5.
- Θερμοκρασία στήλης 40°C
- Ταχύτητα κινητής φάσης 1,2 mL/min
- Μήκος κύματος ανίχνευσης 205 nm

Η πρόσληψη και ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων έγινε με την χρήση του λογισμικού Clarity Lite (Τσεχία).

2.3. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Πυκνά διαλύματα (stock solutions) λεβετιρακετάμης (1mg/mL) και ΕΠ (1mg/mL) παρασκευάστηκαν σε διάλυμα μεθανόλης 100%. Το πυκνό διάλυμα του ΕΠ στην συνέχεια αραιώθηκε με μεθανόλη 100% σε συγκέντρωση 4μg/mL. Τα διαλύματα αυτά αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας (working solutions) σε συγκεντρώσεις 25, 50, 75, 100, 200, 300, 500 και 750 μg/mL τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

Τα διαλύματα βαθμονόμησης (matrix calibrators) παρασκευάστηκαν με την προσθήκη του αντίστοιχου διαλύματος εργασίας σε πρότυπο ορό της εταιρείας ROCHE DIAGNOSTICS ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 και 100μg/mL. Με τον ίδιο τρόπο, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) σε συγκεντρώσεις 7,5, 30,0 και 75,0μg/mL.

2.4. Προκατεργασία δειγμάτων ορού

250μL του διαλύματος του ΕΠ (4μg/ml) προστέθηκαν στάγδην σε δείγματα ορού όγκου 100μL που προέρχονταν από ασθενείς υπό αγωγή με λεβετιρακετάμη καθώς και σε διαλύματα βαθμονόμησης και δείγματα ποιοτικού ελέγχου.

Τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά (60'), αφέθηκαν σε ηρεμία (5') και στην συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm, 10', 4°C). Έπειτα, 150μL από το υπερκείμενο εξατμίστηκαν στους 50°C, υπό ήπιο ρεύμα αζώτου καθαρότητας 99,999%. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 150μL κινητής φάσης. Τέλος, 20μL από το υπερκείμενο εγχύθηκαν στην χρωματογραφική στήλη.

2.5. Πιστοποίηση της μεθόδου

Η επίδοση της μεθόδου ελέγχθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Υπηρεσίας Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) και αφορούσε στον έλεγχο της γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή, της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας των μετρήσεων, της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου, του ελέγχου καταλοίπων (carry-over) και της σταθερότητας των δειγμάτων σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης (European Medicines Agency, EMA <https://www.ema.europa.eu/en>; τελευταία επίσκεψη 23/3/2021).

2.6. Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης και εύρος ανάλυσης

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση της γραμμικής σχέσης μεταξύ του εμβαδού της κορυφής της λεβετιρακετάμης προς το εμβαδόν του ΕΠ (Ελεβετιρακετάμης / ΕΠ) και της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα δείγματα. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του EMA, απαιτούνται τουλάχιστον έξι δείγματα βαθμονόμησης διαφορετικών συγκεντρώσεων με εύρος τιμών το οποίο να υπερκαλύπτει το θεραπευτικό εύρος.

Τα δείγματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων φαρμάκου σε πρότυπο λυοφιλοποιημένο μείγμα ανθρώπινου ορού της εταιρείας ROCHE DIAGNOSTICS ο οποίος, ανασυστήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (blank matrix). Ο ορός αυτός είχε ελεγχθεί για τυχόν παρουσία μολυσματικών παραγόντων. Κατά αυτό τον τρόπο, παρασκευάστηκαν έξι δείγματα βαθμονόμησης συγκεντρώσεων 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 και 100μg/mL τα οποία, αναλύθηκαν χρωματογραφικά εις διπλούν.

Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης. Η καταλληλότητα της καμπύλης καθορίστηκε, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, από τις τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης (regression coefficient - R^2), το σημείο τομής με τον άξονα των ψ (y-intercept) και από τον επαναυπολογισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων βαθμονόμησης μέσω της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης (<https://www.ema.europa.eu/en>).

2.7. Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα

Τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου (quality control samples, QC) με χαμηλή (7,5μg/mL), μέση (30,0μg/mL) και υψηλή (75,0μg/mL) συγκέντρωση λεβητιρακετάμης, παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη των αντιστοιχών διαλυμάτων εργασίας λεβητιρακετάμης σε πρότυπο μείγμα ανθρώπινου ορού της εταιρείας ROCHE DIAGNOSTICS. Στην παρούσα μελέτη, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα εντός σειράς (intra-day) ελέγχθηκε με πέντε αντίγραφα καθενός από τα τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα μεταξύ σειρών (inter-day) ελέγχθηκε με ένα αντίγραφο καθενός από τα τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου, που αναλύθηκε σε πέντε διαφορετικές ημέρες. Η συγκέντρωση κάθε δείγματος ποιοτικού ελέγχου υπολογίστηκε εκ νέου από την εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης. Η ακρίβεια της μεθόδου ορίστηκε ως το επί της εκατό ποσοστό της μετρηθείσας έναντι της προστεθείσας, γνωστής, συγκέντρωσης κάθε δείγματος.

$$\text{Ακρίβεια} = \frac{\text{Μετρηθείσα συγκέντρωση}}{\text{Γνωστή συγκέντρωση}} \times 100$$

Η εκτροπή από την επαναληψιμότητα (imprecision) υπολογίστηκε από τον εκατοστιαίο συντελεστή διακύμανσης % (% Coefficient of variation - CV%) βάσει του τύπου:

$$\text{CV}\% = \frac{\text{Τυπική απόκλιση}}{\text{Μέση τιμή}} \times 100$$

2.8. Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)

Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού της λεβητιρακετάμης προσδιορίστηκε η ελάχιστη ποσότητα της ουσίας η οποία, κατόπιν επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, εμφάνιζε ακρίβεια μεταξύ 85-115% και διακύμανση μικρότερη του 15%.

Το όριο ανιχνευσιμότητας της μεθόδου καθορίστηκε ως η ελάχιστη ποσότητα ουσίας που μπορούσε να προσδιορισθεί σε δείγμα το οποίο έχει υποστεί διαδοχικές αραιώσεις και το σήμα της έναντι του σήματος του θορύβου είχε λόγο 3:1 (signal/noise ration=3).

Αρχικά, ελήφθη χρωματογράφημα μακράς διάρκειας το οποίο, δεν περιείχε την ουσία και στο οποίο, προσδιορίστηκε ο χρωματογραφικός θόρυβος. Έπειτα, ελήφθησαν χρωματογραφήματα ($n=3$) με την ύπαρξη της ουσίας προκειμένου να προσδιοριστεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του σήματος της ουσίας.

2.9. Σταθερότητα δειγμάτων – Stability

Η εκτίμηση της σταθερότητας των δειγμάτων γίνεται με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι σε κάθε στάδιο κατά την διάρκεια προπαρασκευής των δειγμάτων και ανάλυση των δειγμάτων, οι συνθήκες αποθήκευσης δεν επηρεάζουν την συγκέντρωση της ουσίας. Η απόκλιση από την ονομαστική συγκέντρωση της ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 15\%$ (<https://www.ema.europa.eu/en>).

