



ISSN 2241-3081

# ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

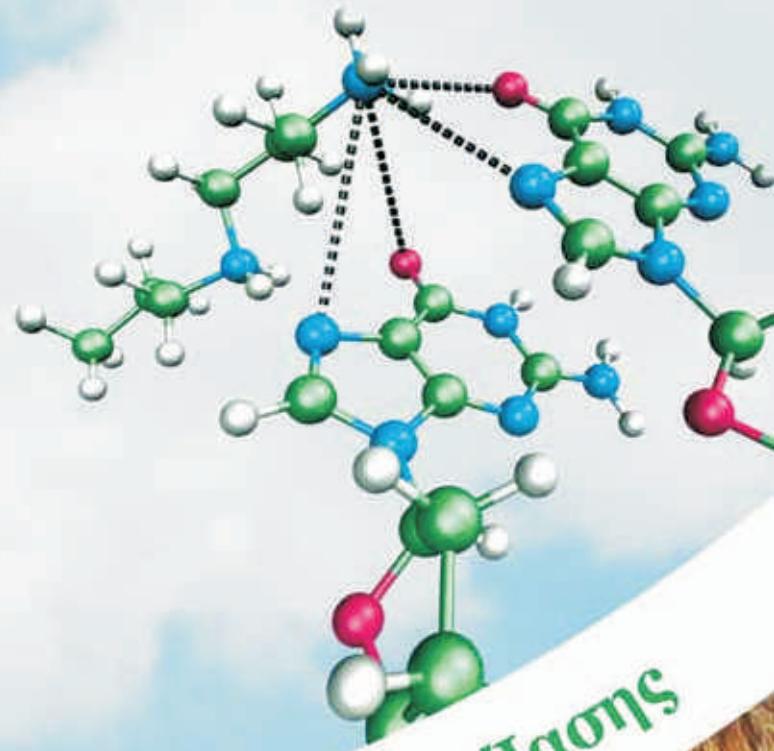
ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES TOPICS

ΤΟΜΟΣ 26 | ΤΕΥΧΟΣ II  
VOLUME 26 | VOLUME II

ΑΠΡΙΛΙΟΣ - ΙΟΥΝΙΟΣ 2014  
APRIL - JUNE 2014



# Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ιασίσ



 Galenica A.C.

ΑΘΗΝΑ: Ελευθερίου 4, 145 64 Κηφισία • Τηλ.: 210 5281700, Fax: 210 5245939 • ΘΕΣ/ΚΗ: Κολυτούριώτου & Φωστανό 2 • Τηλ.: 2310 542685 • <http://www.galenica.gr>

## **ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ**

Τριμηνιαία έκδοση με θέματα

Φαρμακευτικών Επιστημών

Τόμος 26, Τεύχος ΙΙ, Απρίλιος - Ιούνιος 2014

### **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

**B. Δημόπουλος,**

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**N. Κόλμαν, Galenica SA**

**X. Κοντογιώργης,**

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Π. Κουρουνάκης,**

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Π. Μαχαίρας,**

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Σ. Νικολαρόπουλος,**

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστήμιο Πατρών

**Γ. Πάρας,**

Επίκ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**E. 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](http://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 26, Issue I, January - March 2014

### **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](http://www.hsmc.gr)

**Articles published  
in "Pharmakeftiki" are indexed  
in Chemical Abstracts, EMBASE and Scopus.**

**ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ**

Μεθοτρεξάτη, ένας αντιμεταβολίτης του φυλλικού οξέος, 65 χρόνια μετά...

Παναγιώτης Κουφοπαντελής, Ειρήνη Παντερή.....45-56

**ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ**

Η συμμαχία Νανοτεχνολογίας, Βιοεπιστημών και Ρυθμιστικών Οργανισμών με στόχο τα καινοτόμα φάρμακα. Η συμβολή της Ελλάδας

Κώστας Δεμέτζος, Νατάσσα Πίππα.....57-65

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Εφαρμογή των κριτηρίων ταυτοποίησης με συνδυασμό HPLC-UV/Vis και LC/MS. Προσδιορισμός της ρισπεριδόνης και του μεταβολίτη αυτής σε πλάσμα

