



ISSN 2241-3081

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΡΗΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

ΤΟΜΟΣ 25 | ΤΕΥΧΟΣ I
VOLUME NUMBER

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ - ΜΑΡΤΙΟΣ 2013
JANUARY - MARCH



Μη φοβάσαι τον γλυκό.

- Επιτραπέζιο γλυκαντικό από εκχύλισμα φύλλων stevia
- Χωρίς θερμίδες • Με φυσική γλυκιά γεύση

Στα φαρμακεία



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Τριμηνιαία έκδοση με θέματα
Φαρμακευτικών Επιστημών

Τόμος 25, Τεύχος Ι, Ιανουάριος - Μάρτιος 2013

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

A. Τσαντίλη

Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών

tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ:

Γ. Α. Καρίκας

Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών

karikasg@teiath.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Β. Δημόπουλος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

N. Κόλμαν, Galenica SA

Χ. Κοντογιώργης,

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης,

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαρόπουλος,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας,

Επίκ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή,

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

e-mail ΓΙΑ ΥΠΟΒΟΛΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς επισκεφτείτε την διεύθυνση
www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην “Φαρμακευτική” καταχωρούνται
στα Chemical Abstracts, EMBASE και
Scopus.

PHARMAKEFTIKI

A quarterly edition
on Pharmaceutical Sciences' topics

Volume 25, Issue I, January-March 2013

EDITOR:

A. Tsantili

Professor, University of Athens

tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR:

G.A. Karikas

Professor, Technological Educational Institute of Athens

karikasg@teiath.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos,

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos,

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman, Galenica SA

Ch. Kontogiorgis,

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis,

Emeritus Professor, University of Thessaloniki

P. Macheras,

Professor, University of Athens

S. Nikolaropoulos,

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas,

Assistant Professor, University of Patras

I. Panderi,

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas,

Associate Professor, University of Athens

e-mail FOR MANUSCRIPT SUBMISSION:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

For “Pharmakeftiki” electronic edition
and instructions to authors please visit
www.hsmc.gr

Articles published
in “Pharmakeftiki” are indexed
in Chemical Abstracts, EMBASE and Scopus.

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

Κλοπιδογρέλη: Παράγοντες
που Επηρεάζουν τη Δράση της

Ευθύμιος-Σπυρίδων Γαβριήλ

Ευάγγελος Καραλής

Ιωάννα Ανδρεάδου..... 1-15

REVIEW ARTICLE

Clopidogrel: Factors
that affect its action

Efthymios-Spyridon Gavriil

Evangelos Karalis

Ioanna Andreadou..... 1-15

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

Φαρμακευτικές Ουσίες και
Προϊόντα Προσωπικής Φροντίδας
ως Ρύποι στο Υδατικό Περιβάλλον

Κατηγορία Οργανικών Ρύπων σε Υγρά
Απόβλητα με Ειδικά Χαρακτηριστικά

Θωμάς Βλαχογιάννη

Αθανάσιος Βαλαβανίδης..... 16-23

REVIEW ARTICLE

Pharmaceuticals and Personal
Care Products As Contaminants
in the Aquatic Environment

A Category of Organic Wastewater
Pollutants with Special Characteristics

Thomais Vlachogianni

Athanasios Valavanidis..... 16-23

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σχέσεις Δομής-Δραστικότητας-
Εκλεκτικότητας στο Δομικό Υπόβαθρο
της Κετο-Πυρρολυλο-Διφθοροφαινόλης,
Αναστολέων της Αναγωγάσης της Αλδόξης

Ελένη Κotsampasakou

Vassilis J. Demopoulos..... 24-33

RESEARCH ARTICLES

Structure-Activity-Selectivity Relations
on the Keto-Pyrrolyl-Difluorophenol
Aldose Reductase
Inhibitory Scaffold

Eleni Kotsampasakou

Vassilis J. Demopoulos..... 24-33

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ..... 34

NEA-ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ..... 35

5th BBBB International Conference 36

Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοχημείας

ZITA ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΕΣ

ΚΑΙ ΤΟΥΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΑΕ

1ο χλμ Παιανίας - Μαρκοπούλου

19002, Παιανία, Ελλάδα

Τηλ: +30 211 100 1770-71

E-mail: info@zita-congress.gr

Hellenic Society of Medicinal Chemistry Management Office

ZITA CONGRESS SA

1st klm Peanias-Markopoulou

19002, Peania, Greece

Tel: +30 211 100 1770-71

Email: info@zita-congress.gr

Κλοπιδογρέλη: Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Δράση της

Ευθύμιος-Σπυρίδων Γαβριήλ¹, Ευάγγελος Καραλής², Ιωάννα Ανδρεάδου¹

¹ Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας,

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, 157 71 Ζωγράφου, Αθήνα

² Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, 157 71 Ζωγράφου, Αθήνα

Περίληψη

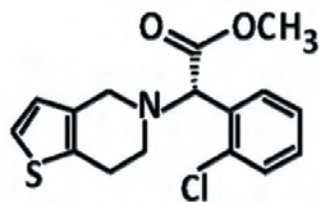
Η κλοπιδογρέλη είναι ένα αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που αναστέλλει μη αναστρέψιμα τον P2Y₁₂ υποδοχέα της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) στα αιμοπετάλια, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα, την παρεμπόδιση της προκαλούμενης από το ADP συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Είναι ένα ανενεργό προφάρμακο που μεταβολίζεται από το σύστημα του κυτοχρώματος P450 στο ήπαρ προς το δραστικό μεταβολίτη. Στην παρούσα εργασία μελετώνται οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση της κλοπιδογρέλης. Συγκεκριμένα, αναλύονται οι αλληλεπιδράσεις με φάρμακα, όπως τους αναστολείς της αντλίας πρωτονίων και τις στατίνες. Επίσης, εξετάζεται η αλληλεπίδραση της κλοπιδογρέλης με την αιθυλική αλκοόλη, ο ρόλος των γενετικών παραγόντων, καθώς και η μεταβλητότητα της δράσης της κλοπιδογρέλης σε διαβητικούς και υπέρβαρους ασθενείς. Η κλοπιδογρέλη χρησιμοποιείται σήμερα για μια σειρά ενδείξεων σε ασθενείς με χρόνιες και οξείες καρδιαγγειακές παθήσεις. Επομένως, προκειμένου η λήψη της να συνοδεύεται από την απαραίτητη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα είναι σημαντικό να γίνουν πλήρως κατανοητοί οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση της.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά – Μηχανισμός Δράσης

Η κλοπιδογρέλη είναι μία θειανοπυριδίνη που αναστέλλει μη αναστρέψιμα τον υποδοχέα της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) στα αιμοπετάλια. Έτσι εμποδίζεται η ενεργοποίηση των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIb/IIIa, που είναι αναγκαία για να μπορούν να δεσμεύσουν τα αιμοπετάλια το ινωδογόνο

ή άλλα αιμοπετάλια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παρεμπόδιση της προκαλούμενης από το ADP συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η κλοπιδογρέλη είναι ένα ανενεργό προφάρμακο που μεταβολίζεται από το σύστημα του κυτοχρώματος P450 στο ήπαρ στο δραστικό μεταβολίτη σε ποσοστό 15%.^{1,2} Η θειόλη του δραστικού μεταβολίτη σχηματίζει δισουλφιδική γέφυρα με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα κυστεΐνης του P2Y₁₂ υποδοχέα με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αναστολή για όλη τη διάρκεια ζωής του αιμοπεταλίου.³



Clopidogrel (inactive)

Σχήμα 1. Η χημική δομή της κλοπιδογρέλης.

Δεδομένου ότι η δραστική μορφή (θειόλη) είναι ανεπαρκώς καθορισμένη, ασταθής και δύσκολο να μετρηθεί, οι φαρμακολογικές μελέτες βασίζονται είτε στη μέτρηση της συγκέντρωσης του ανενεργού μεταβολίτη (καρβοξυλικό οξύ), είτε στη μέτρηση της μητρικής ουσίας στο πλάσμα ή στο βαθμού της αναστολής της συσώρευσης των αιμοπεταλίων.¹

Η ενεργοποίηση από ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *intraplatelet vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP). Έτσι, η μέτρηση της VASP παρέχει μια μέτρηση της δραστικότητας των αιμοπεταλίων. Όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης δραστικότητας των αιμο-

πεταλίων (PRI) τόσο πιο συχνά εμφανίζεται θρόμβωση. Ως εκ τούτου, οι χρήστες κλοπιδογρέλης θα πρέπει να έχουν χαμηλότερα επίπεδα VASP σε σύγκριση με εκείνους που δε λαμβάνουν κλοπιδογρέλη.⁴

1.2 Ενδείξεις

Η κλοπιδογρέλη χρησιμοποιείται σήμερα για μια σειρά ενδείξεων σε ασθενείς με χρόνιες και οξείες καρδιαγγειακές παθήσεις, και σε αυτούς που υποβάλλονται σε στεφανιαία αγγειοπλαστική παρέμβαση (Percutaneous Coronary Intervention, PCI). Σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, συνιστάται η χορήγηση κλοπιδογρέλης, ενώ σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, για τους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε διαγνωστικό καρδιακό καθετηριασμό και για τους οποίους έχει προγραμματιστεί PCI, η κλοπιδογρέλη θα πρέπει να αρχίσει να χορηγείται και να συνεχίζεται για τουλάχιστον 1 μήνα μετά την εμφύτευση γυμνού μεταλλικού στεντ (*bare metal stent*) και για αρκετούς μήνες (έως και 12) μετά την εμφύτευση στεντ που αποδεσμεύουν φάρμακο (*drug-eluting stent*) σε ασθενείς που δε βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για αιμορραγία. Σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, η χορήγηση κλοπιδογρέλης θα πρέπει να αρχίσει αμέσως και να συνεχιστεί για τουλάχιστον 1 και έως 9 μήνες. Επίσης, στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI η συγχορήγηση της ασπιρίνης με κλοπιδογρέλη είναι υποχρεωτική.¹

1.3 Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Στις κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου περιλαμβάνονται η ουδετεροπενία, η θρομβωτική/θρομβοπενική πορφύρα και οι αιμορραγίες (γαστρεντερικές, εγκεφαλικές, μετεγχειρητικές).²

1.4 Φαρμακοκινητική

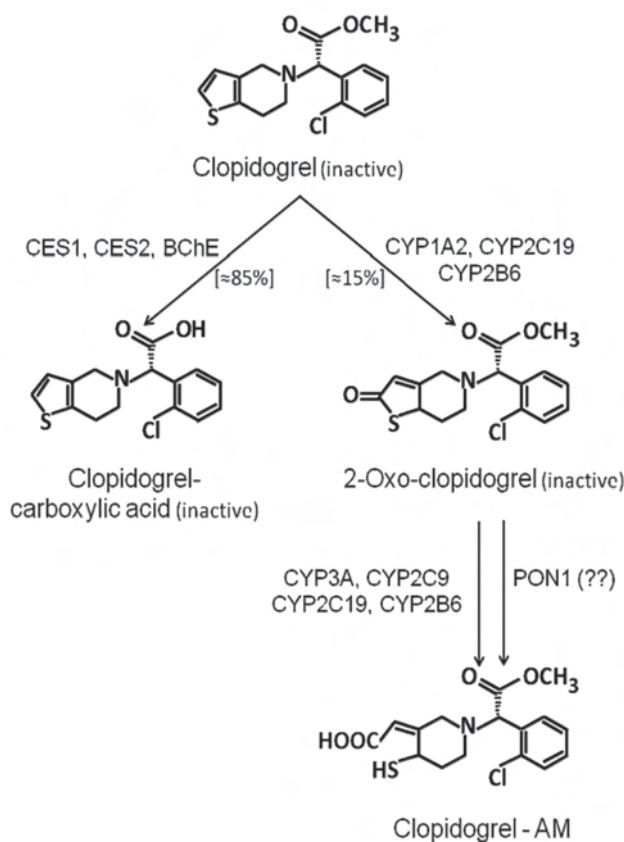
Η απορρόφηση της κλοπιδογρέλης δεν είναι γνωστό ότι επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία τροφής ή την ηλικία. Τα επίπεδα του πλάσματος συσχετίζονται με τη δόση που λαμβάνεται μετά από του στόματος χορήγηση. Ωστόσο, γενετικοί παράγοντες όπως η μεταβλητότητα στο γονίδιο human multidrug-resistance 1 (MDR1) που κωδικοποιεί την εντερική P-γλυκοπρωτεΐνη-μεταφορέα, θεωρείται ότι συμβάλλει στη διακύμανση της απορρόφησης της κλοπιδογρέλης.¹

Η βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης μπορεί να διακριθεί σε 2 στάδια:

- Α) Στην οξείδωση προς τη 2-οξοκλοπιδογρέλη που καταλύεται από τα κυτοχρώματα (CYP) CYP1A2, CYP2C19, CYP2B6 και
- Β) Στην υδρόλυση του δακτυλίου της γ-θειοβουτυρολακτόνης προς τη δραστική θειόλη,

που καταλύεται από τα CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6 και CYP3A.

Σε πρόσφατη μελέτη υποστηρίζεται, πως το δεύτερο βήμα, που αποτελεί και το καθοριστικό στάδιο καταλύεται από τις εστεράσες PON1 και PON3. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο μεθυλεστέρας σε όλες τις μορφές της κλοπιδογρέλης, υδρολύεται προς το ανενεργό καρβοξυλικό οξύ από τις καρβοξυλεστεράσες-1 και -2 και από τη βουτυρυλοχολινεστεράση (Σχήμα 2).^{5,6}



Σχήμα 2. Η πορεία μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης.

Η κλοπιδογρέλη συνδέεται ισχυρά με πρωτεΐνες (όπως και ο ενεργός μεταβολίτης της), απεκκρίνεται τόσο με τα κόπρανα (46%) όσο και με τα ούρα (50%) και έχει κατά προσέγγιση χρόνο ημιζωής 8 ώρες, με χρόνο μέγιστης δράσης τη μία ώρα.¹

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κλοπιδογρέλη, λόγω του μεταβολισμού της από το CYP σύστημα μπορεί θεωρητικά να αλληλεπιδράσει με πολλά φάρμακα τα οποία μεταβολίζονται από τα ίδια ισοένζυμα, όπως φαινυτοΐνη, ταμοξифαίνη, βαρφαρίνη, τολβουταμίδη κ.α.² Ωστόσο, η παρούσα εργασία εστιάζει σε συγκεκριμένες κατηγορίες φαρμάκων που συγχορηγούνται αρκετά συχνά με την κλοπιδογρέλη (ανα-

στολεις αντλίας πρωτονίων, στατίνες), καθώς και σε γενετικούς και άλλους παράγοντες που συνυπάρχουν συνήθως με τη λήψη του συγκεκριμένου φαρμάκου.

2. Αλληλεπίδραση με τους Αναστολείς Αντλίας Πρωτονίων

2.1 Εισαγωγή

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) εξέδωσε το 2009 μια δημόσια ανακοίνωση σχετικά με μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ κλοπιδογρέλης και αναστολέων της αντλίας πρωτονίων (Protein Pump Inhibitors, PPIs) και συνέστησε οι πληροφορίες όλων των φαρμάκων που περιέχουν την κλοπιδογρέλη να τροποποιηθούν ώστε να αποθαρρύνεται η ταυτόχρονη χρήση των αναστολέων αντλίας πρωτονίων εάν δεν είναι απολύτως απαραίτητη.^{7,8} Παρόμοια οδηγία εκδόθηκε και από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Ηνωμένων Πολιτειών νωρίτερα το ίδιο έτος όπου ανέφερε ότι οι PPIs ενδέχεται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης και ότι οι κλινικοί ιατροί πρέπει να αξιολογήσουν εκ νέου την έναρξη ή τη συνέχιση της αγωγής με PPIs σε ασθενείς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη. Ωστόσο, πολλοί ειδικοί εξέφρασαν την άποψη ότι έχει δοθεί υπερβολική σημασία στην αλληλεπίδραση κλοπιδογρέλης - αναστολέων αντλίας πρωτονίων.^{7,9}

Η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης και PPIs μπορεί να συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα ανεπιθύμητων καταστάσεων για τους εξής λόγους: α) και οι δύο μεταβολίζονται από παρόμοια ισοένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450, β) ενδεχομένως οι PPIs να αυξάνουν τα καρδιαγγειακά περιστατικά ανεξάρτητα από την κλοπιδογρέλη και γ) η συγχορήγηση PPIs είναι συχνότερη σε άτομα με πολλαπλούς παράγοντες νοσηρότητας, τα οποία είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν καρδιαγγειακά προβλήματα, δηλαδή τα άτομα αυτά απλά τυχαίνει να λαμβάνουν PPIs και δεν αποτελεί αίτιο των ανεπιθύμητων περιστατικών η συγχορήγησης τους με κλοπιδογρέλη. Εργαστηριακές μελέτες δείχνουν ότι οι PPIs μπορεί να μειώσουν τη δράση της κλοπιδογρέλης. Σε μελέτες, επίσης, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης αιμοπεταλίων όταν συγχωρηγούνται PPIs. Ωστόσο από τις κλινικές μελέτες που εξετάζουν το θέμα αυτό, ο κίνδυνος που έχει προκύψει από τη συγχορήγηση των δύο φαρμάκων είναι γενικά χαμηλός.^{4,10}

2.2 Λόγος συγχορήγησης κλοπιδογρέλης και αναστολέων αντλίας πρωτονίων

Ενώ η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία έχει σαφή αποτελεσματικότητα στη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο,

έχει επίσης τη γνωστή ανεπιθύμητη ενέργεια της αιμορραγίας του γαστρεντερικού συστήματος. Οι αναστολεις της αντλίας πρωτονίων είναι αποτελεσματικά φάρμακα τόσο στη θεραπεία όσο και στην πρόληψη του έλκους του ανώτερου γαστρεντερικού. Ως εκ τούτου, υπάρχουν στοιχεία ότι η χρήση των PPIs σε αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία είναι μία αποτελεσματική στρατηγική για την πρόληψη UGIB, και πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι 1 στους 3 έως 1 στους 5 ασθενείς στους οποίους χορηγείται αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS) λαμβάνουν επίσης PPIs.

Παρά τα πιθανά οφέλη από το συνδυασμό της κλοπιδογρέλης και αναστολέων της αντλίας πρωτονίων για την πρόληψη UGIB, αρκετές δημοσιεύσεις έχουν εκφράσει ανησυχίες σχετικά με μια πιθανή φαρμακολογική αλληλεπίδραση μεταξύ PPIs και κλοπιδογρέλης. Συγκεκριμένα, οι PPIs, μπορούν να μειώσουν την αντιαιμοπεταλιακή απάντηση της κλοπιδογρέλης, με συνέπεια τη μείωση της καρδιοπροστατευτικής της αποτελεσματικότητας.⁴

2.3 Μεταβολισμός PPIs

Οι PPIs είναι ουσιαστικά προφάρμακα, που μετατρέπονται σε όξινο περιβάλλον, μη ενζυματικά, προς τα δραστικά παράγωγα, τα οποία συνδέονται ομοιολογικά με την αντλία πρωτονίων ($H^+/K^+-ATPase$).¹¹ Μεταβολίζονται από το σύστημα του κυτοχρώματος P450 και τα κύρια ισοένζυμα που συμμετέχουν είναι τα CYP2C19 και CYP3A4. Για παράδειγμα, το CYP2C19 είναι υπεύθυνο για το 80% του μεταβολισμού της ομεπραζόλης.