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε:

- Η σταθερότητα πυκνών διαλυμάτων (stock solutions) της λεβητιρακετάμης και του ΕΠ στους -20°C για ένα μήνα
- Η σταθερότητα των διαλυμάτων εργασίας (working solutions) στους -20°C για ένα μήνα
- Η σταθερότητα της λεβητιρακετάμης στον ορό του αίματος στους -20°C για ένα μήνα, μετά από πέντε κύκλους ψύξης-απόψυξης
- Η σταθερότητα επεξεργασμένων δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε 24 ώρες.

2.10. Δείγματα ασθενών

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από ασθενείς υπό αγωγή με λεβητιρακετάμη. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε σε σωληνάρια τύπου BDSSTII (BD, Plymouth, UK). Ο ορός που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη προήλθε από δείγματα αίματος που φυγοκεντρήθηκαν σε 3500 rpm για 10 λεπτά. Τα δείγματα ορού αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

2.11. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SPSS (έκδοση 26.0). Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης με επίπεδο σημαντικότητας σημαντικότητας $p < 0,05$.

Οι διάφορες μετρήσεις των συγκεντρώσεων εκφράστηκαν με τις μέσες τιμές, τυπική απόκλιση και τον συντελεστή διακύμανσης (CV%).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επιλογή κινητής φάσης

Ελέγχθηκαν δύο ρυθμιστικά άλατα με διαφορετικές αναλογίες όγκων, για την εύρεση του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, με σκοπό να διαχωρίζονται επαρκώς οι ουσίες του πρότυπου λυοφιλοποιημένου ορού καθώς και η λεβετιρακετάμη. Χρησιμοποιήθηκε το NaH_2PO_4 25mM σε αναλογία όγκων 94/6 (6% ακετονιτρίλιο) και $\text{pH} = 3,2$. Επίσης, δοκιμάστηκε και σε αναλογία 95/5 με $\text{pH} = 5,6$ καθώς και σε αναλογία 955/45 με $\text{pH} = 4,5$. Το δεύτερο αλάτι που δοκιμάστηκε ήταν το CH_3COOH σε αναλογία όγκων 95/5. Το καταλληλότερο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της λεβετιρακετάμης και του ΕΠ από όλες τις ενδογενείς ουσίες ήταν το NaH_2PO_4 25mM σε αναλογία όγκων 955/45 $\text{pH} = 4,5$ και είχε resolution (συντελεστής διάλυσης) 2,23 μεταξύ παρεμβολών (matrix) και ΕΠ.

3.2. Επιλογή εσωτερικού προτύπου

Δύο ουσίες ελέγχθηκαν, με βάση τον χημικό τους τύπο, για την πιθανότητα χρησιμοποίησής τους ως εσωτερικό πρότυπο, η 1-μεθυλοξανθίνη και το 1,3-διμεθυλουρικό οξύ.

Από αυτές τις ουσίες, επιλέχθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η 1-μεθυλοξανθίνη, καθώς παρουσίασε τον καλύτερο διαχωρισμό σε σχέση με ουσίες του βιολογικού υποστρώματος (matrix) του ορού, των χρωματογραφικών κορυφών του ορού αίματος ελέγχου των επιπέδων φαρμάκων (BIORAD-Lyrfochek) και των άλλων φαρμάκων που ελέγχθηκαν.

3.3. Επιλογή μήκους κύματος

Το μήκος κύματος ανίχνευσης της λεβετιρακετάμης επιλέχθηκε στα 205nm καθώς στην συγκεκριμένη συχνότητα η λεβετιρακετάμη εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση (Engelbrecht *et al.*, 2017).

3.4. Πιστοποίηση της μεθόδου

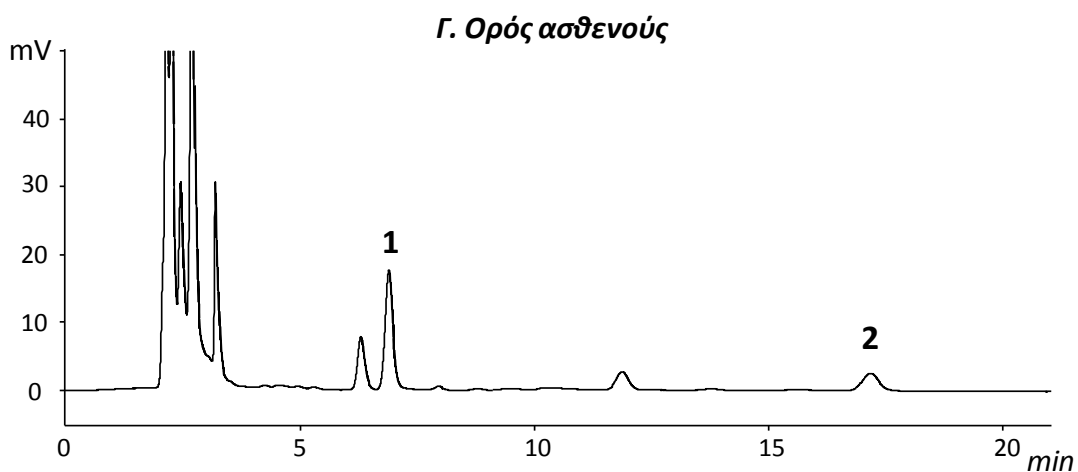
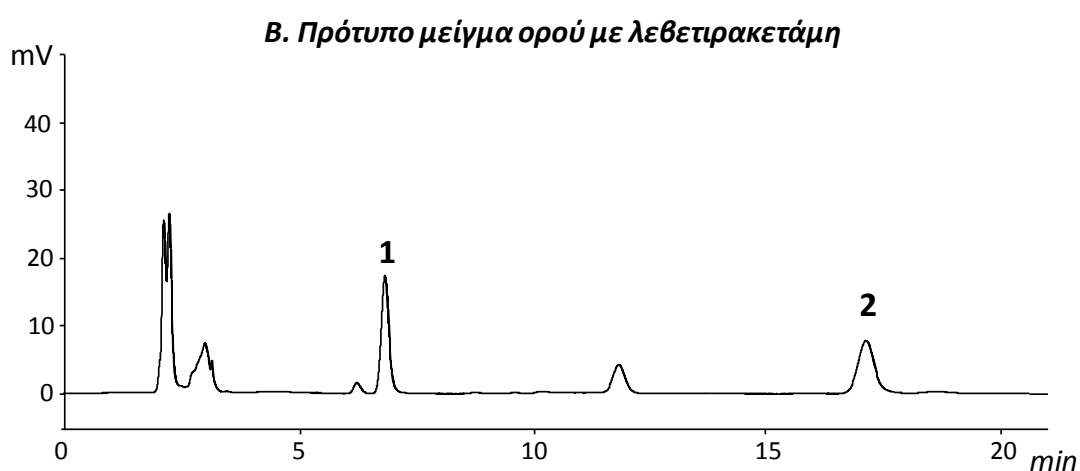
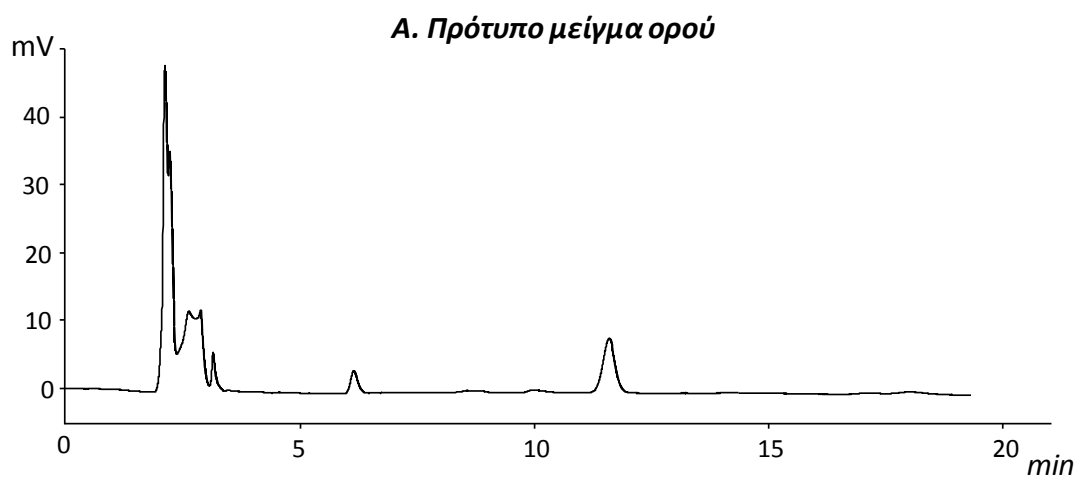
3.4.1. Ειδικότητα

