

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Ιατρικής  
Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής  
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομ. 07.05.2003.  
Αριθ. Πρωτ. 2524

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### ΘΕΜΑ:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΗΣ ΚΑΦΕΙΝΗΣ  
(AFMU+1X+1U)/17U ΓΙΑ ΤΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ  
ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P4501A2 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΗ Η ΧΡΟΝΙΑ  
ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ.

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ε.Κ. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,

Επιβλέπουσα

Σ. Μπονάνου – Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Α. Τσακάλωφ, Λέκτορας Ιατρικής Χημείας

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΜΑΓΛΑΡΑΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ

Λάρισα Μάιος 2003





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

Αριθ. Εισ.: 2853/1

Ημερ. Εισ.: 04-08-2009

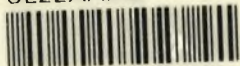
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΜΑΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083647

2

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**  
**Τμήμα Ιατρικής**  
**Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής**  
**«ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΘΕΜΑ:**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΗΣ ΚΑΦΕΙΝΗΣ  
(AFMU+1X+1U)/17U ΓΙΑ ΤΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ  
ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P4501A2 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΗ Η ΧΡΟΝΙΑ  
ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ.**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Ε.Κ. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,**

**Επιβλέπουσα**

**Σ. Μπονάνου – Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας**

**Α. Τσακάλωφ, Λέκτορας Ιατρικής Χημείας**

**ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΜΑΓΛΑΡΑΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ**

**Λάρισα Μάϊος 2003**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ν. Σακελλαρίδη, Καθηγητή Φαρμακολογίας, ο οποίος μας προμήθευσε με ένα μεγάλο μέρος της ξένης βιβλιογραφίας στην οποία στηρίχθηκε η παρούσα εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γ. Νταλέκο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας, ο οποίος συνέταξε το πρωτόκολλο στο οποίο υποβλήθηκαν οι συμμετέχοντες εθελοντές και ήταν υπεύθυνος για την παρακολούθηση των συμμετεχόντων ασθενών εθελοντών καθώς και την κ. Σ. Παπακώστα, Ιατρό - Υποψήφια Διδάκτορα, η οποία ήταν υπεύθυνη για την ενημέρωση των ασθενών εθελοντών και την συλλογή των δειγμάτων των ούρων. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. κ. Σ. Λάφη ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να συνεισφέρει στην εκπόνηση της εργασίας τόσο με τις γνώσεις του σε θέματα Χημείας όσο και με τη διάθεση ανάλογης βιβλιογραφίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Μ. Τσουκαλά, Επίκουρο Καθηγητή Στατιστικής για την άμεση ανταπόκρισή του σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες ζητήθηκε η γνώμη του σε θέματα στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Επίσης ευχαριστίες οφείλονται σε όλους τους εθελοντές που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην παρούσα εργασία.

Συμαντική βοήθεια υπήρξε επίσης εκ μέρους του κ. Η. Μπέγα, Βιοχημικού-Μέλους Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, ο οποίος συνέβαλε καθοριστικά στη διεκπεραίωση του τεχνικού σκέλους της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής κ. Ε. Κ. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, η οποία ως επιβλέπουσα είχε τη γενικότερη εποπτεία και φροντίδα της εκπόνησης της παρούσας εργασίας και τον κ. Α. Τσακάλωφ, Λέκτορα Ιατρικής Χημείας, ο οποίος με την πληρέστατη κατάρτισή του συνέβαλε αποφασιστικά στην εφαρμογή και βελτίωση της αναλυτικής μεθόδου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σ. Μπονάνου- Γζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, η οποία πέραν της άμεσης συμβολής της στην ουσιαστική βελτίωση και διαμόρφωση της εργασίας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, οργάνωσε, κατεύθυνε και εμπύχωσε την προσπάθεια της εδραίωσης και της καταξίωσης του πρωτοποριακού θεσμού του Προγράμματος Σπουδών Επιλογής «Ιατρική Βιοχημεία».

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
Περίληψη.....	4
Περίληψη στα Αγγλικά.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 CΥΡΙΑ2 – Γενικά.....	6
1.2 Καφεΐνη, γενικές ιδιότητες-μεταβολισμός.....	11
1.3 Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα.....	16
1.4 Ηπατική νόσος και μεταβολισμός καφεΐνης.....	22
1.5 Χρωματογραφικές μέθοδοι για την ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Πρωτόκολλο.....	31
2.2 Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες.....	31
2.3 Όργανα και συσκευές.....	32
2.4 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων.....	33
2.5 Διαδικασία εκχύλισης υγρού/υγρού (liquid/liquid extraction).....	34
2.6 Διαχωρισμός μεταβολιτών.....	34
2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	35
2.8 Εσωτερικός έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων.....	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Πρότυπες καμπύλες.....	38
3.2 Εσωτερικός έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων.....	39
3.3 Αποτελέσματα αναλύσεων ούρων των υγιών εθελοντών.....	39
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

*Σκοπός:* Να χρησιμοποιηθεί ο μεταβολικός λόγος των μεταβολιτών της καφεΐνης (AFMU+1U+1X)/17U προκειμένου να προσδιοριστεί η λειτουργία του ενζυμικού συστήματος CYP1A2.

*Υλικά και μέθοδοι:* Στη μελέτη συμμετείχαν 15 υγιείς εθελοντές (μέσος όρος ηλικίας 33,6 έτη, εύρος 22-51) εκ των οποίων 3 καπνιστές (3 τσιγάρα την ημέρα) και 7 ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω ηπατίτιδας Β και C (μέσος όρος ηλικίας 58,3 έτη, εύρος 47-69). Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη χορηγήθηκαν 200 mg καφεΐνης μετά από 2 ημέρες αποχής από κατανάλωση ποτών και τροφίμων που περιείχαν καφεΐνη. Έγινε συλλογή 1 μεμονωμένου δείγματος ούρων 6 ώρες αργότερα και οι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν στήλη Kromasil100, C18, 5μm, 250x4,6 mm ID και ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού ( $\lambda=280$  nm). Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με χρήση κινητής φάσης που αποτελούνταν από μίγμα 0,05% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο σε κατά όγκο αναλογία 92:4:4 με ταχύτητα ροής 0,8 ml/min στο διάστημα 0-11'30'' και 1,3 ml/min στο διάστημα 11'30''- 20'. Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου.

*Αποτελέσματα:* Η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στους υγιείς εθελοντές προσέγγισε την κανονική ( $p=0,507$ ). Δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών ( $p>0,05$ ) καθώς επίσης και μεταξύ ανδρών και γυναικών ( $p>0,05$ ). Ο μέσος όρος του μεταβολικού λόγου ήταν 4,12 (εύρος 2,45-9,71) στους υγιείς και 2,82 (εύρος 2,23-3,41) στους ασθενείς. Η κύρια αιτία αυτής της διαφοράς αποδίδεται πιθανόν στη μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2.

*Συμπέρασμα:* Παρουσιάστηκε μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 σε ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση του ήπατος όπως προκύπτει από τη μείωση της τιμής του μεταβολικού λόγου AFMU+1U+1X/17U στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς.

## ABSTRACT

*Objectives:* The objective of the present study was the assessment of CYP1A2 activity using the caffeine metabolic ratio (AFMU+1U+1X)/17U.

*Materials and methods:* In the study participated 15 healthy volunteers (average age 33,6 years, range 22-51) of which 3 were smokers (1-3 cigarettes per day) and 7 patients with non-compensative cirrhosis resulted from hepatitis B and C (average age 58,28 years, range 47-69). All participants were given 200 mg of caffeine after two days of caffeine abstinence. Six hours later one urine sample was collected and the metabolites of caffeine in urine were analyzed using high pressure liquid chromatography (HPLC). The chromatographic system consisted of a Kromasil100, C18, 5  $\mu$ m, 250x4,6 mm ID column and a UV detector ( $\lambda$ =280nm). The separation of caffeine metabolites was attained with the use of mobile phase that consisted of 0,01% acetic acid/methanol/acetonitrile (92:4:4 v/v) with a flow rate 0,8 ml/min within the period 0- 11'30'' and 1,3 ml/min within the period 11'30''-20'. The metabolites were quantified with the use of the internal standard method.

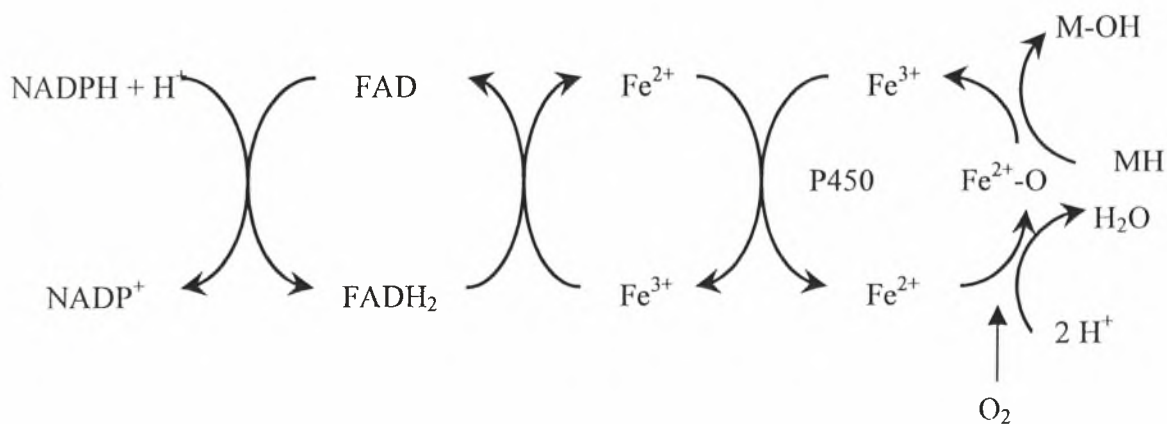
*Results:* The frequency distribution of the metabolite ratio in the healthy subjects was almost normal. The metabolic ratio was not significantly different between smokers and non-smokers and between men and women. The mean metabolic ratio in healthy volunteers was significantly different from that in patients (4,12, range 2,45-9,71) and the mean of the metabolite ratio in patients was 2,82 (range 2,23-3,41), reflecting probably the decreased CYP1A2 activity.

*Conclusions:* There was decreased CYP1A2 activity in patients with non-compensated cirrhosis and that is reflected in the decrease in the measure of the metabolite ratio (AFMU+1U+1X)/17U in patient subjects compared to healthy volunteers.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

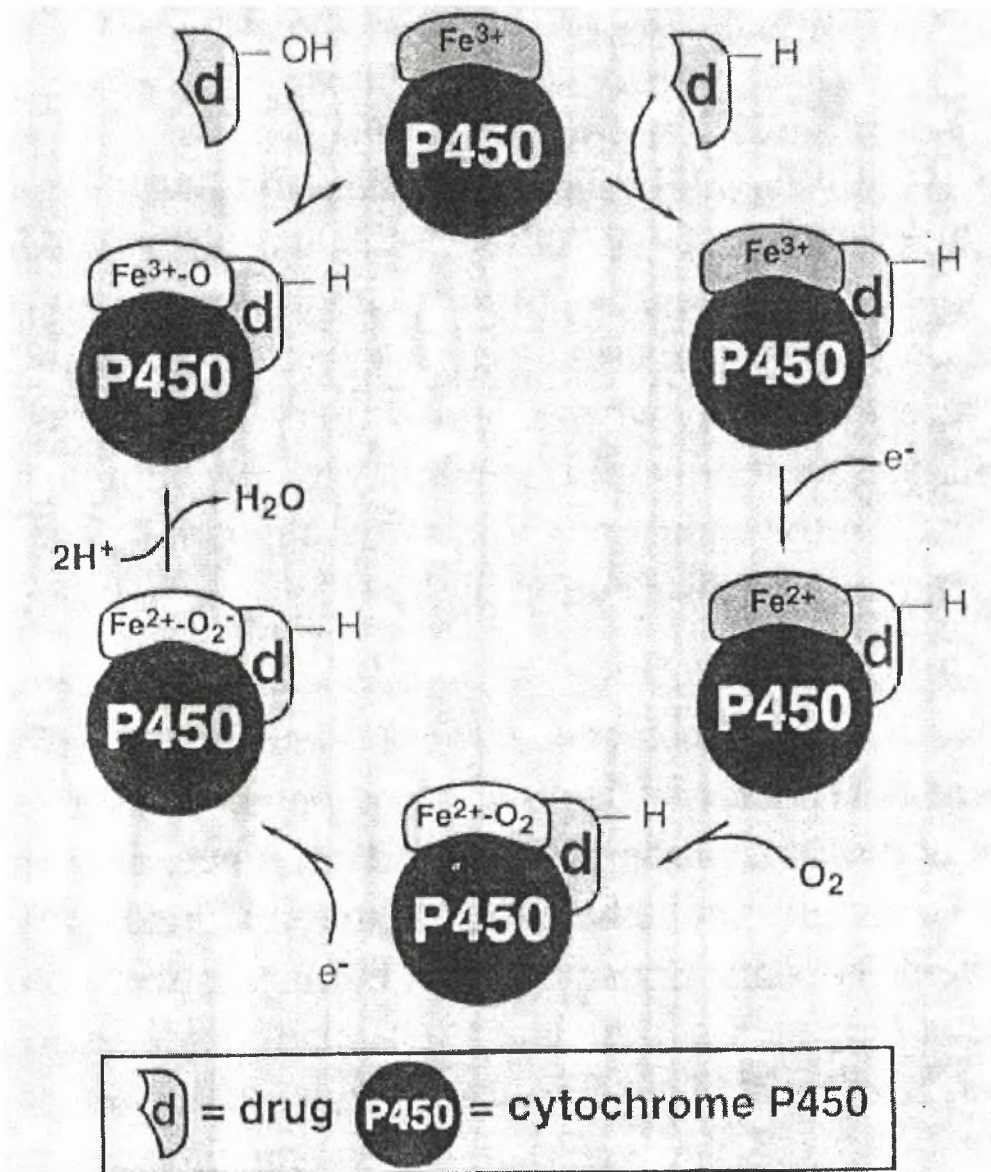
## 1.1 CYP1A2 – Γενικά

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ειδικότερα στις μεμβράνες τους απαντώνται διάφορα συστήματα που έχουν ως σκοπό την μεταφορά των ηλεκτρονίων. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι απαραίτητη σε διάφορες λειτουργίες των οργανισμών όπως για παράδειγμα η αναπνοή. Στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΛΕΔ) των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχει ένας σημαντικός εκπρόσωπος των συστημάτων που μεταφέρουν ηλεκτρόνια, οι οξειδάσες μεικτής λειτουργίας, ο ρόλος των οποίων είναι να υδροξυλιώνουν υποστρώματα (Γεωργάτσος, 1993). Η διαδικασία της υδροξυλίωσης ξεκινά με την ενεργοποίηση του  $O_2$ . Το  $O_2$  ενεργοποιείται διαμέσου μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οποία το NADPH μεταφέρει τα υψηλού δυναμικού ηλεκτρόνια του σε μία φλαβοπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια τα μεταβιβάζει στην αδρενοδοξίνη, μία πρωτεΐνη με μη αιμικό σίδηρο. Η αδρενοδοξίνη μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στη οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος P450 το οποίο ανάγεται. Η ανηγμένη μορφή του P450 στη συνέχεια ενεργοποιεί το  $O_2$  (Stryer, 1997; Εικόνα 1).



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





Εικόνα 2. Μηχανισμός ενεργοποίησης οξυγόνου και οξείδωσης φαρμάκων στο P450 (Benet et al, 1996).

Το κυτόχρωμα P450 πήρε το όνομά από το μήκος κύματος στο οποίο απορροφά την ακτινοβολία όταν είναι συμπλοκοποιημένο μαζί με CO. Το P450 είναι αμοιρωτεΐνη που εντοπίζεται στα τοιχώματα του ΛΕΔ. Μερικές από τις λειτουργίες που επιτελεί (κατάλυση αντιδράσεων) είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής (μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες). Το συγκεκριμένο σύστημα είναι επίσης υπεύθυνο για αντιδράσεις με τις οποίες ο οργανισμός απαλλάσσεται από ξένες ουσίες καθώς και αντιδράσεις με τις οποίες πολλά φάρμακα μεταβολίζονται (Olson, 1997, Εικόνα 2). Ο μεταβολισμός των ξένων ουσιών έχει ως σκοπό την μείωση της λιποδιαλυτότητας των ουσιών και αυτό πραγματοποιείται αυξάνοντας τις ιονιζόμενες ομάδες στο μόριο της ουσίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παθητικής διάχυσης των ξένων ουσιών μέσα από

τις βιολογικές μεμβράνες του οργανισμού και την ταχύτερη απομάκρυνσή τους με μηχανισμούς ενεργητικής μεταφοράς (Μισιρλή, 1999).

Το P450 όπως και όλα τα μικροσωμιακά ένζυμα παρουσιάζουν την ιδιότητα της επαγωγής. Πιο συγκεκριμένα, διάφορες ουσίες όπως φάρμακα, εντομοκτόνα, καρκινογόνα, προσθετικά τροφίμων κλπ έχει αποδειχθεί ότι μετά από επανειλημμένη χορήγηση ή ταυτόχρονο μεταβολισμό άλλων ουσιών αυξάνουν τον ρυθμό του μεταβολισμού τους. Δεν έχει αποδειχθεί ότι οι ουσίες που προκαλούν επαγωγή έχουν κάποια ιδιαίτερα κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Η μοναδική τους ομοιότητα είναι η λιποδιαλυτότητά τους.

Η επαγωγή είναι ουσιαστικά η πρωτεϊνοσύνθεση νέων μικροσωμιακών ενζύμων και μπορεί να εμποδιστεί προσθέτοντας πουρομυκίνη (Μισιρλή, 1999). Ο ρόλος της επαγωγής του P450 είναι να βοηθήσει τον οργανισμό να αντεπεξέλθει στο μεταβολισμό μιας ουσίας (επαγωγικός παράγοντας) όταν αυτή έχει αυξημένη συγκέντρωση. Έτσι, μετά την επαγωγή του ενζύμου ο μεταβολισμός πραγματοποιείται ευκολότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό. Επειδή όμως το P450 δεν είναι ειδικό για το μεταβολισμό του επαγωγέα θα αυξηθεί και ο μεταβολισμός των υπολοίπων ουσιών που μεταβολίζονται από το ίδιο ένζυμο. Παράδειγμα επαγωγής αποτελεί η ανοχή στην αλκοόλη καθώς αυτή μεταβολίζεται από το P450 (Olson, 1997). Έχουν παρατηρηθεί όμως και ουσίες οι οποίες προκαλούν αναστολή στη δραστηριότητα των μικροσωμιακών ενζύμων με αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης των ουσιών που μεταβολίζονται από το ίδιο ένζυμο.

Υπάρχουν στον άνθρωπο 50 περίπου λειτουργικά γονίδια του P450. Όμως, παρά τον μεγάλο αριθμό των γονιδίων ο μεγαλύτερος αριθμός ουσιών και φαρμάκων μεταβολίζεται από έναν μικρό αριθμό ενζύμων P450 τα οποία ανήκουν στις οικογένειες 1, 2 και 3. Πιο συγκεκριμένα τα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των φαρμάκων είναι τα CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A4. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το CYP1A2 το οποίο είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό πολλών ουσιών, ενώ εμπλέκεται και στο μεταβολισμό διαφόρων υποστρωμάτων σημαντικών από τοξικολογικής πλευράς στα οποία συμπεριλαμβάνονται μεταλλαξιγόνα προερχόμενα από τις τροφές και προϊόντα διαδικασιών καύσης (McKinnon and Evans, 2000).