Χρηστόφορος Λαμπρινέας, Ελευθέριος Βαρβεράκης, Κωνσταντίνος Πίστος, Ιωάννης Ντότσικας, Ευάγγελος Γκίκας, Ιωάννης Παπούτσης, Χαρά Σπηλιοπούλου, Σωτήρης Αθανασέλης.....66-76

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ.....77

ΝΕΑ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ.....78-81

**REVIEW ARTICLE**

Methotrexate, an antimetabolite of folic acid, a brief throwback

Panagiotis Koufopantelis, Irene Panderi .....45-56

**REVIEW ARTICLE**

The alliance between nanotechnology, biosciences and regulatory agencies promotes innovative medicines.

The signaling pathways from Greece

Costas Demetzos and Natassa Pippa .....57-65

**RESEARCH ARTICLE**

Overcoming insufficient fragmentation in single quadruple MS by combining HPLC-UV/Vis with LC/MS: The case of risperidone in terms of the identification point system

Christoforos Labrineas, Eleftherios Varverakis, Constantinos Pistos, Ioannis Dotsikas, Evangelos Gikas, Ioannis Papoutsis, Chara Spiliopoulou, Sotiris Athanaselis.....66-76

MEETINGS.....77

NEWS & DEVELOPMENTS.....78-81

Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοχημείας  
ZITA MEDICAL MANAGEMENT  
1ο χλμ Παταινίας - Μαρκοπούλου  
19002, Παταινία, Ελλάδα  
Τηλ: +30 211 100 1764  
E-mail: f.karaoulani@zita-management.com

Hellenic Society of Medicinal Chemistry Management Office  
ZITA MEDICAL MANAGEMENT  
1st klm Peanias-Markopoulou  
19002, Peania, Greece  
Tel: +30 211 100 1764  
Email: f.karaoulani@zita-management.com

# Μεθοτρεξάτη, ένας αντιμεταβολίτης του φυλλικού οξέος, 65 χρόνια μετά...

Παναγιώτης Κουφοπαντελής, Ειρήνη Παντερή

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής,

Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου 157 71 Αθήνα,

## Περίληψη

Η ιστορία της μεθοτρεξάτης ξεκινά από το 1948 όταν ο Farber και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την αμινοπτερίνη στη θεραπεία της παιδικής λευχαιμίας. Η μεθοτρεξάτη ανήκει στην κατηγορία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που είναι γνωστά ως αντιμεταβολίτες. Παραμένει μέχρι σήμερα ο πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενος ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος με δεδομένη δραστικότητα σε ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών όπως στο χοριοκαρκίνωμα, στη λευχαιμία, στο οστεοσάρκωμα, τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, το λέμφωμα μη-Hodgkin, και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Χρησιμοποιείται επίσης για τη θεραπεία και άλλων καρκίνων αλλά και σε μη-καρκινικές καταστάσεις όπως είναι η ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται μια σύντομη ιστορική αναδρομή στη μεθοτρεξάτη και τους αντιμεταβολίτες, παρουσιάζονται το φυλλινικό οξύ, και αναπτύσσονται η φαρμακολογική δράση, ο μεταβολισμός, οι μηχανισμοί δράσης και τα κυριότερα θεραπευτικά σχήματα της μεθοτρεξάτης.

## 1. Ιστορική αναδρομή

Το 1948 μια ομάδα ερευνητών καθοδηγούμενη από τον Sydney Farber ανακάλυψε ότι ένα χημικό ανάλογο του φυλλικού οξέος, η αμινοπτερίνη, βελτίωνε την κατάσταση ασθενών με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ). Την εποχή εκείνη δεν ήταν ακόμη γνωστός ο μηχανισμός δράσης των αναλόγων του