Η ειδικότητα της μεθόδου εξακριβώθηκε με την ανάλυση δείγματος λυοφιλοποιημένου μείγματος ανθρώπινου ορού ο οποίος ανασυστάθηκε με απιονισμένο νερό σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (ROCHE DIAGNOSTICS ACTIVATOR).

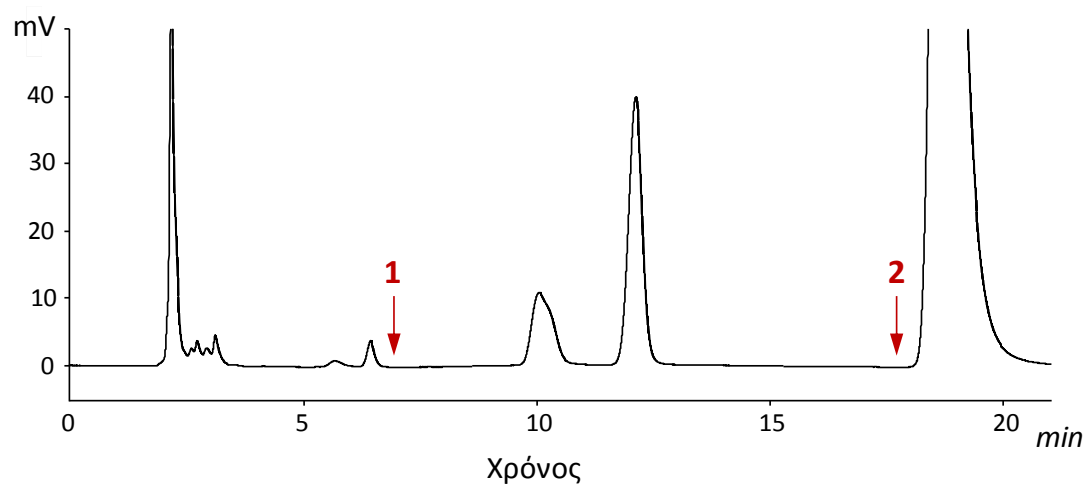
Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα πρότυπου ορού (Α), δείγμα του προηγούμενου ορού στο οποίο προστέθηκαν 50,0 µg/mL λεβετιρακετάμης και ΕΠ (spiked sample, Β) και ορού ασθενούς υπό θεραπεία με λεβετιρακετάμη που συλλέχθηκε λίγο πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης (trough, Γ).

Επίσης, ελέγχθηκαν για τυχόν χρωματογραφικές παρεμβολές, ο πρότυπος ορός ελέγχου επιπέδων φαρμάκων την εταιρείας BIORAD Lyrhocheck, ο οποίος περιέχει πάνω από 40 φάρμακα και ενδογενείς ουσίες (Εικόνα 18, Πίνακας 5). Επιπλέον, αναλύθηκαν για τυχόν παρεμβολές, πρότυπα διαλύματα από εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα φαρμάκων αντιβιοτικά, ΜΣΑΦ, αντιλιπιδαιμικά, διουρητικά, βενζοδιαζεπίνες, αντιψυχωσικά, αντικαταθλιπτικά και αντιεπιληπτικά τα οποία δεν περιέχονταν στον ορό Lyrhocheck (Πίνακας 6).

Η λεβετιρακετάμη και το ΕΠ ανιχνεύθηκαν στα $17,17 \pm 0,22$ λεπτά και $6,86 \pm 0,12$ λεπτά, αντίστοιχα (Εικόνα 17Β, $n=33$). Δεν παρατηρήθηκε καμία χρωματογραφική παρεμβολή μεταξύ του ΕΠ, της λεβετιρακετάμης, ενδογενούς ουσίας, του ορού ελέγχου Lyrhocheck και των φαρμάκων που ελέγχθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου ελέγχθηκαν δύο δείγματα ασθενών, στο πλαίσιο της τακτικής παρακολούθησής τους στα Εξωτερικά Ιατρεία της Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, τα οποία παραχωρήθηκαν από τον θεράποντα ιατρό τους. Τα αποτελέσματα του πιστοποιημένου αναλυτή Cobas Integra 400 plus, ο οποίος χρησιμοποιεί την μέθοδο του πολωμένου ανοσοφθορισμού, βρέθηκαν να είναι για τον ασθενή 1 $10,0$ µg/ml και για τον ασθενή 2 $10,3$ µg/ml ενώ τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με την παρούσα αναπτυχθείσα μέθοδο βρέθηκαν να είναι για τον ασθενή 1 $9,58$ µg/ml και για τον ασθενή 2 $11,2$ µg/ml. Συνεπώς, η απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων χρησιμοποιώντας τις δύο μεθόδους ήταν $<10\%$.



Εικόνα 17: Αντιπροσωπευτικά Χρόνος χρωματογραφήματα HPLC: (A) Πρότυπο μείγμα ορού. (B) πρότυπο μείγμα ορού στον οποίο προστέθηκαν λεβητιρακετάμη (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και το εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ). (Γ) Ορός ασθενούς υπό αγωγή με λεβητιρακετάμη (2x500mg ημερησίως). Συγκέντρωση λεβητιρακετάμης στον ορό του ασθενούς 9,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 1=ΕΠ (1-μεθυλοξανθίνη), 2=λεβητιρακετάμη.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα HPLC του BIORAD–Lyphocheck TDM που περιέχει 40 δραστικές ουσίες των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Πίνακας 5). Δεν παρατηρούνται χρωματογραφικές παρεμβολές στα χρονικά σημεία έκλυσης του ΕΠ (1) και της λεβετιρακετάμης (2).