Η ενεργότητα του CYP1A2 διαφέρει σημαντικά από άτομο σε άτομο μέσα σε έναν πληθυσμό (Carrillo and Benitez, 1996; Carrillo and Benitez, 1994; Grant *et al.*, 1983; Kalow, 1985). Το φαινόμενο αυτό αποδείχθηκε με μελέτες που χρησιμοποίησαν την καφεΐνη ως πρότυπο υπόστρωμα για το ενζυμικό σύστημα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποκάλυψαν μια τρικόρυφη κατανομή της ενζυμικής δραστηριότητας η οποία είναι σύμφωνη με φαινοτύπους ταχέων, μέσων και βραδέων μεταβολιστών (Tang *et al.*, 1994; Butler *et al.*,

1992). Όμως σε διαφορετικές μελέτες δεν καταδείχθηκε η πολυμορφική ιδιότητα του CYP1A2 ενζυμικού συστήματος (Welfare *et al.*, 1999).

Ο πολυμορφικός χαρακτήρας του CYP1A2 αλλά και γενικότερα των γονιδίων του P450 μπορεί να προσδιοριστεί φαινοτυπικά (διερεύνηση ενζυμικής ενεργότητας) αλλά και γονοτυπικά (διερεύνηση αλληλομόρφων). Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός επιτελείται συνήθως με τη συλλογή των ούρων κατόπιν χορηγήσεως ενός κατάλληλου υποστρώματος (probe drug, όπως η καφεΐνη) και του υπολογισμού ενός σχετικού μεταβολικού λόγου (Asproдини *et al.*, 1998). Η χρήση μεταβολικών λόγων για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου καθιερώθηκε αρχικά από τον Evans *et al.* (1960), οι οποίοι χρησιμοποίησαν το λόγο της ισονιαζίδης του πλάσματος προς τον ακετυλιωμένο μεταβολίτη της ως δείκτη του βαθμού της ακετυλίωσης. Μία από τις πρώτες εργασίες στον τομέα αυτόν παραιοποιήθηκε από τους Mahgoub *et al.* (1977) οι οποίοι χρησιμοποίησαν το λόγο της δεβριζοκίνης προς τον κυριότερο μεταβολίτη της, την 4-OH-δεβριζοκίνη, για να προσδιορίσουν τη δραστηριότητα του CYP2D6. Κατά κανόνα οι βραδείς μεταβολιστές έχουν πολύ μικρότερο λόγο μεταβολιτών στα ούρα από ότι οι ταχείς. Η συγκεκριμένη μέθοδος (μεταβολικών λόγων) αποτελεί ένδειξη για την ενζυμική δραστηριότητα χωρίς όμως να καθορίζονται τα αίτια αυτής, γενετικά η οποιαδήποτε άλλα. Σε πληθυσμιακό επίπεδο η μορφή μιας πληθυσμιακής κατανομής (δικόρυφη ή τρικόρυφη) μας δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη πολυμορφισμού, σε ατομικό όμως επίπεδο πολλοί παράγοντες επηρεάζουν το μεταβολικό λόγο όπως για παράδειγμα η δίαιτα η μακροχρόνια λήψη κάποιου φαρμάκου κλπ. Αμεσότερες πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των αλληλομόρφων του P450 παρέχει ο προσδιορισμός του γονοτύπου, αλλά η ακριβής ερμηνεία της πληροφορίας αυτής απαιτεί τη συσχέτιση μεταξύ ενός προσδιορισμένου γονοτύπου και του αντίστοιχου φαινοτύπου (McKinnon and Evans, 2000).

Η υποοικογένεια του ανθρώπινου, επαγόμενου από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), κυτοχρώματος CYP1A αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα ισόένζυμα CYP1A1 και CYP1A2. Παρόλο που υπάρχει μία φαινομενική εκλεκτικότητα για κάποιες ενώσεις, και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις (Tassaneeyakul *et al.*, 1993). Ενώ το CYP1A1 εκφράζεται σε εξωηπατικούς ιστούς, το CYP1A2 είναι ένα ισόένζυμο το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στο ήπαρ και μάλιστα σε ποσοστό περίπου 15% του συνολικού ενζυμικού περιεχομένου του CYP (Shimada *et al.*, 1994).

Η επαγωγή του CYP1A2 μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα το CYP1A2 μπορεί να επαχθεί από κρέας ψημένο στα κάρβουνα (Sinha *et al.*, 1994; Sinha and Rothman, 1999) ενώ επαγωγή παρατηρείται και κατά την πρόσληψη



σταυρανθών όπως μπρόκολα και λαχανάκια Βρυξελλών (Brussels sprouts) (Vistisen *et al.*, 1991; Vistisen *et al.*, 1992).

Η επαγωγή του συγκεκριμένου ενζυμικού συστήματος επηρεάζεται άμεσα από τη διαιτητική κατανάλωση καφεΐνης και ειδικότερα η επαγωγή προκαλείται όχι μόνο από την καφεΐνη αλλά και από άλλα συστατικά του καφέ (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999; LeMarchand *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 1994). Το CYP1A2 έχει αποδειχθεί ότι ποικίλλει ανάλογα με το δείκτη σωματικής μάζας του ατόμου και ειδικότερα τα παχύσαρκα άτομα έχουν μικρότερη κάθαρση στην καφεΐνη σε σύγκριση με τα λεπτά άτομα (στη βάση ml/min/kg σωματικού βάρους) (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999).

Η επαγωγή του CYP1A2 μπορεί να έχει διάφορες συνέπειες στον οργανισμό όπως μείωση της δράσης μιας φαρμακευτικής ουσίας λόγω αυξημένου μεταβολισμού αυτής (Waxman, 1999; Lin and Lu, 1998; Smith *et al.*, 1998). Το CYP1A2 αναστέλλεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο χυμός γκρέϊπ-φρουτ και τα συστατικά του (Fuhr *et al.*, 1993), το αλκοόλ (Le Marchand *et al.*, 1997; Rizzo *et al.*, 1997) ενώ στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και η ηπατική νόσος (Denaro *et al.*, 1996). Στον Πίνακα 1 φαίνονται συγκεντρωτικά οι ουσίες που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην λειτουργία του ενζυμικού συστήματος καθώς και το πως αυτές επηρεάζουν τη λειτουργία του.

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

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

?=όχι πλήρως ξεκαθαρισμένο; ^ = αύξηση; v = μείωση; - = καμία επίδραση

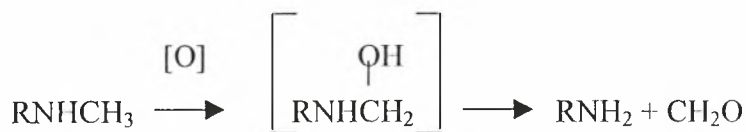
## 1.2 Καφεΐνη, γενικές ιδιότητες-μεταβολισμός.

Η καφεΐνη (137X ή CA) είναι το φάρμακο που χρησιμοποιείται περισσότερο από την ανθρωπότητα. Η λήψη της καφεΐνης έχει γίνει τόσο πολύ μέρος των διατροφικών συνηθειών μας που σπάνια θεωρείται ως φαρμακευτική αγωγή. Έτσι έχει επικρατήσει ότι η κατανάλωσή της δεν εγκυμονεί κινδύνους. Η ευρεία κατανάλωσή της οφείλεται στο ότι διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα με αποτέλεσμα την καταπολέμηση της υπνηλίας, μείωση της κόπωσης, καλύτερη διάθεση και αύξηση της ικανότητας εργασίας. Σε αντίθεση

όμως, όταν η καφεΐνη καταναλώνεται σε μακροχρόνια βάση προκαλεί διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, διαταραχές της αναπαραγωγής, οστεοπόρωση, καρκινογένεση, ψυχιατρικές διαταραχές και προδιάθεση για κατάχρηση φαρμάκων (Carrillo and Benitez, 2000).

Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης της καφεΐνης είναι από το στόμα όπου η απορρόφησή της είναι γρήγορη και επιτελείται από το γαστρεντερικό σωλήνα. (Blanchard and Sawers, 1983). Ειδικότερα απορροφάται από τον γαστρεντερικού σωλήνα και η μέγιστη συγκέντρωσή ( $C_{max}$ ) της επιτυγχάνεται μέσα σε μια ώρα. (Carrillo et al., 2000). Η καφεΐνη είναι αρκετά υδρόφοβη και έτσι διέρχεται μέσα από τις βιολογικές μεμβράνες και κατανέμεται γρήγορα στο σώμα (Bonati et al., 1984). Με τον τρόπο αυτό δεν παρατηρείται συσσώρευση καφεΐνης σε όργανα ή ιστούς του σώματος ενώ ανιχνεύεται σε όλα τα σωματικά υγρά. Μπορεί να εισέλθει στο σίελο, στο σπέρμα, στο μητρικό γάλα και στη χολή. Έτσι ο προσδιορισμός της καφεΐνης στο σίελο είναι μια εναλλακτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παρακολούθηση της συγκεντρώσεως της καφεΐνης στον οργανισμό σε σχέση με τη μέτρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα (Zylber-Katz et al., 1984; Fuhr and Rost, 1994).

Ειδικότερα η καφεΐνη αποβάλλεται με οξειδωτική απομεθυλίωση. Το γενικό σχήμα της αντίδρασης αυτής είναι :

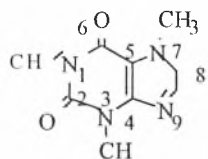


(Benet et al, 1991)

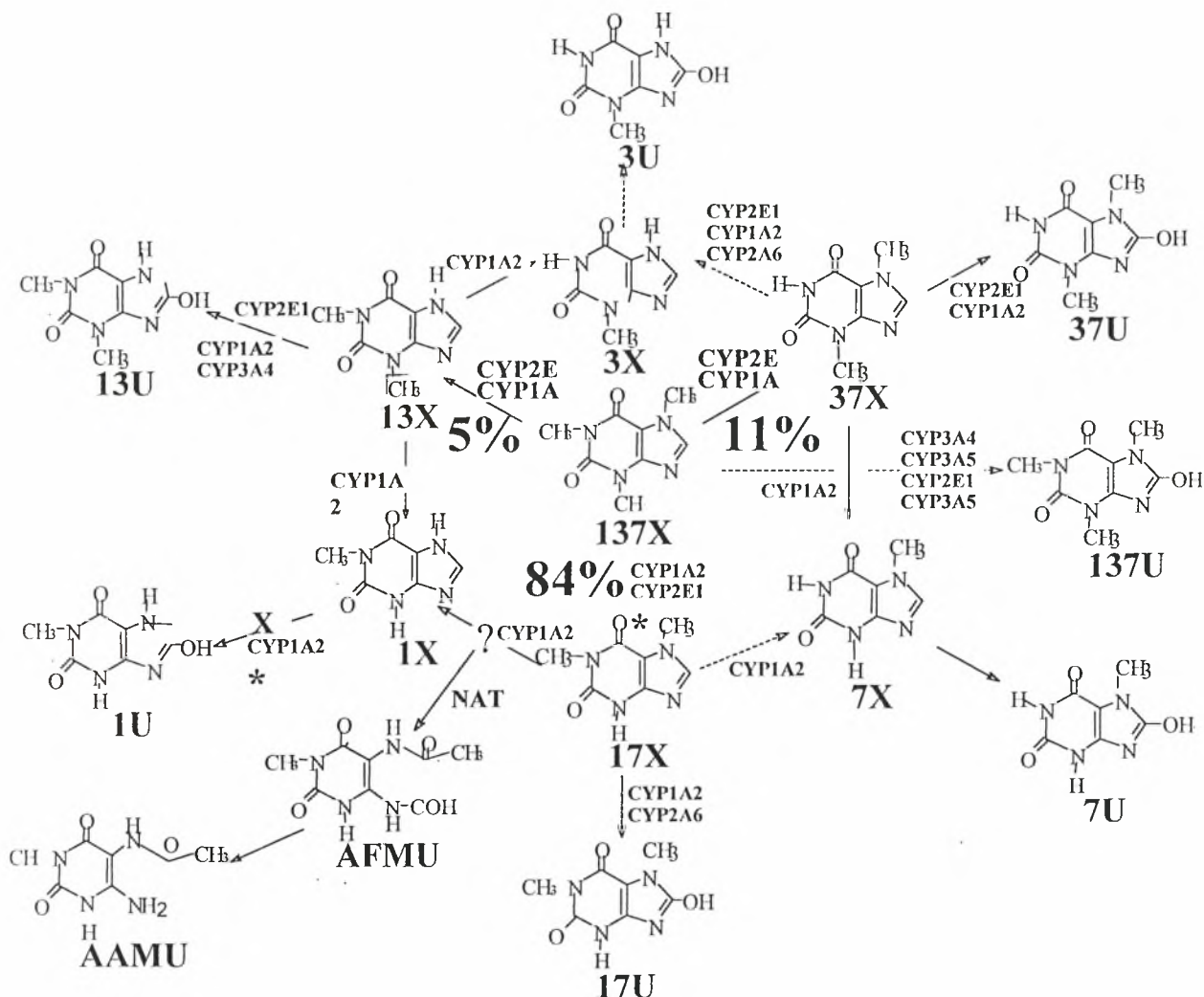
Ο μεταβολισμός της καφεΐνης παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα λόγω της συμμετοχής ενός μεγάλου αριθμού από ένζυμα και ενδιάμεσα προϊόντα. Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευθεί περισσότεροι από 25 μεταβολίτες (Somani and Gupta, 1988). Μελέτες τόσο in vivo (Carrillo et al., 2000; Lelo et al., 1986; Carrillo and Benitez., 1994) όσο και in vitro (Gu et al., 1992) έχουν δείξει ότι η αποβολή γίνεται κυρίως μέσω N3 απομεθυλίωσης προς 1,7- διμέθυλο – ξανθίνη (17X- παραξανθίνη). Η αντίδραση αυτή ευθύνεται για το 84% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης, αν λάβουμε υπ' όψιν μόνο τις μεταβολικές οδούς της απομεθυλίωσης. Το 11% της απομεθυλίωσης της CA οδηγεί στο σχηματισμό της 3,7 διμέθυλο - ξανθίνης ενώ το 5% οδηγεί στο σχηματισμό της 1,3διμέθυλο- ξανθίνης (13X- θεοφυλλίνη) (Lelo et al., 1986; Gu et al., 1992).



Η N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης επιτελείται στο ήπαρ ενώ καταλύεται από το CYP1A2 (Gu *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 1989; Berthou *et al.*, 1991). Όμως το CYP1A2 καταλύει και τις N1 και N7 απομεθυλίωσεις. Συνολικά λοιπόν το CYP1A2 είναι υπεύθυνο για περισσότερο από το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης. Παρόλα αυτά ένα μικρό ποσοστό των N-1 και N-2 απομεθυλίωσεων αποδίδεται στην καταλυτική δράση του CYP2E1, του CYP ενζύμου δηλαδή που επάγεται από την αιθανόλη (Gu *et al.*, 1992).



Η χημική δομή της καφεΐνης



Εικόνα 3. Μεταβολικοί οδοί της καφεΐνης στο ανθρώπινο ήπαρ. Τα συμπαγή βέλη υποδηλώνουν τις κύριες μεταβολικές οδούς και τα στικτά βέλη επισημαίνουν ήσσονος σημασίας μεταβολικές οδούς που δεν συμβάλλουν στον προσδιορισμό κανενός μεταβολικού λόγου που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2. Τα σύμβολα πάνω στα βέλη υποδεικνύουν τα διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν.

Ο μεταβολισμός των ξανθινών αυτών όμως δεν περιορίζεται μέχρι το σημείο αυτό, αφού κάθε μια από τις τρεις διμεθυλο-ξανθίνες (17X, 13X, 37X) απομεθυλιώνεται ξανά και δίνει προϊόντα τις μονομεθυλοξανθίνες (1 μεθυλο-ξανθίνη-1X, 7 μεθυλο-ξανθίνη - 7X, 3 μεθυλοξανθίνη - 3X) (Birkett et al., 1985; Gu et al., 1992; Lelo et al., 1989).

Ειδικότερα, η 17X υδροξυλιώνεται κατ' αρχάς σε 17U και κατόπιν απομεθυλιώνεται προς 1X πάλι από το CYP1A2. Επομένως η 17X λειτουργεί τόσο ως προϊόν όσο και ως υπόστρωμα για το ένζυμο. Η 1X με τη σειρά της μπορεί να μεταβολιστεί με 8-υδροξυλίωση προς 1U από το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης με τη συμμετοχή του CYP1A2 (Grant et al., 1986; Εικόνα 3).

Το ενζυμικό σύστημα CYP1A2 έχει τη δυνατότητα να καταλύει πρακτικά όλες τις οξειδωτικές αντιδράσεις της καφεΐνης και των μεταβολιτών της, όμως στην πραγματικότητα η κατάλυση γίνεται σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα εκτός από δύο περιπτώσεις, την N-3 απομεθυλίωση της CA και την N-7 απομεθυλίωση της παραξανθίνης. Δύο από τα ένζυμα τα οποία συνεργάζονται με το CYP1A2 διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στους ενζυμικούς ελέγχους που γίνονται με την καφεΐνη. Αυτά είναι:

α) η οξειδάση της ξανθίνης η οποία μαζί με το CYP1A2 καταλύει την 8-υδροξυλίωση της 1X προς 1U (Grant et al., 1986).

β) το CYP2A6 κυρίως μαζί με το CYP1A2 καταλύει την 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U με συνέπεια να επηρεάζει την ερμηνεύα των δεδομένων που χρησιμοποιούν το 17U ως μεταβολικό δείκτη (Gu et al., 1992).

Εκτός από τους ανωτέρω έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα προϊόντα του μεταβολισμού της CA με ανοικτό δακτύλιο. Το πιο ποσοτικώς σημαντικό από αυτά είναι η 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλοουρακίλη (AFMU), που προέρχεται από την οδό της 17X είναι ποσοτικώς σημαντικό στα ούρα. (Grant et al 1983; Lelo et al., 1986; Εικόνα 3) η οποία απομεθυλιώνεται προς ένα ασταθές ενδιάμεσο με ανοικτό δακτύλιο το οποίο είτε σταθεροποιείται με ακετυλίωση ως AFMU είτε με εσωτερική επαναδιάταξη που οδηγεί προς 1X. Όμως ο σχηματισμός του AFMU δεν έχει δειχθεί σε κανένα σύστημα *in vitro*. Παρόλα αυτά είναι βέβαιο ότι η ακετυλίωση αυτή συμβαίνει από το πολυμορφικό ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση το οποίο ονομάζεται και NAT2 προκειμένου να διακριθεί από το NAT1 (Kalow and Tang, 1993).

Η AFMU μπορεί να αποβάλει τη φορμυλο-ομάδα της και να μετατραπεί σε 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλοουρακίλη (AAMU). Η μετατροπή αυτή είναι γενικά αργή αλλά όπως αναφέρεται μπορεί να επιταχυνθεί με την αύξηση του pH (Tang et al., 1983).