φυλλικού οξέος. Ωστόσο η σύνθεση αναλόγων του φυλλικού οξέος πυροδοτήθηκε από το γεγονός ότι η χορήγηση φυλλικού οξέος χειροτέρευε τα συμπτώματα ασθενών με λευχαιμία, ενώ δίαιτα πτωχή σε φυλλικό οξύ βελτίωνε τα συμπτώματα της ασθένειας. Η σύνθεση αναλόγων του φυλλικού οξέος οδήγησε στη μεθοτρεξάτη η οποία το 1950 άρχισε να χορηγείται για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Το 1956 δημοσιεύθηκαν οι πρώτες κλινικές μελέτες για τη μεθοτρεξάτη σε ζώα οι οποίες έδειξαν ότι ο θεραπευτικός δείκτης της μεθοτρεξάτης ήταν καλύτερος από αυτόν της αμινοπτερίνης. Την ίδια χρονιά διαπιστώθηκε ότι η μεθοτρεξάτη μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία στερεών όγκων (π.χ. χοριοκαρκίνωμα). Ακολούθησαν μελέτες για τη διερεύνηση της δράσης του φαρμάκου σε άλλες περιπτώσεις καρκίνων, ενώ τη δεκαετία του '70 μελετήθηκε η χορήγηση της μεθοτρεξάτης σε μη-καρκινικές ασθένειες με αποτέλεσμα το 1988 να δοθεί έγκριση από τον FDA για τη χορήγηση της μεθοτρεξάτης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα<sup>1-2</sup>.

## 2. Αντιμεταβολίτες

Οι αντιμεταβολίτες είναι φαρμακευτικές ενώσεις με δομή όμοια με φυσικές ουσίες, οι οποίες απαιτούνται για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Λόγω της δομικής αυτής ομοιότητας πολλοί από τους αντιμεταβολίτες χρησιμεύουν ως υπόστρωμα σημαντικών κυτταρικών ενζύμων. Μετά από μετατροπή τους σε τοξικότερες ουσίες μέσω μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων, πολλοί αντιμεταβολίτες αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση. Κάθε ένζυμο, που εμπλέ-

κεται σε αυτή την διαδικασία αποτελεί δυνητικό στόχο ενός αντιμεταβολίτη, αλλά παράλληλα και δυνητική θέση ανάπτυξης κυτταρικής αντίστασης στον αντίστοιχο αντιμεταβολίτη.

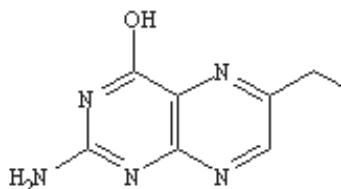
Όλοι οι αντιμεταβολίτες αναστέλλουν την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται είτε με απ' ευθείας αναστολή των ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA ή με ενσωμάτωση του αντιμεταβολίτη ή προϊόντος του στο DNA. Η ικανότητα των αντιμεταβολιτών να εμποδίζουν την σύνθεση του DNA, αφορά στη φάση S του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η δράση ενός αντιμεταβολίτη είναι ανάλογη της έκθεσης των κυττάρων σε αυτόν, εξαρτώμενη κατά συνέπεια από την διάρκεια έγχυσης.

Όγκοι με υψηλό ποσοστό κυττάρων σε φάση S, καθώς και φυσιολογικά κύτταρα με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, όπως τα κύτταρα του πεπτικού σωλήνα και του μυελού των οστών, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην δράση των αντιμεταβολιτών. Στα φυσιολογικά κύτταρα οι αντιμεταβολίτες ασκούν τοξική δράση. Οι αντιμεταβολίτες θεωρούνται γενικά μη μιτογόνα φάρμακα και πολλοί εξ αυτών χρησιμοποιούνται με σχετική ασφάλεια κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους ταξινομούνται σε ανταγωνιστές του. Ονομάστηκε

υψηλό ποσοστό αναιμίας σε σχέση με άλλες γυναίκες στην ίδια κατάσταση και το ίδιο ίσχυε για τα νεογέννητα. Διαπίστωσε ότι η διαφορά αυτή οφειλόταν σε διαφορετικές διατροφικές συνήθειες. Αναιμία δεν παρουσιάζοταν στις περιπτώσεις όπου η διατροφή περιελάμβανε λαχανικά. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η αναιμία κατά την εγκυμοσύνη, όπως και η συχνότητα ανωμαλιών του κεντρικού νευρικού συστήματος των νεογέννων, υποχωρούσαν με χορήγηση υδατικών εκχυλισμάτων λαχανικών (ιδιαίτερα από σπανάκι και φασόλια, τα οποία είναι πλούσια και σε σίδηρο). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στον εντοπισμό της υπεύθυνης ουσίας, η οποία ήταν το φυλλικό ή φολικό οξύ<sup>5</sup>. Η χημική σύνθεση της βιταμίνης αυτής πραγματοποιήθηκε το 1945.