Πίνακας 5: Δραστικές ουσίες των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων οι οποίες περιέχονται στο πρότυπο ορό ελέγχου επιπέδων φαρμάκων της εταιρείας BIORAD (Lyphochek® Therapeutic Drug Monitoring Control)

Κατηγορίες φαρμάκων				
Αντικαταθλιπτικά	Αντιβιοτικά	Αντιαρρυθμικά	Αντιεπιληπτικά	Αντιφλεγμονώδη
Αμιτριπυλίνη	Αμικασίνη	Αμιωδαρόνη	Καρβαμαζεπίνη	Κορτιζόλη
Ιμιπραμίνη	Χλωραμφαινικόνη	Διγοξίνη	Αιθοσουξιμίδη	Σαλικυλικό
Τρικυκλικά Αντικαταθλιπτικά (TCA)	Γενταμικίνη	N-ακετυλοπροκαϊναμίδη (NAPA)	Φαινοβαρβιτάλη	Ανοσοκατασταλτικά
Δεσιπραμίνη	Νετιλμικίνη	Δισοπυραμίδα	Βαλπροϊκό οξύ	Κυκλοσπορίνη
Αντιψυχωσικά	Τομπραμυκίνη	Λιδοκαΐνη	Φαινυτοΐνη	Μεθοτρεξάτη
Αλοπεριδόλη	Βανκομυκίνη	Φλεκαϊνίδα	Πριμιδόνη	Βρογχοδιασταλτικά
Λίθιο	Διεγερτικά	Προκαϊναμίδη		Θεοφυλλίνη
Αναλγητικά	Καφεΐνη	Προπρανολόλη	Ορμόνες	
Ακεταμινοφαΐνη		Κινιδίνη	T3	TSH
			T4	Οιστριόλη

Πίνακας 6: Κατηγορίες και χρόνος κατακράτησης φαρμάκων που ελέγχθηκαν για χρωματογραφικές παρεμβολές με τη λεβετιρακετάμη (χρόνος κατακράτησης λεβετιρακετάμης 17,17±0,22 min) ή με το ΕΠ (χρόνος κατακράτησης ΕΠ 6,86±0,12 min).

Κατηγορία Φαρμάκου	Φάρμακο	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)
Εσωτερικό πρότυπο	1-μεθυλοξανθίνη	6,86
Αντιεπιληπτικά	Λεβετιρακετάμη	17,17
	Λακοσαμίδη	ΜΑ
	Ρουφιναμίδη	ΜΑ
	Βιγαπατρίνη	ΜΑ
	Τοπιραμάτη	ΜΑ
	Γκαμπαπεντίνη	12,00
	Ζονισαμίδη	ΜΑ
	Λαμοτριγίνη	ΜΑ
	Λικαρβαζεπίνη	ΜΑ
	Οξυκαρβαζεπίνη	ΜΑ
	Πρεγκαπαλίνη	12,21
Αντιψυχωσικά	Κλοζαπίνη	ΜΑ
	Νορ-κλοζαπίνη	ΜΑ
	Ολανζαπίνη	ΜΑ
	Χλωροπρομαζίνη	ΜΑ
	Αριπιπραζόλη	ΜΑ
	Παλιπεριδόνη	ΜΑ
	Κουετιαπίνη	ΜΑ
	Ρισπεριδόνη	ΜΑ
Αντικαταθλιπτικά	Φλουοξετίνη	ΜΑ
	Σιταλοπράμη	ΜΑ
	Σερτραλίνη	13,52
Αγχολυτικό	Κλοβαζάμη	ΜΑ
Αντιλιπιδαιμικό	Ατορβαστατίνη	ΜΑ
Αντιβιοτικά	Αμοξικιλίνη+ Κλαβουλανικό	7,40

Βενζοδιαζεπίνες	Λοραζεπάμη	MA
	Βρωμαζεπάμη	MA
	Αλπραζολάμη	MA
Διουρητικό	Φουροσεμίδη	MA
Αντιόξινο (Αναστολέας αντλίας H⁺)	Λανσοπραζόλη	MA
Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη	Πιροξικάμη	MA
	Μελοξικάμη	MA

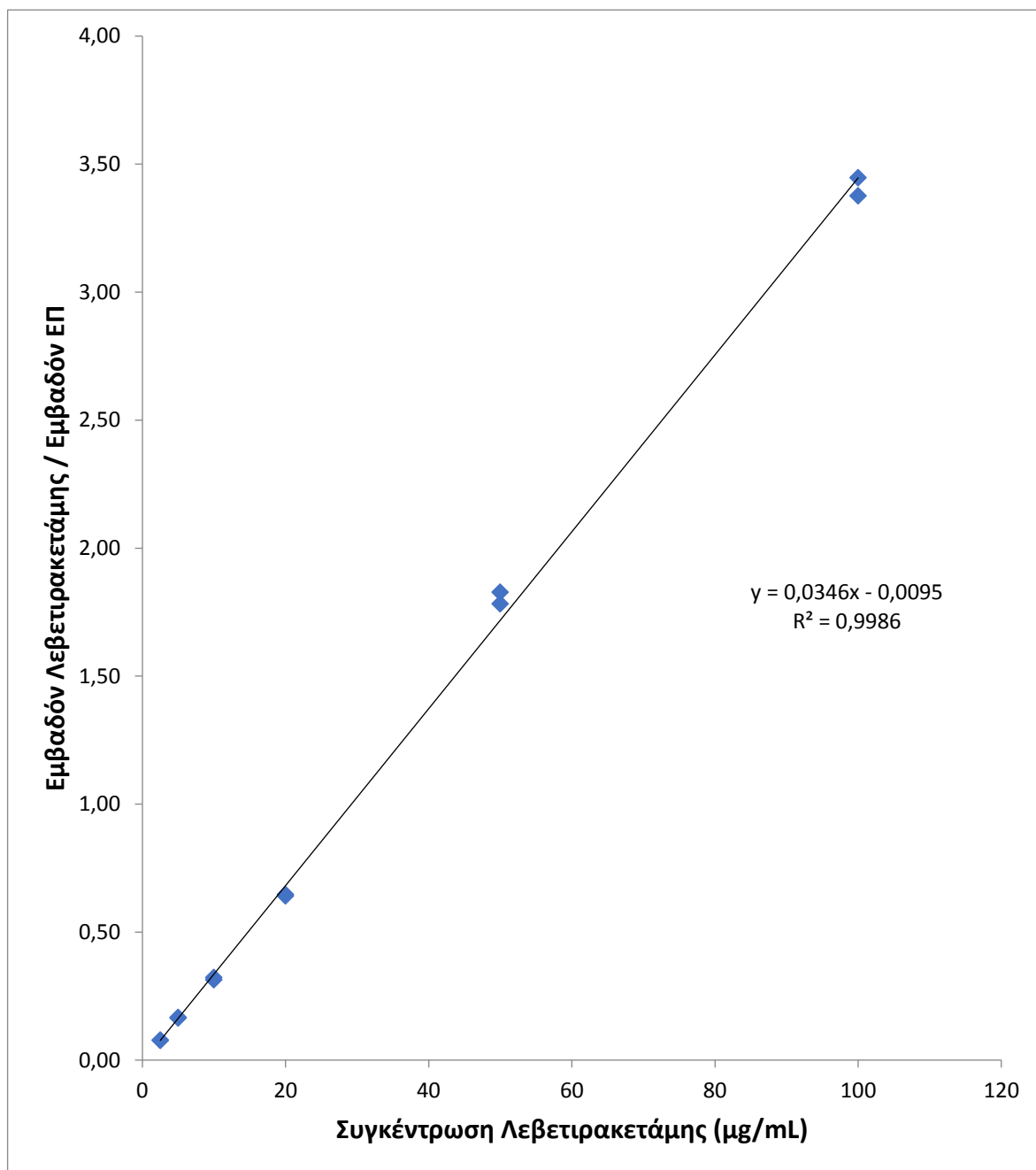
MA: Μη ανιχνεύσιμο υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε μέχρι το 21^ο λεπτό.