Μετά από κλινικές παρατηρήσεις δείχθηκε ότι η συγκεκριμένη μετατροπή συμβαίνει σε

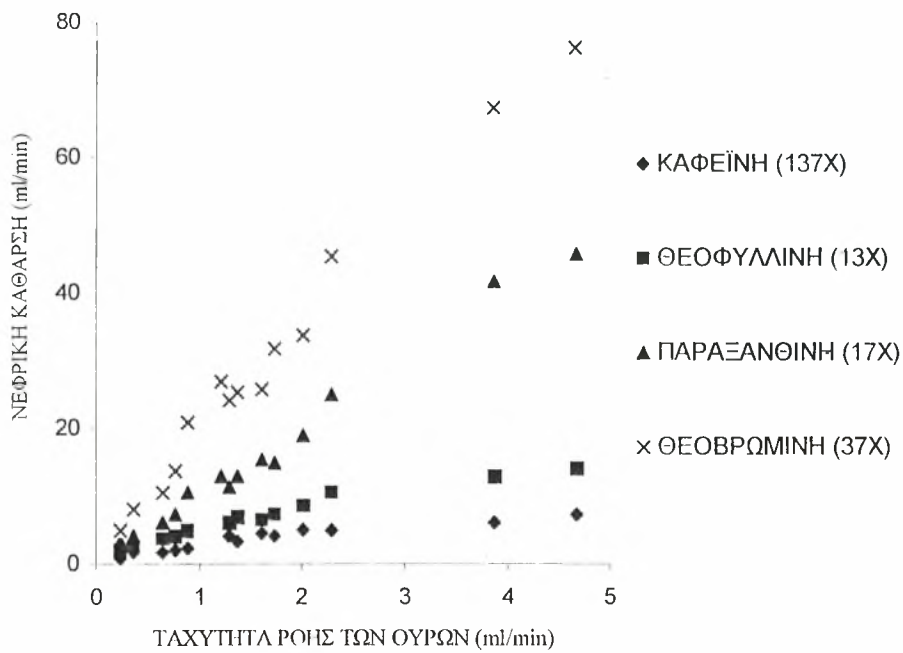
μεγάλο βαθμό μέσα στην ουροδόχο κύστη σε μερικά κατ' εξαίρεση άτομα. αλλά δεν έγινε ξεκάθαρο αν αυτό συμβαίνει εξ' αιτίας του υψηλού pH των ούρων είτε λόγω διαφόρων συστατικών των ούρων που έχουν την ιδιότητα να ενισχύουν την επίδραση του pH (Kalow and Tang, 1993).

Μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-2%) της καφεΐνης που προσλαμβάνεται από τον άνθρωπο απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα. (Bonati et al., 1982; Carrillo and Benitez, 1994). Η τύχη της καφεΐνης και πολλών μεταβολιτών της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως νεφρικούς, ρυθμό ροής των ούρων αλλά και τη μεταβολική ποικιλιότητα. Ο ρυθμός ροής έχει να κάνει με την ποσότητα υγρών που λαμβάνονται από ένα άτομο και μπορεί να επηρεάσει τη νεφρική απέκκριση των μεθυλοξανθινών (Kalow and Tang, 1993). Η συγκέντρωση της καφεΐνης στα ούρα επομένως διαφοροποιείται σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με το χρόνο συλλογής των ούρων.

Ορισμένοι μεταβολίτες παρουσιάζουν ομοιότητες όσον αφορά στη νεφρική απέκκριση. Αυτοί είναι οι 17X, 13X και 37X και πιο συγκεκριμένα η απέκκριση τους εξαρτάται από τη ροή των ούρων και η νεφρική τους κάθαρση είναι υψηλότερη από αυτή της καφεΐνης (Εικόνα 4).

Οι μονο-μεθυλοξανθίνες 3X, 7X τα ουρικά οξέα και οι ουρακίλες έχουν ως κοινό γνώρισμα τη δυσκολία της ανίχνευσής του στο αίμα και στο πλάσμα λόγω της χαμηλής συγκεντρώσεώς τους. Εύκολα όμως μπορούν να μετρηθούν στα ούρα (Tang-Liu et al., 1983). Αυτές οι ενώσεις απεκκρίνονται νεφρικά με τόσο ταχύ ρυθμό που οι ατομικές διαφορές είναι ασήμαντες σε σύγκριση με άλλες διαδικασίες που αφορούν την καφεΐνη. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες, μόλις σχηματίζονται απεκκρίνονται αμέσως με τα ούρα και επομένως είναι πολύ καλοί δείκτες των μεταβολικών διαδικασιών (Kalow and Tang, 1983).





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

### 1.3 Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα.

Ως δείκτες της μεταβολικής δραστηριότητας στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι λόγοι των συγκεντρώσεων ορισμένων μεταβολιτών :

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

$$2) \frac{17X + 17U}{137X} \text{ (Butler et al., 1992)}$$

$$3) \frac{AFMU + 1X + 1U}{17X} \text{ (Grant et al., 1987)}$$

$$4) \frac{17X}{137X} \text{ (Kadlubar et al., 1990)}$$

$$5) \frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X} \text{ (Notarianni et al., 1995)}$$

$$6) \frac{AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U}{137X} \text{ (Carrillo et al., 2000)}$$

Το κοινό γνώρισμα όλων των παραπάνω μεταβολικών λόγων είναι ότι έχουν ως βάση τις αντιδράσεις απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Επίσης, εφόσον οι λόγοι συσχετίζουν τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών μεταξύ τους είναι ανεξάρτητοι από την συνολική ανάκτησή τους στα ούρα.

Θα μπορούσαμε να αναφερθούμε στα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει κάθε λόγος:

Ο λόγος  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  προκύπτει από μια διαδικασία η οποία συνίσταται σε μια μέτρηση στα ούρα των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών AFMU (ή AAMU), 1X, 1U και 17U, 6 ώρες τουλάχιστον μετά τη λήψη της καφεΐνης ή σε ολονύκτια ούρα. Ο συγκεκριμένος λόγος χρησιμοποιείται ουσιαστικά ως δείκτης δραστηριότητας του CYP1A2 (Campbel et al., 1987b; Kalow and Tang 1991a,; Kalow and Tang 1991b). Παρατηρούμε ότι ο αριθμητής του λόγου αντιπροσωπεύει όλους τους μεταβολίτες που παράγονται μέσω του CYP1A2 από την 17X μέσω της οδού της 7- απομεθυλίωσης. Αντίστοιχα, ο παρανομαστής 17U χρησιμεύει σαν αντιρρόπηση στις αποκλίσεις που οφείλονται στις διαφορετικές δοσολογίες της καφεΐνης καθώς και στην ατελή συλλογή των ούρων (Kalow and Tang 1991b), διότι παρουσιάζει τη μικρότερη μεταβλητότητα από όλους τους μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα (Grant et al., 1983).

Στην πραγματικότητα υπάρχει μια μικρή παρέκκλιση της πραγματικής μεταβλητότητας της δραστηριότητας του CYP1A2. Αυτή η παρέκκλιση στη μεταβλητότητα οφείλεται στο ότι η 8-υδροξυλίωση της 17X η οποία δίνει 17U καταλύεται εκτός από το CYP1A2 και από το ένζυμο CYP2A6 (Gu et al., 1992). Επειδή λοιπόν το 17U χρησιμοποιείται στον παρανομαστή, το CYP1A2 το οποίο είναι προσδιοριστικό στον αριθμητή είναι προσδιοριστικό και στον παρανομαστή. Παρόλα αυτά, η παρέκκλιση αυτή στη μεταβλητότητα του CYP1A2 δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συγκριτική κατάταξη των ατόμων σε σχέση με τη δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου (Kalow and Tang, 1993).

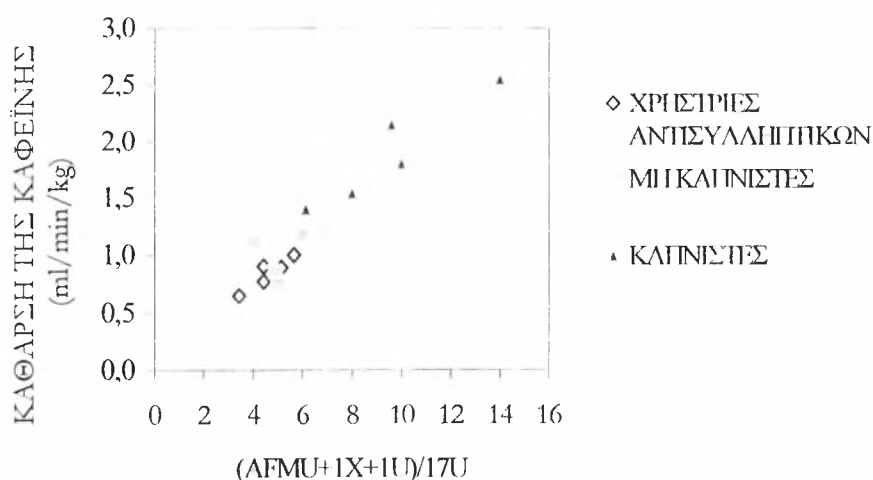
Η εγκυρότητα του μεταβολικού αυτού λόγου ελέγχθηκε με διάφορες μελέτες στις οποίες συσχετίστηκε η τιμή του λόγου αυτού τόσο με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης

η οποία θεωρείται ότι είναι το καλύτερο μέτρο της δράσης του CYP1A2, όσο και με τη δοκιμασία της αναπνοής της καφεΐνης. (Kallow and Tang, 1993). Έτσι παρουσιάστηκε μεγάλη συσχέτιση ( $r=0,91$ ) με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης (Campbell et al, 1987b, Tang et al, 1994, Εικόνα 5) και μεγάλη επίσης συσχέτιση ( $r=0,74$ ) με τη δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης (Lambert et al, 1990). Ο ίδιος λόγος επίσης παρουσίασε υψηλό συντελεστή συσχέτισης ( $r=0,77$ ) σε άλλη μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση μεταξύ αυτού και του λόγου  $\frac{17X + 17U}{137X}$ , ο οποίος παρουσίασε μικρότερη συσχέτιση ( $r=0,46$ ). Στην ίδια μελέτη ο λόγος

$\frac{AFMU + IX + 1U}{17U}$  εμφάνισε κανονική κατανομή σε συμφωνία με την κάθαρση της καφεΐνης

ενώ ο λόγος  $\frac{17X + 17U}{137X}$  όχι.

Ένα πλεονέκτημα του συγκεκριμένου λόγου είναι ότι χρησιμοποιεί τιμές μόνο από τελικά μεταβολικά προϊόντα του μεταβολισμού της καφεΐνης και επομένως ο χρόνος συλλογής των ούρων δεν χρειάζεται να είναι ακριβής αρκεί να τηρείται ένα επαρκές χρονικό διάστημα μεταξύ της λήψης της καφεΐνης και της συλλογής του δείγματος (Εικόνα 5).



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

Η δραστηριότητα του CYP1A2, όπως εκφράζεται με το συγκεκριμένο λόγο, εμφανίζεται ορθώς αυξημένη στους καπνιστές (Kallow and Tang, 1991a; Catteau et al.,



1995; Rasmussen and Brosen, 1996), στα παιδιά (Campbell et al., 1987b), ) και σε άτομα επιβαρημένα με πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (Lambert et al., 1990). Κατά ανάλογο τρόπο ο λόγος αυτός εμφανίζει ορθώς μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 σε έγκυες (Bologa et al., 1991), σε γυναίκες που κάνουν χρήση αντισυλληπτικών (Campbell et al., 1987b; Rasmussen and Brosen, 1996), καθώς και σε άτομα που λαμβάνουν σιμετιδίνη (Shaw-Stiffel et al., 1988).

Ο λόγος  $\frac{17X+17U}{137X}$  όπως και ο  $\frac{17X}{137X}$  χρησιμοποιούνται διότι λειτουργούν με

βάση τον θεωρητικό λόγο: «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο». Παρουσιάζεται όμως το εξής πρόβλημα: επειδή ο μεταβολίτης 17X είναι τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα του CYP1A2 είναι πολύ σημαντικό η συλλογή των ούρων να γίνει με ακρίβεια, δηλαδή ανάμεσα στο χρονικό διάστημα 4-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης.

Επίσης, στους λόγους αυτούς υπάρχουν συστατικά που εξαρτώνται από το ρυθμό ροής των ούρων (17X, 17U, 137X). Είναι πιθανό οι δυο αυτοί παράγοντες στον αριθμητή και στον παρανομαστή να αλληλοαναιρούνται, αλλά ούτε η εξάρτηση από τη ροή ούτε και η νεφρική κάθαρση είναι ίδιες για την καφεΐνη και την 17X .

Ο λόγος  $\frac{AFMU+1U+1X}{17X}$  παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα στους ενήλικες

(εύρος τιμών από 0,89 έως 25,54-σχεδόν 3000%) το οποίο μπορεί να εξηγείται από την επίδραση του ρυθμού ροής των ούρων στην απέκκριση της 17X (Grant et al., 1983).

Οι λόγοι  $\frac{AFMU+1X+1U+17X}{137X}$  και  $\frac{AFMU+1X+1U+17X+17U}{137X}$

χρησιμοποιούν την 17X και τα προϊόντα απομεθυλώσής της προς την καφεΐνη και συμφωνούν καλύτερα με το θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο». Οι λόγοι αυτοί έχουν το μειονέκτημα ότι στον παρανομαστή τους υπάρχει ένα συστατικό που εξαρτάται από το ρυθμό ροής των ούρων το οποίο μπορεί να αλλοιώνει την εικόνα της δραστηριότητας του CYP1A2.

Η διαδικασία η οποία θα απέφερε τα περισσότερα συμπεράσματα θα ήταν η απευθείας σύγκριση μεταξύ των διαφόρων δοκιμασιών δραστηριότητας του CYP1A2 σε ανθρώπους *in vivo* και της λειτουργίας του ενζύμου σε βιοψία ήπατος (η οποία θεωρείται η πρότυπη μέθοδος ελέγχου λειτουργίας του ενζύμου). Αλλά επειδή δεν είναι πάντοτε εφικτή και είναι σαφώς επεμβατική η πρότυπη αυτή μέθοδος, μια άλλη αποδεκτή μέθοδος είναι ο υπολογισμός της μερικής μεταβολικής κάθαρσης της καφεΐνης δια της οδού της 3-απομεθυλώσης. Εύχρηστο πρότυπο αποτελεί επίσης και η συστηματική κάθαρση της

καφεΐνης εφόσον το CYP1A2 ευθύνεται για το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης στα περισσότερα άτομα.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Notarianni et al., (1995), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν 237 υγιή άτομα, εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι υπάρχουν πολύ μικρές συσχετίσεις των περισσότερων λόγων μεταξύ τους, ενώ στο βαθμό που οι διάφοροι λόγοι δεν απεικονίζουν το ίδιο πράγμα κάποιιο είναι ίσως καλύτεροι από άλλους όσον αφορά τη δραστηριότητα του CYP1A2.

Κατόπιν έγινε μια μελέτη με τη χρήση Η/Υ και εξετάστηκε η εγκυρότητα των μεταβολικών αυτών λόγων. Χρησιμοποιήθηκαν φαρμακοκινητικές παράμετροι της CA και των μεταβολιτών της που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Rostami-Hodjegan et al., 1996). Με τη διαδικασία της εξομείωσης συσχετίστηκε η επίδραση των μεταβολών της δραστηριότητας του CYP1A2 στους διάφορους μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης με τις μεταβολές της νεφρικής κάθαρσης της CA και τη δραστηριότητα των CYP2A6 και CYP2E1.

Η συσχέτιση αυτή έδειξε ότι ο λόγος  $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17U}$  μεταβάλλεται ανάλογα με τη δραστηριότητα του CYP1A2. Μεταβάλλεται όμως έμμεσα και με τη δραστηριότητα του CYP2A6 παρόλο που είναι ανεξάρτητος από τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και τη δραστηριότητα του CYP2E1. Κάθε ένας από τους λόγους έχει ένα βαθμό ευαισθησίας στην απεικόνιση της δραστηριότητας του CYP1A2 η οποία αυξάνεται με την εξής σειρά:  $\frac{17X}{137X}$ ,

$\frac{17X + 17U}{137X}$ ,  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ ,  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17X}$ ,  $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$ . Επομένως,

αν όλες οι υπόλοιπες παράμετροι παραμένουν σταθερές, οι τρεις τελευταίοι λόγοι πρέπει να είναι οι καλύτεροι υποκατάστατοι δείκτες της δραστηριότητας του CYP1A2. Αυτό αποδείχθηκε από τους Rost και Roots (1994) οι οποίοι έδειξαν ότι ο λόγος

$\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  ( $r=0,90$ ) ήταν καλύτερος από τους λόγους  $\frac{17X}{137X}$  ( $r=0,62$ ) και

$\frac{17X + 17U}{137X}$  ( $r=0,52$ ) στο να επισημαίνουν καλύτερα τη αύξηση της δραστηριότητας του

CYP1A2 μετά από επαγωγή με την ουσία ομεπραζόλη. Η σύγκριση έγινε με το πρότυπο της συστηματικής κάθαρσης της καφεΐνης η οποία, όπως έχει αναφερθεί γίνεται κατά 95% από το CYP1A2 (Kalow and Tang, 1993).

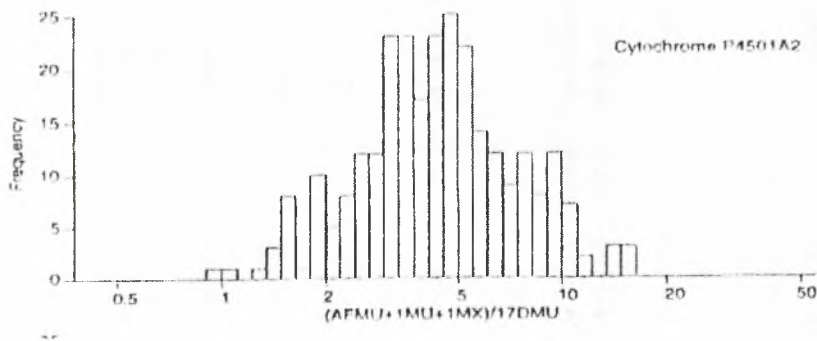
Στη συνέχεια αυτών των μελετών (Denaro et al, 1996) εξετάστηκαν οι μεταβολικοί λόγοι  $\frac{AAMU + 1U + 1X}{17U}$ ,  $\frac{AAMU + 1X + 1U}{17X}$  και  $\frac{17X + 17U}{137X}$  σε σχέση με την κάθαρση της

καφεΐνης με τη χρήση ραδιοεπισημασμένης καφεΐνης. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο

λόγος  $\frac{AAMU + 1U + 1X}{17U}$  είναι περισσότερο αξιόπιστος στο να περιγράφει την κάθαρση της καφεΐνης από του υπόλοιπους. Η μέτρηση είναι εύκολο να γίνει τόσο σε καπνιστές όσο και σε μη καπνιστές μετά από τη λήψη ενός μεμονωμένου δείγματος ούρων (spot urine sample). Υπάρχει όμως η περίπτωση υψηλές δόσεις καφεΐνης (12 mg/kg/ημέρα) να καθιστούν τη συσχέτιση αυτή λιγότερο έγκυρη.