Ως εκ τούτου, θεωρητικά, η χρήση των PPIs σε συνδυασμό με κλοπιδογρέλη θα μπορούσε να μειώσει τη μετατροπή της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη της μέσω συναγωνιστικής αναστολής του CYP2C19, και να μειώσει έτσι τα θεραπευτικά αποτελέσματα της κλοπιδογρέλης. Μία άλλη πιθανή αλληλεπίδραση είναι ότι οι PPIs μπορεί να τροποποιήσουν το ενδογαστρικό pH και ως εκ τούτου, να επηρεάσουν την απορρόφηση της κλοπιδογρέλης.⁴

2.4 Υπάρχει διάκριση μεταξύ των μελών της τάξης των PPIs;

Εφ' όσον υπάρχει σχέση μεταξύ της κλοπιδογρέλης και των PPIs, ένα άλλο θέμα που πρέπει να εξεταστεί είναι κατά πόσον η αλληλεπίδραση σχετίζεται με συγκεκριμένους PPIs. Ενώ οι περισσότεροι PPIs μεταβολίζονται κυρίως από το σύστημα κυτοχρώματος P450, και ειδικότερα από τα ισοένζυμα CYP2C19 και CYP3A4, η παντοπραζόλη έχει μικρότερη συγγένεια για αυτά τα ισοένζυμα και μεταβολίζεται από τη σουλφοτρανσφεράση εκτός του CYP συστήματος.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν πως τα αποτελέσματα των ασθενών που ελάμβαναν παντοπραζόλη δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά από αυτά των ασθενών που έλαβαν άλλους PPIs.^{12,13} Ως εκ τούτου, ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν που να υποστηρίζουν ότι ένας αναστολέας αντλίας πρωτονίων είναι "ασφαλέστερος" από κάποιον άλλον, όταν πρόκειται για πιθανές αλληλεπιδράσεις με κλοπιδογρέλη.⁴

2.5 Συμπεράσματα

Τόσο η κλοπιδογρέλη όσο και οι PPIs συνταγογραφούνται ευρέως από ιατρούς. Οι PPIs συνταγογραφούνται συχνά για συμπτωματική ανακούφιση ή για την πρωτογενή πρόληψη και όχι μόνο για τη θεραπεία μιας επιβεβαιωμένης περίπτωσης πεπτικού έλκους ή για δευτερογενή πρόληψη σε ασθενείς με γνωστό πεπτικό έλκος. Η ευρεία χρήση αυτών των φαρμάκων κάνει επιτακτική την ανάγκη της καλύτερης κατανόησης της επικινδυνότητας μιας ενδεχόμενης αλληλεπίδρασης. Οι υπάρχουσες ενδείξεις εγείρουν ανησυχίες, ωστόσο, τα αποδεικτικά στοιχεία είναι περιορισμένα και είναι λογικό να συμπεραίνεται ότι επί του παρόντος δε χρειάζεται αλλαγή στη συνταγογράφηση μέχρι να συγκεντρωθούν περισσότερα στοιχεία. Ωστόσο, είναι σημαντικό να επανεξεταστεί η κλινική ανάγκη, καθώς ενδεχομένως να είναι σκόπιμο να σταματήσει η χορήγηση της κλοπιδογρέλης ή των αναστολέων της αντλίας πρωτονίων. Αν και τα δύο φάρμακα είναι κλινικά ενδεδειγμένα και ο ιατρός ή ο ασθενής ανησυχούν σχετικά με πιθανή αλληλεπίδραση, τότε μπορεί να δοθεί το ένα φάρμακο το πρωί και το άλλο το βράδυ καθώς και οι δύο ουσίες έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και αυτός ο τρόπος χορήγησης, θεωρητικά, θα πρέπει να αποτρέψει την αλληλεπίδραση.^{4,11}

3. Αλληλεπίδραση με Στατίνες

3.1 Εισαγωγή

Οι στατίνες (ή αναστολείς της αναγωγής του 3-υδροξυ-3-μεθυλσυνενζύμου A, HMGCoA) χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση παθήσεων που κυμαίνονται από την υπερχοληστερολαιμία έως τις καρδιαγγειακές νόσους. Η κλινική σημασία τους υπογραμμίζεται τόσο από τη σχετική ασφάλεια σε σύγκριση με άλλους παράγοντες μείωσης των επιπέδων χοληστερόλης όσο και από τα θετικά αποτελέσματά τους στην καταπολέμηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας ιδιαίτερα στο χώρο των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρόσφατα υπήρξε διαμάχη στη βιβλιογραφία σχετικά με πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ στατινών και της αντι-αιμοπεταλιακής θεινοπυριδίνης, κλοπιδογρέλης. Η κλοπιδογρέλη και οι

στατίνες συχνά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα, και ως εκ τούτου οποιαδήποτε πιθανή αλληλεπίδραση, είναι πηγή ανησυχίας.¹

3.2 Στατίνες

Οι στατίνες μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης αναστέλλοντας συναγωνιστικά την HMG-CoA αναγωγή, γεγονός που περιορίζει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στις ενεργές θέσεις του ενζύμου.¹⁴

Δεδομένης της σχετικά ειδικής αναστολής της αναγωγής HMG-CoA, οποιαδήποτε αλληλεπίδραση των στατινών με άλλα φάρμακα σε φαρμακοδυναμικό επίπεδο είναι μάλλον απίθανη. Μαζί με τις δομικές διαφορές, σημαντικές φαρμακοκινητικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των στατινών. Όλες οι στατίνες, εκτός από την πραβαστατίνη, υφίστανται διεξοδικό μεταβολισμό πρώτης διόδου στο ήπαρ, καθώς μεταβολίζονται από την ομάδα των ενζύμων CYP450.¹⁵

3.3 Φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις Κλοπιδογρέλης και Στατινών

Δεδομένου ότι τόσο η κλοπιδογρέλη όσο και οι στατίνες μεταβολίζονται από τα ένζυμα CYP στο ήπαρ, με την πρώτη να ενεργοποιείται στην οξειδωμένη μορφή της και τις τελευταίες να αδρανοποιούνται σε μεγάλο βαθμό, αναπτύχθηκε ανησυχία για το ενδεχόμενο μιας σημαντικής φαρμακοκινητικής αλληλεπίδρασης. Εξαιτίας της ευρέως διαδεδομένης συγχωρήγησης αυτών των φαρμάκων αρκετές κλινικές μελέτες προσπάθησαν να εκτιμήσουν πιθανές δυσοίονες συνέπειες αυτής της αλληλεπίδρασης παρέχοντας, τελικά, στοιχεία για τη σημαντική φαρμακοκινητική αλληλεπίδραση.

Οι Clarke και Waskell¹⁶ προσπάθησαν να προσδιορίσουν ισοένζυμα που ήταν υπεύθυνα για το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης στον άνθρωπο μελετώντας 10 διαφορετικά ισοένζυμα CYP. Η αλληλεπίδραση μεταξύ κλοπιδογρέλης και ατορβαστατίνης διερευνήθηκε ακολούθως με τη μέτρηση του βαθμού της οξείδωσης της κλοπιδογρέλης από το CYP3A4, με αυξανόμενες δόσεις atorvastatin lactone και atorvastatin acid. Η πρώτη ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας της οξείδωσης της κλοπιδογρέλης, ωστόσο και το οξύ ανέστειλε επίσης το ποσοστό της οξείδωσης της κλοπιδογρέλης, επιτυγχάνοντας 80% αναστολή όταν χορηγείται σε υψηλή δόση. Παρόμοια κατάσταση παρατηρήθηκε όταν αξιολογήθηκε το ποσοστό οξείδωσης της κλοπιδογρέλης από το CYP3A5. Αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν μια δυνητικά σημαντική φαρμακοκινητική αναστολή του μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης με συναγωνιστική αναστολή του CYP3A4 και CYP3A5 από ατορβαστατίνη.

Η πρώτη κλινική μελέτη για τη διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ των στατινών και της κλοπιδογρέλης, δημοσιεύθηκε από τους Lau και συν.¹⁷ Η λιπόφιλη στατίνη ατορβαστατίνη, αλλά όχι η υδρόφιλη στατίνη πραβαστατίνη, μείωσε σημαντικά την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από την κλοπιδογρέλη με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, σε 24 ώρες. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι ο μηχανισμός αυτής της αναστολής ήταν το συναγωνιστικό αποτέλεσμα της λιπόφιλης στατίνης στο CYP3A4, το οποίο μετατρέπει λιπόφιλες ενώσεις σε υδρόφιλα προϊόντα για να διευκολυνθεί η νεφρική απέκκρισή τους.

Οι Serebruany και συν¹⁸ εκτέλεσαν μια αναδρομική ανάλυση της δοκιμής μείωσης εμφάνισης νέου θρόμβου από το Plavix® (Reduction of New Thrombus Occurrence, PRONTO) για να εξετάσουν τις επιπτώσεις της προηγούμενης χρήσης στατινών στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης. Η προκαλούμενη από το ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το μόριο προσκόλλησης-1 (PECAM-1) αιμοπεταλίων-ενδοθηλιακών κυττάρων και η έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης IIb / IIIa αξιολογήθηκαν κατά την έναρξη, μετά από 2 και 5 ημέρες μετά τη θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης μεταξύ της ομάδας με στατίνες και της ομάδας χωρίς στατίνες.

Σε μια άλλη μελέτη, οι Neubauer και συν¹⁹ αξιολόγησαν τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων με μέτρηση της έκφρασης στην επιφάνεια της P-σελεκτίνης με κυτταρομετρία ροής μετά από *ex vivo* διέγερση των αιμοπεταλίων με ADP. Η μελέτη ανέφερε σημαντική ανασταλτική επίδραση της ατορβαστατίνης στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης 5 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης εφόδου της κλοπιδογρέλης. Αυτή η ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε επίσης μετά από 48 ώρες, αλλά η έκταση της επίδρασης ήταν μειωμένη.

Οι Muller και συν²⁰ μελέτησαν την επίδραση της υψηλής δόσης εφόδου της κλοπιδογρέλης (600 mg) σε συνδυασμό με τις στατίνες στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων *ex vivo*. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης είτε 2, είτε 4 ώρες μετά από τη χορήγηση της. Όμως, μειονεκτήματα αυτής της μελέτης ήταν τα πρώιμα χρονικά σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία αίματος, καθώς σε τόσο μικρό χρονικό διάστημα τα φάρμακα δεν έχουν φθάσει σε επίπεδα σταθερής κατάστασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σύγκριση με τις προηγούμενες μελέτες, στην παρούσα χορηγήθηκε σημαντικά υψηλότερη δόση εφόδου (LD) κλοπιδογρέλης.

Οι Mach και συν²¹ απέδειξαν με *ex vivo* δοκιμασία των αιμοπεταλίων ότι δεν αναστέλλουν όλες οι στατίνες το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης. 21 υγιείς εθελοντές έλαβαν θεραπεία με κλοπιδογρέλη 75 mg από το στόμα ημερησίως για 10 εβδομάδες. Μετά την πρώτη εβδομάδα χορήγησης μόνο κλοπιδογρέλης, οι εθελοντές έλαβαν από του στόματος δόσεις από 5 διαφορετικές στατίνες (ροσουβαστατίνη, σιμβαστατίνη, φλουβαστατίνη, πραβαστατίνη και ατορβαστατίνη) για 1 εβδομάδα την καθεμία, με ενδιάμεση διακοπή μίας εβδομάδας ανάμεσα στην κάθε στατίνη. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι μετά από 1 εβδομάδα της διπλής θεραπείας, η *ex vivo* ADP-μεσολαβούμενη συνάθροιση των αιμοπεταλίων περιορίστηκε μόνο σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με σιμβαστατίνη ή φλουβαστατίνη.

Οι Ayalasomayajula και συν²² αξιολόγησαν την επίδραση της χορήγησης κλοπιδογρέλης στην κινητική της σταθερής κατάστασης της φλουβαστατίνης, η οποία μεταβολίζεται από το CYP2C9 στο ήπαρ. Μετρήθηκε η συγκέντρωση της φλουβαστατίνης και με *ex vivo* δοκιμή ελέγχθηκε η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Η βασική παρατήρηση ήταν ότι σε ασθενείς που έλαβαν κλοπιδογρέλη επιτεύχθηκε υψηλότερη συγκέντρωση φλουβαστατίνης στο πλάσμα συγκριτικά με εκείνους που έλαβαν μόνο φλουβαστατίνη. Δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου που να λαμβάνει μόνο κλοπιδογρέλη στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι ο βαθμός της αναστολής της αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας στους ασθενείς με φλουβαστατίνη δεν ήταν σημαντικά διαφορετικός από άλλες μελέτες στις οποίες οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία μόνο με κλοπιδογρέλη.

Η μελέτη αλληλεπίδρασης²³ συνέκρινε τις επιδράσεις στη λειτουργία των αιμοπεταλίων των παρακάτω θεραπευτικών σχημάτων: θεραπεία με κλοπιδογρέλη και ατορβαστατίνη, κλοπιδογρέλη και άλλες στατίνες ή μόνο κλοπιδογρέλη, μετά από στεφανιαία εμφύτευση *stent*. Μετά από 4 και 24 ώρες της θεραπείας με κλοπιδογρέλη δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε όλες τις παραμέτρους εκτός από τη μείωση της έκφρασης PAR-1 (G-protein coupled Protease-Activated thrombin Receptor-1) των αιμοπεταλίων σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με οποιαδήποτε στατίνη. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να αντανάκλα μια νέα αντι-αιμοπεταλιακή επίδραση που ασκούν οι στατίνες.

Συνολικά, οι παραπάνω μελέτες είχαν στόχο την αξιολόγηση των επιπτώσεων των CYP3A4-στατινών στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης. Η παρουσία ενός αριθμού μεθοδολογικών περιορισμών έκαναν απίθανο κάθε καθοριστικό συμπέρασμα. Επιπλέον, λόγω των τεχνικών δυσκολιών στη μέτρηση

του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, την περίοδο που πραγματοποιήθηκαν αυτές οι μελέτες, ως δείκτης των επιπέδων κλοπιδογρέλης για την εξαγωγή φαρμακοκινητικών συμπερασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Νεώτερες εξελίξεις τώρα επιτρέπουν την άμεση δειγματοληψία και τη μέτρηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης. Έτσι, μια προσεκτικά σχεδιασμένη μελέτη θα μπορούσε να προσθέσει περισσότερο αξιόπιστα στοιχεία.¹

3.4 Κλινική σημασία της αλληλεπίδρασης κλοπιδογρέλης-στατινών

Αρκετές μελέτες προσπάθησαν να εξετάσουν την επίδραση μίας φαρμακοκινητικής αλληλεπίδρασης, μεταξύ κλοπιδογρέλης και στατινών, σε ενδεχόμενες κλινικές συνέπειες.

Η επίδραση της ατορβαστατίνης 10 mg vs. 40 mg στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη και στις κλινικές εκδηλώσεις, μετά από στεφανιαίο *stenting* συγκρίθηκε σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS).²⁴ Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετρήθηκε πριν από τη χορήγηση κλοπιδογρέλης και σε 4 ώρες, 24 ώρες, 5 ημέρες, και 8 μήνες αργότερα, σε 130 ασθενείς με ACS. Το συμπέρασμα, της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι η ατορβαστατίνη 10 mg ή 40 mg, συγχρηγούμενη με κλοπιδογρέλη για 8 μήνες, δεν επηρεάζει την αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα της κλοπιδογρέλης και δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις στους ACS ασθενείς.

Σε μια εκ των υστέρων ανάλυση της δοκιμής της κλοπιδογρέλης για την μείωση των συμβάντων κατά τη διάρκεια της παρατήρησης (CREDO)²⁵, οι ερευνητές αξιολόγησαν 1,001 ασθενείς που ελάμβαναν στατίνες CYP3A4 και 158 ασθενείς που ελάμβαναν μη CYP3A4 στατίνες και διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο 1^ο έτος στο σύνθετο τελικό σημείο του θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού.

Η ανάλυση των δεδομένων από τα μητρώα δύο πολυκεντρικών, GRACE και MITRA PLUS, επίσης δεν έδειξε κλινικώς δυσμενή έκβαση σε ασθενείς με συγχρηγήρηση στατινών CYP3A4 και κλοπιδογρέλης.^{26,27} Η μελέτη από τους ερευνητές GRACE αξιολόγησε 15,693 ασθενείς που είχαν παρουσιάσει non-ST έμφραγμα του μυοκαρδίου ή ασταθή στηθάγχη. Η ανάλυση Kaplan-Meier που πραγματοποιήθηκε στους 6 μήνες κατέδειξε όφελος επιβίωσης σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη και στατίνη σε σύγκριση με ασπιρίνη και στατίνη μόνο.

Η μελέτη που εκπονήθηκε από την ομάδα MITRA PLUS ανέλυσε στοιχεία από 2,086 ασθενείς που εμ-

φάνισαν ACS. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στο σύνθετο τελικό σημείο της μακράς διάρκειας θνησιμότητας και του εγκεφαλικού επεισοδίου. Επειδή λιπόφιλες στατίνες χορηγήθηκαν και στις δύο ομάδες μελέτης, η εξαγωγή αξιολογών συμπερασμάτων σχετικά με το θέμα μιας ενδεχόμενης κλινικά σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ λιπόφιλων στατινών και κλοπιδογρέλης ήταν δυσχερής.

Οι Mukherjee και συν²⁸ πραγματοποίησαν μία προοπτική μελέτη σε 1,651 ασθενείς με ACS. Σε αυτή τη μελέτη, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη θνησιμότητα ή στα σοβαρά ανεπιθύμητα καρδιακά επεισόδια σε ασθενείς που έλαβαν μία CYP3A4-στατίνη και κλοπιδογρέλη, σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν μη CYP3A4-στατίνη και κλοπιδογρέλη.

Οι Schmidt και συν²⁹ πραγματοποίησαν μία μελέτη με στόχο να εξεταστεί κατά πόσον ο CYP3A4—μεταβολισμός των στατινών επηρεάζει τη σχέση μεταξύ της κλοπιδογρέλης και των μείζονων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων (MACE) μετά από στεφανιαία εμφύτευση *stent*. Εφάρμοσαν μία χρονικά μεταβαλλόμενη έκθεση στο φάρμακο και προέκυψε πως η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση των δύο φαρμάκων δεν σχετίζεται με αυξημένο ποσοστό ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων.

Οι Serrano και συν³⁰ έκαναν μία μελέτη σε 68 ασθενείς με σταθερή στηθάγχη με προηγούμενη χρήση σιμβαστατίνης, ατορβαστατίνης, ή που δεν είχαν λάβει στατίνη (ομάδα ελέγχου), και που επρόκειτο να υποβληθούν σε στεφανιαία παρέμβαση. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αναλύθηκε με τη μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, των επιπέδων της P-σελεκτίνης και της γλυκοπρωτεΐνης IIb / IIIa (με και χωρίς διέγερση του ADP) με κυτταρομετρία ροής. Προέκυψε, ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μειώνεται με τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης και πως η αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης δε μειώνεται με την παρουσία της σιμβαστατίνης ή ατορβαστατίνης.

Οι Wenaweser και συν³¹ πραγματοποίησαν μία μελέτη με σκοπό να καθορίσουν την ανασταλτική επίδραση της ατορβαστατίνης και φλουβαστατίνης στη διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη. Το συμπέρασμα ήταν πως ούτε η ατορβαστατίνη (40 mg ημερησίως), ούτε η φλουβαστατίνη (80 mg ημερησίως), σε συνδυασμό με την καθιερωμένη διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μετά από εμφύτευση *drug-eluting stent*, επηρεάζει σημαντικά την αντισυγκολλητική επίδραση της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης.

Οι Brophy και συν³² εκτίμησαν εκ των υστέρων 2,927 ασθενείς οι οποίοι έλαβαν κλοπιδογρέλη εντός 5 ημερών πριν υποβληθούν σε PCI. Από αυτούς, οι

727 ασθενείς έλαβαν ατορβαστατίνη και μόνο το 55.2% της ομάδας ελέγχου έλαβε μια στατίνη, που περιελάμβανε τόσο CYP3A όσο και μη CYP3A στατίνες. Αυτή η μελέτη διαπίστωσε ότι οι ασθενείς που έλαβαν ατορβαστατίνη και κλοπιδογρέλη είχαν σχεδόν δύο φορές αυξημένο κίνδυνο σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών σε 30 ημέρες σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν μόνο κλοπιδογρέλη. Επιπλέον, η καθυστέρηση στη λήψη της κλοπιδογρέλης και η λήψη άλλων φαρμάκων τα οποία είναι υποστρώματα του CYP3A4 αύξησαν επίσης σημαντικά την πιθανότητα ενός ανεπιθύμητου συμβάντος. Η μελέτη αυτή προτείνει για πρώτη φορά μία κλινικά σχετική αλληλεπίδραση μεταξύ CYP3A4-στατινών και κλοπιδογρέλης. Ωστόσο, υπάρχει μια σειρά περιορισμών, όπως ο εκ των υστέρων σχεδιασμός της μελέτης και η έλλειψη στοιχείων σχετικά με τις δόσεις και τη συμμόρφωση των ασθενών με τη λήψη των φαρμάκων, καθώς και ο αποκλεισμός των ηλικιωμένων ασθενών.

Η μεγαλύτερη κλινική μελέτη για την εξέταση μιας πιθανής κλινικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των στατινών και της κλοπιδογρέλης ήταν μία εκ των υστέρων ανάλυση της μελέτης της χρήσης κλοπιδογρέλης για υψηλό κίνδυνο αθηροθρόμβωσης και ισχαιμική σταθεροποίηση, διαχείριση και αποφυγή (CHARISMA). Η μελέτη CHARISMA κατένειμε τυχαία 15,604 ασθενείς είτε με κλινικές ενδείξεις ή με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, είτε σε λήψη μόνο ασπιρίνης ή ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης. Η ενδιάμεση παρακολούθηση διήρκεσε 28 μήνες. Μία σχετική εκ των υστέρων ανάλυση της μελέτης CHARISMA³³ και επικεντρώθηκε σε ασθενείς που ελάμβαναν στατίνες κατά την έναρξη. Δεν υπήρχε διαφορά στο πρωτεύον τελικό σημείο μεταξύ των ομάδων, γεγονός που υποδηλώνει μη σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τύπου στατίνης και της λήψης κλοπιδογρέλης.

3.5 Συμπεράσματα

Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που στηρίζουν μια πιθανή φαρμακοκινητική αλληλεπίδραση μεταξύ στατινών και κλοπιδογρέλης. Ειδικότερα, έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι πιο πιθανή με λιπόφιλες στατίνες που μοιράζονται το ίδιο CYP450 μεταβολικό ισοένζυμο. Ωστόσο, η ασυμφωνία μεταξύ των *ex vivo* δεδομένων που τάσσονται υπέρ της αλληλεπίδρασης και της πλειοψηφίας των ανωτέρω κλινικών μελετών που απέτυχαν να ανιχνεύσουν μία κλινικά σημαντική επίδραση, πρέπει να αναγνωριστεί, ενώ συγχρόνως εγείρει ορισμένα ζητήματα.