### Δομή Φυλλικού Οξέος

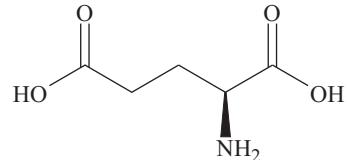
Το φυλλικό οξύ είναι ένωση αποτελούμενη από τρία διακριτά τμήματα: ένα υδροξυ-αμινο-παράγωγο της πτεριδίνης, π-αμινοβενζοϊκό οξύ και L-γλουταμικό οξύ, όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Η χημική ονομασία του φυλλικού οξέος είναι N-[4-[(2-αμινο-4-υδροξυ-6-πτεριδινυλο)μεθυλαμινο]βενζοϊλο]-L(+)-γλουταμικό οξύ. Μια άλλη ονομασία του είναι πτεροϋλογλουταμικό οξύ (PGA). Το πτεροϊκό οξύ είναι το τμήμα του μορίου που περιλαμβάνει το πτεριδινικό



2-Αμινο-4-υδροξυπτεριδιν-6-υλομεθυλο



π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA)



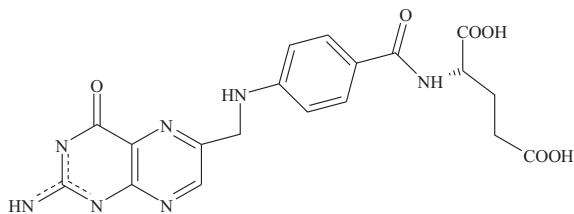
L-γλουταμικό οξύ

### Σχήμα 1. Διακριτά τμήματα του φυλλικού οξέος

έτσι από τον Mitchell, ο οποίος το απομόνωσε το 1941 από τα φύλλα του σπανακιού. Μια παρατήρηση του Wills το 1931 οδήγησε στην αναγνώριση του φυλλικού οξέος (ως παράγοντα ζύμης) σαν μια θρεπτική ουσία, η οποία αποτρέπει την αναιμία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης<sup>4</sup>. Συγκεκριμένα, ο Wills παρατήρησε ότι ορισμένες έγκυες γυναίκες είχαν

παράγωγο και το π-αμινοβενζοϊκό οξύ. Τα παράγωγα αυτά συντίθενται από διάφορα ανώτερα φυτά, όπως και από μικροοργανισμούς<sup>6</sup>. Το φυλλικό οξύ, απαντά σπάνια στα τρόφιμα. Χρησιμοποιείται ωστόσο στα συμπληρώματα διατροφής και στα ενισχυμένα τρόφιμα και είναι.

Τα περισσότερα φυσικά φυλλικά είναι τα πτεροϋλο-



**Σχήμα 2. Χημική δομή Φυλλικού Οξέος**

γλουταμινικά τα οποία περιέχουν ένα έως έξι μόρια L-γλουταμικού οξέος ενωμένα με πεπτιδικό δεσμό με την γ- καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού. Στο σχήμα 2 το τμήμα της πεπτιδίνης παρουσιάζεται στην κετο μορφή, ωστόσο συχνά στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται και στην ταυτομερή ενολική μορφή.