Βρέθηκε ακόμη ότι ο λογάριθμος του λόγου  $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17U}$  έχει κανονική κατανομή (lognormal) συνεπώς βρίσκεται πιθανώς κάτω από περιβαλλοντικό έλεγχο (Kalow and Tang, 1991b; Vistisen et al., 1992; Catteau et al., 1995; Εικόνα 6). Οι λόγοι  $\frac{17X + 17U}{137X}$  και  $\frac{17X}{137X}$  παρουσιάζουν δικόρυφες ή τρικόρυφες κατανομές οι οποίες υποδεικνύουν είτε γενετικό έλεγχο του ενζύμου είτε ποικίλες περιβαλλοντικές επιδράσεις μέσα στον ίδιο πληθυσμό (Butler et al., 1992, Kadlubar et al., 1990). Γενικώς η κανονική κατανομή υποδηλώνει ομοιογενή πληθυσμό ενώ δικόρυφες ή πολυκόρυφες κατανομές υποδηλώνουν ετερογενή πληθυσμό (Καραγιάννης, 1999). Πράγματι, σε μια μελέτη διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις στο ηπατικό ένζυμο NAT 2 με οκτώ αλληλόμορφα τα οποία κωδικοποιούν για το φαινότυπο της ταχείας και επτά αλληλόμορφα τα οποία κωδικοποιούν για το φαινότυπο της αργής ακετυλίωσης. Οι φαινότυποι αυτοί καθορίστηκαν με το μεταβολικό λόγο AFMU/1X στα ούρα μετά τη χορήγηση καφεΐνης. Ο φαινοτυπικός πολυμορφισμός απεικονίστηκε ως μια δικόρυφη κατανομή των συχνοτήτων του λογαρίθμου του ανωτέρου λόγου (Cascorbi et al, 1995). Όσον αφορά το CYP1A2 έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση στην ενεργότητα του ενζύμου μεταξύ διαφόρων ατόμων. Για παράδειγμα μελέτες που χρησιμοποιούν την καφεΐνη ως πρότυπο υπόστρωμα για το CYP1A2 δείχνουν μια τρικόρυφη κατανομή (trimodal) της ενζυμικής δραστηριότητας η οποία είναι σύμφωνη με φαινότυπους ταχέων, μέσων και βραδέων μεταβολιστών (Tang et al., 1994; Butler et al., 1992, Welfare et al, 1999). Παρόλη την λεπτομερή έρευνα σχετικά με τον πολυμορφισμό δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου CYP1A2 αν εξαιρέσουμε μια σπάνια μετάλλαξη σε έναν κινεζικό πληθυσμό (Hung et al, 1999). Επειδή λοιπόν δεν υπάρχουν λειτουργικά σημαντικοί γενετικοί πολυμορφισμοί, έχουν προταθεί ιδιοσυστατικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που ευθύνονται για τη μεγάλη ποικιλότητα του ανθρώπινου CYP1A2 μεταξύ διαφόρων ατόμων. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η συχνότητα κατανομής του λογαρίθμου του λόγου  $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17X}$

αναφέρεται ότι είναι κεκλιμένος (skewed) παρόλο που ο διπλός λογάριθμος έδειξε μία πιο συμμετρική κατανομή (Relling et al., 1992).



Εικόνα 6. Κατανομή συχνότητας των μεταβολικών λόγων των ούρων που αντιπροσωπεύουν τη δραστηριότητα του CYP1A2 σε 277 υγιείς εθελοντές (Rasmussen and Brosen, 1996).

#### 1.4 Ηπατική νόσος και μεταβολισμός της καφεΐνης.

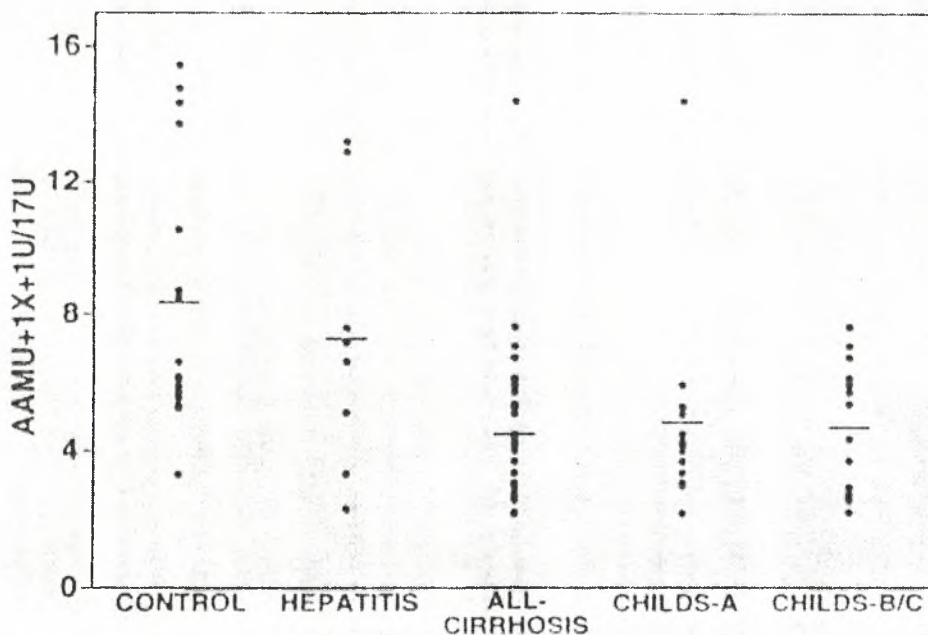
Σε ασθενείς που πάσχουν από κάποια ηπατική νόσο ο μεταβολισμός των φαρμάκων αναστέλλεται ενώ η συνολική συγκέντρωση του κυτοχρώματος P450 είναι σημαντικά μειωμένη (Howden et al., 1989). Κατ' ανάλογο τρόπο, στους ασθενείς αυτούς είναι μειωμένη και η αποβολή της καφεΐνης. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός αυτό μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την καφεΐνη και ειδικότερα την κάθαρση αυτής για εκτιμήσουμε την λειτουργία του ήπατος (Holstege et al., 1989; Scott et al., 1989). Παρατηρείται μια εξαίρεση στον κανόνα αυτόν στους ασθενείς με αντισταθμιζόμενη ηπατική νόσο αφού η κάθαρση της καφεΐνης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό επειδή δεν μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς από τους υγιείς (Scott et al., 1988; Scott et al., 1989).

Σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρή κίρρωση Child B και στους ασθενείς που βρίσκονται στο στάδιο Child A ο Bechtel *et al.*, (2000) παρατήρησε σημαντική μείωση του μεταβολισμού της καφεΐνης. Η μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας προήλθε από μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, του μοναδικού ενζύμου δηλαδή που είναι υπεύθυνο για την N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης. Από τις ίδιες πηγές αναφέρεται ότι σε ασθενείς που πάσχουν από αλκοολική κίρρωση ο μειωμένος μεταβολισμός της καφεΐνης που αυτοί εμφανίζουν δεν προσφέρει κάποια επιπλέον πληροφορία όσον αφορά τη σοβαρότητα της ασθένειας εάν μάλιστα συγκριθεί με τις κλινικές δοκιμασίες που ήδη υπάρχουν. Η νόσος όμως έχει κάποια διαφορετική επίδραση στα ένζυμα της μεταβολικής οδού της καφεΐνης με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια μετατόπιση από τις κύριες οδούς του μεταβολισμού προς δευτερεύουσες.



Οι ασθενείς με αλκοολική κίρρωση θα μπορούσαν να επωφεληθούν της συγκεκριμένης δοκιμασίας διότι η ύπαρξή της σε συνδυασμό με τις συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις βελτιώνει την παρακολούθηση (follow up) των ασθενών.

Με ασθενείς που έπασχαν από διαπιστωμένη πρωτογενή χολική κίρρωση (PBC), ταξινομημένους σύμφωνα με την κατάταξη κατά Scheuer, και υγιείς ως ομάδα ελέγχου ασχολήθηκε ο Lelouet *et al.*, (2001) χρησιμοποιώντας μάλιστα την ίδια μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ο μεταβολικός δείκτης του CYP1A2 ήταν σημαντικά μειωμένος τόσο περισσότερο όσο οι ασθενείς ήταν ταξινομημένοι σε υψηλότερο ιστολογικό στάδιο. Επομένως οι ασθενείς που πάσχουν από PBC εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού της καφεΐνης. Αυτό συμβαίνει λόγω της μειωμένης δραστηριότητας του CYP1A2. Την εικόνα αυτή παρατηρούμε σε οποιαδήποτε χρόνια ηπατική νόσο ανεξάρτητα από την προέλευσή της (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Λόγος AAMU+1X+1U ο οποίος υπολογίστηκε από μεμονωμένα δείγματα ούρων σε υγιείς εθελοντές (control) και σε ασθενείς που έπασχαν από ηπατική ασθένεια. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τις μέσες τιμές του λόγου (Denaro *et al.*, 1990).

Σε ξεχωριστή μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Ullrich *et al.* (1992), συμμετείχαν ασθενείς με κίρρωση (Child A=5, Child C=2). Εξετάστηκε η απέκκριση της καφεΐνης και 14 μεταβολιτών της με τη μέθοδο της HPLC και βρέθηκαν σημαντικές

διαφορές ανάμεσα στα προφίλ απέκκρισης μεταξύ κίρρωτικών και υγιών. Από τα παραπάνω διαπιστώνεται διαφοροποίηση στην αποικοδόμηση της καφεΐνης μεταξύ υγιών και ασθενών.

Ο Rodopoulos *et al.* (1995) σε διαφορετική μελέτη που πραγματοποίησε και στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με χρόνια αλκοολική κίρρωση στους οποίους χορηγήθηκε καφεΐνη έδειξε ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης ( $T_{1/2}$ ) ήταν περισσότερο παρατεταμένος στους ασθενείς με κίρρωση παρά στους υγιείς, και μάλιστα οι υψηλότερες τιμές παρουσιάστηκαν σε αυτούς που παρουσίαζαν τη νόσο με μεγάλη σοβαρότητα, κλινικώς μη αντισταθμιζόμενη ηπατική λειτουργία. Σε ασθενείς που παρουσιάζουν ήπια μορφή κίρρωσης όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά την οποία τα αποβαλλόμενα ούρα χρησιμοποιούνται ως διακριτικό στοιχείο της ηπατικής βλάβης ο  $T_{1/2}$  της καφεΐνης στους ασθενείς αλληλεπικαλύπτονταν με τον  $T_{1/2}$  των υγιών, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στη χρήση της μεθόδου. Το ποσοστό των μεταβολιτών της οδού της PX στά ούρα ήταν χαμηλότερο στους ασθενείς απότι στους υγιείς. Εξάλλου, στους ασθενείς χαμηλότερες ήταν διαδικασίες της N-3 απομεθυλίωσης καθώς και της N-7 απομεθυλίωσης, ενώ η N-1 απομεθυλίωση ήταν υψηλότερη από ότι στους υγιείς. Σαν ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων μπορούμε να πούμε ότι αυξημένος  $T_{1/2}$  στους ασθενείς δεν οφείλεται μόνον στο μειωμένο αριθμό των λειτουργικών ηπατοκυττάρων, γιατί τότε θα ήταν αναμενόμενη μία παράλληλη και συμμετρική μείωση σε όλα τα στάδια της βιομετατροπής της καφεΐνης, αλλά οφείλεται κυρίως στη μείωση της ικανότητας της N-3 και N-7 απομεθυλίωσης δηλαδή στη μειωμένη μεταβολική ικανότητα των ηπατοκυττάρων και συνεπώς στη μειωμένη λειτουργικότητα του υπεύθυνου για τις αντιδράσεις αυτές ενζύμου CYP1A2.

Στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Denaro *et al.* (1996) σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από αλκοολική κίρρωση, χολική κίρρωση και ηπατίτιδα Β, C χορηγήθηκε καφεΐνη και παρατηρήθηκε ότι η κάθαρση της καφεΐνης ήταν μειωμένη στους ασθενείς αυτούς σε σχέση με τους υγιείς. Διάφοροι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης επηρεάστηκαν από την ηπατική νόσο και πιο συγκεκριμένα, ο λόγος  $\frac{AAMU + 1X + 1U}{17U}$  βρέθηκε να είναι αρκετά μικρότερος στους ασθενείς με κίρρωση σε σχέση με τους υγιείς. Όμως η τιμή του λόγου αυτού σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα δεν διαφέρει από αυτή των υγιών κατά μεγάλο βαθμό. Ακόμη, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν συσχετίστηκε ο λόγος με την κατάξη των ασθενών κατά Child-Pugh όπως είχε δειχθεί σε άλλες μελέτες (Holstege *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1989). Οι Denaro *et al.* (1996) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ανωτέρω λόγος επηρεάζεται σε άτομα που πάσχουν από ηπατική νόσο και αντανακλά τη μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2. Επομένως η μέτρηση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία ελέγχου του ήπατος. Ανεξάρτητα από την μεγάλη ποικιλότητα που παρατηρείται

μεταξύ των ατόμων η δοκιμασία μπορεί να επαναληφθεί στον ίδιο ασθενή πολλές φορές ώστε να γίνει παρακολούθηση (monitoring) της σταδιακής μείωσης της δραστηριότητας του CYP1A2 με προοδευτική εξασθένηση της ηπατικής λειτουργίας. Το μειονέκτημα που παρατηρείται και εδώ είναι ο μεγάλος βαθμός επικάλυψης που παρατηρείται στις μετρούμενες τιμές και γι' αυτό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος για διάγνωση σε έναν συγκεκριμένο ασθενή, ενώ μπορεί να διακρίνει ηπατικούς ασθενείς από υγιείς.

Στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε από τους El-Yazigi *et al.* (1999) μετρήθηκε το μεταβολικό προφίλ της καφεΐνης καθώς και η κάθαρσή της από το σίελο σε παιδιατρικούς ασθενείς με ηπατική νόσο. Προσδιορίστηκε ο λόγος  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$  μετρώντας τους μεταβολίτες με τη μέθοδο της HPLC. Διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος αλλά και η κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο παρουσίαζαν σημαντική μείωση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς.

Οι Lewis and Rector (1992) ασχολήθηκαν και αυτοί με την κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο και η μέτρηση έγινε σε ασθενείς με κίρρωση σε δείγματα νηστείας, χωρίς χορηγούμενη δόση καφεΐνης. Ο μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στο ήπαρ παρουσιάστηκε πολύ ελαττωμένος σε νοσοκομειακούς ασθενείς με επιπλοκές ηπατικής νόσου. Και στη συγκεκριμένη μελέτη, αλλά και σε άλλες, παρά το γεγονός της ισχυρής συσχέτισης ανάμεσα στην κάθαρση και σε κλινικούς δείκτες της σοβαρότητας της ηπατικής νόσου, η κλίμακα Child-Pugh προβλέπει τη θνησιμότητα το ίδιο καλά και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερα σε σχέση με την κάθαρση. Όμως χρήσεις στις οποίες μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά η ηπατική λειτουργία περιλαμβάνουν εκτός από την πρόβλεψη της επιβίωσης, τον υπολογισμό της σοβαρότητας της μεταβολικής βλάβης, με σκοπό τη χορήγηση των κατάλληλων φαρμάκων, περιγραφή της προόδου της ασθένειας της νόσου, εξέταση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και υπολογισμό του ιδανικού χρόνου για μεταμόσχευση ήπατος. Η κάθαρση της καφεΐνης για τις χρήσεις αυτές πρέπει να ελεγχθεί, παρουσιάζει όμως μεγάλο πλεονέκτημα λόγω της εγκυρότητας των απλοποιημένων μετρήσεων και της ευκολίας με την οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ασθενείς με σοβαρή μορφή της νόσου.

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

	ΣΤΑΔΙΟ Α (Ελάχιστη-ήπια νόσος)	ΣΤΑΔΙΟ Β (Μέτρια νόσος)	ΣΤΑΔΙΟ C (Προχωρημένη νόσος)
Χολερυθρίνη ορού	< 2,0mg/dl	2,0-3.0mg/dl	> 3,0mg/dl
Λευκωματίνη ορού	> 3,5 g/dl	2,8-3.5 g/dl	< 2,8 g/dl
Ρονοπροθορομβίνης (χρόνος σε sec)	< 4	4-6	> 6
Λσκίτης	Δεν υπάρχει	Εύκολα ελεγχόμενος	Δύσκολα ελεγχόμενος
Ηπατική εγκεφαλοπάθεια	Απούσα	Στάδιο 1 ή 2	Στάδιο 3 ή 4

### 1.5 Χρωματογραφικές μέθοδοι για την ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την απομόνωση των μεταβολιτών της καφεΐνης από τα ούρα και την επακόλουθη ποιοτική και ποσοτική τους ανάλυση.

Το 1983 ο Grant και οι συνεργάτες του (Grant et al., 1983) απομόνωσαν 13 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα με εκχύλιση υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη σε κατ' όγκον αναλογία 85/15. Το AFMU απομονώθηκε ξεχωριστά με καθαρό χλωροφόρμιο. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με χρήση χρωματογραφικής στήλης C18 και η έκλουση των 4 μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά με διαλύτη 0,05 % οξικό οξύ / μεθανόλη σε κατ' όγκον αναλογία 88/12 για τις ξανθίνες και τα ουρικά και 85/15 για το AFMU. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 1,2 ml/min και η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 280 nm. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε 1-ακετυλο-π-αμινοφαινόλη.

Το 1991 ο Tang και οι συνεργάτες του (Tang et al., 1991) ακολούθησαν την ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι μετέτρεψαν το AFMU σε LAMU μετά από έκθεσή του για 10 λεπτά σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (pH=10) και ανάλυση με χρωματογραφία αποκλεισμού (exclusion chromatography) σε ξεχωριστή στήλη. Η ανίχνευσή του έγινε στα 263 nm.



Το 1993 ο Dobrocky και οι συνεργάτες του ( Dobrocky et al., 1993) ανέλυσαν 16 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα χωρίς απομόνωση αλλά με απευθείας έγχυση του δείγματος των ούρων. Έγινε προκατεργασία του AFMU το οποίο μετατράπηκε σε AAMU όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Η προκατεργασία περιλάμβανε μόνο την αραίωση του δείγματος με νερό και φυγοκέντρηση πριν την έγχυση. Στη μέθοδο αυτή το AAMU ανιχνεύτηκε ταυτόχρονα με τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η 4-ακεταμινοφαινόλη. Στην παρούσα μέθοδο οι πιο υδρόφιλοι μεταβολίτες διαχωρίστηκαν με στήλη C18 με βαθμιδωτή έκλυση. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μείγμα ακετονιτρίλιου και νερού με προσθήκη μικρής ποσότητας υδροχλωρίου. Οι τέσσερις πιο λιπόφιλοι μεταβολίτες (13X, 17X, 137U και καφεΐνη) διαχωρίστηκαν ισοκρατικά σε διαφορετική στήλη με τη χρήση μείγματος τετραϋδροφουρανίου και οξικού νατρίου.

Το 1994 οι Carrillo και Benitez (Carrillo and Benitez, 1994) ανέλυσαν 12 μεταβολίτες της καφεΐνης και την ίδια την καφεΐνη αφού τους απομόνωσαν με εκχύλιση υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη σε κατ' όγκο αναλογία 90/10. Το AFMU μετατράπηκε σε AAMU κάτω από βασικές συνθήκες (pH=10) και αναλύθηκε με χρωματογραφία αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography). Οι υπόλοιποι μεταβολίτες διαχωρίστηκαν με τη χρήση δύο εν σειρά συνδεδεμένων χρωματογραφικών στηλών (ανάστροφης φάσης). Η έκλυση των μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά με τη χρήση μείγματος οξικού οξέος, ακετονιτρίλιου, τετραϋδροφουρανίου και ύδατος σε κατ' όγκον αναλογία 1/44/2,5/952,5 αντίστοιχα. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml/min και η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 280 nm.

Το 1996 η Rasmussen και οι συνεργάτες της (Rasmussen et al., 1996) απομόνωσαν 13 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα με εκχύλιση υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας ακετοξικό οξύ/ 2-προπανόλη σε κατά βάρος αναλογία 93/7. Η χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολιτών έγινε με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης C18 και η έκλυση των μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (0,1 M, pH = 4,0) και μεθανόλη σε κατά βάρος αναλογία 91/9. Η στήλη διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας σε θερμοκρασία 30 °C και η ταχύτητα ροής ήταν 1ml/min μέχρι το 11' λεπτό, 1,5 ml/min μέχρι το 17' λεπτό και 2,5 ml/min μέχρι το 30' λεπτό. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 273 nm ενώ σαν εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η β-υδροξυμεθυλο-θεοφυλλίνη.

Το 1996 ο Zhao και οι συνεργάτες του (Zhao et al , 1996) ανέλυσαν 4 μεταβολίτες της καφεΐνης με τη μέθοδο της μικυλλιακής ηλεκτροκινητικής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης η οποία επιτυγχάνει καλύτερο διαχωρισμό των μεταβολιτών.