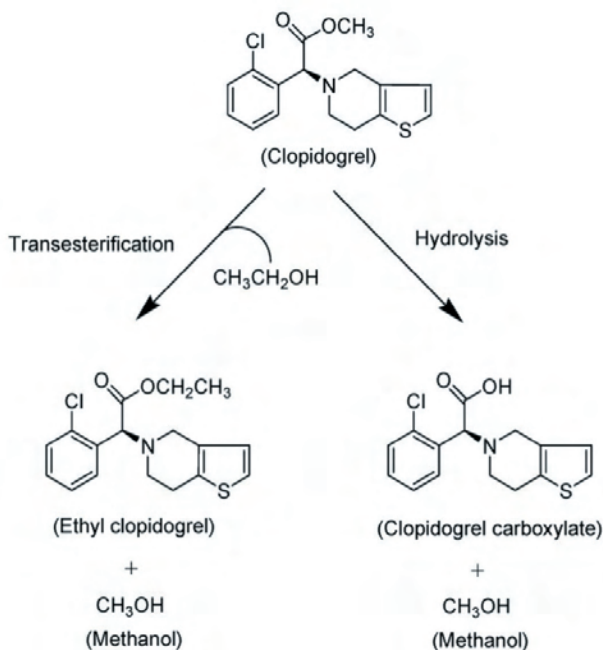
Αρχικά, τίθεται υπό αμφισβήτηση η ερμηνεία και επεξήγηση των *ex vivo* δοκιμών της δραστηριότητας

των αιμοπεταλίων και ορισμένοι ειδικοί υποστηρίζουν ότι μια συνολική εκτίμηση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων απαιτεί την αξιολόγηση τριών γεγονότων: ενεργοποίηση (*activation*), προσκόλληση (*adhesion*) και συσσωρευση (*aggregation*). Επίσης, κάποιες *in vitro* δοκιμές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να μην αντανακλούν άλλους *in vivo* μηχανισμούς που θα μπορούσαν να «αντισταθμίσουν» την αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας ενός ισοενζύμου. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό για παράδειγμα σε ασθενείς με χαμηλή CYP3A4 δραστηριότητα. Τέλος, ορισμένες κλινικές μελέτες παρουσιάζουν μία σειρά μεθοδολογικών ζητημάτων, συμπεριλαμβανομένων σχεδίων εκ των υστέρων, έλλειψη παρουσίας της δόσης ή τη μη υποβολή εκθέσεων για τη σημασία της συμμόρφωσης των ομάδων ελέγχου. Συγχρόνως κάποιες από αυτές αναφέρονται σε ένα σύνθετο τελικό σημείο, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιμορραγία, το οποίο δεν εκφράζει αποκλειστικά και άμεσα την υποτιθέμενη αρχή του μηχανισμού αλληλεπίδρασης στατινών-κλοπιδογρέλης, δηλαδή την αναστολή της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης της κλοπιδογρέλης.¹

4. Αλληλεπίδραση με αιθυλική αλκοόλη

Η κλοπιδογρέλη περιέχει μία εστερομάδα και η υδρόλυσή της οδηγεί σε μειωμένη αντιαιμοπεταλιακή δράση. Οι καρβοξυλεστεράσες HCE1 και HCE2 αντιπροσωπεύουν δύο σημαντικές υδρολάσες που είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό φαρμάκων και άλλων ξένων προς τον οργανισμό ουσιών. Στο ήπαρ εκφράζονται σε αφθονία και οι δύο τύποι καρβοξυλεστερασών ενώ στη γαστρεντερική οδό εκφράζεται κατά κύριο λόγο η HCE2. Η κλοπιδογρέλη αποτελεί υπόστρωμα της HCE1 και μπορεί να υποστεί τόσο υδρόλυση όσο και μετεστεροποίηση ανάλογα με την παρουσία ή όχι αιθυλικής αλκοόλης. Εκτός από την HCE1 και η υδρόλωση Α έχει αποδειχθεί ως καταλύτης μετεστεροποίησης.

Κλινική μελέτη έδειξε ότι η αιθυλική αλκοόλη αυξάνει την κυτταροτοξική δράση της κλοπιδογρέλης, υποδεικνύοντας ενισχυμένη βιολογική δραστηριότητα. Από την άλλη πλευρά, η αιθυλική αλκοόλη παρατείνει την παρουσία του μητρικού φαρμάκου, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικές φαρμακολογικές συνέπειες. Με βάση τις τιμές της C_{max}, η συγκέντρωση της κλοπιδογρέλης (μητρικού φαρμάκου) είναι 4 φορές μεγαλύτερη από τον ενεργό μεταβολίτη (οξειδωμένη κλοπιδογρέλη), και η συγκέντρωση του υδrolυμένου μεταβολίτη (καρβοξυλικό οξύ) είναι περίπου 10,000 φορές μεγαλύτερη από την οξειδωμένη κλοπιδογρέλη. Συνεπώς, η παρατεταμένη συ-



Σχήμα 3. Μετεστεροποίηση και υδρόλυση της κλοπιδογρέλης.³⁴

νύπαρξη της κλοπιδογρέλης με αιθυλική αλκοόλη φαίνεται να επιτρέπει στην οξειδωση να προχωρήσει περισσότερο. Αποτέλεσμα είναι να αυξάνεται η φαρμακολογική δράση, ιδιαίτερα όταν η αιθυλική αλκοόλη καταναλώνεται με μέτρο.³⁴

5. Κλοπιδογρέλη και πολυμορφισμός

5.1. Πολυμορφισμός του CYP3A4

Από τα ένζυμα CYP, τα ένζυμα CYP3A είναι τα πιο κατάλληλα για μελέτη, καθώς καταλύουν το 20% του συνόλου των αντιδράσεων φάσης I στο ήπαρ και μεταβολίζουν περισσότερο από το 50% των φαρμάκων.^{35,37} Η μεταβολική δραστηριότητα του CYP3A4, που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της κλοπιδογρέλης είναι γενετικά ελεγχόμενη. Σε μελέτη που έγινε εξετάστηκε το κατά πόσο επηρεάζουν οι πολυμορφισμοί του την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και πρόδευε πως ο πολυμορφισμός του CYP3A4 ρυθμίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη και ενδέχεται να συμβάλει στη μεταβλητότητα της απάντησης στο φάρμακο.³⁶

5.2. Πολυμορφισμός του CYP3A5

Το CYP3A5 εκφράζεται πολυμορφικά και παρουσιάζει σημαντικές διεθνικές διαφορές. Οι Suh και συν^{35,37} πραγματοποίησαν μελέτη για τον κίνδυνο

αθηροθρομβωτικών επεισοδίων σε άτομα που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη. Ο σκοπός ήταν να εξετάσουν εάν η CYP3A5 μειωμένη δραστηριότητα, η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκων ή σε γενετικούς πολυμορφισμούς, σχετίζεται με κλινικά σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης.

Στη φάση 1 της μελέτης, η αναστολή του CYP3A4 από ιτρακοναζόλη, στα άτομα που έλειπε το CYP3A5 συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της δραστηριότητας της κλοπιδογρέλης, ενώ κάποια δραστηριότητα (περίπου 25%) διατηρήθηκε σε αυτά με το γονότυπο expressor CYP3A5.

Στη φάση 2 της μελέτης τους, οι Suh και συν³⁷ παρατήρησαν τη συχνότητα των αθηροθρομβωτικών επεισοδίων (καρδιακός θάνατος, έμφραγμα του μυοκαρδίου και μη αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο) σε περίοδο 6 μηνών παρακολούθησης μεταξύ 348 ασθενών που υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειοπλαστική με εμφύτευση *stent* και αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Διαπίστωσαν ότι τα γεγονότα αυτά παρουσιάστηκαν πιο συχνά μεταξύ των ασθενών που είχαν CYP3A5 μη -εκφρασμένο γονότυπο από ό,τι μεταξύ εκείνων με εκφρασμένο γονότυπο.

Αποτελέσματα από τις δύο φάσεις της μελέτης τους δείχνουν ότι η CYP3A5 μειωμένη δραστηριότητα οδήγησε σε μείωση του μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης στην ενεργό μορφή της, γεγονός που σχετίζεται με μειωμένη κλινική αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

5.3. Πολυμορφισμός του CYP2C19

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης της μειωμένης δραστηριότητας του CYP2C19 στη δράση της κλοπιδογρέλης, αποδείχθηκε ότι η μείωση της λειτουργίας του CYP2C19 μειώνει το σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, με αποτέλεσμα χαμηλότερη αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.³⁸ Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η γενετική επίδραση ήταν εμφανής ακόμα και μετά την υψηλότερη δόση κλοπιδογρέλης 600 mg (δόση εφόδου) και συνεχίστηκε καθ' όλη τη φάση 75 mg (δόση συντήρησης). Επίσης, το CYP2C19 2 αλληλόμορφο συσχετίστηκε με μεγαλύτερη μη αντίδραση των αιμοπεταλίων στην κλοπιδογρέλη, κάτι που έχει συνδεθεί με την επιδείνωση του κλινικού αποτελέσματος μετά από στεφανιαίο *stenting*.

Σε μία άλλη μελέτη, εξετάστηκε εάν ο διπλασιασμός της δόσης κλοπιδογρέλης είναι αποτελεσματικός σε ασθενείς, που λαμβάνουν κανονική δόση και εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα των αιμοπεταλίων.

Πίνακας 1. Παρατηρούμενοι γονότυποι και αντίστοιχες λειτουργικές κατηγορίες (προβλεπόμενοι φαινότυποι)³⁸

Γονίδιο	Προβλεπόμενος Φαινότυπος	Παρατηρούμενοι Γονότυποι	Clopidogrel (n, %)
CYP1A2	EM	1A/1A, 1A/1D, 1A/1E, 1D/1D, 1D/1E	45 (96)
	RM	1C/1D	1 (2)
CYP2C19	EM	17/17, 1A/17, 1A/1A	37 (79)
	RM	1A/2A, 1A/8, 2A/2A	9 (19)
	Uncertain functional status	2A/17	1 (2)
CYP2B6	EM	1A/1A, 1A/1C, 1C/1C	29 (62)
	RM	1A/9, 1C/9, 9/9	17 (36)
CYP2C9	EM	1A/1A, 1A/2A, 1A/12	40 (85)
	RM	1A/3A, 2A/2A, 2A/3A	7 (15)
CYP3A4	EM	1A/1A	47 (100)
CYP3A5	EM	1A/1A, 1A/3A	11 (23)
	RM	3A/3A	35 (74)

n, Αριθμός Ασθενών; *CYP*, Κυτόχρωμα P450; *EM*, Εκτενής Μεταβολισμός; *RM*, Μειωμένος Μεταβολισμός.

ων.³⁹ Το συμπέρασμά της ήταν πως η αύξηση της δόσης της κλοπιδογρέλης από 75 σε 150 mg ημερησίως μείωσε τη δραστικότητα των αιμοπεταλίων, αλλά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στην αντιαιμοπεταλιακή δράση σε σχέση με το CYP2C19. Ωστόσο, η μείωση στη δραστικότητα ήταν ελάχιστη στο μικρό αριθμό ασθενών που ήταν ομόζυγοι για τα αλληλόμορφα που συνεπάγονται απώλεια λειτουργίας.

Αυτά τα αποτελέσματα προκαλούν κάποια σύγχυση, διότι δεν επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι οι μη φορείς του γονιδίου απώλειας λειτουργίας θα επωφελούνταν περισσότερο από την αύξηση της δόσης σε σχέση με τους φορείς. Όσον αφορά το σύνολο των ασθενών, ο διπλασιασμός της δόσης είχε ευεργετικά αποτελέσματα περίπου στους μισούς.

Η επίδραση της διακύμανσης της λειτουργίας του CYP2C19 στην ανταπόκριση στην κλοπιδογρέλη περιπλέκει τη χορήγησή της. Η συχνότητα των CYP2C19 γονοτύπων RM δείχνει μεγάλη φυλετική διακύμανση, καθώς κυμαίνονται από 20-30% σε Καυκάσιους, σε 35-45% σε Αфро-Αμερικανούς και 50-65% στην Ανατολική Ασία. Το πιο κοινό ελαττωματικό αλληλόμορφο, CYP2C19 2, αντιπροσωπεύει το 75-85% των CYP2C19 αλληλόμορφων υπεύθυνων για RMs σε Καυκάσιους και στην Ανατολική Ασία. Η φυλετική διακύμανση του CYP2C19 2 είναι πιθανόν ένας από τους λόγους για τους οποίους μεταξύ των διαφόρων εθνοτήτων υπάρχουν διαφορές στην φαρμακοκινητική των διαφόρων φαρμάκων που είναι υποστρώματα του CYP2C19 και επίσης δείχνει ότι η απάντηση στην κλοπιδογρέλη μπορεί να διαφέρει με βάση την εθνικότητα.³⁸

5.4. Πολυμορφισμός της Paraoxonase-1

Η βιο-ενεργοποίηση της κλοπιδογρέλης διακρίνεται σε 2 στάδια: α) στην οξείδωση προς τη 2-οξοκλοπιδογρέλη που καταλύεται από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 και β) στην υδρόλυση του δακτυλίου της γ-θειοβουτυρολακτόνης προς τη δραστική θειόλη. Το δεύτερο βήμα, που αποτελεί το καθοριστικό στάδιο, καταλύεται από το P450 και από την paraoxonase1 (PON1). Υπάρχουν δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο, Q192R και L55M. Όταν στη θέση 192 υπάρχει Arg, η ικανότητα υδρόλυσης είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με Gln192. Αντίθετα στη σύγκριση Met55 με Leu55 δεν παρατηρούνται διαφορές.

Σε μελέτη που διεξήχθη, άτομα με στεφανιαία νόσο που υποβλήθηκαν σε PCI έλαβαν κλοπιδογρέλη για 6-12 μήνες. Σε σύγκριση με άτομα είτε με RR192 PON1 ή QR192 γονότυπο, τα QQ192 ομόζυγα άτομα ήταν συχνότερα στην ομάδα *stent* θρόμβωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η γρήγορη *stent* θρόμβωση (εντός 30 ημερών) ήταν πιο συχνή από την αργή ή πολύ αργή *stent* θρόμβωση (> 30 ημέρες) σε QQ192 άτομα σε σύγκριση με QR192 ετερόζυγα και RR ομόζυγα άτομα.

Μετά τη χορήγηση της δόσης κλοπιδογρέλης 600 mg, τα άτομα που είχαν υποστεί μη θανατηφόρο *stent* θρόμβωση κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης έδειξαν χαμηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Επίσης, είχαν μια υψηλότερη συγκέντρωση του 2-οξο-μεταβολίτη, μια υψηλότερη αναλογία 2-οξοκλοπιδογρέλης προς ενεργό μεταβολίτη και χαμηλότερη αναστολή

της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τους συμμετέχοντες χωρίς *stent* θρόμβωση. Οι συγκεντρώσεις της μητρικής κλοπιδογρέλης και του αδρανούς μεταβολίτη (καρβοξυλικού οξέος), καθώς και η αρχική συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων.

Παράμετροι που αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα της κλοπιδογρέλης (δραστηριότητα *paraoxonase* στο πλάσμα, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του ενεργού μεταβολίτη και η μέγιστη αναστολή των αιμοπεταλίων) ήταν εξίσου ισχυροί δείκτες με το γονότυπο PON1 Q192R για τον κίνδυνο *stent* θρόμβωσης σε μονομεταβλητές και πολυμεταβλητές αναλύσεις παλινδρόμησης (*Cox regression analysis*). Σταθερά, ο PON1 Q192R γονότυπος ήταν ο μόνος παράγοντας που σχετίστηκε σημαντικά με τη δραστηριότητα *paraoxonase* (PON) στο πλάσμα, τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης και της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε μονομεταβλητά και πολυμεταβλητά γραμμικά μοντέλα παλινδρόμησης. Υπήρχε επίσης στενή συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της *paraoxonase* και της συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη, όπως και της αναστολής των αιμοπεταλίων. Συμπερασματικά, η προβλεπτική δύναμη των δημογραφικών, κλινικών και άλλων γενετικών παραγόντων, βελτιώνεται σημαντικά με την ένταξη του γονότυπου PON1.

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της συσχέτισης της PON1 με την κλινική ανταπόκριση στην κλοπιδογρέλη, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη σε ομάδα 1.982 ατόμων με οξεία στεφανιαία σύνδρομο. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα πορίσματα της προηγούμενης μελέτης. Η αδιόρθωτη αναλογία κινδύνου θανατηφόρου και μη θανατηφόρου *stent* θρόμβωσης σε σχέση με PON1 QQ192 vs RR192 ήταν 10,20. Λιγότερο σημαντικές συσχετίσεις κινδύνου βρέθηκαν επίσης με τα πιο πολύπλοκα αιτιολογικά, δευτερεύοντα τελικά σημεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου και το σύνθετο του αγγειακού θανάτου, μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου και μη θανατηφόρου ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μη μετρημένες συμμεταβλητές εξασθενούν τη σχέση με τον PON1 γονότυπο. Ο PON1 γονότυπος δε συσχετίστηκε με τον κίνδυνο ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου ή μη αγγειακού θανάτου, κάτι που συμφωνεί με την έλλειψη αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης για εγκεφαλικό επεισόδιο και μη αγγειακό θάνατο στις κλινικές δοκιμές. Τα QQ192 ομόζυγα άτομα παρουσίασαν χαμηλότερο κίνδυνο σοβαρής αιμορραγίας που θα μπορούσε να σχετιστεί με μια λιγότερο αποτελεσματική αναστολή των αιμοπεταλίων. Παρόμοιες

εκτιμήσεις κινδύνου ελήφθησαν για τη δραστηριότητα της *paraoxonase* στο πλάσμα. Τα άτομα που συμμετείχαν δε διέφεραν σε δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά.

Στο σύνολό τους, αυτές οι βιοχημικές, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η λειτουργική παραλλαγή του γονιδίου PON1 Q192R αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα της φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής ανταπόκρισης στην κλοπιδογρέλη και στην κλινική αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.⁶

5.5. Πολυμορφισμός του ADP-Υποδοχέα P2Y₁₂

Ο δραστικός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης μπλοκάρει τους υποδοχείς P2Y₁₂ στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, γεγονός που αναστέλλει τη μεσολαβούμενη από την ADP συσσώρευση. Ως εκ τούτου, μεταλλάξεις στο γονίδιο P2Y₁₂ μπορούν επίσης να εξηγήσουν τη μεταβλητότητα της αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης. Στο γονίδιο P2Y₁₂ έχουν καθοριστεί δύο τύποι: οι ασθενείς με H2 τύπο έχουν βρεθεί να εμφανίζουν αυξημένη μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε απάντηση στο ADP και ενδεχομένως, μια χαμηλότερη ανταπόκριση στα φάρμακα, όπως η κλοπιδογρέλη.

Η υψηλή δραστηριότητα των αιμοπεταλίων (HTPR) μετά από δόση εφόδου 600 mg κλοπιδογρέλης σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων μετά από PCI. Η HTPR θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, χρησιμοποιώντας προσαρμογή της LD με αποτέλεσμα τη βελτίωση της κλινικής έκβασης. Ωστόσο, η στρατηγική αυτή απέτυχε σε σχεδόν 10% των ασθενών με HTPR. Στόχος μελέτης που πραγματοποιήθηκε ήταν να καθοριστεί εάν οι πολυμορφισμοί των P2Y₁₂ ADP-υποδοχέων συνδέονται με την αποτυχία της προσαρμογής της δόσης. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν αρνητικό με βάση την παρακολούθηση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων.⁴⁰

5.6. Πολυμορφισμός του ABCB1

Το γονίδιο ABCB1 (γνωστό και ως MDR1) κωδικοποιεί την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση, μεταφορά και αποβολή της κλοπιδογρέλης. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου (συγκεκριμένα ο 3435C→T) μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Μελετήθηκε η επίδραση του πολυμορφισμού, μεμονωμένα και σε συνδυασμό με τη λειτουργικότητα του CYP2C19, σε καρδιαγγειακά περιστατικά ασθενών που ελάμβαναν κλοπιδογρέλη, καθώς και σε υγιείς

προκειμένου να μελετηθούν φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του φαρμάκου.⁴¹

Μετά από 15μηνη παρακολούθηση βρέθηκε ότι:

- Σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με κλοπιδογρέλη, ο ABCB1 3435C → T γονότυπος σχετίστηκε σημαντικά με τον κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου, ή εγκεφαλικού επεισοδίου.
- Οι TT ομοζυγώτες είχαν 72% αυξημένο κίνδυνο στο πρωτεύον τελικό σημείο σε σύγκριση με CT / CC άτομα.
- Οι γονότυποι ABCB1 3435C → T και CYP2C19 ήταν σημαντικοί, ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες του πρωταρχικού τελικού σημείου, και 47% των ασθενών που ελάμβαναν κλοπιδογρέλη, που είτε είχαν μειωμένη λειτουργία του CYP2C19, είτε ήταν ABCB1 3435 TT ομοζυγώτες, ή και τα δύο είχαν αυξημένο κίνδυνο του πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου.
- Στους υγιείς συμμετέχοντες, η μείωση της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με την κλοπιδογρέλη στους TT 3435 ομοζυγώτες ήταν 7.3 φορές μικρότερη σε σχέση με τα CT / CC άτομα.