### Λειτουργίες φυλλικού οξέος

Όπως και οι άλλες βιταμίνες του συμπλέγματος B, το φυλλικό οξύ δρα ως συνένζυμο σε μεγάλο αριθμό βιοχημικών αντιδράσεων. Είναι μέρος δύο συν-ενζύμων, τα οποία είναι απαραίτητα στη σύνθεση νέων κυττάρων. Μετά την απορρόφησή του, αλλάζει μορφή με μια σειρά από αναγωγικές αντιδράσεις όπου τελικά σχηματίζονται τουλάχιστον πέντε μορφές συν-ενζύμων, που η βασική τους ένωση είναι το τετραϋδροφυλλικό οξύ. Η πρωταρχική δράση των συν-ενζύμων αυτών είναι η μεταφορά μονάδων με ένα άτομο άνθρακα από τη μία ένωση στην άλλη<sup>7</sup>. Το φυλλικό οξύ είναι συνένζυμο για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη, τη μετατροπή της σερίνης σε γλυκίνη, τη σύνθεση του θυμιδυλικού οξέος (ρυθμιστικό στάδιο της σύνθεσης DNA), το μεταβολισμό της ιστιδίνης και τη σύνθεση των πουρινών<sup>8</sup>.

Τα συνένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για τις ακόλουθες σημαντικές λειτουργίες -αντιδράσεις: Το σχηματισμό των πουρινών και των πυριμιδινών οι οποίες, με τη σειρά τους, απαιτούνται για τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA, τα οποία είναι ζωτικά για τους πυρήνες όλων των κυττάρων του ζώντος οργανισμού. Αυτή η δράση του φυλλικού οξέος εξηγεί το σημαντικό ρόλο του στη διαίρεση των κυττάρων και στην αναπαραγωγή<sup>9</sup>. Το σχηματισμό της αίμης, δηλαδή της πρωτεΐνης, η οποία περιέχει σίδηρο στο μόριο της αιμοσφαιρίνης<sup>10</sup>. Την αλληλομετατροπή του αιμονοξέος σερίνη, η οποία περιέχει τρία άτομα άνθρακα, σε γλυκίνη, δηλαδή αιμονοξέος που περιέχει δύο

άτομα άνθρακα ή το αντίθετο.

Το σχηματισμό του αιμονοξέος τυροσίνη από τη φαινυλαλανίνη, καθώς και του γλουταμικού οξέος από την ιστιδίνη. Το σχηματισμό του αιμονοξέος μεθειονίνη από την ομοκυστεΐνη. Τη σύνθεση της χολίνης από τη μεθανολαμίνη. Τη μετατροπή του νικοτιναμίδου σε N-μεθυλονικοτιναμίδιο, το οποίο είναι ένας από τους μεταβολίτες της νιασίνης και ο οποίος απεκρίνεται με τα ούρα.

### Μεταβολισμός Φυλλικού οξέος

Το τετραϋδροφυλλικό οξύ ( $\text{FH}_4$ ), μεταβολίτης του φυλλικού οξέος, αποτελεί υπόστρωμα σε ορισμένες αντιδράσεις μεταφοράς χημικών ομάδων που περιέχουν ένα άτομο άνθρακα<sup>11-15</sup>. Οι πιο σημαντικές από αυτές τις αντιδράσεις είναι η σύνθεση του δακτυλίου των πουρινών (αδενίνη, γουανίνη) και η μετατροπή της μονοφωσφορικής δεοξυουριδίνης (dUMP) σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTMP). Η τελευταία αντιδραση είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της θυμίνης, άρα και του σχηματισμού του DNA.

Το φυλλικό οξύ, για την απόκτηση της ενζυμικής του δράσης, μετά την απορρόφησή του από το έντερο ανάγεται μέσα στα κύτταρα σε τετραϋδροφυλλικό οξύ ( $\text{FH}_4$ ) σε δύο στάδια. Ανάγεται αρχικά σε διυδροφυλλικό οξύ ( $\text{FH}_2$ ), με το ένζυμο διυδροφυλλική αναγωγάση, και στη συνέχεια σε τετραϋδροφυλλικό οξύ ( $\text{FH}_4$ ), με το ίδιο ένζυμο (DHFR). Η βιταμίνη  $\text{B}_3$ , με τη μορφή του αναχθέντος φωσφορικού νικοτιναμίδο-αδενοσινο-δινουκλεοτίδιου (NADPH) είναι απαραίτητος συμπαράγοντας και για τα δύο βήματα της σύνθεσης. Στη συνέχεια, το τετραϋδροφυλλικό οξύ μετατρέπεται σε μεθυλενο- $\text{FH}_4$  με την προσθήκη της ομάδας μεθυλενίου από έναν από τους τρεις χορηγούς του άνθρακα: φορμαλδεΰδη, σερίνη, ή γλυκίνη. Τέλος, το μεθυλενο- $\text{FH}_4$  μετατρέπεται σε μεθυλο- $\text{FH}_4$  με αναγωγή της ομάδας μεθυλενίου με NADPH. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιταμίνη  $\text{B}_{12}$  είναι ο μόνος απο-δέκτης του μεθυλο- $\text{FH}_4$ . Υπάρχει επίσης μόνο ένας αποδέκτης της μεθυλο- $\text{B}_{12}$ , που είναι η ομοκυστεΐνη με μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης. Αυτό είναι σημαντικό διότι έλλειψη μεθυλοτρανσφεράσης της ομοκυστεΐνης, ή ανεπάρκεια σε  $\text{B}_{12}$  μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία μεθυλίωσης του  $\text{FH}_4$  και την