Το ίδιο έτος η Ambrose και οι συνεργάτες της (Ambrose et al., 1996) ανέλυσαν 6 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα με απευθείας έγχυση του δείγματος των ούρων σε χρωματογραφική στήλη με υλικό πληρώσεως silicalite το οποίο αποτελεί μοριακό κόσκινο. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφική ανάλυση περιείχε 10% και 55% ακετονιτρίλιο ανάλογα με το επιθυμητό pH. Η ανίχνευση έγινε στα 230 nm.

Το 1998 οι Krul and Hageman (Krul and Hageman, 1998) απομόνωσαν 5 μεταβολίτες καφεΐνης από τα ούρα με εκχύλιση υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας μείγμα χλωροφόρμιο / 2-προπανόλη σε κατά όγκο αναλογία 4/1. Η χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολιτών έγινε με χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και η έκλουση των 5 μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά με τη χρήση κινητής φάσης που αποτελούνταν από διάλυμα 33% οξικού οξέος - τετραυδροφουράνιο / ακετονιτρίλιο / υπερκαθαρό νερό σε κατά όγκο αναλογία 1/2,5/44/952,5. Η ταχύτητα ροής διατηρήθηκε στο 1 ml/min και η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 280 nm. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό πρότυπο N-ακεταμινοφαινόνη.

Το 1999 η Sinues και οι συνεργάτες της (Sinues et al., 1999) απομόνωσαν 13 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα με μέθοδο της υγρής εκχύλισης με μείγμα χλωροφόρμιου και ισοπροπανόλης σε κατά όγκο αναλογία 95/5. Ο διαχωρισμός έγινε με χρωματογραφία ανάστροφης φάσης με κινητή φάση που ήταν μείγμα ακετοξικού οξέος, μεθανόλης και νερού σε κατά όγκο αναλογία 0,5/ 90/ 905,5 ενώ η έκλουση των μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά. Η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

Το 2000 ο Bendriss και οι συνεργάτες του ( Bendriss et al., 2000) απομόνωσαν 16 μεταβολίτες της καφεΐνης από τα ούρα με διαδικασία εκχύλισης υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας μείγμα με χλωροφόρμιο και ισοπροπυλική αλκοόλη με περιεκτικότητα κατά όγκο 85/15. Η χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολιτών έγινε με χρήση στήλης C18 και η έκλουση των μεταβολιτών έγινε μη ισοκρατικά με τη μέθοδο της σταδιακής βαθμιδωτής έκλουσης (step gradient) και χρησιμοποιήθηκαν 2 κινητές φάσεις, 0,05 % οξικό οξύ / μεθυλική αλκοόλη σε κατά όγκο αναλογία 92,5/7,5 και 0,05% οξικό οξύ / μεθυλική αλκοόλη σε αναλογία κατά όγκο 60/40. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,5 ml/min μέχρι το 10<sup>ο</sup> λεπτό και κατόπιν αυξήθηκε στο 1 ml/min μέχρι το 60<sup>ο</sup> λεπτό. Στη μέθοδο αυτή το εσωτερικό πρότυπο ήταν η N-ακετυλο-p-αμινοφαινόλη.

Το 2000 η Nyeki και οι συνεργάτες της ( Nyeki et al., 2000) ανέλυσαν την καφεΐνη, το AAMU και 13 άλλους μεταβολίτες της καφεΐνης με απευθείας έγχυση του δείγματος των ούρων σε χρωματογραφική στήλη με υλικό πληρώσεως την Polyamine 3. Η προκατεργασία του δείγματος περιελάμβανε μόνο αραιώση και φυγοκέντριση. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μείγμα φορμικού οξέος και ακετονιτριλίου σε διάφορες αναλογίες με

διαδοχική βαθμιδωτή έκλουση των μεταβολιτών (step gradient elution). Το εσωτερικό πρότυπο ήταν το 1,9 μεθυλοουρικό οξύ και η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 260 και 380 nm ταυτόχρονα.

Το 2001 ο Baud-Camus και οι συνεργάτες του (Baud-Camus et al., 2001) ανέλυσαν 3 μεταβολίτες της καφεΐνης που περιέχονται στα ούρα. Για τους μεταβολίτες 1U, 1X χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction) χρησιμοποιώντας μεθανόλη και μείγμα ακετοξικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου σε pH=3,8 σε κατά όγκο αναλογία 1/9. Το AFMU μετατράπηκε σε AMU κάτω από βασικές συνθήκες. Η χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολιτών έγινε σε στήλη με λειτουργική ομάδα NH<sub>2</sub> και η έκλουση των μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μείγμα ακετονιτρίλιου και 0,5% οξικού οξέος σε κατά όγκο αναλογία 95/15. Έγινε επίσης χρήση guard column ενώ η ταχύτητα ροής διατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης στο 1ml/min. Η ανίχνευση του μεταβολίτη 1U έγινε στα 273 nm ενώ του 1X στα 245 nm. Για την ανίχνευση του AMU χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας (LC-ES-MS). Η δυφιλίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

Το 2001 η Georga και οι συνεργάτες της (Georga et al., 2001) απομόνωσαν 11 μεταβολίτες της καφεΐνης που περιέχονται στα ούρα με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας μείγμα μεθανόλης ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος (pH=3,5) σε κατά όγκο αναλογία 50/50. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με χρωματογραφική στήλη C4. Η έκλουση των μεταβολιτών έγινε με βαθμιδωτή έκλουση χρησιμοποιώντας για κινητή φάση μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος ακετοξικού οξέος (pH=3.5) και μεθανόλης. Η ταχύτητα ροής διατηρήθηκε στο 1 ml/min καθ' όλη τη διάρκεια της μεθόδου, ενώ η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 275 nm. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρακεταμόλη.

Το 2001 η Caubet και οι συνεργάτες της (Caubet et al., 2001) ανέλυσαν 15 μεταβολίτες της καφεΐνης με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε σε στήλη C18. Η έκλουση των μεταβολιτών έγινε με βαθμιδωτή έκλουση χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μείγμα νερού / ακετοξικού οξέος/ THF σε κατά όγκο αναλογία 996,5/1/5 καθώς και ακετονιτρίλιο ως δεύτερη κινητή φάση. Η ταχύτητα ροής διατηρήθηκε στα 1 ml/min καθ' όλη τη διάρκεια της μεθόδου ενώ η ανίχνευση των ξανθινών και του εσωτερικού προτύπου έγινε στα 270 nm και η ανίχνευση των ουρικών οξέων στα 290 nm. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 23 ± 5°C. Σαν εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η β-υδροξυεθυλοθειοφυλλίνη.

Στην παρούσα εργασία έγινε ποσοτικός προσδιορισμός τεσσάρων από τους κυριότερους μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα, δηλαδή των AFMU, 1U, 1X, 17U. Η

απομόνωση των μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου από τα ούρα έγινε με εκχύλιση υγρού/υγρού χρησιμοποιώντας μείγμα χλωροφορμίου/ ισοπροπανόλης (85/15 κατά όγκο αναλογία). Ο διαχωρισμός των μεταβολιτών επιτεύχθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης με χρήση στήλης C18. Η έκλυση των μεταβολιτών έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση που αποτελούνταν από μείγμα 0,01% οξικό οξύ/ μεθανόλη/ακετονιτρίλιο σε κατά όγκο αναλογία 92/4/4. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού και σε μήκος κύματος 280 nm.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πρωτόκολλο

Στη μελέτη συμμετείχαν 15 υγιή άτομα (9 άνδρες και 6 γυναίκες) και 7 ασθενείς άνδρες με κίρρωση από ηπατίτιδα Β, C αφού τους δόθηκαν γραπτές και προφορικές οδηγίες. Η μέση ηλικία των ατόμων ήταν 33,6 χρόνια (εύρος 22-51). Τρία άτομα δήλωσαν ότι είναι καπνιστές (1- 3) τσιγάρα την ημέρα. Καμία γυναίκα δεν λάμβανε αντισυλληπτικά. Τα άτομα απείχαν από κατανάλωση τροφίμων και ποτών που περιέχουν μεθυλοξανθίνες για 24 ώρες πριν από τη μελέτη και μέχρι τη χρονική στιγμή συλλογής του δείγματος των ούρων. Επίσης απείχαν για το ίδιο διάστημα από φάρμακα και αλκοόλ. Κάθε άτομο την ημέρα της δοκιμασίας κατανάλωσε 1 κάψουλα με 200 mg καφεΐνης (caffeine pure, Φαρμακείο Χαρ. Κούρτη, Λάρισα). Έξι ώρες αργότερα κάθε άτομο συνέλεξε 1 μεμονωμένο δείγμα ούρων σε αποστειρωμένο πλαστικό ουροσυλλέκτη ο οποίος περιείχε 150 ml υδροχλωρικού οξέος 6N. Το δείγμα των ούρων αποθηκεύτηκε στους 4° C μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Κατόπιν, και σε όσο το δυνατόν συντομότερο διάστημα (περίπου 2 ώρες) το δείγμα μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας και προσαρμόστηκε σε pH= 3,5 με την προσθήκη 6N υδροχλωρικού οξέος όπου ήταν απαραίτητο. Στη συνέχεια δείγματα (aliquots) 1 ml από τα ούρα αυτά αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

### 2.2 Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Η προμήθεια των προτύπων ουσιών 1U, 17U, 1X και της 4-ακεταμιδοφαινόλης έγινε από τη Sigma (Steinheim, Γερμανία). Η πρότυπη ουσία AFMU παραχωρήθηκε μετά από ευγενική προσφορά του κ. R.Foumeaux (Centre Recherche Nestle – Laussane, Ελβετία) και ήταν καθαρότητας >98%.

Η προμήθεια του ακετονιτριλίου και της ισοπροπανόλης έγινε από την SDS (Peypin, France) και ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC. Η μεθανόλη και το χλωροφόρμιο

προμηθεύτηκαν από την Merck (Darmstadt, Germany) και ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC.

Η προμήθεια των ουσιών υδροχλωρίο, θειικό αμμώνιο και οξικό οξύ έγινε από τη Riedel – de Haen (Seelze, Γερμανία) και ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό νερό (αγωγιμότητας 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) το οποίο παράχθηκε από μια ιοντοανταλλακτική στήλη η οποία ήταν συνδεδεμένη με συσκευή αντίστροφης ώσμωσης.

### 2.3 Όργανα και συσκευές

Η διαδικασία της υγρής εκχύλισης και της χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των παρακάτω οργάνων και συσκευών:

- α) Μικροσύριγγα, εγχύσεως δείγματος Hamilton, 100  $\mu\text{l}$  (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Ελβετία).
- β) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7010 (Alltech Associates Inc., Deerfield IL, ΗΠΑ)
- γ) Ενσωματωμένος βρόχος (loop) σταθερού όγκου δείγματος, 20 $\mu\text{l}$  (Rigas Labs, Θεσ/νίκη).
- δ) Αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσ/νίκη)
- ε) Ανιχνευτής υπεριώδους/ ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσ/νίκη).
- στ) Απαερωτής κινητής φάσης (Alltech on-line degasser system)
- ζ) Φίλτρο κινητής φάσης (Alltech metal-free mobile phase inlet filter)
- η) Συνθετικοί σωλήνες μεταφοράς της κινητής φάσης από το δοχείο έως την αντλία διπλού τοιχώματος, 1/8'' x 1,5mm (εξωτ. διάμετρος x εσωτ. διάμετρος) οι οποίοι αποτρέπουν την επαναδιάλυση του ατμοσφαιρικού αέρα στην απαερωμένη κινητή φάση (Alltech, NO-OX tubing)
- θ) Φυγόκεντρος TDX σταθερής ταχύτητας 11220 rpm (ABBOTT Diagnostics Products GmbH, Γερμανία)
- ι) Φυγόκεντρος Runne Heildeberg, Mod. 80-2 μεταβλητής ταχύτητας (Runne Heildeberg, Γερμανία)
- ια) Στήλη χρωματογραφίας Kromasil 100, C18, διαμέτρου σωματιδίων 5 $\mu\text{m}$ , διαστάσεων 250 x 4,6 mm (μήκος x εσωτ. διάμετρος) (Rigas Labs)
- ιβ) Φίλτρα δηθίσεως 0,45  $\mu\text{m}$  (Alltech syringe filters)

- ιγ) Συσκευή παρασκευής υπερκαθαρού νερού USF – IONPURE (USF/Seral, Ransbach-Baumbach, Γερμανία)
- ιδ) Κωνικά φιαλίδια εξαερώσεως δείγματος 3,0 ml (Alltech mini-vials)
- ιε) Θερμαντική συσκευή εξαερώσεως δείγματος, MULTI-BLOK Heater (LAB-LINE Instruments, Melrose Park IL, ΗΠΑ)
- ιστ) Προσωπικός υπολογιστής Intel Pentium (100 Mhz)
- ιζ) Λογισμικό πρόγραμμα πρόσληψης και επεξεργασίας των δεδομένων Chrom & Spec (Rigas Labs)
- ιη) Αναλυτικός ζυγός – Gibertini (Gibertini Elettronica SRL, Milano, Ιταλία)
- ιθ) Ηλεκτρονικό πεχάμετρο WPA- CD 7400 (Walden Precision Apparatus Ltd, Cambridge, M. Βρετανία). Ηλεκτρόδιο πεχαμέτρου Blue Line 6 pH (Schott-Gerate, Gmbh, Hoffheim, Γερμανία)
- ικ) Συσκευή αναδέυσεως δειγμάτων (Vortex) Genie 2 VWR scientific (Scientific Industries, Inc, Bohemia, NY, USA)

#### 2.4 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

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

- α) 17U σε 2,5mM NaOH (Nyeki *et al.*, 2001)
- β) 1X, 1U σε 5mM NaOH >>
- γ) AFMU σε 0,05% οξικό οξύ
- δ) 4-ακεταμιδοφαινόλη 10 mM σε 0,05% οξικό οξύ, για τη χρήση της ως εσωτερικού προτύπου.

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

Όλα τα πρότυπα διαλύματα, πλην του AFMU διατηρήθηκαν στους 4°C. Το πρότυπο διάλυμα του AFMU κα φυλάχτηκε στους -20°C.

Παρασκευάστηκαν επίσης πρότυπα μίγματα των AFMU, 1U, 1X, 17U συγκεντρώσεως 500 μM από τα αρχικά (stock) διαλύματα. Το AFMU προστέθηκε εκ των υστέρων αφού έγινε προσαρμογή του μίγματος σε pH ~ 3,5, με οξικό οξύ, καθώς το AFMU είναι ασταθές σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα μίγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης (calibration) με ανάμιξη με ούρα υγιούς ατόμου που απείχε από μεθυλοξανθίνες για 7 ημέρες.

## 2.5 Διαδικασία εκχύλισης υγρού/ υγρού (liquid/liquid extraction)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την εκχύλιση των μεταβολιτών από τα ούρα ήταν η εξής:

α) σε 200 μl ούρων τα οποία έχουν τοποθετηθούν σε φιαλίδιο erendorff προστίθεται 120 mgθειϊκού αμμωνίου προκειμένου να κατακρημινισθούν οι πρωτεΐνες που πιθανόν να υπάρχουν στα ούρα.

β) προστέθηκαν 100 μl εσωτερικό πρότυπο (4- ακεταμιδοφαινόλη, 2 mM)

γ) προστέθηκαν 200 μl οξικού οξέος 0,05%

Στη συνέχεια τα μίγματα αναδεύτηκαν με τη βοήθεια μιας συσκευής vortex ισχυρά μέσα σε ένα erendorff μέχρι να διαλυθεί η ποσότητα του θειϊκού αμμωνίου, ενώ ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11260 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 20 ml, προστέθηκαν 6 ml μίγματος χλωροφορμίου / ισοπροπανόλης (85:15, v/v) κι έγινε ισχυρή ανάδευση για 1 min με τη βοήθεια μιας συσκευής vortex. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 5000 rpm για 2 min. Ο διαχωρισμός των δυο φάσεων έγινε με μια διαχωριστική χοάνη και η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε γυάλινα κωνικά φιαλίδια ενώ ακολούθησε εξάτμιση στους 45<sup>0</sup> C μέχρι ξηρού με ήπιο ρεύμα αζώτου.

Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 200 μl οξικού οξέος 0,05%, αναδεύτηκε ισχυρά με vortex για 30 sec και κατόπιν διηθήθηκε με χρήση πλαστικής σύριγγας 1 ml και φίλτρα σύριγγας 0,45 μm. Από το δείγμα που συλλέχτηκε 20 μl εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη.

## 2.6 Διαχωρισμός μεταβολιτών

Ο διαχωρισμός των 4 μεταβολιτών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας κατά την οποία αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα 0,05% οξικού οξέος / μεθανόλης / ακετονιτρίλιου σε αναλογία 92/4/4 (v/v/v) με ταχύτητα ροής 0,8 ml/min για το διάστημα 0- 11'30'' και 1,4 ml/min για το διάστημα 11',30''-25'(Μπέγας και συν., 2000). Στην παρούσα εργασία έγιναν 2 μετατροπές σε σχέση με την αρχική μέθοδο χωρίς να επηρεαστεί ο διαχωρισμός των μεταβολιτών:

α) Αυξήθηκε η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οξικό οξύ από 0,05 % σε 0,1 %.

β) Μειώθηκε η ταχύτητα της κινητής φάσης στο χρονικό διάστημα 0-11'30'' από 1,4 ml/min σε 1,3 ml/min για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση της πίεσης.



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

Χρόνος (min)	Ταχύτητα ροής(ml/min)	Διαλύτης A (%)
0	0,8	100
11,5	1,3	100

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

Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες παρέμειναν ίδιες όπως στην αρχική μέθοδο, δηλαδή η θερμοκρασία ανάλυσης ήταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 280 nm.