Συμπεράσματα: Τα άτομα με το γονότυπο ABCB1 3435 TT εμφανίζουν μειωμένη αναστολή των αιμοπεταλίων και αυξημένο κίνδυνο νέων ισχαιμικών επεισοδίων κατά τη θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που έχουν υποβληθεί σε PCI, όταν ληφθεί υπόψη ο συνδυασμός ABCB1 και CYP2C19, τότε σχεδόν ο μισός πληθυσμός φέρει ένα γονότυπο που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων κατά τη διάρκεια σταθερών δόσεων κλοπιδογρέλης.

Σε άλλη μελέτη που έγινε στη Γαλλία προέκυψε επίσης πως ο γονότυπος ABCB1 3435 TT συνδέεται με πρόωμη *stent* θρόμβωση.⁴²

5.7. Πολυμορφισμός του ITGB3

Το ITGB3 είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη b υπομονάδα της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa. Πραγματοποιήθηκε μελέτη,⁴³ όπου συμμετείχαν 2,208 ασθενείς από όλη τη Γαλλία για να φανεί εάν οι πολυμορφισμοί του γονιδίου σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το γονίδιο δε σχετίζεται με την έκβαση ατόμων με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που ελάμβαναν το φάρμακο.

Σε άλλη μελέτη που έγινε στη Γαλλία συγκρίθηκαν 123 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI και είχαν πρόωμη *stent* θρόμβωση και διαθέσιμα δείγματα

DNA, με ομάδα ελέγχου 246 ατόμων που δεν είχαν θρόμβωση.⁴² Μελετήθηκαν πολυμορφισμοί διαφόρων γονιδίων και βρέθηκε μεταξύ άλλων ότι το ITGB3 PLA2 είναι αποφασιστικός παράγον στην πρόωμη *stent* θρόμβωση.

6. Κλοπιδογρέλη και διαβήτης

6.1. Εισαγωγή

Η διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με κλοπιδογρέλη και ασπιρίνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά τα ισχαιμικά επεισόδια σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική (PCI) και τοποθέτηση *stent*. Παρά το αποδεδειγμένο όφελος αυτής της θεραπείας, οι διαβητικοί ασθενείς εξακολουθούν να βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων ισχαιμικών γεγονότων, σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς.

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι διαβητικοί ασθενείς είναι ανθεκτικοί ή εν μέρει μόνο ανταποκρίνονται στις θεραπείες με διπλή αντιαιμοπεταλιακή δράση (κυρίως όσον αφορά την κλοπιδογρέλη), γεγονός που σχετίζεται με άσχημα κλινικά αποτελέσματα, όπως *stent* θρόμβωση και επαναλαμβανόμενα αθηροθρομβωτικά περιστατικά. Για τη χαμηλή ανταπόκριση στην κλοπιδογρέλη έχει θεωρηθεί υπεύθυνη η υπεργλυκαιμία, η μη συμμόρφωση με τη λήψη του φαρμάκου, η αντοχή στην ινσουλίνη (μεταβολικό σύνδρομο), η αλληλεπίδραση των φαρμάκων και η προς τα πάνω ρύθμιση (up-regulation) του υποδοχέα P2Y12 που έχει παρατηρηθεί σε διαβητικούς τύπου II.^{44,45}

6.2. Θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι Yang και συν⁴⁶ αναφέρουν ότι η τριπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία (διπλή αντιαιμοπεταλιακή και cilostazol) έχει ως δυνατό αποτέλεσμα μία πιο ισχυρή αναστολή της ADP μεσολαβούμενης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων συγκριτικά με τη διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία σε ασθενείς με διαβήτη και εμφύτευση *drug-eluting stent* (DES). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η τριπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία είναι μια θεραπευτική επιλογή για τη βελτίωση της χαμηλής ανταπόκρισης στην κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη.

Δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα απολύτως αποτελεσματικές θεραπείες της χαμηλής ανταπόκρισης στην κλοπιδογρέλη σε σακχαρώδη διαβήτη. Επί του παρόντος, οι στρατηγικές για την αντιμετώπιση της χαμηλής ανταπόκρισης των διαβητικών στην κλοπιδογρέλη, περιλαμβάνουν:

- Συγχορήγηση cilostazol. Το cilostazol αναστέλλει εκλεκτικά τη φωσφοδιεστεράση III αυξάνοντας τα επίπεδα του ενδοκυττάρου cAMP στα αιμο-

πετάλια, αποτρέποντας έτσι την ενεργοποίησή τους.

- Αύξηση της δόσης των αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων.
- Χρήση νέων φαρμάκων, όπως πρασουγρέλη (μη αντιστρεπτός αναστολέας του υποδοχέα P2Y₁₂ του ADP στα αιμοπετάλια) ή ticagrelor (αναστέλλει αντιστρεπτά μέσω αλλοστερικού ανταγωνισμού τον P2Y₁₂ υποδοχέα).
- Συγχρορήγηση γλιταζονών.

Οι παραπάνω στρατηγικές χρήζουν περαιτέρω μελέτης στο μέλλον. Επίσης, η εξατομικευμένη και πιο επιθετική αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία πρέπει να εξεταστεί για να προστατεύσει τους διαβητικούς ασθενείς που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο.^{44,45}

7. Κλοπιδογρέλη και δείκτης μάζας σώματος

7.1. Κλινικές μελέτες

Η δόση εφόδου 300 mg κλοπιδογρέλης χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπληρωματική αντιθρομβωτική αγωγή για να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων αμέσως μετά την τοποθέτηση στεφανιαίου *stent* (CS). Αντιθρομβωτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως κατά τη διάρκεια στεφανιαίων παρεμβάσεων, όπως η ηπαρίνη και οι αναστολείς της γλυκοπρωτεΐνης IIb / IIIa, προσαρμόζονται ανάλογα με το βάρος. Ωστόσο δε συμβαίνει το ίδιο με τη δόση εφόδου της κλοπιδογρέλης και λίγα διαθέσιμα στοιχεία υπάρχουν για το ποια είναι η πιο αποτελεσματική LD του φαρμάκου αυτού.

Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) ορίζεται ως ο λόγος του βάρους σε kg προς το τετράγωνο του ύψους σε m. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε μελέτη⁴⁷ προκειμένου να αξιολογηθεί κατά πόσον ο BMI επηρεάζει την απάντηση των αιμοπεταλίων στην LD κλοπιδογρέλης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε CS. Η προκαλούμενη από την ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων αξιολογήθηκε σε 48 ασθενείς υπό θεραπεία με ασπιρίνη που υποβάλλονται σε CS και λαμβάνουν 300 mg κλοπιδογρέλης (LD) κατά την επέμβαση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων (PA) αξιολογήθηκε στην αρχή της θεραπείας και έως και 24 ώρες μετά την επέμβαση. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με τον BMI: υπέρβαροι (BMI ≥ 25 kg / m², 29 ασθενείς) και κανονικό βάρος (BMI <25 kg / m², 19 ασθενείς). Η PA ήταν σημαντικά υψηλότερη στους υπέρβαρους από ότι στους ασθενείς με κανονικό βάρος κατά την έναρξη, σε 24 ώρες και κατά τη συνολική διάρκεια

της μελέτης. Το ποσοστό της αναστολής της PA 24 ώρες μετά την LD κλοπιδογρέλης ήταν ανεπαρκές (< 40%) στο 59% των υπέρβαρων και στο 26% των ασθενών με κανονικό βάρος. Ο αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος ήταν ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για την ελαττωμένη απόκριση των αιμοπεταλίων.

Μία άλλη μελέτη επιχείρησε να ελέγξει την ίδια υπόθεση.⁴⁸ 217 ασθενείς υποβλήθηκαν σε τοποθέτηση εγκεφαλικού αγγειακού *stent* ή σε αντιμετώπιση ανευρύσματος. Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ταυτόχρονη θεραπεία με άλλους αντιθρομβωτικούς παράγοντες αποκλείστηκαν. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν κλοπιδογρέλη 300mg το προηγούμενο βράδυ και το πρωί της διαδικασίας. Η σχέση μεταξύ ΔΜΣ και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αξιολογήθηκαν στατιστικά. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι πως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και της ανταπόκρισης των αιμοπεταλίων στην κλοπιδογρέλη και πως πρέπει να λαμβάνονται υπόψη άλλοι παράγοντες όπως συνυπάρχοντες παράγοντες θνητότητας, η χρήση άλλων φαρμάκων (όπως αντισταμινικών) και οι γενετικοί πολυμορφισμοί.

Μία τρίτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε,⁴⁹ επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της δεύτερης. Συγκεκριμένα, 251 ασθενείς υποβλήθηκαν σε δοκιμή της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων 6 έως 24 ώρες μετά από PCI και το συμπέρασμα ήταν πως υπάρχει πολύ χαμηλή συσχέτιση μεταξύ του BMI και της πλήρης θεραπείας με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη.

7.2. Συμπεράσματα

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις παραπάνω μελέτες είναι αντικρουόμενα. Απαιτούνται επομένως πρόσθετα στοιχεία για να διαπιστωθεί εάν ο δείκτης μάζας σώματος επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης.

8. Επίλογος

Η κλοπιδογρέλη είναι ένα ευρέως συνταγογραφούμενο φάρμακο. Διάφορα σκευάσματα που διατίθενται από τα φαρμακεία περιέχουν ως δραστική ουσία την κλοπιδογρέλη. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα, καθώς και των υπολοίπων παραγόντων που επηρεάζουν τη δράση της είναι σχετικά πρόσφατη και όπως έγινε αντιληπτό από την παραπάνω ανάλυση, υπάρχουν πολλά σημεία που απαιτούν εκτενέστερη έρευνα. Σαφή συμπεράσματα πρέπει οπωσδήποτε να προκύψουν όσον αφορά την αλληλεπίδραση με τους αναστολείς της αντλίας πρωτονίων και τις στατίνες, αφού η συγχροήγηση της

κλοπιδογρέλης με φάρμακα αυτών των κατηγοριών είναι ιδιαίτερα συχνό φαινόμενο. Επίσης, στα πλαίσια της προσπάθειας για μία στοχευμένη, ατομική θεραπευτική είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί αν το άτομο που λαμβάνει κλοπιδογρέλη, όντως ανταποκρίνεται στη δράση της και δεν παρουσιάζει αντίσταση. Διαφορετική θεραπεία ενδεχομένως να απαιτείται σε διαβητικούς και υπέρβαρους όπως προκύπτει από τις ανωτέρω παρουσιαζόμενες μελέτες.

Συμπερασματικά, προκειμένου η λήψη κλοπιδογρέλης από τον ασθενή να συνοδεύεται από την απαραίτητη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες από τους ερευνητές, όπως και υπεύθυνες και ενσυνείδητες αποφάσεις από τους οργανισμούς φαρμάκων, ώστε αν κριθεί αναγκαίο, να γίνουν οι κατάλληλες συστάσεις σε ιατρούς, φαρμακοποιούς και ασθενείς για αλλαγές στον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου.

Clpidogrel: Factors that affect its action.

Efthymios-Spyridon Gavriil¹, Evangelos Karalis², Ioanna Andreadou¹

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, 157 71 Zografou, Athens, Greece

² Laboratory of Biopharmaceutics – Pharmacokinetics, University of Athens, Panepistimiopolis, 157 71 Zografou, Athens, Greece

Abstract

Clopidogrel is an antiplatelet drug that irreversibly inhibits the P2Y₁₂ ADP receptor on platelets, which results in the inhibition of the ADP-induced platelet aggregation. It is an inactive pro-drug which is metabolized by the cytochrome P450 in the liver to the active metabolite. This paper studies the factors affecting the action of clopidogrel. Specifically, the interactions with drugs such as proton pump inhibitors and statins are analyzed. Furthermore, the interaction with ethyl alcohol, various genetic factors as well as the variability of action of clopidogrel in diabetic and overweight are examined. Clopidogrel is currently used for a number of indications in patients with chronic and acute cardiovascular disorders. Therefore, it is important to fully understand the factors that affect its action, so that the use of this drug can be accompanied by the necessary safety and efficacy.

Corresponding Author: Ioanna Andreadou,
e-mail: jandread@pharm.uoa.gr

Βιβλιογραφία

1. Bhindi R., Ormero O., Newton J., Banning A.P., Testa L. Interaction between statins and clopidogrel: is there anything clinically relevant? *Q.J.Med.* 101, 915-925, 2008.
2. Howland R., Mycek M., Harvey R., Champe P. Φαρμακολογία 3η έκδοση: Κεφάλαιο 20 - Φάρμακα που επηρεάζουν το αίμα σελ.250, 2007, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
3. Angiolillo D.J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E., Alfonso F., Macaya C., Bass T.A., Costa M.A. Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel: Clinical Implications, Management, and Future Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49,1505-1516, 2007.
4. Chow C.K., Moayyedi P., Devereaux P.J. Is it safe to use a proton pump inhibitor with clopidogrel? *Pol. Arch. Med. Wewn.* 119,564-8, 2009
5. Cattaneo M. The Clinical Relevance of Response Variability to Antiplatelet Therapy. *ASH Education Book vol. 2011, 70-75, 2011*
6. Bouman H.J., Schömig E., van Werkum J.W., Velder J., Hackeng C.M., Hirschhäuser C., Waldmann C., Schmalz H.-G., ten Berg J.M., Taubert D. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat. Med.* 17, 110–116, 2011.
7. Allen C., Dunn S.P., Macaulay T.E., Mukherjee D. Clopidogrel-Proton Pump Inhibitor Interaction: A Primer for Clinicians. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 10, 66-72, 2010.
8. Public statement on possible interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors *London, EMEA/328956/2009.*
9. Public Health Advisory: Updated Safety Information about a drug interaction between Clopidogrel Bisulfate (marketed as Plavix) and Omeprazole (marketed as Prilosec and Prilosec OTC) *U.S. Food and Drug Administration (FDA).*
10. Rude M., Chey W. Proton Pump Inhibitors, Clopidogrel and Cardiovascular Adverse Events: Fact, Fiction or Something In Between? *Gastroenterology.* 137, 1168-1171, 2009.
11. Laine L., Hennekens C. Proton Pump Inhibitor and Clopidogrel Interaction: Fact or Fiction? *Am J Gastroenterol.* 105, 34-41, 2010.
12. Sibbing D., Morath T., Stegherr J., Braun S., Vogt W., Hadamitzky M., Schömig A., Kastrati A., Von Beckerath N. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 101, 714-719, 2009.

13. Moayyedi P., Sadowski D.C. Proton pump inhibitors and clopidogrel - hazardous drug interaction or hazardous interpretation of data? *Can. J. Gastroenterol.* 23, 251-252, 2009.
14. Istvan E.S., Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, 1160-4, 2001.
15. Bellosa S., Paoletti R., Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 109, 50-7, 2004.
16. Clarke T.A., Waskell L.A. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab. Dispos.* 31, 53-9, 2003.
17. Lau W.C., Waskell L.A., Watkins P.B., Neer C.J., Horowitz K., Hopp A.S., Tait A.R., Carville D.G., Guyer K.E., Bates E.R. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 107, 32-7, 2003.
18. Serebruany V.L., Malinin A.I., Callahan K.P., Gurbel P.A., Steinhubl S.R. Statins do not affect platelet inhibition with clopidogrel during coronary stenting. *Atherosclerosis* 159, 239-41, 2001.
19. Neubauer H., Gunesdogan B., Hanefeld C., Spiecker M., Mugge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function—a flow cytometry study. *Eur. Heart. J.* 24, 1744-9, 2003.
20. Muller I., Besta F., Schulz C., Li Z., Massberg S., Gawaz M. Effects of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel. *Circulation* 108, 2195-7, 2003.
21. Mach F., Senouf D., Fontana P., Boehlen F., Reber G., Daali Y., de Moerloose P., Sigwart U. Not all statins interfere with clopidogrel during antiplatelet therapy. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 476-81, 2005.
22. Ayalasomayajula S.P., Vaidyanathan S., Kemp C., Prasad P., Balch A., Dole W.P. Effect of clopidogrel on the steady-state pharmacokinetics of fluvastatin. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 613-9, 2007.
23. Serebruany V.L., Midei M.G., Malinin A.I., Oshrine B.R., Lowry D.R., Sane D.C., Tanguay J.F., Steinhubl S.R., Berger P.B., O'Connor C.M., Hennekens C.H. Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study. *Arch. Int. Med.* 164, 2051-7, 2004.
24. Hong S.J., Park J.Y., Kim K.A., Ahn C.M., Park J.S., Kim Y.H., Shim W.J., Park S.M., Lim D.S. Comparison of low vs moderate dose of atorvastatin in clopidogrel resistance after coronary stenting in Korean patients with acute coronary syndrome. *Circ. J.* 73, 1111-8, 2009.
25. Saw J., Steinhubl S.R., Berger P.B., Kereiakes D.J., Serebruany V.L., Brennan D., Topol E.J. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation Investigators. Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation* 108, 921-4, 2003.
26. Lim M.J., Spencer F.A., Gore J.M., Dabbous O.H., Agnelli G., Kline-Rogers E.M. et al. Impact of combined pharmacologic treatment with clopidogrel and a statin on outcomes of patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: perspectives from a large multinational registry. *Eur. Heart J.* 26, 1063-9, 2005.
27. Wienbergen H., Gitt A.K., Schiele R., Juenger C., Heer T., Meisenzahl C., Limbourg P., Bossaller C., Senges J., MITRA PLUS Study Group. Comparison of clinical benefits of clopidogrel therapy in patients with acute coronary syndromes taking atorvastatin versus other statin therapies. *Am. J. Cardiol.* 92, 285-8, 2003.
28. Mukherjee D., Kline-Rogers E., Fang J., Munir K., Eagle K.A. Lack of clopidogrel-CYP3A4 statin interaction in patients with acute coronary syndrome. *Heart* 91, 23-6, 2005.
29. Schmidt M., Johansen M.B., Maeng M., Kaltoft A., Jensen L.O., Tilsted H.H., Bøtker H.E., Baron J.A., Sørensen H.T. Concomitant use of clopidogrel and statins and risk of major adverse cardiovascular events following coronary stent implantation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 74, 161-70, 2012.
30. Serrano Júnior C.V., Soeiro Ade M., Araújo L.F., Jabot B., Rached F., Orii N.M., Nicolau J.C., Duarte A.J., Ramires J.A. Lack of clopidogrel-statin interaction in patients undergoing coronary stent implantation. *Arq. Bras. Cardiol.* 95, 321-7, 2010.
31. Wenaweser P., Eshtehardi P., Abrecht L., Zwahlen M., Schmidlin K., Windecker S., Meier B., Haeblerli A., Hess O.M. A randomised determination of the Effect of Fluvastatin and Atorvastatin on top of dual antiplatelet treatment on platelet aggregation after implantation of coronary drug-eluting stents. The EFA-Trial. *Thromb. Haemost.* 104, 554-62, 2010.
32. Brophy J.M., Babapulle M.N., Costa V., Rinfret S. A pharmacoepidemiology study of the interaction between atorvastatin and clopidogrel after percutaneous coronary intervention. *Am. Heart. J.* 152, 263-9, 2006.
33. Saw J., Brennan D.M., Steinhubl S.R., Bhatt D.L., Mak K.H., Fox K., Topol E.J. CHARISMA

- Investigators. Lack of evidence of a clopidogrel–statin interaction in the CHARISMA trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 291-5, 2007.
34. Tang M., Mukundan M., Yang J., Charpentier N., LeCluyse E.L., Black C., Yang D., Shi D., Yan B. Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterificated in the presence of ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1467-76, 2006.
 35. Turgeon J., Pharand C., Michaud V. Understanding clopidogrel efficacy in the presence of cytochrome P450 polymorphism. *CMAJ.* 174, 1729, 2006.
 36. Angiolillo D.J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E., Ramírez C., Cavallari U., Trabetti E., Sabaté M., Hernández R., Moreno R., Escaned J., Alfonso F., Bañuelos C., Costa M.A., Bass TA., Pignatti P.F., Macaya C. Contribution of Gene Sequence Variations of the Hepatic Cytochrome P450 3A4 Enzyme to Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1895-1900, 2006.
 37. Suh J.W., Koo B.K., Zhang S.Y., Park K.W., Cho J.Y., Jang I.J., Lee D.S., Sohn D.W., Lee M.M., Kim H.S. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ.* 174, 1715-22, 2006.
 38. Varenhorst C., James S., Erlinge D., Brandt J., Braun O., Man M., Siegbahn A., Walker J., Wallentin L., Winters K., Close S. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 30, 1744-1752, 2009.
 39. Barker C.M., Murray S.S., Teirstein P.S., Kandzari D.E., Topol E.J., Price M.J. Pilot study of the antiplatelet effect of increased clopidogrel maintenance dosing and its relationship to CYP2C19 genotype in patients with high on-treatment reactivity. *JACC Cardiovasc. Interv.* 3, 1001-1007, 2010.
 40. Bonello L., Bonello-Palot N., Armero S., Bonello C., Mokhtar O.A., Arques S., Dignat-George F., Camoin-Jau L., Paganelli F. Impact of P2Y12-ADP receptor polymorphism on the efficacy of clopidogrel dose-adjustment according to platelet reactivity monitoring in coronary artery disease patients. *Thromb. Res.* 125, 167-70, 2010.
 41. Mega J.L., Close S.L., Wiviott S.D., Shen L., Walker J.R., Simon T., Antman E.M., Braunwald E., Sabatine M.S. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON—TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *The Lancet*, 376 1312 - 1319, 2010.
 42. Cayla G., Hulot JS., O'Connor S.A., Pathak A., Scott S.A., Gruel Y., Silvain J., Vignalou J.B., Huerre Y., de la Briolle A., Allanic F., Beygui F., Barthélémy O., Montalescot G., Collet J.P. Clinical, angiographic, and genetic factors associated with early coronary stent thrombosis. *JAMA.* 306, 1765-74, 2011.
 43. Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M., Quteineh L., Drouet E., Méneveau N., Steg P.G., Ferrières J., Danchin N., Becquemont L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. *N. Engl. J. Med.* 360, 363-75, 2009.
 44. Kim J.Y. Strategy for the Treatment of Clopidogrel Low Responsiveness in Diabetes Mellitus and Stent Implantation. *Korean Circ. J.* 39, 459–461, 2009.
 45. Scheen A. Aspirin and clopidogrel resistance in patients with diabetes mellitus. *Eur. Heart J.* 27, 2900, 2006.
 46. Yang T.H., Kim D.I., Kim J.Y., Kim I.H., Kim K.H., Han Y.C., Kim W., Seol S.H., Kim S.M., Kim D.K., Kim D.S. Comparison of triple anti-platelet therapy (aspirin, clopidogrel, and cilostazol) and double antiplatelet therapy (aspirin and clopidogrel) on platelet aggregation in type 2 diabetic patients undergoing drug-eluting stent implantation. *Korean Circ. J.* 39, 462–466, 2009.
 47. Angiolillo D.J., Fernández-Ortiz A., Bernardo E., Barrera Ramírez C., Sabaté M., Fernandez C., Hernández-Antolín R., Escaned J., Alfonso F., Macaya C. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J. Invasive Cardiol.* 16, 169-74, 2004.
 48. Wyrick C., Adesanya A., Greilich P., Boyd J., Sarode R. Body Mass Index Does Not Influence Platelet Responsiveness to Clopidogrel in Patients Undergoing Percutaneous Vascular Intervention. *Chest.* 138, 852, 2010.
 49. Gaglia M.A Jr., Torguson R., Pakala R., Xue Z., Sardi G., Mahmoudi M., Suddath W.O., Kent K.M., Satler L.F., Pichard A.D., Waksman R. Relation of Body Mass Index to On-Treatment (Clopidogrel + Aspirin) Platelet Reactivity *Am. J. Cardiol.* 108, 766-71, 2011.