3.4.2. Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης

Η καμπύλη βαθμονόμησης της λεβετιρακετάμης παρουσίασε γραμμικότητα στο εύρος συγκεντρώσεων 2,5 έως 100,0μg/mL και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y=(0,0346\pm 0,0004)x-(0,0095\pm 0,019)$$

Το σημείο τομής με τον άξονα των ψ δεν διέφερε σημαντικά από το μηδέν (p=0,615) (Εικόνα 19). Ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης (R²) ήταν 0,9986 υποδηλώνοντας εξαιρετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων βαθμονόμησης και της απόκρισης του ανιχνευτή στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.



Εικόνα 19: Καμπύλη βαθμονόμησης της λεβετιρακετάμης

Η συγκέντρωση των δειγμάτων βαθμονόμησης υπολογίσθηκε εκ νέου σύμφωνα με τις οδηγίες που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων χρησιμοποιώντας την προαναφερθείσα εξίσωση. Η απόκλιση των επαναυπολογισμών από τις πραγματικές συγκεντρώσεις δεν υπερέβη το 5,53% (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των δειγμάτων βαθμονόμησης της λεβητρακετάμης (n=2).

Συγκέντρωση διαλύματος ορού βαθμονόμησης (µg/mL)	Μέση μετρηθείσα συγκέντρωση (µg/mL)	CV (%)	Ακρίβεια(%)
2,50	2,52	1,07	100,85
5,00	5,05	0,73	101,01
10,00	9,47	2,01	94,70
20,00	18,89	0,64	94,47
50,00	52,45	1,75	104,89
100,00	98,88	1,45	98,88

3.4.3. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου για δείγματα εντός σειράς (intra-day, n=5) και μεταξύ των σειρών (inter-day, n=5) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Η ακρίβεια της μεθόδου κυμάνθηκε από 92,80 έως 105,68% και η επαναληψιμότητα, με βάση τον συντελεστή διακύμανσης, από 1,57 έως 9,01%.

Πίνακας 8: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα εντός και μεταξύ των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου.

Συγκέντρωση (µg/mL)		CV%	Accuracy%
Προσθεθείσα	Μέση μετρηθείσα		
Εντός σειράς (intra-day, n=5)			
7,50	7,93	4,26	105,68
30,00	29,17	9,01	97,25
75,00	71,18	1,95	94,91
Μεταξύ σειρών (inter-day, n=5)			
7,50	7,32	5,95	97,65
30,00	27,84	4,46	92,80
75,00	70,55	1,57	94,07

3.4.4. Ανάκτηση

Η ανάκτηση της λεβητιρακετάμης από τα δείγματα ορού για συγκέντρωση 7,5μg/mL (v=9) ήταν $95,40 \pm 4,63\%$, για συγκέντρωση 30,0μg/mL (v=9) ήταν $95,13 \pm 5,75\%$ και για συγκέντρωση 75,0μg/mL (v=9) ήταν $95,83 \pm 4,43$. Ο μέσος όρος ανάκτησης του ΕΠ ήταν $94,14 \pm 3,38\%$ (n=27).

3.4.5. Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)

Το ελάχιστο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) ήταν 2,50μg/mL, με ακρίβεια 110,80% και συντελεστή διακύμανσης (CV%) 9,64% (v=5). Το κατώτατο όριο ανιχνευσιμότητας (LOD) ορίστηκε στο τριπλάσιο του λόγου σήματος/θόρυβο και ήταν $0,212\mu\text{g/mL} \pm 0,027$ (v=3).

3.4.6. Έλεγχος καταλοίπων (carry-over)

Ο έλεγχος καταλοίπων πραγματοποιήθηκε για το ΕΠ και για το μείγμα πρότυπου ορού της λεβητιρακετάμης. Σύμφωνα με το EMA, πραγματοποιείται χρωματογραφία τυφλού δείγματος αμέσως μετά από δείγμα υψηλής συγκέντρωσης ή δείγμα πρότυπου ορού βαθμονόμησης συγκέντρωσης πάνω από την τιμή LLOQ. Η τιμή του ΕΠ δεν πρέπει να έχει απόκλιση πάνω από 5% της τιμής LLOQ και το μείγμα πρότυπου ορού λεβητιρακετάμης δεν πρέπει να έχει απόκλιση πάνω από 20% της τιμής LLOQ (<https://www.ema.europa.eu/en>). Στην παρούσα μελέτη, ο έλεγχος καταλοίπων για το ΕΠ υπολογίστηκε στο 0,54%, που σημαίνει ότι είναι κάτω από το 5% της τιμής LLOQ και για το μείγμα πρότυπου ορού λεβητιρακετάμης υπολογίστηκε στο 0,27%, δηλαδή κάτω από τη τιμή LLOQ.

3.4.7. Σταθερότητα των δειγμάτων

➤ Σταθερότητα των πυκνών διαλυμάτων (stock solutions) στους -20°C

Η σταθερότητα του πυκνού διαλύματος της λεβητιρακετάμης σε μεθανόλη, μετά από παραμονή ενός μηνός στους -20°C, ελέγχθηκε με την σύγκριση των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών πριν και μετά την παραμονή για διάστημα ενός μηνός στην κατάψυξη. Ο έλεγχος έγινε μετά από αραιώση του αρχικού διαλύματος συγκέντρωσης 1mg/mL σε 100μg/mL. Η σύγκριση των χρωματογραφικών εμβαδών έδειξε ως αποτέλεσμα 95,46% το οποίο υποδηλώνει τη σταθερότητα της ουσίας στις προαναφερθείσες συνθήκες. (Πίνακας 9).

➤ Σταθερότητα του ΕΠ

Με την ίδια διαδικασία ελέγχθηκε και η σταθερότητα αποθήκευσης του μεθανολικού διαλύματος του ΕΠ 1mg/mL. Ο έλεγχος έγινε μετά από αραιώση του πυκνού διαλύματος σε συγκέντρωση 4μg/mL. Η σύγκριση των χρωματογραφικών εμβαδών έδειξε ως αποτέλεσμα ότι το αρχικό διάλυμα παρέμενε σταθερό έως τρεις εβδομάδες αποθήκευσης σε ποσοστό 100%. Σε περαιτέρω έλεγχο, που έγινε αμέσως μετά την 4^η εβδομάδα αποθήκευσης, παρατηρήθηκε διάσπαση σε ποσοστό 21% (Πίνακας 9).