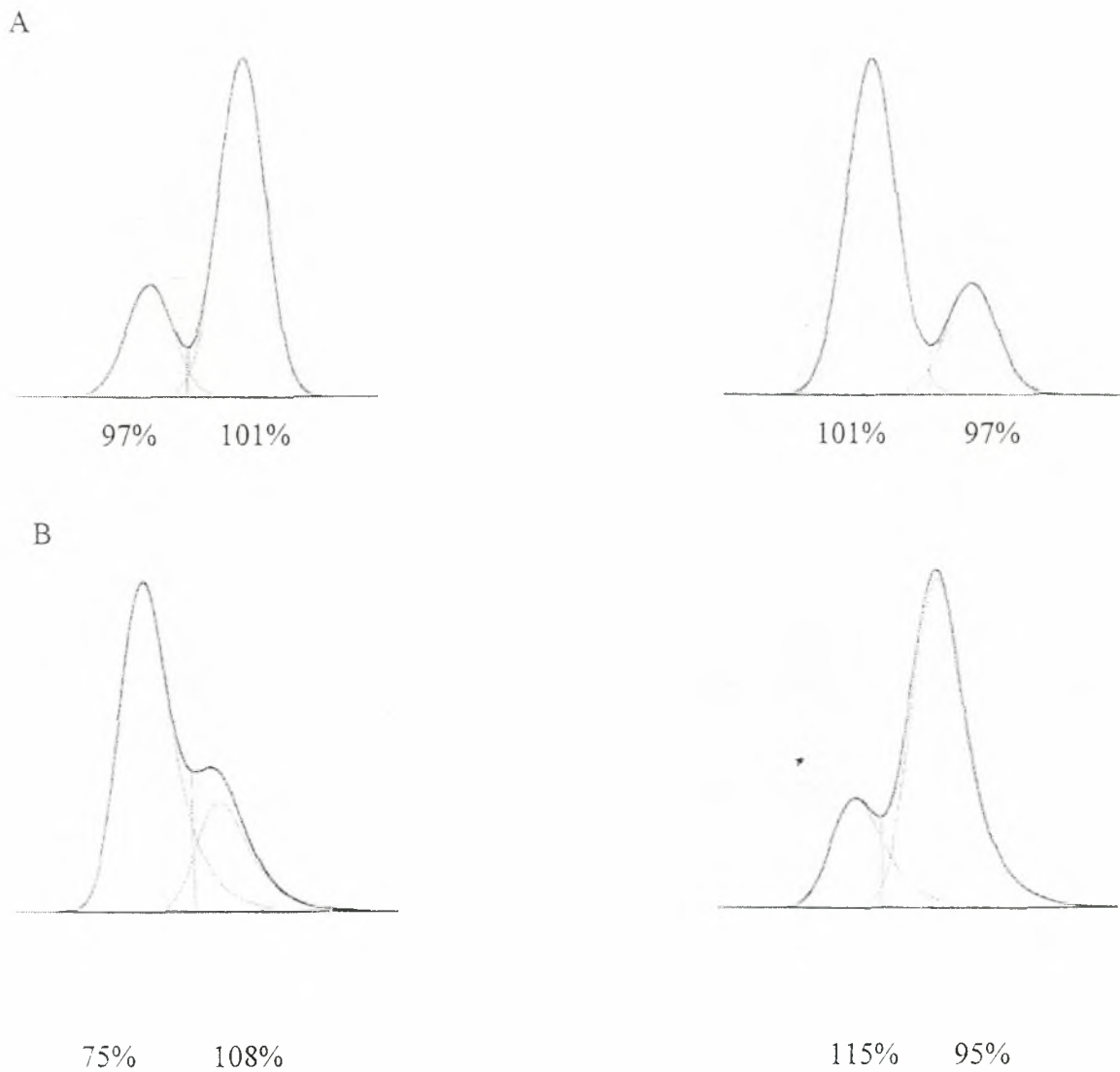
## 2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των 4 μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα έγινε με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, δηλαδή κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες (calibration curves) με την ανάλυση ούρων ελεύθερων από μεθυλοξανθίνες με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις των 4 μεταβολιτών και προσθήκη εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη).

Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν 200 μl ούρων από υγιές άτομο που απείχε από μεθυλοξανθίνες και φάρμακα για 7 ημέρες. Στα ούρα αυτά προστέθηκαν 200 μl προτύπου μίγματος των 4 μεταβολιτών της καφεΐνης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 150, 200 μM για κάθε μεταβολίτη (blank spiked urine) και 100 μl του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 2mM). Στη συνέχεια, τα ούρα αυτά εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν χρωματογραφικά σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στις αντίστοιχες παραγράφους. Έγιναν δύο προσδιορισμοί για κάθε συγκέντρωση και οι πρότυπες καμπύλες συσχέτισαν το λόγο των εμβαδών των κορυφών των μεταβολιτών προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου αφενός, με την ονομαστική συγκέντρωση των μεταβολιτών αφετέρου. Οι πρότυπες καμπύλες και οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης υπολογίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού EXCEL. Οι στατιστικοί έλεγχοι έγιναν με τη χρήση του λογισμικού SPSS 10.0.

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ορισμένων δειγμάτων, παρουσιάστηκαν κάποιες μικρές παρεμβαλλόμενες ενδογενείς κορυφές από το βιολογικό υπόστρωμα (matrix) των ούρων στα χρονικά σημεία έκλουσης ορισμένων από τους μεταβολίτες της καφεΐνης. Οι

κορυφές αυτές επηρεάζουν τον ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων κορυφών. Γι' αυτό το λόγο το ακριβές εμβαδόν υπολογίστηκε με βάση τη μαθηματική επεξεργασία που ισχύει για ατελώς διαχωριζόμενες κορυφές (Meyer, 1997) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Κανόνες ποσοτικού προσδιορισμού για ατελώς διαχωριζόμενες κορυφές.

A: Κορυφές συμμετρικές (Gaussian).

B: Κορυφές μη συμμετρικές (Meyer, 1997).

Πιο συγκεκριμένα, τα σφάλματα τα οποία παρουσιάζονται στον προσδιορισμό των εμβαδών των ατελώς διαχωριζομένων κορυφών μπορούν να περιγραφούν ποιοτικά με πολύ απλό τρόπο: όταν υπάρχουν συμμετρικές (κωδωνοειδείς) κορυφές, η μεγάλη κορυφή παρουσιάζεται με εμβαδόν μεγαλύτερο και η μικρή κορυφή μικρότερο από το πραγματικό, ανεξαρτήτως της σειράς με την οποία εκλούνται. Όταν υπάρχουν ασύμμετρες κορυφές (το οποίο είναι και το πλέον συνηθισμένο) η πρώτη εκλούμενη κορυφή είναι μικρότερη και η δεύτερη μεγαλύτερη από το κανονικό ανεξαρτήτως του λόγου των εμβαδών τους. Το σφάλμα στον ποσοτικό προσδιορισμό αυξάνεται όσο μειώνεται ο διαχωρισμός των κορυφών και όσο αυξάνεται η ασυμμετρία τους. Στα παραδείγματα της Εικόνας 9 εμφανίζονται ζεύγη ατελώς διαχωριζομένων κορυφών με λόγο εμβαδών 1/3. Επίσης εμφανίζονται τα αποτελέσματα της μαθηματικής επεξεργασίας από την οποία εξάγεται το ακριβές εμβαδόν των κορυφών ως ποσοστό του εμβαδού που εξάγεται από τον αυτόματο υπολογισμό τους μέσω Η/Υ (integrator) ο οποίος τις διαχωρίζει με μια κάθετη γραμμή στο χαμηλότερο σημείο ανάμεσά τους (valley) (Meyer, 1997).

## 2.8 Εσωτερικός έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων

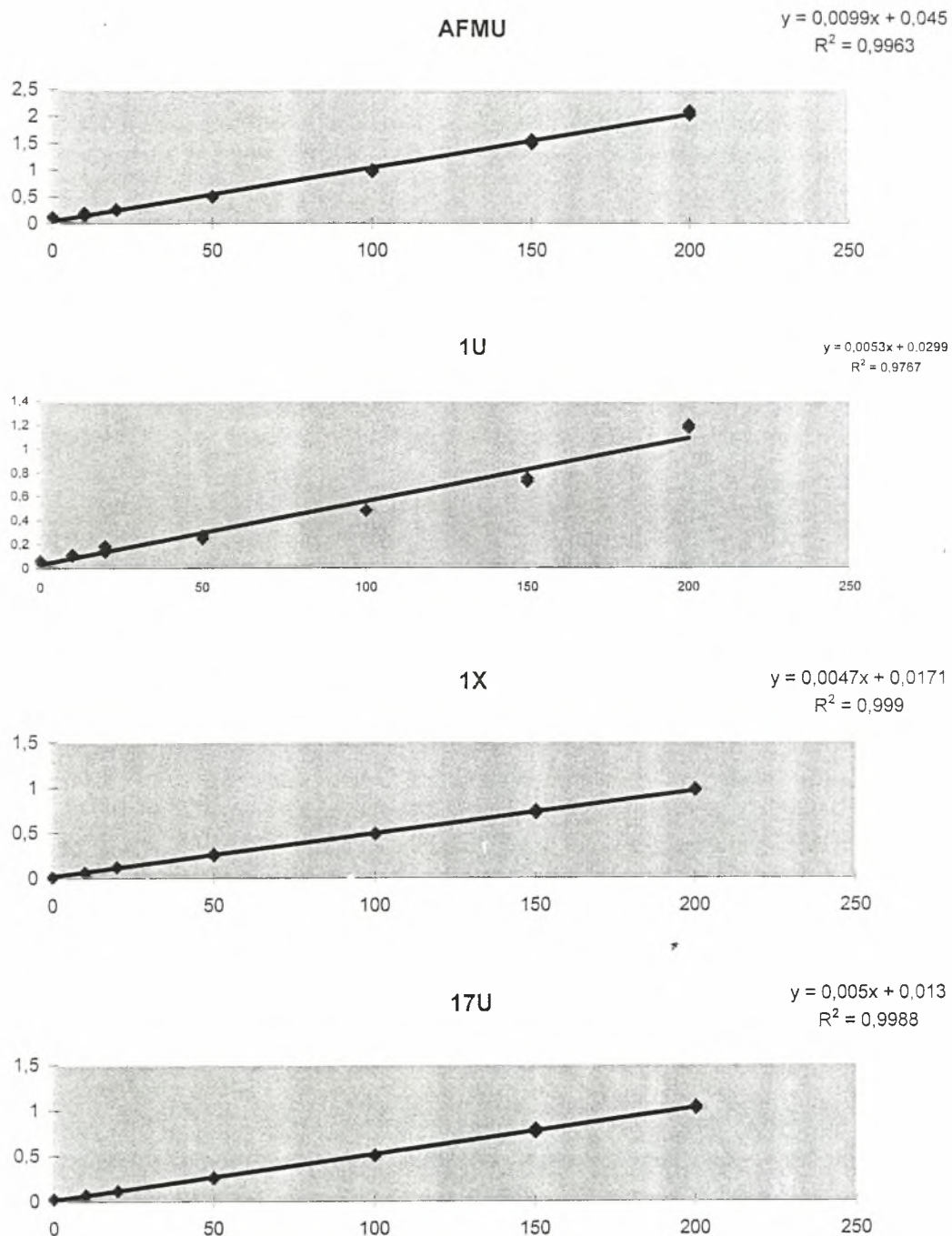
Η παρούσα αναλυτική μέθοδος έχει ελεγχθεί ως προς την αξιοπιστία της και την πρακτικότητά της με συγκεκριμένα μεγέθη του ενδοαναλυτικού σφάλματος που μας επιτρέπουν να την εφαρμόσουμε για αναλύσεις ρουτίνας. Όταν όμως μια μέθοδος εφαρμόζεται είναι δυνατόν να παρουσιαστούν πρόσθετα τυχαία και συστηματικά σφάλματα τα οποία οφείλονται σε διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, στη θερμοκρασία σε πρότυπα διαλύματα κλπ. Ο έλεγχος ποιότητας έχει σκοπό την ανίχνευση αυτών των πρόσθετων σφαλμάτων.

Ο έλεγχος έγινε με ανάλυση ούρων (blank spiked urine) σε συγκεντρώσεις 30, 75 και 160  $\mu\text{M}$ . Τα όρια της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων καθορίστηκαν ως μια μέγιστη απόκλιση της τάξης του  $\pm 10\%$  της μετρούμενης από την πραγματική συγκέντρωση των μεταβολιτών για τα δείγματα ελέγχου (Quality Controls) μεσαίας (75  $\mu\text{M}$ ) και μεγάλης (150  $\mu\text{M}$ ) συγκέντρωσης και  $\pm 15\%$  για τα δείγματα ελέγχου μικρής (30  $\mu\text{M}$ ) συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου που αναλύθηκαν καθώς και των δειγμάτων των ατόμων που συμμετείχαν προσδιορίστηκαν με τη χρήση των εξισώσεων γραμμικής παλινδρόμησης

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Πρότυπες καμπύλες

Η απόκριση του ανιχνευτή ήταν γραμμική για τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (10-200  $\mu\text{M}$ ) με συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης ( $R^2$ ) 0,9963, 0,9792, 0,999, 0,998 για τα AFMU, 1U, 1X και 17U αντίστοιχα. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10. Πρότυπες καμπύλες των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα:

X Άξονας: συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ), Y Άξονας: λόγος εμβαδών μεταβολίτη / εσωτερικό πρότυπο.

### 3.2 Εσωτερικός έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων ελέγχου μικρής (30  $\mu\text{M}$ ), μεσαίας (75  $\mu\text{M}$ ) και μεγάλης (160  $\mu\text{M}$ ) συγκέντρωσης για τους τέσσερις μεταβολίτες που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων ελέγχου

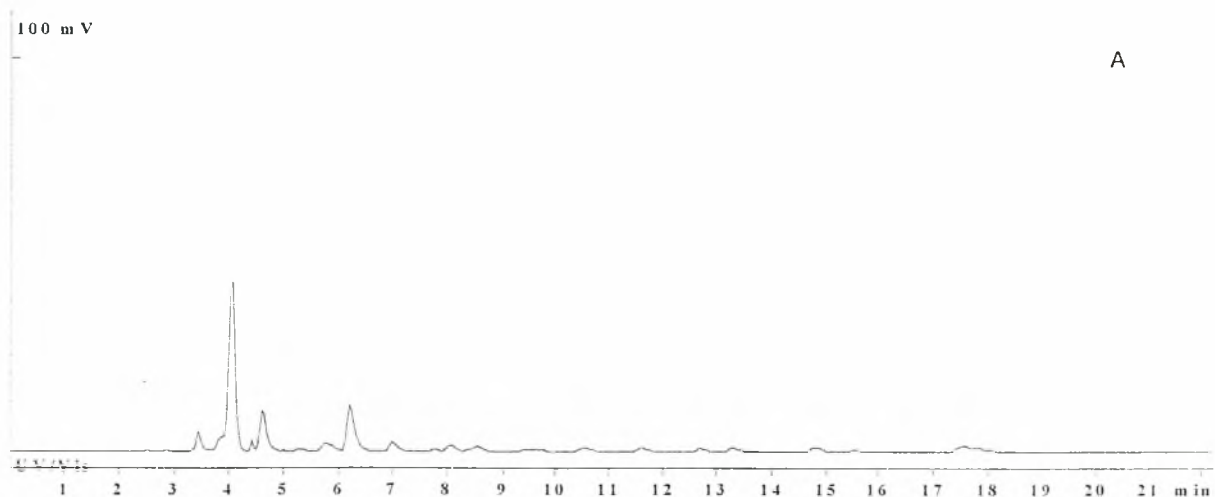
Προστιθέμενες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{M}$ )	AFMU		1U		1X		17U	
	Μετρ.	%από- κλιση	Μετρ.	%από- κλιση	Μετρ.	%από- κλιση	Μετρ.	%από- κλιση
30	26,77	10,77	33,98	13,27	22,75	7,5	27,6	8,00
75	72,63	3,16	77,00	2,67	71,92	4,11	75	0
160	150,81	5,74	160,21	0,13	152,96	4,40	153,4	4,13

Από τον πίνακα παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα του εσωτερικού ελέγχου βρίσκονται μέσα στα όρια αξιοπιστίας του  $\pm 15\%$  για τη μικρή (30  $\mu\text{M}$ ) συγκέντρωση και  $\pm 10\%$  για τις μεσαίες (75  $\mu\text{M}$ ) και μεγάλες (160  $\mu\text{M}$ ) συγκεντρώσεις (Guidance for Industry, 1998).

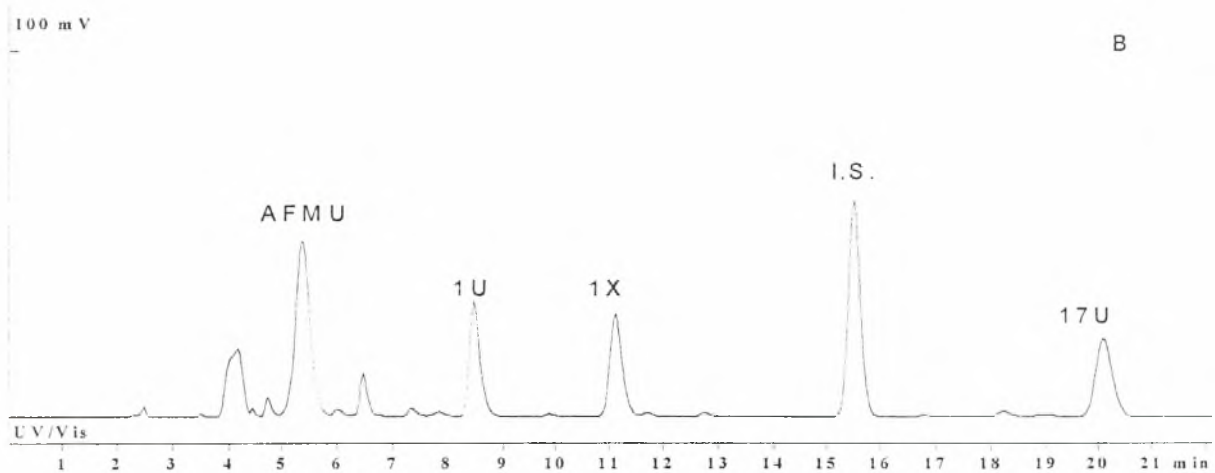
### 3.3 Αποτελέσματα αναλύσεων ούρων των υγιών εθελοντών

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα ούρων τα οποία προέκυψαν από την εφαρμογή των χρωματογραφικών συνθηκών όπως περιγράφονται στην παράγραφο της μεθοδολογίας. Στην εικόνα 11 Α παρατηρείται απουσία παρεμβολών από ενδογενείς κορυφές των ούρων (matrix artifacts) στα χρονικά σημεία έκλουσης των 4 μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου, γεγονός που επισημαίνει την εκλεκτικότητα της μεθόδου.

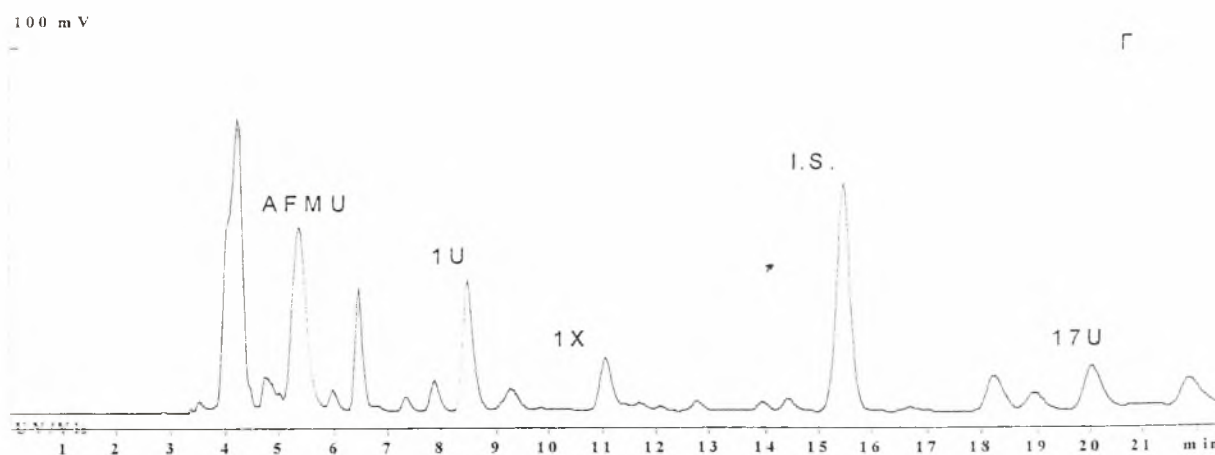




A



B



Γ

Εικόνα 11.

A: χρωματογράφημα ούρων ατόμου που απείχε από μεθυλοξανθίνες για 7 ημέρες μετά από εκχύλιση υγρού/υγρού.

B: χρωματογράφημα ούρων ατόμου με καθορισμένες συγκεντρώσεις μεταβολιτών.

Γ: χρωματογράφημα ούρων υγιούς ατόμου 6 ώρες μετά από κατανάλωση 200 mg καφεΐνης.

Οι τιμές του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U (Caffeine Metabolic Ratio-CMR) που προέκυψαν από ανάλυση ούρων υγιών ατόμων που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ανάλυσης των ούρων και τιμή CMR των υγιών εθελοντών.