Pharmaceuticals and Personal Care Products As Contaminants in the Aquatic Environment A Category of Organic Wastewater Pollutants with Special Characteristics

Thomas Vlachogianni, Athanasios Valavanidis

¹Department of Chemistry, University of Athens, University Campus Zografou, 15784 Athens, Greece

Summary

Pollution from Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in the aquatic environment is recognized as an important “emerging” environmental problem. Scientists have developed in the last decade an extensive area of research for analysis, chemical identification, and quantitative measurements in the aquatic environment of PPCPs. Additionally, research elucidated the transformation pathways when present in wastewater-treatment plants or in environmental matrices. The development and application of advanced treatment processes for their removal and/or mineralization have been advanced to minimize their environmental impact. Toxicological and ecotoxicological studies were advanced for environmental risk assessment and their potential biological effects in living organisms and ecosystems. Some of PPCPs are a unique category of micropollutants, because of their special chemical degradation characteristics. Residues of PPCPs were identified in municipal sewage treatment plant discharges, river and stream waters in many industrialised countries. In the last decade these chemicals are considered as “emerging” or “new” contaminants in the aquatic environment and were included in a priority list of hazardous substances.

This review tries to present the knowledge that is currently available with regard to the occurrence of pharmaceutical residues in aquatic matrices, the progress made during the last several years on identification of such compounds down to trace levels, and of new, previously unidentified, pharmaceuticals. Pharmaceutical chemicals include medicinal drugs (including antibiotics, steroids, analgetics, anticancer), veterinary drugs, materials for hygiene, diagnostic agents, nutraceuticals (from nutrition + pharmaceuticals, e.g. vitamins, dietary supplements, polyphenols, herbal extracts), disinfectants,

antioxidants and their packaging materials. Personal care products include lotions, skin creams, shampoos, soaps, cosmetics, toothpastes, and sunscreen creams and a variety of hygiene items. These PPCPs, degradation products and metabolites have been found at worrying concentrations in municipal wastewater. Recent studies of pharmaceutical residues and PCs in wastewater and the aquatic environment in Greece are also presented.

Introduction: Are pharmaceuticals and personal care products “emerging” pollutants for the 21st century?

In the last decades the production and consumption of Pharmaceutical substances and Personal Care Products (PPCPs) in the developed countries increased substantially. According to international statistics the global pharmaceutical market was estimated to have produced drugs valued at 956 \$ billion in 2011 and it is estimated to increase to 1.2 \$ trillion in 2015. The worldwide pharmaceutical market is growing in the last decade at a 5-8% rate. Only in the USA it is estimated that there were 4 billion prescriptions of drugs in 2009 (sales at 300 \$ billion). Also, in the USA it is estimated that there are 100,000 over-the-counter drugs which do not need prescription. The world pharmaceutical market sales by region was: USA 36%, Europe 31.5%, Japan 11.3%, Asia (India, China, S, Korea), Africa (South Africa, Nigeria, etc), Australia 12.7%, Latin America (Brazil, Argentina, etc) 5.7% and Canada 2.8%.^{1, 2}

In the last decades Personal care products is another sector of manufacturing providing a great variety of consumer and hygiene items (lotions, hand cream, hygiene, toothpaste, lotions, sun-screen oils, diagnostic agents, menstrual cycle hygiene products, disinfectants, insect repellent) for every day consumption. Additionally, Nutraceuticals, for

Corresponding author : Dr. Th. Vlachogianni, e-mail: thvlach@chem.uoa.gr & vlachogianni@mio-ecsde.org

example vitamins, antioxidants, dietary supplements, plant polyphenols, herbal extracts, etc, is another fast expanding sector of health and diet products.^{3,4}

The manufacturers of pharmaceuticals and personal care products may accidentally spill or purposefully dump harmful byproducts directly into the environment. Drug users also introduce these substances into the environment when handling drugs and when the substances pass through their bodies and into a septic tank or sewage system. Also, their plastic packaging materials are discarded as garbage. Pharmaceutical chemicals and personal care products can be found in municipal wastewater, in soil matrices (from municipal waste sites) and in as marine litter. Because PPCPs tend to dissolve relatively easily and do not evaporate at normal temperatures, they often

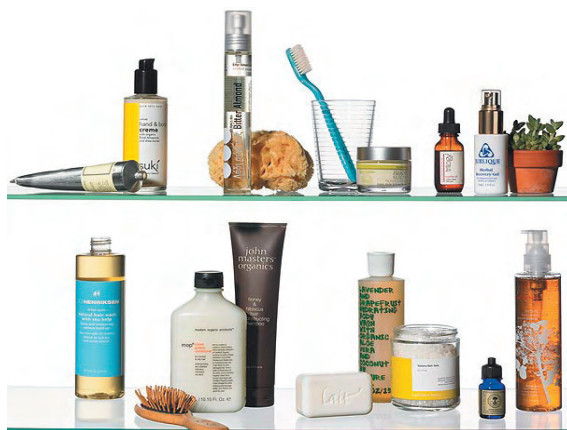


Figure 1. Personal care products and pharmaceutical substances are the “emerging” pollutants of the 21st century. Residues and their metabolites were detected in municipal and industrial effluents and in biosolids.

Source and detection of PPCPs in the aquatic environment and waste water treatment plants

One of the initial analytical studies for PPCPs was carried out in Germany in the 1990s. It found residues belonging to 32 different medicinal classes (antiphlogistics, lipid regulators, psychiatric drugs, antiepileptic drugs, beta-blockers and β_2 -sympathomimetics as well as five metabolites) in German municipal sewage treatment plant discharges, river and stream waters. Mainly acidic drugs like the lipid regulators bezafibrate, gemfibrozil, the antiphlogistics diclofenac, ibuprofen, indometacin, naproxen, phenazone and the metabolites clofibric acid, fenofibric acid and salicylic acid as well as neutral or weak basic drugs like the beta-blockers metoprolol, propranolol and the antiepileptic drug carbamazepine were found to be ubiquitously present

in the rivers and streams, mostly in the ng l^{-1} -range. Due to their wide-spread presence in the aquatic environment many of these drugs have to be classified as relevant environmental pollutants.⁵

A study by the U.S. Geological Survey (USGS) report published in 2002 found detectable quantities of PPCPs in 80% of a sampling of 139 susceptible streams in 30 states of the USA. The most common pharmaceuticals detected were steroids and nonprescription drugs; detergents, fire retardants, pesticides, natural and synthetic hormones, and an assortment of antibiotics and prescription medications were also found. The most frequently detected chemicals (found in more than half of the streams) were coprostanol (fecal steroid), cholesterol (plant and animal steroid), N-N-diethyltoluamide (insect repellent), caffeine (stimulant), triclosan (antimicrobial disinfectant), tri(2-chloroethyl)phosphate (fire retardant), and 4-nonylphenol (non-ionic detergent metabolite). Steroids, non-prescription drugs, and insect repellent were the chemical groups most frequently detected.^{6,7}

In 2000, USGS scientists collected samples from 47 ambient ground-water sites (not drinking-



Figure 2. Detectable quantities of various pharmaceutical substances and their metabolites are found in the municipal wastewater and in the aquatic environment of industrialized countries.

water wells) in 18 states and analyzed for 65 organic wastewater contaminants. In the summer of 2001, samples were collected from 74 sources of raw, untreated, drinking water in 25 states and analyzed for 100 organic wastewater contaminants. The five most frequently detected compounds in samples collected from ambient ground-water sites were N,N-diethyltoluamide (35%, insect repellent), Bisphenol A (30% plastic and epoxy-manufacturing ingredient), tri(2-chloroethyl) phosphate (30%, fire retardant), sulfamethoxazole (23%, veterinary and human

antibiotic), and 4-octylphenol monoethoxylate (19%, detergent metabolite).⁸

The U.S. Geological Survey focused on detectable concentrations of pharmaceutical compounds in sewage treatment plant effluents, surface water, and sediment in various states of the U.S.A. These studies found that the most important pharmaceutical classes included antibiotics, analgesics and anti-inflammatories, lipid regulators, beta-blockers, anti-epileptics, and steroid hormones. Although most chemical concentrations were detected at low levels (nano-grams/Liter (ng/L)), there are uncertainties that remain regarding the levels at which toxicity occurs and the risks of bioaccumulation of these pharmaceutical compounds. In a study of 2011, pharmaceutical compounds were detected at low concentrations in 2.3% of 1231 samples of groundwater (median depth wells=61m) used for public drinking-water supply in California. Of 14 pharmaceutical compounds analyzed, 7 were detected at concentrations greater than or equal to method detection limits: acetaminophen (analgesic, maximum concentration 1.89 µg/L), caffeine (stimulant, 0.29 µg/L), carbamazepine (mood stabilizer, 0.42 µg/L), codeine (opioid analgesic, 0.214 µg/L), p-xanthine (caffeine metabolite, 0.12 µg/L), sulfamethoxazole (antibiotic, 0.17 µg/L), and trimethoprim (antibiotic, 0.018 µg/L). Median detected concentration of pharmaceutical compounds was similar to those of volatile organic compounds, and higher than that of pesticides.⁹

“Emerging” pollutants in municipal and industrial effluents in industrialized countries

Scientists in the European Union countries addressed in the last decade the hot issue of the so-called “emerging” or “new” contaminants (i.e. pharmaceuticals, personal care products, human and veterinary drugs, surfactants, textile dyes, etc). The scientific projects focused on one hand on the tracing of “emerging” pollutants in industrial and municipal effluents and on the other in the active removal of organic pollutants by advanced water treatment technologies.^{10, 11}

These “emerging” pollutants are at present at low concentrations but it is suspected that their interactions and synergy may cause adverse effects in humans and wildlife. The emerging classes of chemical compound are:

Pharmaceuticals analgesics and anti-inflammatory drugs (codein, ibuprofen, acetaminophen, acetylsalicylic acid, dichlofenac), psychiatric drugs (diazepam), b-blockers (Metoprolol, Timolol),

steroids (estradiol, estrone), lipid regulators, hormones, sulphonamides (human and veterinary drugs), tetracyclines (human and veterinary drugs).

Personal care products (toothpaste, shampoo, skin crèmes, etc), Fragrances (nitro, polycyclic and macrocyclic musks), Sun-screen agents (benzophenone, methylbenzylidene camphor), Insect repellent (N,N-diethyltoluamide), *Antiseptics* (Triclosan, Chlorophene), etc, Surfactants, Alkylphenol and Alkylphenol Ethoxylates (APES) (alkylphenolethoxylates, 4-nonylphenol carboxylates, octylphenol ethoxycarboxylate), Flame retardants, polymer additives: polybrominated diphenyl ethers, PBDEs, tetrabromo bisphenol A, Bisphenol A (BPA, 4, 4-isopropylidenediphenol), Chloroalkanes, Tris (2-chloroethyl) phosphate.

A research project initiated in 2004 (Western Balkan and EU countries, abbreviated as EMCO, 9 partners, FP6, 2004-2007) focused in tracing emerging chemicals and their removal in industrial and municipal effluents by advanced treatment technologies. The 1st EMCO workshop entitled “Analysis and removal of contaminants from wastewaters for the implementation of the Water Framework Directive (WFD)” was organized in Dubrovnik, Croatia on October 20-21, 2005. A 2nd EMCO workshop entitled “Emerging contaminants in waste waters: Monitoring tools and treatment technologies” was organized in Belgrade, Serbia on April 26-27, 2007 (www.cid.csic.es/emco/home.htm) supported financially by the European Union EMCO project and by the Spanish Ministry of Education and Science project EVITA J.¹³

Pollution data on “emerging” contaminants in the aquatic environment and wastewater treatment plants

The scientific literature contains numerous papers on the identification, analysis of “emerging” pollutants, pharmaceuticals and personal care products in rivers, groundwater, biosolids and surface water in a number of industrialized countries.

A survey in Southern California of raw and treated drinking water from four filtration plants in San Diego County showed the occurrence of several pharmaceutical substances and PCPs. These included phthalate esters, sunscreens, clofibrate, clofibrilic acid, ibuprofen, triclosan, and DEET. Also, several of these (ibuprofen, triclosan) were found at low concentrations in the finished water.¹⁴

Scientists in Switzerland evaluated the ecotoxicological potential of the 100 pharmaceuticals expected to occur in high concentrations in the

wastewater of a general hospital and a psychiatric centre in Switzerland. Researchers related the toxicity data to predicted concentrations in different wastewater streams to assess the overall risk potential for different scenarios, including conventional biological pre-treatment in the hospital and urine source separation. The concentrations in wastewater were estimated with pharmaceutical usage information provided by the hospitals and literature data on human excretion into feces and urine. Environmental concentrations in the effluents of the exposure scenarios were predicted by estimating dilution in sewers and with literature data on elimination during wastewater treatment.¹⁵

Japan and other economically emerging Asian countries (India, China, Indonesia, etc) have very high consumer rates and extensive use of pharmaceuticals and personal care products. In recent years, scientists are concerned for their environmental consequences in the aquatic environment, especially rivers and drinking water sources. A recent review refers to Southern China problems for these particular contaminants, raising concerns amongst chemists and toxicologists. In China, scientists started to get concerned by the large amounts of pharmaceutical metabolites in wastewater. Particular emphasis was placed to the enormous production and widespread use of pharmaceuticals and particularly antibiotics utilised in human and veterinary medicine applications.¹⁶ A recent study by the UK Environment Agency's collected data on pollution problems of groundwater sources from "emerging" organic groundwater contaminants (EGCs). Most of these chemicals were agricultural chemicals but also nanomaterials, pharmaceuticals, personal care products, fragrances, water treatment by-products, flame retardants and surfactants, as well as caffeine and nicotine. Some of the pharmaceutical substances detected were carbamazepine and triclosan, nicotine, food additives and alkyl phosphates. The report presented the routes by which these compounds enter groundwater, their toxicity and potential risks to drinking water and the environment. The report identifies challenges that need to be met in the future to minimise risk to drinking water and ecosystems.¹⁷

In Italy, scientists reviewed the state of environmental pollution by pharmaceutical substances and the relevant papers with the aim to provide a comprehensive view on a national scale. Their review included papers on analysis, occurrence, monitoring, modelling, treatment, control of the emissions, and ecotoxicological effects of pharmaceutical substances in the environment. Pharmaceutical metabolites in Italy are widespread contaminants, entering the

aquatic environment from a myriad of scattered points. Priority pharmaceuticals, were measured in waste and surface water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-TMS), and the loads detected are generally comparable to the predicted ones. The sewage system is an important point in the control of pollution, but sewage treatment plants are not able efficiently to abate a substantial part of water-borne pharmaceuticals. Scientists suggest that specifically adjusted waste water treatment can improve the efficiency of drug abatement, mitigating potential environmental hazards.¹⁸

In Spain, scientists evaluated the occurrence and persistence of a group of 100 organic compounds in five municipal sewage treatment plants in various parts of Spain. The pollutants belonged to several chemical groups (pharmaceuticals, personal care products, pesticides and metabolites). The study also identified 20 of the mostly detected and persistent compounds in wastewater effluent, of which hydrochlorothiazide, atenolol, gemfibrozil, galaxolide and three metabolites [(fenofibric acid, N-Acetyl-4-amino-antipyrine(4-AAA) and N-Formyl-4-amino-antipyrine(4-FAA)], presented the highest average contribution percentages, in relation to the total load of contaminants.¹⁹

A review for emerging contaminants focused in the Llobregat River (North-East Spain) which is the most important drinking water source for Barcelona and its surrounding area. As one of the only water sources in the area the river water have been overexploited and effluents from more than 30 urban wastewater treatment plants have been discharged into the river. Surfactants, estrogens, pharmaceuticals, personal care products, pesticides, and even abuse drugs were the main groups detected in different studies. The information collected provided an overview of the river status according to the EU Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC).²⁰

The same river delta was used for a monitoring survey of "emerging" organic pollutants in the tertiary wastewater treatment plant of Depurbaix (Spain). The presence of 170 pharmaceuticals, personal care products, priority substances according to the 2008/105/EU Directive and four metals (Cd, Ni, Hg, Pb) have been investigated at the Llobregat delta, south of Barcelona (Spain). The concentrations of most pharmaceutical group of chemical substances detected rarely exceeding a few µg/L. Caffeine, Nicotine and galaxolide (musk fragrance) were found to be present in more than 60% of the samples. Diuron was the only priority substance detected. The study found that after the waste water treatment the

majority of organic contaminants were removed from tertiary treated wastewater and their concentration was reduced below 0.1µg/L. Monitoring revealed a widespread occurrence of analysed compounds in groundwater. Among them Codeine (analgesic), Ibuprofen (anti-inflammatory), Iopamidol, Iopromide (contrast agent) and paraxanthine (metabolite of caffeine) have only been detected in groundwater.²¹

Pharmaceuticals and personal care products as micropollutants were investigated in rivers of Romania. The river Someş (Transylvania) was the subject of these studies and GC/MS analysis was performed. The concentrations for 15 chemical micropollutants (drugs, such as analgesics, antiepileptics, psychiatric, stimulants, anticoagulants, antineoplastic, their metabolites, musk fragrances, disinfectants, etc) were in the range of 30 ng/l to 10 µg/l.²²

Another study was conducted in two South Wales (UK) rivers. The presence and fate of 56 pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs were investigated in river Taff and river Ely which were monitored for a period of 10 months. The majority of concentrations of micropollutants were in the range of 1-9 µg L⁻¹ and their levels dependent on the extent of water dilution (rainfall). Discharge of treated wastewater effluent into the river course was found to be the main cause of water contamination with PPCPs. These drugs were mainly antibacterial drugs (trimethoprim, erythromycin-H₂O and amoxicillin), anti-inflammatories and analgesics drugs (paracetamol, tramadol, codeine, naproxen, ibuprofen and diclofenac) and antiepileptic drugs (carbamazepine and gabapentin).²³

Pharmaceuticals and pesticide residues were measured upstream and downstream two wastewater treatment plant outlets in a Mediterranean river basin in the Arc river, Aix en Provence of France. The most important drugs detected were antiphlogistics, lipid regulators and carbamazepine. Pesticide pollution occurred through a high pollution peak in spring, while pharmaceuticals were continuously infused into the river via wastewater effluents. Carbamazepine and bezafibrate were detected in almost all samples at concentration levels ranging from ng/L to microg/L.²⁴

An extensive study in South Korea investigated the presence and distribution of 15 pharmaceutical residues in municipal wastewater treatment plants (WWTPs), livestock farms, hospitals, and pharmaceutical manufacturers. The effluents had different patterns of pharmaceuticals than their corresponding influents because of the different fate of each compound in the WWTPs. Non-steroidal anti-inflammatory drugs were the most dominant micropollutants, while antibiotics were dominantly

detected in the wastewater of livestock farms. The distribution of pharmaceuticals in the effluents varied with sampling sites and periods.²⁵