➤ Σταθερότητα διαλυμάτων εργασίας (working solutions) στους -20°C

Η σταθερότητα των διαλυμάτων εργασίας ελέγχθηκε για παραμονή ενός μηνός στους -20°C. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν δύο διαλύματα εργασίας σε συγκεντρώσεις λεβητιρακετάμης 25μg/mL και 200μg/mL με σύγκριση των εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών πριν και μετά την κατάψυξη. Η σύγκριση των χρωματογραφικών εμβαδών έδειξε ως αποτέλεσμα ποσοστά 94,4% και 90,59%, αντίστοιχα (v=3) (Πίνακας 9).

➤ Σταθερότητα δειγμάτων πρότυπου ορού αίματος στους -20°C

Η σταθερότητα των δειγμάτων πρότυπου ορού αίματος με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις λεβητιρακετάμης 7,50μg/mL και 75μg/mL, ελέγχθηκε μετά από παραμονή τους στους -20°C για την διάρκεια ενός μήνα. Έγινε επεξεργασία των δειγμάτων και υπολογισμός των συγκεντρώσεων βάση της πρότυπης καμπύλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σταθερότητα 100,13% και 91,50% για τις συγκεντρώσεις 7,50μg/mL και 75μg/mL, αντίστοιχα (Πίνακας 9).

➤ Σταθερότητα επεξεργασμένων δειγμάτων ορού αίματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Παρασκευάστηκαν “φρέσκα” διαλύματα πρότυπου ορού αίματος με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις λεβητιρακετάμης 7,50μg/mL και 75μg/mL. Τα διαλύματα εκχυλίστηκαν, εξατμίστηκαν και ανασυστάθηκαν με την ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως. Τα ανασυσταμένα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και στην συνέχεια, αναλύθηκαν χρωματογραφικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν 108,26% και 95,22% σταθερότητα για τις συγκεντρώσεις 7,50μg/mL και 75μg/mL, αντίστοιχα (Πίνακας 10).

Πίνακας 9: Ποσοστά σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων της λεβετιρακετάμης και του ΕΠ στους -20°C για διάστημα ενός μηνός (v=3).

Συγκεντρώσεις (µg/mL)	Πυκνά διαλύματα λεβετιρακετάμης	Διαλύματα εργασίας λεβετιρακετάμης**	ΕΠ
	%Ποσοστό σταθερότητας	%Ποσοστό σταθερότητας	
100,0*	95,46% ± 5,38	90,56% ± 2,21***	-
25,0	-	94,40% ± 4,80	-
4,0*	-	-	100% ± 3,57****

*Αραίωση από μεθανολικό διάλυμα 1 mg/mL, **υδατικά διαλύματα, ***αραίωση από διάλυμα 500 µg/mL, ****σταθερότητα για 3 εβδομάδες

Πίνακας 10: Ποσοστά σταθερότητας δειγμάτων πρότυπου ορού αίματος (v=3).

Προσθεθείσα συγκέντρωση (µg/mL)	Αποθήκευση στους -20°C (1 μήνας)		Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (24 ώρες)*	
	Μετρηθείσα συγκέντρωση	Ποσοστό σταθερότητας %	Μετρηθείσα συγκέντρωση	Ποσοστό σταθερότητας %
75,0	68,63±0,16	91,35%±0,22	71,42±3,27	95,22% ±4,37
7,5	7,51±0,43	100,7%±5,75	8,12±0,02	108,20%±0,28

*δείγματα κατόπιν επεξεργασίας

Πίνακας 11: Ποσοστά σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων εργασίας λεβετιρακετάμης στους 4°C για διάστημα μίας εβδομάδας (v=3).

Συγκεντρώσεις (µg/mL)	%Ποσοστό σταθερότητας
100,0*	102,76±4,10
25,0	102,64±1,17

*Αραίωση από διάλυμα 500 µg/mL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια γρήγορη, εύκολη και χαμηλού κόστους μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων λεβετιρακετάμης σε ανθρώπινο ορό. Η ακριβής μέθοδος HPLC-UV εφαρμόστηκε σε δείγματα λυοφιλοποιημένου ανθρώπινου ορού αίματος και στόχος ήταν η εφαρμογή της στην κλινική πράξη ως εξέταση ρουτίνας. Μια σημαντική προϋπόθεση για την παρακολούθηση των επιπέδων ενός φαρμάκου στην θεραπεία του ασθενούς (TDM), στο πλαίσιο ενός κλινικού εργαστηρίου, αποτελεί η ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων με απλές χρωματογραφικές συνθήκες, μικρό χρόνο ανάλυσης δειγμάτων και απλή χρήση εξοπλισμού εργαστηρίου. Στην συγκεκριμένη μελέτη, η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει ισοκρατική έκλυση των ουσιών προς μελέτη, την ανίχνευσή τους στο υπεριώδες και επεξεργασία δειγμάτων λυοφιλοποιημένου ανθρώπινου ορού αίματος με κατακρήμνιση πρωτεϊνών με μεθανόλη. Με τη μέθοδο αυτή, ο προσδιορισμός των επιπέδων της λεβετιρακετάμης είναι απλούστερος σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως το LC-MS/MS, όπου απαιτούνται εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμός, συνεπάγοντας υψηλό κόστος για ένα κλινικό εργαστήριο.

Η εξαιρετική ειδικότητα και αξιοπιστία της μεθόδου υποδηλώνεται από την ανάλυση δειγμάτων ορού τα οποία περιείχαν πάνω από 70 συχνά συνταγογραφούμενα και πιθανώς συγχωρηγούμενα φάρμακα με την λεβετιρακετάμη, τα οποία ελέγχθηκαν για χρωματογραφικές παρεμβολές με την λεβετιρακετάμη.

Στην μέχρι τώρα βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λεβετιρακετάμης (Pucci *et al.*, 2004; Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005; Juenke *et al.*, 2006, 2011; Greiner-Sosanko *et al.*, 2007; Contin *et al.*, 2008; Matar, 2008; Baldelli *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2017; Kalaria *et al.*, 2018). Σημαντικό εύρημα είναι επίσης ότι ένα μέρος της βιβλιογραφίας αναφέρει ότι η λεβετιρακετάμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες ασθένειες εκτός της επιληψίας.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η χρήση δείγματος μικρού όγκου (100μL) και η απλή επεξεργασία των δειγμάτων με κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Ο όγκος του δείγματος που απαιτείται είναι μικρός αφού στην βιβλιογραφία αρκετές μελέτες αναφέρουν μεγαλύτερο όγκο δείγματος (Pucci *et al.*, 2004; Juenke *et al.*, 2006, 2011; Contin *et al.*, 2008; Kalaria *et al.*, 2018). Υπάρχουν όμως και μελέτες που χρησιμοποίησαν μικρότερο όγκο δείγματος (100-250 μL) (Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005;

Greiner-Sosanko *et al.*, 2007; Matar, 2008; Baldelli *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2017). Η χρήση μικρού όγκου δείγματος καθιστά τη μέθοδο κατάλληλη για τακτική ανάλυση επιπέδων λεβετιρακετάμης σε ενήλικες ασθενείς αλλά και σε παιδιά ή ηλικιωμένους όπου η λήψη μεγαλύτερης ποσότητας αίματος είναι δύσκολη. Σημαντική παρατήρηση της παρούσας μελέτης είναι ότι το LLOQ είναι συγκρίσιμο με το LLOQ μελετών που χρησιμοποίησαν διαφορετικό όγκο δείγματος. Συγκεκριμένα, στην μελέτη Baldelli *et al.*, 2015, χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος όγκος δείγματος (250μL) και εμφάνισε περίπου το ίδιο LLOQ (2,4) με την παρούσα μελέτη. Αντίθετα, στην μελέτη Kalaria *et al.*, 2018, ο όγκος του δείγματος ήταν πολύ μεγαλύτερος (500μL) με LLOQ 2,0.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε κάποιες προηγούμενες μελέτες όπου η κατεργασία δείγματος δεν γινόταν με κατακρήμνιση πρωτεϊνών με μεθανόλη, αλλά με κάποιο οξύ, ACN ή εκχύλιση SPE, παρουσίασαν πολύ χαμηλότερο LLOQ (Pucci *et al.*, 2004; Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005; Juenke *et al.*, 2006; Kalaria *et al.*, 2018).

Ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η επιλογή του εσωτερικού προτύπου, 1-μεθυλοξανθίνη. Το ΕΠ της μελέτης είναι ευρέως διαθέσιμη και χαμηλού κόστους ουσία, η οποία δεν συνιστά φάρμακο και συνεπώς δεν υπάρχει πιθανότητα συγχωρήγησης της με την λεβετιρακετάμη. Αντιθέτως, σε κάποιες προηγούμενες μελέτες (Greiner-Sosanko *et al.*, 2007; Baldelli *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2017) έχουν χρησιμοποιηθεί ως ΕΠ ουσίες οι οποίες μπορεί να λαμβάνονται από τον ασθενή ή να συγχωρηθούν με την λεβετιρακετάμη όπως είναι η γκαμπαπεντίνη, η λινεζολίδα ή η μεπιβακαΐνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει μεγάλος κίνδυνος αλληλεπιδράσεων και παρεμβολών στην χρωματογραφική μελέτη της λεβετιρακετάμης και είναι προτιμότερο η χρήση πιο απλών ουσιών.

Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο συνολικός χρόνος ανάλυσης της λεβετιρακετάμης. Συγκρίνοντας προηγούμενες μελέτες, ο χρόνος έκλουσης της λεβετιρακετάμης της παρούσας μελέτης είναι πολύ μεγάλος, περίπου στα 17 λεπτά (Pucci *et al.*, 2004; Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005; Juenke *et al.*, 2006, 2011; Greiner-Sosanko *et al.*, 2007; Contin *et al.*, 2008; Matar, 2008; Baldelli *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2017; Kalaria *et al.*, 2018). Αυτό οφείλεται στην μεγάλη επιλεκτικότητα της παρούσας μεθόδου αφού χρησιμοποιήθηκαν πολύ περισσότερα φάρμακα για έλεγχο χρωματογραφικών παρεμβολών σε σχέση με τις άλλες μεθόδους

(Πίνακας 3). Επίσης, ένας άλλος λόγος είναι οι διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες όπως είναι η προκατεργασία του δείγματος, ισοκρατική ή βαθμιαία έκλυση και ο όγκος του δείγματος. Γενικά, σε μελέτες όπου πραγματοποιήθηκε βαθμιαία έκλυση, δηλαδή η κινητή φάση μεταβάλλεται, ο χρόνος ανάλυσης της λεβετιρακετάμης ήταν αρκετά μικρός σε σχέση με μελέτες ισοκρατικής έκλυσης (Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2005; Greiner-Sosanko *et al.*, 2007; Baldelli *et al.*, 2015).

Αξιοσημείωτο εύρημα των επιστημόνων αποτελεί το γεγονός ότι η λεβετιρακετάμη, καθώς και πολλά άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, χρησιμοποιούνται και για ψυχολογικές διαταραχές όπως είναι η κατάθλιψη, η σχιζοφρένεια, η μανία, διαταραχές συναισθημάτων, διπολική διαταραχή κ.α (Endres *et al.*, 2017). Τις τελευταίες δεκαετίες η λεβετιρακετάμη εντάχθηκε ως νέο αντισπασμωδικό για την διπολική διαταραχή και φαίνεται να συμβάλλει στην σταθεροποίηση διάθεσης και συναισθήματος. Μελέτη του 2003 (Bräunig and Krüger, 2003) αναφέρει ότι η χορήγηση λεβετιρακετάμης συγχορηγούμενη με βαλπροϊκό οξύ σε δύο ασθενείς με διπολική διαταραχή επέφερε σταθεροποίηση της κατάστασης των ασθενών και μείωση των συμπτωμάτων τους μέχρι και για ένα εξάμηνο (Bräunig and Krüger, 2003). Παρομοίως, σε άλλη περιγραφή περιστατικού αναφέρεται ότι σε 21χρονη ασθενή που έπασχε από ανθεκτική διπολική διαταραχή η χορήγηση λεβετιρακετάμης ως μονοθεραπεία επέφερε σταθεροποίηση των συμπτωμάτων της για τουλάχιστον 1 έτος (Kaufman, 2004).

Πλέον της ευεργετικής επίδρασης της λεβετιρακετάμης σε ασθενείς με διπολική διαταραχή, έχει διαπιστωθεί ότι η λεβετιρακετάμη βελτιώνει τα γνωστικά ελλείματα σε μοντέλο σχιζοφρένειας σε αρουραίους υποδηλώνοντας την ευεργετική δράση του φαρμάκου στα ελλείματα της γνωστικής λειτουργίας που παρατηρούνται στη σχιζοφρένεια (Endres *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2018).

Σημαντική πρόκληση στην αντιμετώπιση της επιληψίας παραμένει ο προσδιορισμός του κατάλληλου θεραπευτικού εύρους των χορηγούμενων φαρμάκων. Το εύρος ανάλυσης της παρούσας μελέτης (2,5-100μg/mL) υπερκαλύπτει το εύρος αναφοράς της λεβετιρακετάμης στον ορό ασθενών με επιληψία, το οποίο μέχρι σήμερα είναι 12-46μg/mL. Αυτό αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την εγκαθίδρυση εξατομικευμένης θεραπείας και συνεπώς εξατομικευμένων τιμών αναφοράς για κάθε ασθενή, κυρίως σε περιπτώσεις μη συμμόρφωσης του ασθενή καθώς και σε καταστάσεις όπου η φαρμακοκινητική μεταβάλλεται όπως είναι στα παιδιά, στους ηλικιωμένους, στη