επακόλουθη ανεπάρκειά του φυλλικού οξέος. Έτσι, ανεπάρκεια σε  $B_{12}$  μπορεί να δημιουργήσει μια μεγάλη συσώρευση μεθυλο-  $FH_4$  που αφού δεν θα μπορεί να συνεχίσει τον κύκλο του φυλλικού οξέος, θα ομοιάζει με ανεπάρκεια φυλλικού οξέος.

Μια άλλη μορφή του  $FH_4$ , το φορμυλο-  $FH_4$  ή φυλλινικό οξύ είναι αποτελέσμα της οξείδωσης του μεθυλενο-  $FH_4$  ή της προσθήκης μιας φορμυλομάδας στο  $FH_4$ . Τέλος, η ιστιδίνη μπορεί να δωρίσει έναν άνθρακα στο  $FH_4$  ώστε να μετατραπεί σε μεθενυλο-  $FH_4$ .

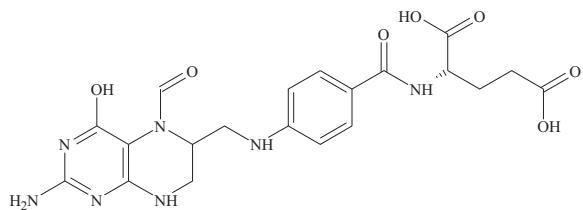
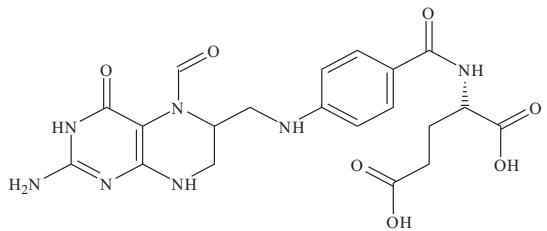
### Βιολογικός ρόλος φυλλικού οξέος

Έχει διαπιστωθεί ότι το φυλλικό οξύ είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα η ανεπαρκής πρόσληψή του κατά τη διάρκεια της σύλληψης και στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης να οδηγεί συχνά σε ανωμαλίες του νευρικού συστήματος. Η ομοκυστεΐνη<sup>16-18</sup>, η οποία είναι υπεύθυνη για το φυλλικό οξύ, μπορεί να επηρεασθεί από τις γενετικές μεταβολές στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. Η μέτρια υπερομοκυστεΐναιμία στις έγκυες γυναίκες έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο γενετικών ανωμαλιών (ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα, NTDs). Ο νευρικός σωλήνας, ο οποίος εμφανίζεται κατά μήκος της ράχης του εμβρύου περίπου την τρίτη εβδομάδα της κύησης (17-30 ημέρες μετά τη σύλληψη), εξελίσσεται αργότερα στον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και τις προστατευτικές μεμβράνες και των δύο. Εάν ο σωλήνας αυτός δεν μπορεί να αναπτυχθεί πλήρως, ενδέχεται να επέλθουν βλάβες στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Η λήψη συμπληρωμάτων πολυνιτιαμινών που περιέχουν φυλλικό οξύ, πριν τη σύλληψη μπορεί να ομαλοποιήσει το μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης και να μειώσει τον κίνδυνο ανωμαλιών<sup>19</sup>. Στην ενήλικη ζωή η ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος παρεμποδίζει την κυτταρική διαίρεση, η παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροποίηση) περιορίζεται και αυτό οδηγεί σε μεγαλοβλαστική αναιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλα ανώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται μάταιες απόπειρες κανονικής αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA, καθώς και κυτταρικής διαίρεσης με αποτέλεσμα την παραγωγή υπερβολικά μεγάλων ερυθρών κυττάρων που ονομάζονται μεγαλοβλάστες (και ουδετερόφιλων με κατατμημένους πυρήνες), οι οποίοι διαθέτουν άφθονο