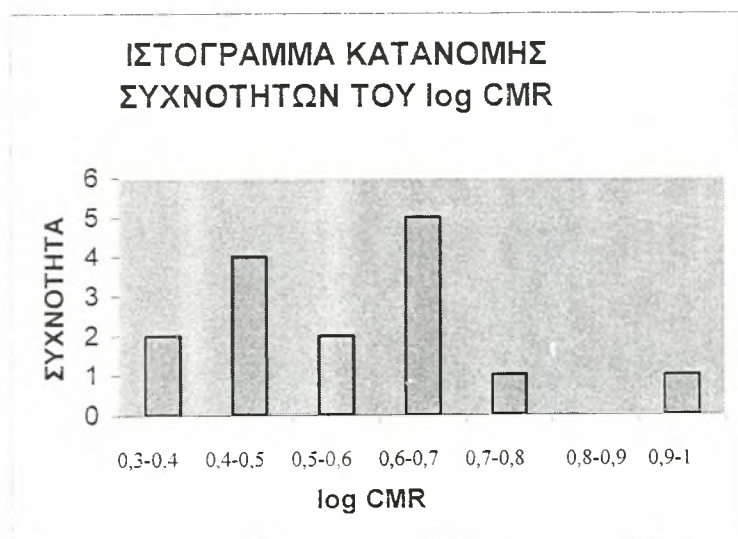
ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΑ	CMR
1	51	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	2,997
2	36	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	4,861
3	35	Θ	1-3/ΗΜΕΡΑ	ΟΧΙ	9,713
4	26	A	ΟΧΙ		2,596
5	28	Θ	1-3/ΗΜΕΡΑ	ΟΧΙ	3,108
6	23	A	ΟΧΙ		4,627
7	22	A	ΟΧΙ		3,151
8	41	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	3,292
9	32	A	1-33/ΗΜΕΡΑ		4,491
10	46	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	4,162
11	30	A	ΟΧΙ		2,455
12	23	A	ΟΧΙ		6,205
13	37	A	ΟΧΙ		3,331
14	35	A	ΟΧΙ		2,45
15	40	A	ΟΧΙ		4,342
				M.O.	4,118
				ΕΥΡΟΣ	2,45-9,713

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ούρων των ασθενών που πάσχουν από μη αντιρροπούμενη κίρρωση από ηπατίτιδα Β, C παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ανάλυσης των ούρων και τιμή CMR ασθενών εθελοντών

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΦΥΛΛΟ	CMR
1	55	ΝΑΙ	Α	-
2	69	ΟΧΙ	Α	3,41
3	53	ΟΧΙ	Α	2,23
4	68	ΝΑΙ	Α	2,71
5	62	ΟΧΙ	Α	2,535
6	54	ΟΧΙ	Α	3,218
7	47	ΟΧΙ	Α	-
Μ.Ο.				2,82
ΕΥΡΟΣ				2,23-3,41

Με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 5 κατασκευάστηκε ιστόγραμμα κατανομής συχνότητων των τιμών του μεταβολικού λόγου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητων μεταβολικού λόγου καφεΐνης σε υγιείς εθελοντές

Στη συνέχεια, έγινε στατιστικός έλεγχος προσαρμογής σε κανονική κατανομή Kolmogorov- Smirnov με το λογισμικό SPSS 10.0. Το επίπεδο της σημαντικότητας του ελέγχου ήταν 0,507 το οποίο σημαίνει ότι τα δεδομένα μας είναι πολύ πιθανό να

προέρχονται από κανονική κατανομή. Δοκιμή κανονικότητας Kolmogorov-Smirnoff έγινε και για το δείγμα των ασθενών. Το αποτέλεσμα για τους ασθενείς ( $p=0,992$ ) δείχνει ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η κατανομή να είναι και σε αυτό το δείγμα κανονική. Επίσης, έγινε έλεγχος για την πιθανότητα ύπαρξης στατιστικώς σημαντικής διαφοράς της μέσης τιμής του CMR μεταξύ ανδρών και γυναικών καθώς και καπνιστών και μη καπνιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του CMR για τις δύο αυτές κατηγορίες όσον αναφορά το φύλο και το κάπνισμα ( $P= 0,429$  και  $P=0,413$ ) αντίστοιχα. Η έλλειψη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς της μέσης τιμής του CMR μεταξύ των καπνιστών και των μη καπνιστών πιθανόν να οφείλεται στην κατανάλωση μικρού αριθμού τσιγάρων την ημέρα.

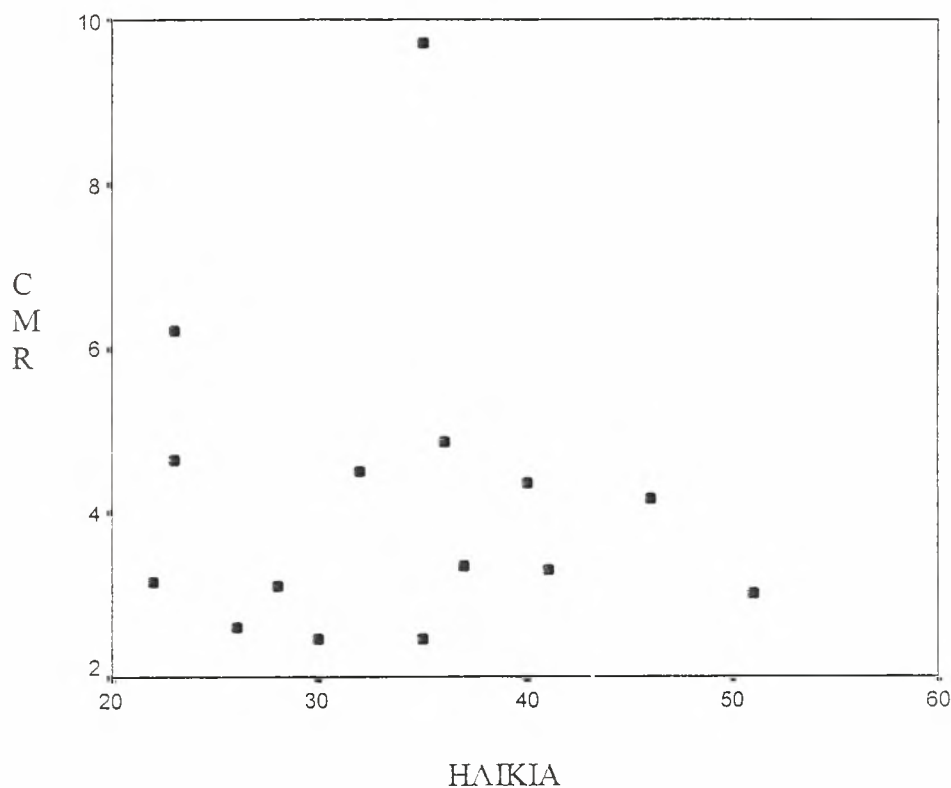
Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από το δείγμα οι καπνιστές και έγινε νέος έλεγχος μεταξύ ανδρών και γυναικών ο οποίος δεν έδειξε και πάλι στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p= 0,778$ , Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Τιμές του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης σε σχέση με το φύλο και το κάπνισμα.

	ΑΝΔΡΕΣ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	
	ΚΑΠΝΙΖΟΝΤΕΣ	ΜΗ ΚΑΠΝΙΖΟΝΤΕΣ	ΚΑΠΝΙΖΟΥΣΕΣ	ΜΗ ΚΑΠΝΙΖΟΥΣΕΣ
Αρ. Ατόμων	1	8	2	3
Μέσος	4,491	3,644	6,410	4,105
Εύρος	-	2,450-6,205	3,108-9,713	3,292-4,861

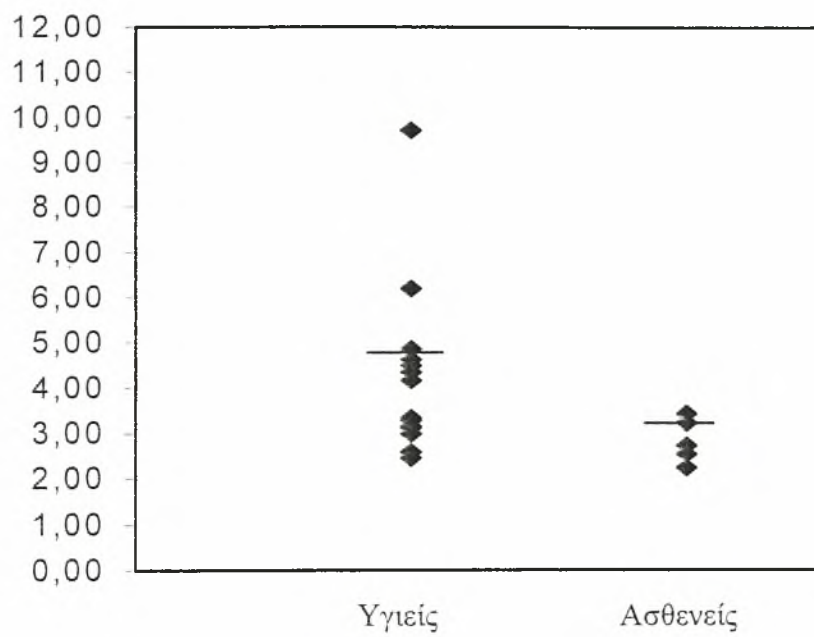
Επίσης έγινε έλεγχος συσχέτισης μεταξύ ηλικίας των συμμετεχόντων και των τιμών του μεταβολικού λόγου. Τα αποτελέσματα του ελέγχου έδειξαν τη μη ύπαρξη συσχέτισης των δύο μεταβλητών (συντελεστής Pearson  $r=0,056$ , Εικόνα 13). Τέλος, έγινε σύγκριση της μέσης τιμής του CMR μεταξύ των ασθενών και των υγιών εθελοντών. Πριν τη σύγκριση έγινε η στατιστική δοκιμή F (F test) για τη διερεύνηση στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των διασπορών των τιμών των δυο δειγμάτων. Η δοκιμή έδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς σε επίπεδο σημαντικότητας 5% και 1%. Κατόπιν αυτού, και με την προϋπόθεση ότι το δείγμα των υγιών προσαρμόζεται αρκετά καλά σε κανονική κατανομή, έγινε

δοκιμασία στατιστικού ελέγχου Student's t-test προκειμένου να ελεγχθεί η διαφορά στις μέσες τιμές των δύο δειγμάτων με το λογισμικό SPSS 10.0. Η δοκιμασία έδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών σε επίπεδο σημαντικότητας  $p=0,025$ . Αν δεν ληφθεί υπ' όψιν όμως η κατανομή των δύο δειγμάτων, λόγω του μικρού μεγέθους τους πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μη-παραμετρική δοκιμή Mann-Whitney. Το επίπεδο σημαντικότητας αυτής της δοκιμής ήταν  $p=0,106$  το οποίο δεν δείχνει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων. Στην Εικόνα 14 φαίνονται συγκριτικά οι μέσοι όροι του CMR των υγιών και των ασθενών.



Εικόνα 13. Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ ηλικίας και μεταβολικού λόγου της καφεΐνης στους υγιείς εθελοντές.





Εικόνα 14. Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) τιμών του CMR των υγιών εθελοντών (Μ.Ο. 4,118, n=15) και ασθενών (Μ.Ο. 2,82, n=5) (Students t-test, p=0,025).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μέθοδος HPLC η οποία αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας προκειμένου να επιτευχθεί ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα. Στην ανωτέρω μέθοδο μετά την έκλυση των πλέον πολικών μεταβολιτών στο χρονικό σημείο 11'30'' η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης αυξήθηκε από 0,8 ml/min σε 1,4 ml/min, προκειμένου να εκλουστούν ταχύτερα οι λιγότερο πολικοί μεταβολίτες. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή όμως η ταχύτητα της κινητής φάσης από 1,4 ml/min μειώθηκε σε 1,3 ml/min με σκοπό να αποφευχθεί η υπέρμετρη αύξηση της πίεσης στο εσωτερικό της χρωματογραφικής στήλης, πράγμα το οποίο θα είχε ως συνέπεια την διαταραχή της ομοιογένειας του υλικού πληρώσεώς της και τη μείωση του χρόνου ζωής της στήλης. Το γεγονός αυτό δεν επηρέασε το διαχωρισμό των δεκατεσσάρων μεταβολιτών της καφεΐνης ενώ στην παρούσα εργασία μόνο τέσσερις από αυτούς (AFMU, 1U, 1X, 17U) ήταν απαραίτητο να ποσοτικοποιηθούν.

Η παρούσα μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες που έχουν αναπτυχθεί κατά καιρούς. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ανάλυσης των μεταβολιτών που μας ενδιαφέρουν είναι σημαντικά περιορισμένος σε σχέση με άλλες μεθόδους (Rodopoulos et al 1995; Caubet et al, 2001; Nyeki et al, 2000).

Επίσης, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ισοκρατική έκλυση μεταβολιτών η οποία απλοποιεί τη διαδικασία σε σχέση με τη βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution) όπως αυτό φαίνεται στις μεθόδους που αναπτύχθηκαν από τους Georga et al., (1991) και Dobrocky et al., (1993).

Άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου HPLC που χρησιμοποιήθηκε είναι η ταυτόχρονη έκλυση της καφεΐνης και δεκατεσσάρων μεταβολιτών της σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούν δύο στάδια για να διαχωρίσουν τους διάφορους μεταβολίτες. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιείται η χρωματογραφία αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography) προκειμένου να απομονωθεί το AFMU μετά από μετατροπή του σε AAMU κάτω από βασικές συνθήκες (Tang et al., 1991; Carillo and Benitez., 1994). Ο διαχωρισμός στη χρωματογραφία αποκλεισμού είναι συνάρτηση του μοριακού μεγέθους αλλά γενικώς είναι μια μέθοδος με χαμηλή

ικανότητα διαχωρισμού. Συνεπώς, δε χρησιμοποιείται για να αναλυθούν πολύπλοκα βιολογικά δείγματα τα οποία διαχωρίζονται συνήθως με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ανάστροφης φάσης. Χρησιμοποιείται κυρίως ως προκαταρτικός διαχωρισμός σε πολύπλοκα δείγματα ( Boyes and Alpert, 1997).

Στην παρούσα μέθοδο δε χρησιμοποιήθηκε θερμοστατούμενη στήλη, κάτι το οποίο μειώνει το κόστος της ανάλυσης αλλά ενδέχεται να παρουσιαστεί αστάθεια στους χρόνους κατακράτησης των διαφόρων μεταβολιτών. Όσον αφορά την εκχύλιση των μεταβολιτών από τα ούρα, πέραν των μεθόδων εκχύλισης υγρού / υγρού (LLE) έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι εκχύλισης στερεάς φάσης.(Solid Phase Extraction-SPE). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση υγρού / υγρού των μεταβολιτών η οποία όμως έχει το μειονέκτημα της χρήσης μεγαλύτερου όγκου οργανικών διαλυτών οι οποίοι επιβαρύνουν την υγεία και το περιβάλλον, ενώ επίσης αυξάνουν το χρόνο ανάλυσης λόγω επακόλουθης εξαέρωσης του διαλύτη. Τα μειονεκτήματα αυτά αποφεύγονται με τη SPE, χωρίς όμως μέχρι τώρα να έχει αναπτυχθεί μέθοδος SPE η οποία να διαχωρίζει την AFMU ή την AAMU από τα ούρα.

Η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης (CMR) στα υγιή άτομα που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη, ήταν με αρκετά καλή προσέγγιση, κανονική. Κάποια απόκλιση που παρατηρήθηκε από την κανονική κατανομή, οφείλεται πιθανότατα στο μικρό αριθμό των συμμετεχόντων (n=15) ενώ ο ελάχιστος αριθμός ατόμων που απαιτούνται προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα είναι τριάντα (Αγραφιώτης, 2000). Πράγματι, το 1991 οι Kalow και Tang (Kalow and Tang, 1991) πραγματοποίησαν μελέτη σε 178 υγιείς εθελοντές και η κατανομή συχνοτήτων του μεταβολικού λόγου ήταν κανονική στον πληθυσμό αυτό. Επίσης, οι Rasmussen και Brosen (Rasmussen and Brosen, 1996) πραγματοποίησαν μελέτη σε 277 δείγματα ούρων υγιών εθελοντών. Η κατανομή του μεταβολικού λόγου στον πληθυσμό των 277 ατόμων ήταν κανονική. Τέλος η Sinues και οι συνεργάτες της (Sinues et al., 1999) πραγματοποίησαν μελέτη σε 125 υγιείς εθελοντές (59 μη καπνίζοντες και 66 καπνίζοντες) και βρήκαν επίσης ότι η κατανομή του μεταβολικού λόγου ήταν κανονική.

Στην παρούσα μελέτη η μέση τιμή του CMR στις γυναίκες ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη μέση τιμή των ανδρών χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Σε μελέτη των Kalow και Tang (Kalow and Tang, 1991) η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου των ανδρών ήταν μεγαλύτερη από αυτή των γυναικών.

Σε αντίστοιχη μελέτη του Tang και των συνεργατών του (Tang et al., 1993) αντίθετα, δεν παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά του μεταβολικού λόγου ανάμεσα στα δύο φύλα. Το 1996 οι Rasmussen και συν. βρήκαν το μέσο όρο του μεταβολικού λόγου στους άνδρες μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των γυναικών και η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική. Το 1997 οι Campell και συν., δεν παρατήρησαν διαφορές στις μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου ανάμεσα στα δύο φύλα. Ακόμη, σε μελέτη των Krul και Hageman (1998) οι άντρες είχαν υψηλότερη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου από τις γυναίκες. Τέλος, σε μελέτη που πραγματοποίησαν η Sinues και συν. Το 1999 στους μη καπνίζοντες εθελοντές που συμμετείχαν, οι άνδρες είχαν μεγαλύτερη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου από τις γυναίκες.

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν μόνο 3 καπνιστές με ελάχιστη κατανάλωση τσιγάρων (κατά μέσο όρο 3 τσιγάρα την ημέρα) και συνεπώς δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη διαφορά μεταξύ των μεταβολικών λόγων μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Σε άλλες μελέτες όμως αυτό έγινε εφικτό. Έτσι, σε μια από αυτές, που πραγματοποίησαν οι Rasmussen και Brosen (1996) δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου ανάμεσα στους καπνίζοντες των δύο φύλων. Αντίθετα, οι Campell και συν., το 1997 παρατήρησαν ότι οι καπνιστές είχαν μεγαλύτερο μεταβολικό λόγο από τους μη καπνιστές. Σε παρόμοια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Sinues και συν., το 1999 παρουσιάστηκε μεγαλύτερη τιμή μεταβολικού λόγου στους μη καπνίζοντες σε σχέση με τους καπνίζοντες στο σύνολο των 125 υγιών εθελοντών που έλαβαν μέρος. Οι Carrillo και συν., το 2000 βρήκανε μικρότερο μεταβολικό λόγο σε μη καπνίζουσες γυναίκες και μη καπνίζοντες άντρες. Τέλος οι Caubet και συν., το 2001 σε μελέτη στην οποία έλαβαν μέρος 20 υγιείς εθελοντές συμπέρανε ότι οι μη καπνίζοντες άντρες έχουν μεγαλύτερους μεταβολικούς λόγους από τους καπνίζοντες.

Σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί μειωμένη μέση τιμή του CMR σε χρήστριες αντισυλληπτικών σε σχέση με τις μη χρήστριες. Έτσι, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kalow και Tang (1991) σε 178 εθελοντές βρέθηκε ότι η χρήση των αντισυλληπτικών μειώνει τη δραστηριότητα του CYP1A2. Σε άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 39 εθελοντές οι Tang και συν., το 1993 διαπίστωσαν ότι ο μεταβολικός λόγος  $(AFMU+1U+1X)/17U$  των γυναικών που χρησιμοποιούσαν αντισυλληπτικά ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με το μεταβολικό λόγο αυτών που δε χρησιμοποιούσαν. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε μελέτη των Rasmussen και Brosen στην οποία έλαβαν μέρος 277 υγιείς εθελοντές. Επίσης οι Campell και συν.,

το 1997 συμπέραναν ότι γυναίκες που έκαναν χρήση αντισυλληπτικών είχαν μειωμένο μεταβολικό λόγο από αυτές που δεν χρησιμοποιούσαν. Τέλος οι Krul και Hageman (1998) δε βρήκαν διαφορές στο μεταβολικό λόγο ανάμεσα σε χρήστριες και μη χρήστριες αντισυλληπτικών.

Επίσης σε μελέτες που συμμετείχαν άτομα διαφορετικών εθνοτήτων (Tang et al., 1993; Kalow and Tang., 1991) δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά του μεταβολικού λόγου στις διάφορες εθνικότητες. Στην παρούσα όμως μελέτη δεν υπήρχαν άτομα που να ανήκουν σε διαφορετικές εθνικότητες.

Όσον αφορά την ηπατική νόσο έχουν μελετηθεί διάφορες κατηγορίες ασθενών σχετικά με τη δραστηριότητα του CYP1A2. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 7 ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση η οποία προέρχονταν από ηπατίτιδα Β και C. Τρεις από τους συμμετέχοντες ασθενείς είχαν συγκεντρώσεις μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα μικρότερες από τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου. Η μέση τιμή του CMR ήταν μικρότερη από των υγιών και υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (student t-test,  $p=0,025$ ). Παρόλη όμως αυτή τη διαφορά, παρατηρήθηκε μεγάλος βαθμός αλληλεπικάλυψης των τιμών των CMR των υγιών και των ασθενών. Ως εκ τούτου, η δοκιμασία αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς αλλά μόνο για την παρακολούθηση της πορείας της ηπατικής νόσου στον ίδιο ασθενή. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξε και μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν εννέα υγιείς εθελοντές και σαράντα τρεις ηπατοπαθείς (Denaro et al, 1996).

Σε άλλες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων παρατηρήθηκε επίσης στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ο Scott και οι συνεργάτες του (Scott et al., 1988) πραγματοποίησαν μελέτη σε 10 εθελοντές με αντιρροπούμενη κίρρωση, 6 ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση και 8 υγιείς εθελοντές. Παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στους μετρούμενους μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα και στο αίμα (7-U, 7-X, 1-U, 3-X, 1-X, 1,3-U, 1,7-U) ανάμεσα στους ασθενείς και στους υγιείς με τους ασθενείς να παρουσιάζουν χαμηλότερη συγκέντρωση μεταβολιτών σε σχέση με τους υγιείς. Οι Rodopoulos και συν., (1995) πραγματοποίησαν μελέτη σε 13 ασθενείς που έπασχαν από χρόνια ηπατική νόσο και σε ένα σύνολο 11 υγιείς εθελοντές. Στους ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της καφεΐνης (1,3,7-X, 1,3,7-U) που μετρήθηκαν στο πλάσμα και τα ούρα ήταν μικρότερες από ότι στους υγιείς. Οι Denaro και συν. (1996) πραγματοποίησαν μελέτη σε 12 υγιείς άντρες οι οποίοι ήταν όλοι καπνίζοντες



αλλά και 11 ασθενείς (10 άντρες και 1 γυναίκα) που έπασχαν από κίρρωση του ήπατος που προκλήθηκε από υπερβολική λήψη αλκοόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση στη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου (AFMU+1X+1U)/17U στους ασθενείς με κίρρωση. Οι El-Yazigi και συν., (1999) μελέτησαν 9 ασθενείς (2-13 ετών) με ιστολογική απόδειξη ηπατικής νόσου, και 9 υγιή παιδιά. Βρέθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U ήταν μικρότερος στα ούρα των ασθενών σε σχέση με των υγιών.

Η Lelouet και οι συνεργάτες της (Lelouet et al., 2001) πραγματοποίησε μελέτη σε 67 ασθενείς που πάσχουν από PBC, και 70 υγιείς εθελοντές (controls). Βρέθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στην καφεΐνη και τους μεταβολίτες της σε ασθενείς που βρίσκονταν στο ιστολογικά στάδια Scheuer 1, 2 ενώ υπήρχε μείωση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο μισό στους ασθενείς που βρίσκονταν στα ιστολογικά στάδια Scheuer 3, 4. Τέλος, ο Bechtel και οι συνεργάτες του (Bechtel et al., 2000) μελέτησε 226 ασθενείς με αλκοολική κίρρωση και 70 υγιείς εθελοντές. Παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στους λόγους των ασθενών και των υγιών και ειδικότερα ο μέσος όρος του λόγου (AFMU+1U+1X)/17U των ασθενών ήταν μικρότερος.

## 5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η δραστηριότητα του CYP1A2 σε υγιείς και ασθενείς που έπασχαν από μη αντιρροπούμενη κίρρωση λόγω ηπατίτιδας Β και C, με τη χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου δείκτη (probe drug). Μετρήθηκαν οι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και στη συνέχεια υπολογίστηκε η τιμή του μεταβολικού λόγου  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ . Από την κατανομή συχνοτήτων αυτού του μεταβολικού λόγου

συνάγεται ότι το ένζυμο CYP1A2 δεν είναι πολυμορφικό αλλά υπόκειται μόνο σε περιβαλλοντικές επιδράσεις στους υγιείς. Όσον αφορά την ηπατική νόσο, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών όσον αφορά τη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου  $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ .

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβαδίζουν σε γενικές γραμμές με αυτά που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Απαιτείται όμως μεγαλύτερος αριθμός συμμετεχόντων, υγιών και ασθενών καθώς και σαφής ομαδοποίηση της ηπατικής νόσου, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την αξία και την εφαρμοσιμότητα της χρήσης των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για την εκτίμηση της δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αγραφιώτης Γ. Βιοστατιστική. pp 77-78. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 2000.
2. Ambrose D.L., and Fritz J.S. High-performance liquid chromatographic determination of drugs and metabolites in human serum and urine using direct injection and a unique molecular sieve. *J. Chromatogr. B* 709:89-96, 1998.
3. Asproдини E.K., Zifa E., Papageorgiou I., and Benakis A. Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *J. Drug Metab. Pharmacok.* 23: 501-506, 1998.
4. Baud-Camus F., Marquet P., Soursac M., Davrinche C., and Farinotti R. Determination of N-acetylation phenotype using caffeine as a metabolic probe and high-performance liquid chromatography with either ultraviolet detection or electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 760:55-63, 2001.
5. Bechtel Y.C., Haffen E., Lelouet H., Brientini M.P., Paintaud G., Miguet J.P., and Bechtel P.R. Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therap.* 38(10):467-475, 2000.
6. Bendriss E., Markoglou N., and Wainer I.W. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *J. Chromatogr. B* 746:331-338, 2000.
7. Benet L.Z., Mitchell J.R. and Sheiner L.B. Pharmacokinetics : The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, Ralph T.W., Nies A.S. and Taylor P.(eds ) pp. 14, Pergamon Press New York, 1991.
8. Benet L.Z., Kroetz D.L. and Sheier L.B. Pharmacokinetics, The Dynamics Of Drug Absorption, Distribution and Elimination. In: Goodman and Giman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics,Hardman J.G. and Limbird L.E.(eds). 9<sup>th</sup> edition, pp. 12 McGraw-Hill New York, 1996.

9. Berthou F., Flinois J.-P., Ratanasavanh D., Beaune P., Riche C., and Guillouzo A. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* 19(3):561-567, 1991.
10. Birkett D.J., Dahlqvist R., Miners J.O., Lelo A., and Billing B. Comparison of theophylline and theobromine metabolism in man. *Drug Metabol. Dispos.* 13(6):725-728, 1985.
11. Blanchard J., and Sawers S.J.A. The Absolute Bioavailability of Caffeine in Man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:93-98, 1983
12. Bologna M., Tang B., Klein J., Teroso A., and Koren G. Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257(2):735-740, 1991
13. Bonati M., Latini R., Galletti F., Young J.F., Tognoni G., and Garattini S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1):98-106, 1982.
14. Bonati M., Latini R., Tognoni G. et al. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab. Rev.* 15(7):1355-1383, 1984.
15. Boyes B. and Alpert A. Biochemical Samples: Proteins, Nucleic Acids, Carbohydrates and related compounds. In: *Practical HPLC Method Development*. Seider L.R., Kirkland J. J., Glejch J. L., eds Second edition pp. 526-528 John Wiley and Sons Inc, NY, 1997
16. Butler M.A., Iwasaki M., Guengerich F.P., and Kadlubar F.F. Human cytochrome P-450<sub>1A2</sub> (P-450<sub>1A2</sub>), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7696-7700, 1989
17. Butler M.A., Lang N.P., Young J.F., Caporaso N.E., Vineis P., Hayes R.B., Teitel C.H., Massengill J.P., Lawsen M.F., and Kadlubar F.F. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 2(3):116-127, 1992.
18. Campbell M.E., Spielberg S.P., and Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42(2):157-165, 1987
19. Carrillo J.A. and Benitez J. Caffeine metabolism in a healthy Spanish population:

- N-Acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin. Pharmacol. Therap.* 55(3):293-304, 1994.
20. Carrillo J.A and Benitez J. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41:605-608, 1996
21. Carrillo J.A., and Benitez J. Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions Between Dietary Caffeine and Medications. *Clin. Pharmacokinet.* 39(2):127-153, 2000.
22. Carrillo J.A., Christensen M., Ramos S.I., Alm C., Dahl M.-L., Benitez J., and Bertilsson L. Evaluation of Caffeine as an In Vivo Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therap. Drug Monitor.* 22:409-417, 2000.
23. Cascorbi I., N. Drakoulis, J. Brockmoller, A. Maurer, K. Sperling and I. Roots. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am. J. Genet.* 57: 581-592, 1995.
24. Catteau A., Bechtel Y.C., Poisson N., and Bechtel P.R. A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47:423-430, 1995.
25. Caubet M.-S., Elbast W., Dubuc M.-C., and Brazier J.-L. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 27:261-270, 2002.
26. Γεωργάτσος Ι.Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. 4η Έκδοση. pp 110-111. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1993.
27. Γεωργάτσος Ι.Γ. και Αρζόγλου Π.Ι. Αρχές Κλινικής Χημείας. pp 31-32, 100, 230-233. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1999.
28. Denaro C.P., Brown C.R., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin. Pharmacol. Therap.* 48(3):277-285, 1990.
29. Denaro C.P., Wilson M., Jacob P., and Benowitz N.L. Validation of urine caffeine metabolite ratios with use of stable isotope-labeled caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Therap.* 59(3):284-296, 1996.
30. Dobrocky P., Bennett P.N., and Notarianni L.J. Rapid method for routine



determination of caffeine and its metabolites by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 652:104-108, 1994.

31 El-Yazigi A., Shabib S., Al-Rawithi S., Yusuf A., Legayada E.S., and Al-Humidan A. Salivary Clearance and Urinary Metabolic Pattern of Caffeine in Healthy Children and in Pediatric Patients with Hepatocellular Diseases. *J. Clin. Pharmacol.* 39:366-372, 1999

32. Evans D.A.P., Manley K.A., and McKusick V.A. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med J.* 2:485-491, 1960.

33. Fuhr U., Doehmer J., Battula N. Wolfel C., Flick I., Kudla C., Keita Y., and Staib A.H. Biotransformation of methylxanthines in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isophorms. Allocation of metabolic pathways to isoformes and inhibitory effects of quinolones. *Toxicology* 82(1-3):169-189, 1993.

34. Fuhr U., and Rost K.L. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 4:109-116, 1994.

35. Georga K.A., Samanidou V.F., and Papadoyannis I.N. Use of solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *J. Chromatogr. B* 759:209-218, 2001.

36. Grant D.M., Campbell M.E., Tang B.K., and Kalow W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem. Pharmacol.* 36(8):1251-1260, 1987.

37. Grant D.M., Tang B.K., and Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33(5):591-602, 1983.

38. Grant D.M., Tang B.K., Campbell M.E., and Kalow W. Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 21:454-458, 1986.

39. Gu L., Gonzalez F.J., Kalow W., and Tang B.K. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2:73-77, 1992.

40. Guidance for Industry, Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, US Department of Health and Human Services Food and Drug administration, Center for

41. Holstege A., Staiger M., Haag K., and Gerok W. Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis. *Klin. Wochenschr.* 67(1):6-15, 1989.
42. Howden C.W., Birnie G.G., and Brodie M.J. Drug metabolism in liver disease. *Pharmacol. Ther.* 40:439-474, 1989.
43. Huang J.-D., Guo W.-C., Lai M.-D., Guo Y.L., and Lambert G.H. Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese. *Drug Metabol. Disp.* 27(1):98-101, 1999.
44. Kadlubar F.F., Talaska G., Butler M.A., Teitel C.H., Massengill J.P., and Lang N.P. Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. In: *Mutation and the environment. Part B*, pp 107-114, Wiley-Liss, Inc., 1990.
45. Kalow W. and Tang B.-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 49(1):44-48, 1991.
46. Kalow W. Variability of Caffeine Metabolism in Humans. *Arzneimittel Forschung* 35(I):319-324, 1985.
47. Kalow W., and Tang B.-K. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(5):503-514, 1993.
48. Kalow W., and Tang B.-K. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50(5):508-519, 1991.
49. Καραγιάννης Μ.Ι. Επεξεργασία, αξιολόγηση και παρουσίαση αναλυτικών δεδομένων. Αθήνα, 1987.
50. Krul C., and Hageman G. Analysis of caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 709:27-34, 1998.
51. Lambert G.H., Schoeller D.A., Kotake A.N., Flores C., and Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev. Pharmacol. Ther.* 9:375-388, 1986.
52. Lambert G.H., Schoeller D.A., Humphrey H.E.B., Kotake A.N., Lietz H., Campbell M., Kalow W., Spielberg S.P., and Budd M. The Caffeine Breath Test and

- Caffeine Urinary Metabolite Ratios in the Michigan Cohort Exposed to Polybrominated Biphenyls: A Preliminary Study. *Envir. Health Persp.* 89:175-181, 1990.
53. Le Marchand L., Franke A.A., Custer L., Wilkens L.R., and Cooney R.V. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 7:11-19, 1997
54. Lelo A., Miners J.O., Robson A., and Birkett D.J. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br. J. Pharmac.* 22:183-186, 1986.
55. Lelouet H., Bechtel Y.C., Paitaud G., Brientini M.P., Miguet J.P., and Bechtel P.R. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 39(1):25-32, 2001.
56. Lewis F.W., and Rector W.G. Caffeine clearance in cirrhosis: The value of simplified determinations of liver metabolic capacity. *J. Hepatol.* 14:157-162, 1992.
57. Lin J.H., and Lu A.Y.H. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35(5):361-390, 1998.
58. Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., Lancaster R., and Smith R.L. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2(8038):584-586, 1977.
59. McKinnon R.A. and Evans A.M. Cytochrome P450. *Aust. J. Pharm.* 30:102-105, 2000.
60. Meyer V. Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures. pp 50-51, 76-77, 108-109. Huthig Ver84.
61. Μισιρλή Ε. Τοξικολογία. pp 19-23. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 1999. lag, Heidelberg, 1997.
62. Μπέγας Η., Τσακαλωφ Α., Μπενακης Α., Ασπροδίνη Ε.Κ. Εκτίμηση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση της καφεΐνης: Προσδιορισμός του μεταβολικού λόγου AFMU+1U+1X/17U στα ούρα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας. Περίληψεις ομιλιών και ανακοινώσεων, σελ. 57, 2002.
63. Notarianni L.J., Oliver S.E., Dobrocky P., Bennett P.N., and Silverman B.W. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *Br. J. Clin. Pharmac.* 39:65-69, 1995.

64. Nyeki A., Biollaz J., Kesslerling U.W., and Decosterd L.A. Extractionless method for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary caffeine metabolites for N-acetyltransferase 2, cytochrome P4501A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J. Chromatogr. B* 755:73-84, 2001.
65. Olson J. Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή. pp 7-8. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997
66. Rasmussen B.B., and Brosen K. Determination of Urinary Metabolites of Caffeine for the Assessment of Cytochrome P4501A2, Xanthine Oxidase, and N-Acetyltransferase Activity in Humans. *Therap. Drug. Monit.* 18:254-262, 1996.
67. Relling M.V., Lin J.S., Ayers G.D., and Evans W.E. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(6):643-658, 1992.
68. Rizzo N., Hispard E., Dolbeault S., Dally S., Leverage R., and Girre C. Impact of long-term ethanol consumption on CYP1A2 activity. *Clin. Pharmacol. Therap.* 62(5):505-509, 1997.
69. Rodopoulos N., Wisen O., and Norman A. Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55:229-242, 1995.
70. Rostami-Hodjegan A., Nurminen S., Jackson P.R., and Tucker G.T. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 6:121-149, 1996.
71. Scott N.R., Stambuk D., Chakraborty J., Marks V., and Morgan M.Y. The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. *Br. J. Pharmac.* 27:205-213, 1989.
72. Scott N.R., Stambuk D., Chakraborty J., Marks V., and Morgan M.Y. Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. *Clinical Science* 74:377-384, 1988.
73. Shaw-Stiffel T.A., Tang B.K., Spielberg S.P., and Shear N.H. Caffeine-A novel probe to assess drug effects on hepatic cytochrome P-450 activity. *Hepatology* 8:1385, 1988.
74. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M. *et al.* Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J.*

Pharmacol. Exp. Ther. 270(1):414-423, 1994.

75. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Mark S.D., Hoover R.N., Caporaso N.E., Levander O.A., Knize M.G., Lang N.P., and Kadlubar F.F. Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Research* 54:6154-6159, 1994.

76. Sinha R. and Rothman N. Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters* 143:189-194, 1999.

77. Smith G., Stubbins M.J., Harries L.W., et al. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 28(12):1129-1165, 1998.

78. Somani S.M., and Gupta P. Caffeine: a new look at an age-old drug. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 26(11):521-533, 1988.

79. Stryer L. Βιοχημεία. 2η Έκδοση. pp 617. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.

80. Tang B.K., Grant D.M., Kalow W. Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab. Disp.* 11:218-220, 1983.

81. Tang B.K., Zhou Y., Kadar D., and Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* 4(3):117-124, 1994.

82. Tang-Liu D.D.S., Tozer T.N., and Riegelman S. Dependence of renal clearance on urine flow: A mathematical model and its application. *J. Pharm. Sci.* 72:154-158, 1983.

83. Tantcheva-Poór I., Zaigler M., Rietbrock S., and Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 9:131-144, 1999.

84. Tassaneeyakul W., Birkett D.J., Veronese M.E., McManus M.E., Tukey R.H., Quattrochi L.C., Gelboin H.V., and Miners J.O. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P4501A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265(1):401-407, 1993.

85. Ullrich D., Compagnone D., Brandes A., Hille H., and Bircher J. Urinary caffeine metabolites in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43:167-172, 1992.



86. Vistisen K., Loft S., and Poulsen H.E. Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283:407-411, 1991.
87. Vistisen K., Poulsen H.E., and Loft S. Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* 13(9):1561-1568, 1992.
88. Waxman D.J. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Bioph.* 69(1):11-23, 1999
89. Welfare M.R., Aitkin M., Bassendine M.F. and Daly A.K. Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* 9(6):782, 1999.
90. Zhao Y., and Lunte C.E. Determination of caffeine metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 688:265-274, 1997.
91. Zylber-Katz E., Granit L., and Levy M. Relationship between caffeine concentrations in plasma and saliva. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36(1):133-137, 1984.