εγκυμοσύνη, σε ηπατοπάθεια, σε νεφροπάθεια και σε περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαρμάκων. Κυρίως σε άτομα με νεφροπάθεια, είναι υψίστης σημασίας να προσδιοριστούν τα επίπεδα της LEV, καθώς απεκκρίνεται κυρίως από το νεφρικό σύστημα.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη μέθοδος χρωματογραφίας HPLC-UV για τον προσδιορισμό των επιπέδων λεβετιρακετάμης σε λυοφιλοποιημένο ανθρώπινο ορό αίματος. Σημαντικά ευνοϊκά χαρακτηριστικά της αποτελούν η ευαισθησία, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και η απουσία χρωματογραφικών παρεμβολών με άλλα αντιεπιληπτικά, αντιψυχωσικά ή συχνά χορηγούμενα φάρμακα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε εξετάσεις ρουτίνας για την παρακολούθηση των επιπέδων της για θεραπευτικούς σκοπούς στην επιληψία ή/και στη ψυχιατρική καθώς και στην αποφυγή τοξικότητας στο φάρμακο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΠΗΓΕΣ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abou-Khalil B (2008) Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat* **4**:507–523.
2. Ali A (2018) Global Health: Epilepsy. *Semin Neurol* **38**:191–199.
3. Baldelli S, Cattaneo D, Giodini L, Baietto L, Di Perri G, D’Avolio A, and Clementi E (2015) Development and validation of a HPLC-UV method for the quantification of antiepileptic drugs in dried plasma spots. *Clin Chem Lab Med* **53**:435–444.
4. Beghi E (2020) The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology* **54**:185–191.
5. Beghi E, Giussani G, and Sander JW (2015) The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disord* **17**:243–253.
6. Bräunig P, and Krüger S (2003) Levetiracetam in the treatment of rapid cycling bipolar disorder. *J Psychopharmacol* **17**:239–241.
7. Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, and Baruzzi A (2008) Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **873**:129–132.
8. Endres D, Perlov E, Feige B, Altenmüller D-M, Venhoff N, and Tebartz van Elst L (2017) Schizophrenia Associated with Epileptiform Discharges without Seizures Successfully Treated with Levetiracetam. *Front Psychiatry* **8**:12.
9. Engelbrecht L, Grobler CJ, and Rheeders M (2017) A simple and cost-effective HPLC-UV method for the detection of levetiracetam in plasma/serum of patients with epilepsy. *Biomed Chromatogr* **31**.
10. Feyissa AM (2019) Brivaracetam in the treatment of epilepsy: a review of clinical trial data. *Neuropsychiatr Dis Treat* **15**:2587–2600.
11. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, and Wiebe S (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**:475–482.

12. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, and Engel J (2005) Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**:470–472.
13. GBD 2016 Epilepsy Collaborators (2019) Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **18**:357–375.
14. Golyala A, and Kwan P (2017) Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. *Seizure* **44**:147–156.
15. Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, and Krasowski MD (2007) Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. *J Chromatogr Sci* **45**:616–622.
16. Hildenbrand S (2012) Levetiracetam and Brivaracetam: Synthesis of Radioligands as Pharmacological Tools for Studying Their Interactions with Target Proteins. 204.
17. Johannessen Landmark C, Johannessen SI, and Patsalos PN (2020) Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs: current status and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **16**:227–238.
18. Juenke J, Brown PI, Urry FM, and McMillin GA (2006) Drug monitoring and toxicology: a procedure for the monitoring of levetiracetam and zonisamide by HPLC-UV. *J Anal Toxicol* **30**:27–30.
19. Juenke JM, Brown PI, Johnson-Davis KL, and McMillin GA (2011) Simultaneous quantification of levetiracetam and gabapentin in plasma by ultra-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. *Ther Drug Monit* **33**:209–213.
20. Kalaria SN, Dahmane E, Armahizer M, McCarthy P, and Gopalakrishnan M (2018) Development and validation of a HPLC-UV assay for quantification of levetiracetam concentrations in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy. *Biomed Chromatogr* **32**:e4257.

21. Kaufman KR (2011) Antiepileptic drugs in the treatment of psychiatric disorders. *Epilepsy Behav* **21**:1–11.
22. Kaufman KR (2004) Monotherapy treatment of bipolar disorder with levetiracetam. *Epilepsy Behav* **5**:1017–1020.
23. Knezevic CE, and Marzinke MA (2018) Clinical Use and Monitoring of Antiepileptic Drugs. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **3**:115–127.
24. Koh MT, Shao Y, Rosenzweig-Lipson S, and Gallagher M (2018) Treatment with levetiracetam improves cognition in a ketamine rat model of schizophrenia. *Schizophr Res* **193**:119–125.
25. Krasowski MD (2010) Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy Medications. *Pharmaceuticals (Basel)* **3**:1909–1935.
26. Manford M (2017) Recent advances in epilepsy. *J Neurol* **264**:1811–1824.
27. Martens-Lobenhoffer J, and Bode-Böger SM (2005) Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **819**:197–200.
28. Matar KM (2008) Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal* **48**:822–828.
29. Mattson RH (1998) Medical management of epilepsy in adults. *Neurology* **51**:S15-20.
30. Mawhinney E, Craig J, Morrow J, Russell A, Smithson WH, Parsons L, Morrison PJ, Liggan B, Irwin B, Delanty N, and Hunt SJ (2013) Levetiracetam in pregnancy: results from the UK and Ireland epilepsy and pregnancy registers. *Neurology* **80**:400–405.
31. Mbuba CK, Ngugi AK, Newton CR, and Carter JA (2008) The epilepsy treatment gap in developing countries: a systematic review of the magnitude, causes, and intervention strategies. *Epilepsia* **49**:1491–1503.
32. Meyer VR (2013) *Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures*, John Wiley & Sons.
33. Pack AM (2019) Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Continuum (Minneap Minn)* **25**:306–321.

34. Patsalos PN (2013a) Drug interactions with the newer antiepileptic drugs (AEDs)--part 1: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between AEDs. *Clin Pharmacokinet* **52**:927–966.
35. Patsalos PN (2013b) Drug interactions with the newer antiepileptic drugs (AEDs)--Part 2: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between AEDs and drugs used to treat non-epilepsy disorders. *Clin Pharmacokinet* **52**:1045–1061.
36. Patsalos PN, and Bourgeois BFD (2018.) The Epilepsy Prescriber’s Guide to Antiepileptic Drugs. 333:124-133.
37. Patsalos PN, Spencer EP, and Berry DJ (2018) Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. *Ther Drug Monit* **40**:526–548.
38. Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Ferranti A, Kenndler E, and Raggi MA (2004) High-performance liquid chromatographic determination of Levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. *Biomed Chromatogr* **18**:37–44.
39. Shakirullah, Ali N, Khan A, and Nabi M (2014) The Prevalence, Incidence and Etiology of Epilepsy. *International Journal of Clinical and Experimental Neurology* **2**:29–39, Science and Education Publishing.
40. Shorvon SD (2009) Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909-1958. *Epilepsia* **50 Suppl 3**:69–92.
41. Sosanya NM, Brager DH, Wolfe S, Niere F, and Raab-Graham KF (2015) Rapamycin reveals an mTOR-independent repression of Kv1.1 expression during epileptogenesis. *Neurobiol Dis* **73**:96–105.
42. Thijs RD, Surges R, O’Brien TJ, and Sander JW (2019) Epilepsy in adults. *Lancet* **393**:689–701.
43. Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, and Lunn MPT (2014) Levetiracetam for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD010943.
44. Wright CC, Downing J, Mungall D, Khan O, Williams A, Fonkem E, Garrett D, Aceves J, and Kirmani BFMD (2013) Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Levetiracetam. *Front Neurol* **4**, Frontiers.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Καρκαλούσος Π. 2015. *Κεφάλαιο 8: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) (HPLC) στην κλινική χημεία. Βασικές Αρχές και παραδείγματα.* Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών.
(https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5388/3/02_chapter_08.pdf)