PPCPs and endocrine disrupting chemicals were detected in sludge from five wastewater treatment plants in southern California. Paracetamol, naproxen and ibuprofen were the dominant compounds, with mean concentrations of 41.7, 35.7 and 22.3µg/L, respectively. Concentration were significantly higher in winter than in the summer, which is attributed to more human consumption of pharmaceuticals during winter and faster degradation of the compounds in summer. The highest concentrations of triclosan and octylphenol were detected in sewage sludge, with mean concentrations of 1505 and 1179ng/g, respectively.²⁶

Studies on PPCPs were conducted in China due to substantial increase of new hospitals and the expanding urban areas. Scientists analysed 13 target pharmaceuticals in different water samples from the Hangzhou metropolitan area and Linan County, Southeast China. Sampling was conducted in five hospitals, two wastewater treatment plants (WWTPs), and in the Qiantang River. Trimethoprim, erythromycin A dihydrate, norfloxacin, ofloxacin, diclofenac sodium, and atenolol were the most frequently detected pharmaceuticals in hospital effluents. Results indicated that hospitals are more concentrated sources of pharmaceuticals than WWTPs.²⁷

Three very informative reviews have been published in recent years concerning pharmaceutical residues, personal care products and organic micro-contaminants in environmental waters and wastewater plants. The first review presented the knowledge that is currently available with regard to the occurrence of pharmaceutical residues in aquatic matrices and the identification of such compounds down to trace levels. Also, recent findings are presented in respect of the capacity of various treatment technologies to remove these contaminants.²⁸

The second review summarised major categories of organic micropollutants (pharmaceuticals, personal care products, sun-screen agents, etc) that have been detected in wastewaters. The review presented also studies on the fate of micropollutants during the wastewater treatment process.²⁹

The third review-survey covered the 15 years scientific papers and research projects connected with the elucidation of the effects and risks of PPCPs in the environment and to identify key outstanding issues regarding the effects of PPCPs on human and ecological health. The researchers promoted an international experts workshop to discuss the top priorities and issues. The top 20 priority questions fell into seven categories:

a) prioritization of substances for assessment, b) pathways of exposure, c) bioavailability and uptake, d) effects characterization, e) risk and relative risk, f) antibiotic resistance, and g) risk management. This exercise prioritized the most critical questions to aid in development of future research programs on the topic of organic micropollutants.³⁰

Monitoring and scientific research on pharmaceutical residues and Personal Care Products (PCPs) in wastewater treatment plants, rivers, ground and drinking water, has been carried in the last decade in Greece. A number of acidic pharmaceutical residues (ibuprofen, naproxen, ketoprofen), other commercial drugs (clofibric, diclofenac, phenazone, polyphenazone, 2,4-dichlorobenzoin acid), personal care materials and endocrine disrupting chemicals have been determined by gas or liquid chromatography-mass spectrometry. The selected areas of studies were municipal and hospital wastewater treatment plants, sewage sludge, rivers, ground and drinking water. Concentrations in the influent and effluents varied and the removal efficiency ranged from 15-80%.³¹⁻³⁵

Conclusions

The detection of “emerging” chemical micropollutants and pharmaceutical residues in surface water, groundwater and drinking water raised considerable public concern in the last decade. Scientists initiated studies to identify, analyse and evaluate their toxicological importance for a variety of emerging contaminants relevant to the drinking water and the ecological water cycle. The maximum concentration levels reported in surface waters, groundwater and/or drinking water were below the margin of safety. But these micropollutants can act synergistically or their metabolites may be more toxic. While it is clear that a large amount of excellent research has been conducted to date, it is equally evident that there is still much to be done to assess the toxicological effects of emerging mixtures of chemicals and how best to regulate these chemicals in the water industry. Wastewater treatment methods have been improved substantially in recent years to deal with the removal of these emerging pollutants.³⁶

Φαρμακευτικές Ουσίες και Προϊόντα Προσωπικής Φροντίδας ως Ρύποι στο Υδατικό Περιβάλλον

Κατηγορία Οργανικών Ρύπων σε Υγρά Απόβλητα με Ειδικά Χαρακτηριστικά

Θωμάς Βλαχογιάννη και Αθανάσιος Βαλαβανίδης
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Αθήνα.

Περίληψη

Περιβαλλοντική ρύπανση από φαρμακευτικές χημικές ουσίες και προϊόντα ατομικής φροντίδας (που καθιερώθηκαν με τη σύντμηση PPCPs, Pharmaceutical and Personal Care Products) είναι γνωστό ότι συμβαίνει στα υδατικά συστήματα και την τελευταία δεκαετία αποτελεί σοβαρό «αναδυόμενο» περιβαλλοντικό πρόβλημα. Οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει εκτεταμένη έρευνα για την ανάλυση των κυριότερων χημικών ουσιών, τον προσδιορισμό της δομής τους και τις ποσοτικές μετρήσεις στο υδατικό περιβάλλον. Επιπλέον, ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην ερμηνεία των οδών μετασχηματισμού των χημικών ουσιών στα συστήματα κατεργασίας υδατικών αποβλήτων και κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (αέρας, νερό, έδαφος). Στην κατεργασία υγρών αποβλήτων έχουν αναπτυχθεί επιπλέον μεθοδολογικές παρεμβάσεις για να μειώσουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες έχουν αναπτυχθεί για να διερευνήσουν τις βιολογικές επιπτώσεις σε ζωντανούς οργανισμούς και οικοσυστήματα. Μερικοί από τους μικρο-ρύπους

αυτούς επιδεικνύουν ιδιαιτερότητες στη διάσπαση τους σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Μεγάλος αριθμός χημικών φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων ατομικής φροντίδας έχουν προσδιορισθεί στα συστήματα αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων, σε ποτάμια, λίμνες και υπόγεια νερά. Σημαντικό μέρος των χημικών αυτών ουσιών έχουν ενταχθεί σε λίστες προτεραιότητας για ανάλυση και περιβαλλοντική εκτίμηση κινδύνου. Το άρθρο αυτό επισκόπησης παρουσιάζει τις σημερινές γνώσεις των επιστημόνων για τις φαρμακευτικές ουσίες και άλλα καταναλωτικά προϊόντα σε περιβαλλοντικά δείγματα και την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια για την ανάλυση και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Οι κυριότερες ουσίες ως ρύποι στο υδατικό περιβάλλον είναι: οι φαρμακευτικές ουσίες, όπως τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, τα αναλγητικά και τα αντικαρκινικά φάρμακα, τα κτηνιατρικά φάρμακα, τα υλικά υγιεινής, τα διαγνωστικά υλικά, οι βιταμίνες, τα διατροφικά συμπληρώματα, τα εκχυλίσματα βοτάνων, τα απολυμαντικά υλικά, οι αντιοξειδωτικές ουσίες και οι συσκευασίες τους. Επίσης, υπάρχουν και ευρύτατα χρησιμοποιούμενα προϊόντα όπως τα αρώματα, οι δερματικές αλοιφές, τα σαπούνια, οι οδοντόπαστες, τα αντιηλιακά ελαιώδη υλικά κ.λπ. Πολλές από αυτές τις χημικές ουσίες και παρασκευάσματα έχουν βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αστικά συστήματα καθαρισμού υγρών αποβλήτων. Επίσης, παρουσιάζονται πρόσφατες έρευνες για φαρμακευτικές ουσίες και προϊόντα προσωπικής φροντίδας σε εγκαταστάσεις υγρών αποβλήτων και του υδάτινου περιβάλλοντος στην Ελλάδα.

Αλληλογραφία: Δρ. Θωμάς Βλαχογιάννη e-mail:
thylach@chem.uoa.gr, vlachogianni@mio-ecsde.com

References

1. International Trade Administration Office of Health and Consumer Goods (<http://ita.doc.gov/td/health/PharmaceuticalIndustryProfile2010.pdf>)
2. IMS Institute for Health Care Informatics. Global Headquarters Parsippany, New Jersey, 07054 USA. IMS Health press releases.
3. Ankley G.T., Brooks B.W., Huggett D.B., Sumpter J.P. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8211-8217, 2007; Templeton M.R., Graham N., Voulvoulis N. Emerging chemical contaminants in water and wastewater. *Philos. Trans. Royal Soc. A* 367, 3873-3875, 2009.
4. Daughton C.G., Ternes T.A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment: agents of subtle change? Review. *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938, 1999; Heberer Th. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment; a review of recent research data. *Toxicol. Letters* 131,5-17, 2002.
5. Ternes T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245-3260, 1998.
6. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. Water quality data for pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000. U.S. Geological Survey. Fact Sheet FS-027-02 (June 2002). <http://toxics.usgs.gov/pubs/FS-027-02/>
7. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36,1202-1211, 2002.
8. Barnes K.K., Kolpin, D.W., Focazio M.J., Furlong E.T., Meyer M.T. Zaugg S.D., Haack S.K., Barber L.B., Thurman E.M. Water-quality data for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in ground water and in untreated drinking water sources in the United States, 2000-01: U.S. Geological Survey Open-File Report 2008-1293, 7 p. plus tables, 2008.
9. Fram M.S., Belitz K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci. Total Environ.* 409, 3409-3417, 2011.
10. Barcelo D., Petrovic M. (Eds). Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Sources and Occurrence. Vol. 5/S/1, The Handbook of Environmental Chemistry Series, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2008.
11. Barcelo D., Petrovic M. (Eds). Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Removal Technologies. 5/S/2. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2008.
12. Houtman C.J. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *J Integrat Environ Sci* 7(4):271-295, 2010.
13. Radienovic J, Petrovic M, Barcelo D. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Anal Bioanal Chem* 387: 1365-1377, 2007.
14. Gregory A, Mark L., Pettigrove E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environ. Sci. Technol.* 40 (3), pp 687-695, 2006.
15. Escher BI, Baumgartner R, Koller M, Treyer K, et al. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 46(1):75-92, 2011.
16. Richardson BJ, Lam PK, Martin M. Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Mar Pollut Bull.* 50(9):913-20, 2005.
17. Stuart M, Lapworth D., Crane E, Hart A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ.* 416:1-21, 2012.
18. Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Reitano G, Bagnati R, et al.. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. *Environ Sci Pollut Res Int* 13(1): 15-21, 2006.
19. Martínez Bueno MJ, Gomez MJ, Herrera S, Hernando MD, et al. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environ Pollut* 164:267-273, 2012.
20. González S, López-Roldán R, Cortina JL. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. *Environ Pollut.* 161:83-92, 2012.
21. Teijon G, Candela L, Tamoh K, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging

- contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 408, 3584-3595, 2010.
22. Moldovan Z. Occurrences of pharmaceuticals and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere* 64, 1808-1817, 2006.
 23. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* 42, 3498-3518, 2008.
 24. Comoretto L., Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Sci. Total Environ.* 349, 201-210, 2005.
 25. Sim W.-J., Lee J.-W., Lee E.-S., Shin S.-K., Hwang S.-R., Oh J.-E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 62, 179-186, 2011.
 26. Yu Y, Wu L, Chang AC. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. *Sci Total Environ.* 442C:310-316, 2012.
 27. Chen H., Li X., Zhu S. Occurrence and distribution of selected pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments: a comparative study of regions in China with different urbanization levels. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 2381-2389, 2012.
 28. Fatta-Kassinos D., Meric S., Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 251-275, 2011.
 29. Ratola N., Cincinelli A., Alves A., Katsoyiannis A. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment. *J. Hazard Mater.* 239-240, 1-18, 2012.
 30. Boxall A.B., Rudd M.A., Brooks B.W., Caldwell D.J., Choi K., Hickmann S., Innes E., Ostapchuk K., Staveley J.P., Verslycke T., Ankley G.T., Beazley K.F., Belanger S.E., Berninger J.P., Carriquiriborde P., Coors A., DeLeo P.C., Dyer S.D., Ericson J.F., Gagné F., Giesy J.P., Gouin T., Hallstrom L., Karlsson M.V., Joakim Larsson D.G., Lazorchak J.M., Mastrocco F., McLaughlin A., McMaster M.E., Meyerhoff R.D., Moore R., Parrott J.L., Snape J.R., Murray-Smith R., Servos M.R., Sibley P.K., Straub J.O., Szabo N.D., Topp E., Tetreault G.R., Trudeau V.L., Van Der Kraak G. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120, 1221-1229, 2012.
 31. Heberer Th., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler K., Tsipi D., Koutsouba V., Hiskia A. (2001) Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground, and drinking water in Greece and Berlin (Germany). In: Daughton CG, Jones-Lepp TL (Eds). *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*. ACS Symposium Series, Vol. 791. ACS publications, Washington DC, Chapter 4, pp. 70-83.
 32. Koutsouba K., Heberer Th., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler K., Tsipi D., Hiskia A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water in Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51, 69-75, 2003.
 33. Δρίλλια Π. «Τύχη των φαρμακευτικών ουσιών κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με διεργασία ενεργού ιλύος κατά τη διάθεσή τους σε υδάτινους αποδέκτες και στο έδαφος». Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ιαν. 2005.
 34. Kosma C.I., Lambropoulou D.A., Albanis T.A. Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece. *J. Hazard Mater.* 179, 804-817, 2010.
 35. Samaras V.G., Thomaidis N.S., Stasinakis A.S., Lekkas T.D.. An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2549-2561, 2011.
 36. Schriks M., Heringa M.B., van der Kooij M.M.E de Voogt P., van Wezel A.P. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Res.* 44, 461-476, 2010.

Structure-Activity-Selectivity Relations on the Keto-Pyrrolyl-Difluorophenol Aldose Reductase Inhibitory Scaffold

Eleni Kotsampasakou¹ and Vassilis J. Demopoulos¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

Abstract

In recent years it has been observed worldwide a striking increase of cases of diabetes mellitus, which tend to attain an epidemic prevalence. Aldose reductase (ALR2, AR, AKR1B1, EC 1.1.1.21) belongs to the aldoketoreductase superfamily. It is the first enzyme of the polyol pathway, which converts glucose to sorbitol. The physiological role of ALR2 is detoxifying and regulating, but in cases of diabetes and/or hyperglycemia, glucose is converted rapidly to sorbitol, which tends to concentrate into the cells, damaging them in many tissues. Therefore, ALR2 was proposed responsible for the long term complications of diabetes, such as neuropathy, nephropathy, retinopathy and cataract. Aldehyde reductase (ALR1, AKR1A1, EC 1.1.1.2) belongs also to the ketoreductase superfamily. The major role of ALR1 is also the detoxification of toxic aldehydes. The two enzymes exhibit 65% sequence, as well as structural homology. Thus, simultaneous inhibition of both enzymes could cause unwanted effects, due to deteriorated detoxification.

The fifteen compounds of this study (Figure 1) have been previously synthesized in our lab and their inhibitory activity in ALR2 and ALR1 has been tested *in vitro*. We have tried to correlate statistically pIC_{50}^{ALR2} and selectivity index ($IC_{50}^{ALR1}/IC_{50}^{ALR2}$, SI) with various calculated physicochemical properties of the molecules, such as lipophilicity, pKa, MR, TPSA, atomic and electronic spatial parameters, as well as the energies of HOMO and LUMO.

We have found out, from the best equation, that pIC_{50}^{ALR2} depends on the distance between the carbonyl oxygen and the phenolic oxygen (D_1), the energy of HOMO (E_{HOMO}) and the dihedral angle between the pyrrolyl ring and the aroyl substituent (A):

$$pIC_{50}^{ALR2} = -0.18(\pm 0.07)D_1 + 0.014(\pm 0.006)A - 39.03(\pm 15.76)E_{HOMO} - 5.84(\pm 5.39)$$

$$n=15, r^2=0.647, s=0.313, MAE=0.200$$

We have also found out that the selectivity index (SI) depends on the distance of the aromatic centre of the molecule to the phenolic oxygen (D_2), coupled with lipophilicity (calculated as $S+\log P$):

$$SI = -33.06(\pm 10.42)D_2 + 67.00(\pm 18.74)\log P - 39.94(\pm 73.41)$$

$$n=14, r^2=0.583, s=43.467, MAE=32.519$$

1. Introduction

1.1. Aldose Reductase (ALR2) and Aldehyde Reductase (ALR1)

Diabetes mellitus is a complex metabolic disorder that is characterized by abnormal metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, as a result of lack of insulin production or insulin resistance¹. Unfortunately, during the 20th century diabetes acquired an epidemic prevalence and from the beginning of the 21st century it is developing into pandemic phenomenon. In 2011, 366 million people were suffering from the disease, while by 2030 the number is estimated to elevate up to 522 million patients, with frequency of prevalence 7.7%². In addition, according to epidemiologic studies, it was found out that diabetes is not exclusively a disease of the developed world, since it appears in very high rate in some developing countries of Asia and Latin America, while in some developed countries of Central Europe (e.g. Holland, Austria) it appears in unexpectedly low rates³. Diabetes is closely associated with high morbidity and mortality due to its chronic complications that develop over the years because of systematic insufficient glycemic control⁴,

which in chronic bases affects the patients' health and quality of life. Among these chronic complications are angiopathy and cardiovascular diseases, neuropathy, nephropathy, retinopathy and cataract⁵.

The enzyme that is considered responsible for diabetes' chronic complications is aldose reductase (ALR2, AR, AKR1B1, EC 1.1.1.21), a cytosolic enzyme, member of the aldo-ketoreductase superfamily⁶. Aldoketoreductases are ancient proteins, that share a common structure of a conserved (β/α)⁸ barrel and a conserved pyridine nucleotide binding site⁷. ALR2 is responsible for a series of physiologic functions, such as the regulation of the proinflammatory response via the reduction of aldehyde phospholipids, the synthesis of metabolically vital compounds such as prostaglandins, and the modulation and modification of steroids *in vivo*⁶. It is the first enzyme of the polyol pathway, which converts glucose into sorbitol using NADPH as a co-factor. Sorbitol is slowly converted into fructose by the second enzyme of the pathway, sorbitol dehydrogenase (SDH), which uses NAD^+ as a co-factor⁸.

In case glucose's levels in the blood are normal, the polyol pathway possesses only a small part in the metabolism of glucose, because ALR2 has a low affinity to glucose. However, in case of hyperglycaemia, glucose is rapidly converted by the polyol pathway to sorbitol, which cannot easily cross cell membranes and accumulates into cells, causing swelling, as well as cell and tissue dysfunction⁹. Additionally, the exhaustion of NADPH results in the deactivation of glutathione (GSH) reductase and NO synthase, that leads to the exhaustion of GSH and NO and production of ROS (reactive oxygen species). These effects, in combination with the disturbance of NADH/NAD^+ ratio (pseudohypoxia), can cause oxidative stress, which is additionally related to diabetic chronic complications^{1, 10-12}. Furthermore, fructose, the last product of the polyol pathway, via oxidation, gives intermediates that can lead to AGEs (advanced glycation end products), which are also considered responsible for diabetes' chronic complications^{11, 13}.

Finally, recent studies have shown that ALR2 is related to prostaglandin-F (PGF) synthase activity, which is highly connected to ischemic and inflammatory pathologic conditions,^{13, 14} as well as to other inflammatory factors^{5, 14}, while is related to some particular types of cancer, such as in liver, lungs, breast, ovaries, cervix and rectum^{5, 15}.

All the above evidence point out that ALR2 is an important pharmacological target and its inhibition could be the key to many pathological conditions. Of

course, this means that there is a continuously rising need for new and effective aldose reductase inhibitors (ARIs), since today only epalrestat is on the market and only in Japan. Even though many active ALR2 inhibitors have been synthesized over the years, most of them are derivatives of the carboxylic acid or the hydantoin moiety, which have proved to have either poor bioavailability or serious adverse effects¹⁶.

Aldehyde reductase (ALR1, AKR1A1, EC 1.1.1.2,) is a cytosolic enzyme, member of the aldoketoreductase superfamily, like aldose reductase (ALR2). It also catalyzes several physiological functions, among them, detoxification of toxic aldehydes^{7, 17, 18}. In addition, the two enzymes share a high level of sequence ($\sim 65\%$) and structural homology,⁶ as well as common physical and chemical properties¹⁹. This has as a result the increased tendency of many substrates or ligands to bind with both ALR1 and ALR2 and complicates the development of novel ARIs^{17, 20}. This happens because the inhibition of both of the enzymes is thought to lead to toxic phenomena⁶, due to insufficient detoxification capacity of the living cell. However it has been indicated that there are other available enzymes for the aldehydes' detoxification, in case of parallel inhibition of ALR2 and ALR1⁸, but this matter needs further investigation.

In order to overcome the problematic pharmacokinetic profile of carboxylic acids, novel bioisosteric approaches have been implemented, as for example with the trifluoromethyl ketone substituted ARIs²¹. In previous work, and in continuation of searching for new ARI chemotypes^{4, 22}, we have prepared and *in vitro* tested a series of keto-pyrrolyl-difluorophenol derivatives (Figure 1). In these molecules 2,6-difluorophenol was used as a non-classical bioisosteric replacement of the acetic acid moiety¹⁸, while the pyrrole ring was substituted by different keto-groups. The synthesized compounds were tested regarding their ALR2 inhibitory activity ($\text{IC}_{50}^{\text{ALR2}}$), as well as their selectivity (Selectivity Index, $\text{SI} = \text{IC}_{50}^{\text{ALR1}} / \text{IC}_{50}^{\text{ALR2}}$). In order to explain the potency and the selectivity of this series of 15 synthesized compounds (Figure 1), we conducted a QSAR study with various molecular descriptors, which include lipophilicity, spatial disposition of key moieties and quantum chemical properties. The results of this study were also expected to help us with the extraction of useful conclusions about the design of future ARIs.

1.2. QSAR main points

Generally, QSAR is the key for understanding the effect of a molecular structure to a biological

system and use this knowledge to our advantage, in order to develop predictive models²³. A QSAR model establishes a statistical relationship between the biological activity exerted by a series of compounds and a set of parameters determined from the structures of the compounds. The central assumption of a QSAR model is that the numerical value of a specified biological activity measured for a set of molecules depends on the structure of these molecules²⁴. Thus, if we take a series of chemical structures and try to form a quantitative relationship between the biological effects (i.e. the activity) and the chemical structures, then we are able to form a quantitative structure-activity relationship or QSAR.

In case the data are less complex or non quantitatively parametrised, i.e. while trying to understand the effect of a sub-structure in a certain activity, we simply use the term structure-activity relationship or SAR. Together QSARs and SARs can be reported as (Q)SARs and belong to a series of techniques that are called *in silico* approaches. In general, even though there is no formal definition, *in silico* includes both SARs and QSARs, as well as the use of databases, category formation and read across. It also borders into various areas of cheminformatics and bioinformatics. Basically a (Q)SAR is consisted of three parts: i) the (activity) data to be modelled and therefore predicted, ii) data with which to model and iii) a method to form the model.

There are many practical reasons for using QSAR and these techniques are utilized in several situations. The basic purposes for using QSAR are to predict the biological activity and physico-chemical properties by rational means, as well as to comprehend and rationalize the mechanisms of action within a series of chemical compounds.

Underlying these aims, the reasons for wishing to develop these models include:

- Reduction in the cost of the product development (e.g. in the pharmaceutical, pesticide, personal products, etc. areas).
- Predictions could reduce the requirement for lengthy and expensive animal tests.
- Reduction (and even, in some cases, replacement) of animal tests, thus minimizing animal use and obviously pain and discomfort to animals.
- Other areas of promoting green or/and greener chemistry to increase efficiency and to eliminate waste by not following leads unlikely to be successful.

The reason these models can be valuable in the

development of drugs or other chemicals is more than obvious, and numerous applications can be found in literature^{23,24}.

Classical QSAR involving data of a response variable (Y-variable), a pool of descriptors (X-matrix) and a statistical technique to link these types of information constitutes a 2-D methodology. 3-D QSAR or higher dimensional QSAR requires molecular modeling / docking techniques and structure alignment with most favorable approaches CoMFA and CoMSIA^{25,26}. Nevertheless, 3-D features can be incorporated in 2-D QSAR as well, though implementation of 3-D descriptors calculated by relevant techniques. In each case energy minimization and conformational search is required. In the present study the Monte-Carlo approach and *ab initio* Hartree-Fock approximation were used to calculate spatial and electronic 3-D descriptors, to be used in modeling our compounds (Figure 1). A brief description of Monte-Carlo algorithm and Hartree-Fock method is given below under 1.3 and 1.4.

1.3. The Monte Carlo method in conformer search

The Monte Carlo algorithm in computational chemistry²⁷ is based on the Metropolis criterion (MMC) and uses the van der Waals potential energy term of the MMFF94 force field for the evaluation of the Boltzmann factor, as well as a SMARTS expression recognition procedure to detect the degrees of freedom of the treated molecules (rotatable bonds + non-planar trigonal nitrogen). The main core of the MMC algorithm is processed as follows: (1) a rotatable bond or a trigonal non-planar nitrogen is chosen randomly; (2) if a rotatable bond has been chosen, then an angle of rotation is selected randomly from a list of dihedral variation, starting from 30 degrees to 180 degrees with intervals of 30 degrees; (3) the geometric transformation is applied, that is, either a dihedral rotation with the selected angle on the selected rotatable bond or the nitrogen inversion; (4) the van der Waals (VDW) MMFF94 energy term is evaluated and compared to the VDW energy of the previous MMC step; (5) if the energy difference is negative or if the Boltzmann factor (BF) is satisfactory (Metropolis criterion), then the new conformation is accepted. If not, a new conformation is generated from the previously accepted conformation, and the global procedure goes on until the number of Monte Carlo cycles is reached. The simulation temperature used for the evaluation of the Boltzmann factor is recommended to be set to 1200 K, as it has proven to give a higher conformational diversity.

The global procedure consists of a defined number of Monte Carlo cycles and steps (e.g., 10 cycles of 2000 steps), with each cycle starting with a new seed but from the same initial conformation. After the global number of Monte Carlo cycles is reached, a procedure follows which ensures conformational diversity within the defined energy window (e.g. 5 kcal/mol). Unlike the evaluation of the Boltzmann factor, the potential energy term calculated during the energy window calibration is not restrained to the sole van der Waals term, as it also evaluates the torsional term, in order to eliminate conformations with too high torsional strain energy. The procedure that ensures conformational diversity is based on a two-step procedure. First, a pair-wise torsion angle RMSD calculation is applied on all the generated conformations, using one referenced dihedral angle for each of the rotatable bonds, with a threshold usually of 5 degrees. Once this first diversity filter is applied, a standard pair-wise Cartesian RMSD based filter is applied to ensure conformational diversity with a pre-defined threshold value (e.g. 0.25 Å).

A general rule of thumb concerning the CPU time required on a processor of 2.4 GHz with 2 GB memory to generate one conformer ensemble is on average 40–80 s from 1 to 8 rotatable bonds in a compound, and increases quadratically for compounds with more than 8 rotatable bonds.

1.4. Quantum mechanics considerations

The starting point of any discussion into quantum mechanics²⁸ is always the time-independent Schrödinger equation (1):

$$\mathbf{H}\psi = E\psi \quad (1)$$

where $\mathbf{H}$ is the *Hamiltonian operator*, E is the energy of the molecule and ψ is the wavefunction which is a function of the position of the electrons and nuclei within the molecule. A number of solutions exist for Eq. (1), with each one representing a different electronic state of the molecule. Importantly the lowest energy solution represents the ground state. It is worth stating that the Schrödinger equation is an eigenvalue equation, which in mathematical terms means that the equation contains an operator acting upon a function that produces a multiple of the function itself as the result [Eq. (2)]:

$$\text{Operator} \cdot \text{function} = \text{constant} \cdot \text{function} \quad (2)$$

In Eq. (1) the wavefunction (ψ) can be approximated to the electronic state, this being the configuration of the electrons in a series of molecular orbitals. It is then possible to evaluate differing electronic

configurations of the wavefunction in terms of their energies, with the lowest energy configuration being the ground state. It is the ground state energy that corresponds to the ground state geometry of a given molecule. For a given wavefunction the associated *Hamiltonian* is calculated according to Eq. (3):

$$\mathbf{H} = \text{KE}_{\text{total}} + \text{PE}_{\text{total}} \quad (3)$$

where KE_{total} = total kinetic energy = $\sum$ (coulomb repulsion between each pair of charged entities)

PE_{total} = total potential energy = $\sum$ (electron–nuclei attraction) + $\sum$ (electron–electron repulsion) + $\sum$ (nuclei–nuclei repulsion).

In order to evaluate the components of Eq. (3), a number of approximations is required, as for example the Hatree-Fock self-consistent field method for ab initio calculations.

Generally, the first step towards obtaining an optimised electronic structure (i.e. the ground state) for a molecule is to consider the wavefunction as a series of molecular orbitals with differing electronic occupations. One of these sets of molecular orbitals will correspond to the ground state and hence have the lowest energy. Approximating the wavefunction to a series of molecular orbitals allows the substitution of the wavefunction in Eq. (1) with Eq. (4) resulting in Eq. (5) (both Eqs. (4) and (5) are simplified to illustrate the important conceptual idea that in Hartree–Fock theory the wavefunction is represented by a series of molecular orbitals).

$$\Psi = \varphi_1 \varphi_2 \varphi_3 \dots \varphi_n \quad (4)$$

$$\mathbf{H}(\varphi_1 \varphi_2 \varphi_3 \dots \varphi_n) = E(\varphi_1 \varphi_2 \varphi_3 \dots \varphi_n) \quad (5)$$

where φ_n is the n^{th} molecular orbital.

Having broken down the electronic wavefunction into a series of molecular orbitals, Hartree–Fock theory then makes use of so-called “basis functions”. These functions are a series of one-electron mathematical representations that are localised on individual atoms, which can be thought of as representing the atomic orbitals. The more basis functions included in the molecular orbital calculation, the more accurate the final representation. A further approximation is often used²⁹. If a system has a multiplicity of zero, which means that all the electrons are paired, then the electrons may be restricted to moving in pairs. This is called restricted Hartree-Fock (RHF), and is the best method for closed-shell molecules as the wavefunction is for singlet spin states. For open-shell molecules where unpaired electrons are present, unrestricted Hatree-Fock (UHF) must be used as the wavefunction is for non-singlet spin states; UHF can also be used for singlet states. Finally, when evaluating

the energy of the wavefunction within Hartree–Fock theory, correlation effects (i.e. interactions between pairs of electrons with opposing spins) are completely neglected³⁰.

Initially, the usage of Hartree–Fock theory was limited to very small systems for which the iterative process of locating the lowest energy wavefunction was amenable to early computers. Such limitations led to the development of so-called semi-empirical quantum mechanics methods, with the aim of allowing chemically meaningful systems to be investigated. As would be expected, one of the most time-consuming steps in the Hartree–Fock optimisation procedure is the manipulation of the mathematical representations of the molecular orbitals. In contrast, the semi empirical Austin Method 1 (AM1) deals only with the valence electrons, thus significantly reducing the complexity and hence time of one of the most computationally expensive steps. Additional computational savings are made in the use of parameterised functions for some of the terms in the *Hamiltonian*. These functions are developed using experimental data such as heats of formation, the aim being that the functions are optimised (often manually) until the resulting calculations can reproduce a series of experimental molecular properties. Such approximations obviously reduce the accuracy of

the AM1 method (and semi empirical methods in general), which is considered as the major limitation. Semi-empirical methods generally perform well for calculations upon molecular systems for which the basis functions were optimised (for example, heats of formations are frequently well reproduced). However (and as might be expected) calculations into systems for which no experimental data existed (or was used) in the parameterisation procedure often perform poorly. The significant advantage of the computational efficiency resulting from the various approximations in the AM1 methodology is that it allows for a high number of chemicals to be investigated in a reasonable timeframe, and for calculations upon large molecular systems³¹.

2. Experimental

2.1. Spatial and electronic properties

A low conformation of the studied compounds (Figure 1) was attained with Spartan³². Energy minimization with the semi empirical AM1 method was applied for every compound, followed by Monte Carlo conformational analysis, using force field MMFF94, in order to calculate the lowest energy conformation. The lowest energy conformations of the molecules were subject to ab initio calculations with the restricted Hartree-Fock (RHF) level of theory using the 3-21G(*) basic set.

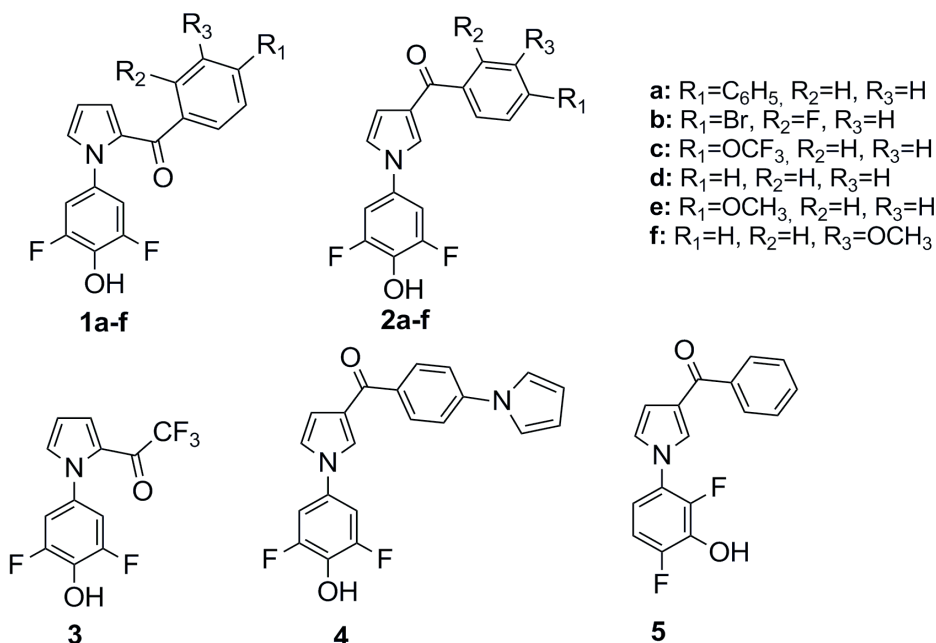


Figure 1: Compounds used in the computational study.

Table 1: Biological data and the most important descriptors of the compounds for the computational study.

Compound	IC ₅₀ ^{ALR2} (μM)	pIC ₅₀ ^{ALR2a}	IC ₅₀ ^{ALR1} (μM)	SI ^b	D1 ^c (Å)	D2 ^d (Å)	A ^e (deg)	E _{HOMO} ^f (eV)	S+logP ^g
1a	0.51	6.292	121	238	7.2941	5.0537	65.4	-0.317998	5.567
2a	2.31	5.638	4.32	1.87	9.1951	9.2995	53.2	-0.316763	5.672
1b	0.19	6.721	0.19	1	6.7872	5.9089	71.2	-0.319653	4.468
2b	0.40	6.398	5.64	14.1	6.7905	7.0726	57.4	-0.324797	4.815
1c	0.52	6.238	16.2	31.2	7.2874	4.8465	65.6	-0.325463	3.956
2c	0.75	6.125	13.1	17.5	9.1959	7.0691	52.9	-0.328033	4.166
3	0.93	6.032	18.9	20.3	5.9968	4.5925	0.0 ⁱ	-0.331283	3.091
1d	1.06	5.975	4.56	4.3	7.2924	4.8463	65.5	-0.320497	3.652
2d	0.40	6.398	13.4	33.5	9.1950	7.0663	53.4	-0.323498	3.829
1e	0.39	6.409	27.8	71.3	6.1373	5.8735	63.0	-0.317559	3.773
2e	2.49	5.604	9.96	4	9.1952	7.0686	52.7	-0.319807	3.981
1f	1.18	5.928	23.5	19.9	7.3141	4.8222	63.7	-0.318547	3.600
2f	9.93	5.003	51.6	5.2	9.1922	7.0678	52.3	-0.318244	3.792
4	5.90	5.230	- ^h	- ^h	9.1960	8.9532	53.1	-0.304102	4.099
5	1.26	5.900	1.61	1.28	9.0381	6.2917	52.9	-0.319083	3.765

^a pIC₅₀^{ALR2} = -logIC₅₀^{ALR2}

^b SI(Selectivity Index) = IC₅₀^{ALR1}/IC₅₀^{ALR2}

^c D1: the distance between the carbonyl oxygen and the phenolic oxygen

^d D2: the distance between the aromatic centre of the molecule and the phenolic oxygen

^e A: the angle between the pyrrole ring and the aroyl substituent

^f E_{HOMO}: the energy of HOMO

^g S+logP: expression of lipophilicity, where logP is calculated through a non-linear model, by neural networks, where the atomic contributions of Moriguchi are used

^h : not determined

ⁱ : no aroyl substituent present

2.2. Calculation of physicochemical properties and statistical analysis

The calculation of lipophilicity according to Hansch and Leo was conducted with the ClogP program³³. The calculation of S+logP, S+logD & MlogP, as alternative lipophilicity descriptors, and TPSA (Topological Polar Surface Area) was conducted with MedChem Designer³⁴. The calculation of pK_a was conducted by ACD/ChemSketch³⁵. In Table

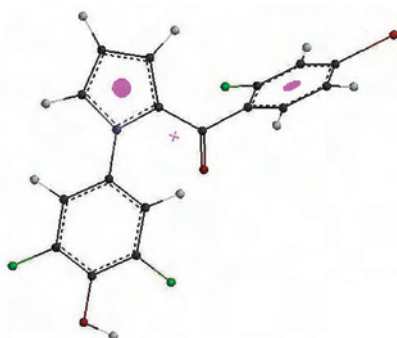


Figure 2: The lowest energy conformation of 1b. The pink cross stands for the centre of the total aromatic area of the molecule. The pink disks stand for the planes of the aromatic rings.

1, only the descriptors utilized in the final models are included. Finally, with the software package Statistica-Axa³⁶ we explored equations, describing correlations of pIC₅₀^{ALR2} or SI with the calculated molecular descriptors

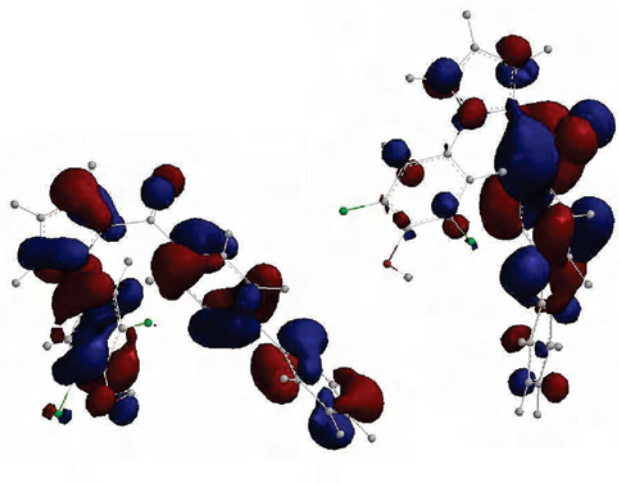


Figure 3: HOMO (left) and LUMO (right) energy maps of compound 1a.

3. Results and Discussion

Compounds **1a-c**, **2a-c** & **3**²², **1d-f**, **2d-f** & **5**⁴ as well as **4**³⁷ (Figure 1) were previously synthesized in our laboratory and their biological profile has been evaluated *in vitro*, regarding their inhibitory activity on enzymes ALR2 and ALR1. In this study, we present quantitative correlations of pIC_{50}^{ALR2} and selectivity index (SI, $IC_{50}^{ALR1}/IC_{50}^{ALR2}$) with a number of calculated molecular descriptors, for these compounds. These descriptors include lipophilicity, spatial disposition of key moieties and quantum chemical properties.

The biological data of the compounds, as well as the most important calculated molecular descriptors, are shown in Table 1. An example (compound **1b**) of a low energy conformation is shown in Figure 2, along with a visualization of point and spatial disposition. In Figure 3, the HOMO and the LUMO energy maps for compound **1a** are depicted.

After the statistical correlation of the calculated molecular descriptors with pIC_{50}^{ALR2} and SI, we ended up to two plausible equations, one regarding pIC_{50}^{ALR2} (equ. 6) and one SI (equ. 7):

$$pIC_{50}^{ALR2} = -0.18(\pm 0.07)D1 + 0.014(\pm 0.006)A - 39.03(\pm 15.76)E_{HOMO} - 5.84(\pm 5.39)n = 15, r^2 = 0.647, s = 0.313, MAE = 0.200 \quad (6)$$

$$SI = -33.06(\pm 10.42)D2 + 67.00(\pm 18.74)\log P - 39.94(\pm 73.41)n = 14, r^2 = 0.583, s = 43.467, MAE = 32.519 \quad (7)$$

According to the equation (6), the distance between the carbonyl and the phenolic oxygen affects negatively the biological activity of the compounds, while an angular disposition of the pyrrolyl and the aroyl ring has a positive effect on inhibitory activity. Thus, we could state that an overall folded spatial conformation favors ligand-enzyme interaction.

A simple linear regression between ARI activity and LUMO has been previously described in a series of chromenone ARIs, which was explained on the basis of a charge transfer interaction³⁸. Another QSAR study in a series of benzimidazole derivatives pointed out that the biological activity is negatively affected by logP, steric energy and LUMO³⁹. Implication of LUMO is also noticed in a series of pyrrol-1-yl-acetic acid derivatives⁴⁰, where it was showed a negative contribution of LUMO. In the present series of difluorophenol ARIs, the negative sign on the HOMO energy coefficient in the equation (1) points out to the importance of the role of an ionic or/and hydrogen bond formation during the ligand-enzyme interaction. It should be noted that an anion binding pocket has

been identified in the active site of ALR2⁴¹. Regarding lipophilicity, we didn't come up to a quantitative relation between any logP descriptor and biological activity; however it seems that it may be implicated in molecules' selectivity (as we will discuss below).

According to equation (7), the selectivity index is affected in a negative way by the distance between the centre of the total aromatic area of the molecules and their phenolic oxygen, which shows that an extended molecular conformation does not favor selectivity. On the contrary, molecules, in order to be selective, should be more compact. In addition, lipophilicity, expressed as S+logP, positively affects selectivity, which implies that molecular obesity may not favor ligand promiscuity in this series of ARIs, and non specific entropy- driven binding seems to be more critical for ALR2.

From the above findings, regarding that a folded/compact structure favors both high ARI activity and selectivity, we can propose [1,1'-biphenyl]-2-yl(1-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-2-yl)methanone as a potential active and selective ARI, but this matter, of course, needs further investigation.

4. Conclusions

Summarizing, in the present work, after finding the lowest energy conformations for a series of 15 aldose reductase inhibitors, analogues of 2,6-difluoro-4-pyrrol-1-yl-phenol and calculating various electronic and spatial parameters, we ended up in two meaningful equations, 6 and 7, describing structure-activity relations.

According to these equations, it was shown that ARI activity is favoured i) by a non-extended molecular conformation, ii) by the presence of a dihedral angle between the pyrrolyl ring and the aroyl substituent, and iii) by a low HOMO energy. Regarding the selectivity index, it was recognised that a folded molecular conformation and a high lipophilicity, have a positive effect on its expression.

The different effect on selectivity observed with the C- α substitution of biphenylcarbonyl *versus* bromofluorobenzoyl could be the result of a combination of physicochemical properties and spatial disposition. For example, **1a** is more lipophilic than **1b** (S+logP: 5.6 and 4.5 respectively) and adapts a more folded conformation (e.g. the intramolecular distance in the lowest energy conformation, from Monte Carlo simulation, between the phenolic oxygen and the centre of the total aromatic area in **1a** is 5.1 Å while in **1b** is 5.9 Å). However, this needs further investigation by preparing/testing an appropriately targeted series of compounds.

Σχέσεις Δομής-Δραστηκότητας-Εκλεκτικότητας στο Δομικό Υπόβαθρο της Κετο-Πυρρολυλο-Διφθοροφαινόλης, Αναστολέων της Αναγωγάσης της Αλδόζης

Ελένη Κοτσαμπασάκου και Βασίλης Ι. Δημόπουλος

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124, Ελλάδα

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί παγκοσμίως μια αλματώδης αύξηση στα κρούσματα σακχαρώδους διαβήτη, που τείνει πλέον να αποκτήσει επιδημικό χαρακτήρα. Η αναγωγή της αλδόζης (ALR2, AR, AKR1B1, EC 1.1.1.21) ανήκει στην ενζυμική υπεροικογένεια των αλδοκετοαναγωγασών. Είναι το πρώτο ένζυμο της μεταβολικής οδού των πολυολών, το οποίο μετατρέπει την γλυκόζη σε σορβιτόλη. Φυσιολογικά, έχει αποτοξινωτικό και ρυθμιστικό ρόλο στον οργανισμό, ωστόσο, σε περιπτώσεις διαβήτη και/ή υπεργλυκαιμίας, η γλυκόζη μετατρέπεται ραγδαία σε σορβιτόλη, η οποία συσσωρεύεται στα κύτταρα προκαλώντας ιστικές και κυτταρικές βλάβες. Γι' αυτό το λόγο η αναγωγή της αλδόζης θεωρείται υπεύθυνη των διαβητικών επιπλοκών, όπως νεφροπάθειας, ρετινοπάθειας και καταρράκτη. Η αναγωγή των αλδεϋδών (ALR1, AKR1A1, EC 1.1.1.2) ανήκει επίσης στην υπεροικογένεια των αλδοκετοαναγωγασών. Ο κύριος ρόλος της ALR1 είναι επίσης να αποτοξινώνει τον οργανισμό από τοξικές αλδεϋδες. Τα δύο αυτά ένζυμα παρουσιάζουν

65% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, καθώς και δομική ομολογία. Συνεπώς, ταυτόχρονη αναστολή των δύο ενζύμων θα μπορούσε να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω περιορισμένης αποτοξίνωσης του οργανισμού.

Οι δεκαπέντε ενώσεις αυτής της μελέτης (Figure 1) έχουν προηγουμένως συντεθεί στο εργαστήριό μας και η ανασταλτική τους δράση έναντι της ALR2 και της ALR1 έχει εξεταστεί *in vitro*. Προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε στατιστικά τόσο την pIC_{50}^{ALR2} όσο και το δείκτη εκλεκτικότητας (selectivity index, $SI = IC_{50}^{ALR1} / IC_{50}^{ALR2}$) με διάφορες υπολογισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων, όπως λιποφιλία, pK_a , μοριακή διαθλασιμότητα (MR), TPSA, ατομικές και ηλεκτρονικές χωρικές παραμέτρους, καθώς και οι ενέργειες των HOMO και LUMO.

Από την καλύτερή μας εξίσωση, διαπιστώσαμε πως η pIC_{50}^{ALR2} εξαρτάται από την απόσταση ανάμεσα στο καρβονυλικό οξυγόνο και το φαινολικό οξυγόνο (D_1), την ενέργεια του HOMO (E_{HOMO}) και τη διεδρη γωνία ανάμεσα στον πυρρολικό δακτύλιο και τον αροϋλο-υποκαταστάτη (A):

$$pIC_{50}^{ALR2} = -0.18(\pm 0.07)D_1 + 0.014(\pm 0.006)A - 39.03(\pm 15.76)E_{HOMO} - 5.84(\pm 5.39)$$
$$n=15, r^2=0.647, s=0.313, MAE=0.200$$

Επίσης, διαπιστώσαμε ότι ο δείκτης εκλεκτικότητας (SI) εξαρτάται από την απόσταση ανάμεσα στο συνολικό αρωματικό κέντρο του μορίου και το φαινολικό οξυγόνο (D_2) σε συνάρτηση με τη λιποφιλία (υπολογισμένη ως $S + \log P$):

$$SI = -33.06(\pm 10.42)D_2 + 67.00(\pm 18.74)\log P - 39.94(\pm 73.41)$$
$$n=14, r^2=0.583, s=43.467, MAE=32.519$$

Acknowledgements

Many thanks to Professor Anna Tsantili-Kakoulidou, School of Pharmacy, University of Athens, for the permission to use the programs ClogP and Statistica.

References

1. Tang W.H., Martin K.A., Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front. Pharmacol.* 3, Article 87, 2012.
2. Lam D.W., LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19, 93, 2012.
3. Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J. K., Farzadfar

- F., Khang Y.H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A., Ezzati M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31, 2011.
4. Chatzopoulou M., Mamadou E., Juskova M., Koukoulitsa C., Nicolaou I., Stefek M., Demopoulos V.J. Structure-activity relations on [1-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl]phenylmethanone. The effect of methoxy substitution on aldose reductase inhibitory activity and selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 1426, 2011.

5. Alexiou P., Pegklidou K., Chatzopoulou M., Nicolaou I., Demopoulos V.J. Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century. *Curr. Med. Chem.* 16, 734, 2009.
6. El-Kabbani O., Carbone V., Darmanin C., Oka M., Mitschler A., Podjarny A., Schulze-Briese C., Chung R.P.T. Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor Fidarestat: Implications for inhibitor binding and selectivity. *J. Med. Chem.* 48, 5536, 2005.
7. Barski O.A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553, 2008.
8. Alexiou P., Demopoulos V.J. A diverse series of substituted benzenesulfonamides as aldose reductase inhibitors with antioxidant activity: Design, synthesis, and in vitro activity. *J. Med. Chem.* 53, 7756, 2010.
9. Minehira D., Takeda D., Urata H., Kato A., Adachi I., Wang X., Matsuya Y., Sugimoto K., Takemura M., Endo S., Matsunaga T., Hara A., Koseki J., Narukawa K., Hirono S., Toyooka N. Design, synthesis, and biological evaluation of novel (1-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-9-yl)acetic acids as selective inhibitors for AKR1B1. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 356, 2012.
10. Darmanin C., Chevreux G., Potier N., Van D. A., Hazemann I., Podjarny A., El-Kabbani O. Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modeling and noncovalent mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 3797, 2004.
11. Rapposelli S., Da Settimo F., Digiacomo M., La Motta C., Lapucci A., Sartini S., Vanni M. Synthesis and biological evaluation of 2'-Oxo-2,3-dihydro-3'H-spiro[chromene-4,5'-[1,3]oxazolidin]-3'yl]acetic acid derivatives as aldose reductase inhibitors. *Arch. Pharm.* 344, 372, 2011.
12. Ola M.S., Nawaz M.I., Siddiquei M.M., Al-Amro S., Abu El-Asrar A.M. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *J. Diabetes Complicat.* 26, 56, 2012.
13. El-Kabbani O., Ruiz F., Darmanin C., Chung R.P. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 750, 2004.
14. Pandey S., Srivastava S. K., Ramana K.V. A potential therapeutic role for aldose reductase inhibitors in the treatment of endotoxin-related inflammatory diseases. *Exp. Opin. Investigat. Drug* 21, 329, 2012.
15. Laffin B., Petrash M. Expression of the ald0-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Front. Pharmacol.* 3, Article 104, 2012.
16. Chatzopoulou M., Alexiou P., Kotsampasakou E., Demopoulos V.J. Novel aldose reductase inhibitors: A patent survey (2006 present). *Expert Opin. Ther. Pat.* 22, 1303, 2012.
17. Carbone V., Giglio M., Chung R., Huyton T., Adams J., Maccari R., Ottana R., Hara A., El-Kabbani O. Structure of aldehyde reductase in ternary complex with a 5-arylidene-2,4-thiazolidinedione aldose reductase inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 1140, 2010.
18. Barski O.A., Gabbay K.H., Bohren K.M. Characterization of the human aldehyde reductase gene and promoter. *Genomics* 60, 188, 1999.
19. El-Kabbani O., Sthanam L., Narayana V.L., Moore K.M., Green N.C., Flynn T.G., Delucas L.J. Crystallization and preliminary structure determination of porcine aldehyde reductase from two crystal forms. *Acta Crystallogr. D* 49, 490, 1993.
20. El-Kabbani O., Ramsland P., Darmanin C., Chung R.P.T., Podjarny A. Structure of human aldose reductase holoenzyme in complex with Statil: An approach to structure-based inhibitor design of the enzyme. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50, 230, 2003.
21. Maccari R., Ciurleo R., Giglio M., Cappiello M., Moschini R., Del Corso A., Mura U., Ottana R. Identification of new non-carboxylic acid containing inhibitors of aldose reductase. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 4049, 2010.
22. Kotsampasakou E., Demopoulos V.J. Synthesis of derivatives of the keto-pyrrolyl-difluorophenol scaffold: Some structural aspects for aldose reductase inhibitory activity and selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 869, 2013.
23. Cronin M.T.D. (2010) Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs)-Applications and Methodology, In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and Applications*, Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D. Eds., Springer, p. 3-5.
24. Ivanciuc O. (2001) 3D QSAR Models, In: *QSPR/QSAR Studies by Molecular Descriptors*, Diudea M. V. Ed., Nova Science, Huntington, N.Y., pp. 233-280.
25. Cramer R. D. III, Patterson D. E.; Bunce J. D.

- Comparative molecular field analysis (CoMFA).
1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5959-67, 1988.
26. Klebe G. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis: CoMSIA. *Perspect. Drug Discov. Des.* 12, 87-104, 1998.
 27. Sperandio O., Souaille M., Delfaud F., Miteva M.A., Villoutreix B.O. MED-3DMC: A new tool to generate 3D conformation ensembles of small molecules with a Monte Carlo sampling of the conformational space. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 1405, 2009.
 28. Enoch S.J. (2010) The Use of Quantum Mechanics Derived Descriptors in Computational Toxicology, In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and Applications*, Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D. Eds., Springer, pp. 16-17.
 29. Goodman M.J. (1998) *Chemical Applications of Molecular Modelling*, The Royal Society of Chemistry, pp. 133-136.
 30. Enoch S.J. (2010) The Use of Quantum Mechanics Derived Descriptors in Computational Toxicology, In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and Applications*, Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D. Eds., Springer, pp. 17-18.
 31. Enoch, S.J. (2010) The Use of Quantum Mechanics Derived Descriptors in Computational Toxicology, In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and Applications*, Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D. Eds., Springer, pp. 18-19.
 32. Spartan SGI v. 5.1.3 Open GL, Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612.
 33. ClogP v.4.0 Biobyte Corp. 201 West 4th St. Suite 204 Claremont, CA 91711.
 34. MedChem Designer™ Version 1.0.1.15, Copyright © 2011 Simulations Plus, Inc. [www.simulations-plus.com].
 35. ACD/ChemSketch Version 3.00, Copyright © 1994-1998 Advanced Chemistry Development Inc., 133 Richmond St. West, Suite 605, Toronto, ON M5H 2L3, Canada, [www.acdlabs.com].
 36. Statistica-Axa 7.0 software package, StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA.
 37. Mamadou E. Design-Synthesis of derivatives of 3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl-pyrrolylmethanone. Putative usefulness in the treatment of the long term diabetes' chronic complications. *Master Thesis*, Aristotle University of Thessaloniki, October 2005.
 38. Kador P.F.; Sharpless N.E. Structure-activity studies of aldose reductase inhibitors containing the 4-oxo-4H-chromen ring system. *Biophysical Chemistry* 8, 81, 1978.
 39. Singour P.K., Kohli D.V. Quantitative structure activity relationship analysis of benzimidazole derivatives as aldose reductase inhibitors. *International Journal of Drug Design and Discovery* 2, 425, 2011.
 40. Tsantili-Kakoulidou A., Nicolaou I., Vrakas D., Demopoulos V.J. Modeling of aldose reductase inhibitory activity of pyrrol-1-yl-acetic acid derivatives by means of multivariate statistics. *Med. Chem.* 1, 321, 2005.
 41. Miyamoto S. Molecular modeling and structure-based drug discovery: Studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-Bio Informatics J.* 2, 74, 2002.

May 19-23, 2013 Camerino, Italy

31st Camerino-Cyprus-Noordwijkerhout Symposium

<http://www.unicam.it/farmacia/symposium/index.html>

Organized by:

School of Pharmacy-University of Camerino Divisione di Chimica Farmaceutica Società Chimica Italiana

Contact persons:

Prof. Mario Giannella:

Tel: +39 0737 402 237 - Fax: +39 0737 637 345

Email: secretariat.camerino@unicam.it

Prof. Dr H. Timmerman

Tel: +31 71 576 27 91 - Fax: +31 71 364 65 56

Email: henktim@planet.nl

* * *

Μάιος 31- Ιούνιος 3

16ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο Το φάρμακο Ιαμα στην Κρίση

Τεχνόπολις Δήμου Αθηναίων

Κτίριο “Δεξαμενές καθαρισμού” Πειραώς 100 Γκάζι
Διοργανωτής : Πανελληνια Ένωση Φαρμακοποιών
Γραμματεία Οργάνωσης: One to One A.E.
e-mail: one2one-congress.gr

* * *

June 12-15, 2013, Athens, Greece

MEDICTA 2013, 11th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis

<http://www.hsta.gr/medicta2013/>

organized by: Hellenic Society of Thermal Analysis

Contact person: Vicky Delidimitriou

tel: (+30) 210 2715032 - fax: (+30) 210 27114437

Email: vicky@kprovoli.gr

* * *

June 23-26, 2013 San Francisco, US

Frontiers in Medicinal Chemistry

<http://wizard.musc.edu/frontiers2013.html>

Co-organised by the European Federation for Medicinal Chemistry and the Division of Medicinal Chemistry of ACS.

Organizing Committee:

Jeff Zablocki, Ph.D. (USA)

Patrick M. Woster, Ph.D. (USA)

Koen Augustyns, Ph.D. (Belgium)

Anders Karlen (Sweden)

Ulrich Stilz (Germany)

June 30 - July 3, 2013 Bologna, Italy

24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2013)

<http://www.pba2013.org>

Contact person:

Carlo Bertucci (Chairman)

Tel: +39 051 209 97 31

Fax: +39 051 209 97 34

Email: carlo.bertucci@unibo.it

Organized by:

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie,
Università di Bologna

Organised by:

Division of Medicinal Chemistry of the Italian
Chemical Society (Società Chimica Italiana) (Italy)

* * *

June 30 - July 4, 2013 Lublin, Poland

VIIIth Joint Meeting on Medicinal Chemistry

Organized by:

The Polish Society of Medicinal Chemistry
and Prof. Dariusz Matosiuk Chairman of the
Organizing Committee

Contact person:

Prof. Dariusz Matosiuk

Tel: +48 81 535 73 55

Fax: +48 81 535 73 55

Email: darek.matosiuk@am.lublin.pl

Organised by:

Polish Society of Medicinal Chemistry (Poland)

* * *

September 26-28 2013, Athens, Greece

5th BBBB International Conference

www.bbbb-eufeps.org

Organized by:

EUFEPS, Hellenic Society of Medicinal
Chemistry, Hellenic Pharmaceutical Society

Contact person:

Prof. Panos Macheras,

Tel: +30 210 7274026

Fax: +30 210 7274027

e-mail: macheras@pharm.uoa.gr

Νέα από το Διαδίκτυο Εφαρμογή Open PHACTS



Δόθηκε στη δημοσιότητα και είναι ελεύθερη στο διαδίκτυο δοκιμαστικά η εφαρμογή **Open PHACTS Explorer**. Η διαδικτυακή αυτή εφαρμογή δημιουργήθηκε στα πλαίσια της πρωτοβουλίας IMI (Innovative Medicines Initiative) ως αποτέλεσμα του τριετούς προγράμματος με πλήρη τίτλο ‘**An open, integrated and sustainable chemistry, biology and pharmacology knowledge resource for drug discovery**’, Το πρόγραμμα αυτό στοχεύει στη δημιουργία πλατφόρμας υποβοήθησης για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων- **Open PHACTS discovery platform**. Η διαδικτυακή εφαρμογή **Open PHACTS Explorer** επιτρέπει τη συνδυασμένη αναζήτηση φαρμακολογικών και χημικών /φυσικοχημικών δεδομένων από 9 βάσεις δεδομένων συμπεριλαμβανομένων των ChEBI, ChEMBL, ACD Labs/ChemSpider, DrugBank, Enzyme, SwissProt και GeneOntology, μειώνοντας τους φραγμούς στην πληροφορία και γεφυρώνοντας τις προσπάθειες της φαρμακευτικής βιομηχανίας και του ακαδημαϊκού χώρου στην ανακάλυψη νέων καινοτόμων φαρμάκων. Στο πρόγραμμα συμμετέχουν 28 εταίροι από την βιομηχανία, τον ακαδημαϊκό χώρο, μικρομεσαίες επιχειρήσεις και επιστημονικές εταιρείες.

Λεπτομερείς πληροφορίες για τη διαδικτυακή εφαρμογή και το πρόγραμμα **Open PHACTS** υπάρχουν στην ιστοσελίδα **www.openphacts.org/explorer**

Συνιστάται η εγγραφή του χρήστη πριν τη χρησιμοποίηση της διαδικτυακής εφαρμογής για πρώτη φορά.

5th

BBBB International Conference

From Drug Discovery and Formulation Strategies

(design-synthesis and preclinical testing, delivery systems, nanotechnology, biopharmaceuticals, biosimilars, generics-bioequivalence)

To Pharmacokinetics-Pharmacodynamics

(metabolism, transporters, pharmacogenomics, biomarkers, drug therapy, individualized therapy, biotherapeutics, PK/PD modeling)

2
congresses
in 1

▶ **26-28 September 2013**
Athens-Greece

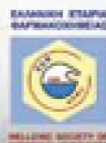
▶ **Metropolitan Hotel**



**NATIONAL AND KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS**



**Hellenic
Pharmaceutical Society
H.P.S.**



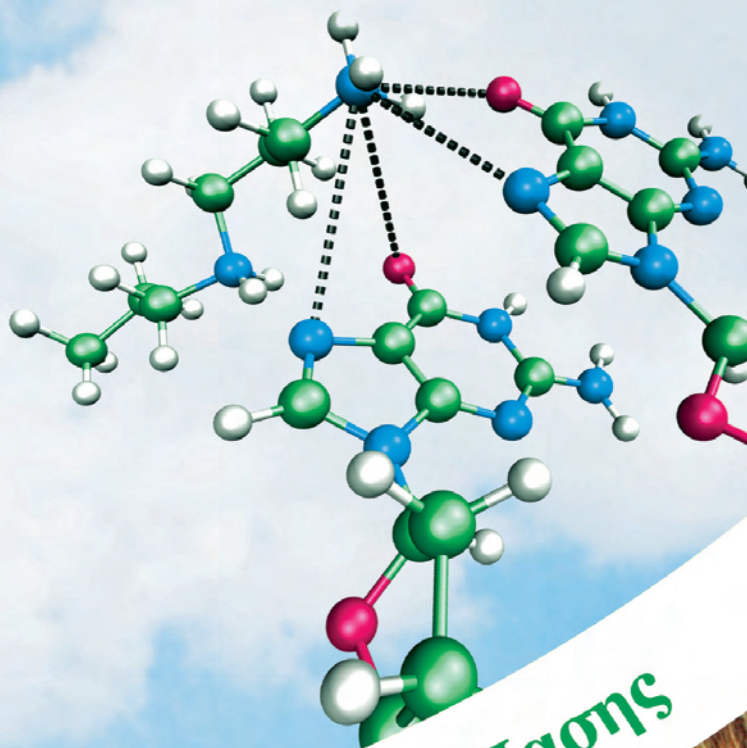
Congress website:
www.bbbb-eufeps.org



1st Announcement



Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ίασης



 **Galenica α.ε.**

ΑΘΗΝΑ: Ελευθερίας 4, 145 64 Κηφισιά • Τηλ.: 210 5281700, Fax: 210 5245939 • ΘΕΣΣ/ΚΗ: Κουντουριώτου & Φασιανού 2 • Τηλ.: 2310 542685 • <http://www.galenica.gr>



30 years of excellence, inspiration, efficiency
Congresses & Events / Travels / Associations



ISO 9001
ISO 14001

We inspire results

1st klm Peanias-Markopoulou Avenue, 19002, Peania, T: +30 211 1001 777, F: +30 210 6642 116

info@zita-congress.gr, www.zita-congress.gr