κυτταρόπλασμα ικανό να συνθέσει RNA και πρωτεΐνες, αλλά με συσσωρευμένη και θραυσματοποιημένη πυρηνική χρωματίνη. Ορισμένα από αυτά τα μεγάλα κύτταρα, αν και ανώριμα (δικτυοερυθροκύτταρα), απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από το μυελό των οστών, νωρίτερα, σε μια προσπάθεια αντιστάθμισης της αναιμίας. Και οι ενήλικες και τα παιδιά λοιπόν, χρειάζονται φυλλικό οξύ για να παράγουν φυσιολογικά ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια για την πρόληψη της μεγαλοβλαστικής αναιμίας. Η ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος δεν προκαλεί αναιμία όταν συνυπάρχει με υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης. Σοβαρής μορφής ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος μπορεί να προκύψει λόγω ελλιπούς διατροφικής πρόσληψης ή μειωμένης απορρόφησής του ή λόγω γενετικών μεταλλάξεων. Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, άνοιας και νόσο Alzheimer<sup>20</sup>. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης  $B_{12}$  προκαλεί επίσης ένα τύπο αναιμίας ίδιο με αυτόν της ανεπάρκειας του φυλλικού οξέος που προκαλεί αμετάκλητη βλάβη στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Επομένως για την πρόληψη της μεγαλοβλαστικής αναιμίας είναι απαραίτητη η επάρκεια τόσο σε βιταμίνη  $B_{12}$  όσο και σε φυλλικό οξύ. Για αυτόν το λόγο τα συμπληρώματα φυλλικού οξέος πρέπει να περιλαμβάνουν και βιταμίνη  $B_{12}$ <sup>21</sup>.

### Φυλλινικό οξύ

Η χημική ονομασία του φυλλινικού οξέος είναι N-[4-[[[2-Αμινο-5-φορμυλο-1,4,5,6,7,8 -εξαϋδρο- 4- οξοπτεριδινυλο] μεθυλο] αμινο] βενζοϋλο]- L- γλουταμικό οξύ<sup>22-25</sup>. Περιέχει τον υδρογονωμένο δακτύλιο του τετραϋδροφυλλικού οξέος και φέρει στο 5 άζωτο μια φορμυλομάδα που δεν εμφανίζει όμως υψηλό δυναμικό μεταφοράς ομάδας. Στο σχήμα 3 φαίνεται η χημική δομή του φυλλινικού οξέος. Το φυλλινικό οξύ (ή φοιλινικό οξύ ή λευκοβορίνη) είναι ένα 5-φορμυλο παραγωγό του τετραϋδροφυλλικού οξέος. Μετατρέπεται εύκολα σε άλλα παράγωγα του φυλλικού οξέος (π.χ.  $FH_4$  ), και συνεπώς έχει βιταμινική δραστηριότητα που ισοδυναμεί με αυτή του φυλλικού οξέος. Ωστόσο, δεν απαιτεί τη δράση του ενζύμου της διϋδροφυλλικής αναγωγάσης για τη μετατροπή του και η λειτουργία του ως βιταμίνη είναι ανεπηρέαστη από την αναστολή του ενζύμου αυτού.



Φυλλικό οξύ

### Σχήμα 3. Χημική δομή φυλλινικού οξέος

Το φυλλινικό οξύ, ως εκ τούτου, επιτρέπει κάποιο ποσοστό σύνθεσης πουρίνης / πυριμιδίνης να λάβει χώρα χωρίς την παρουσία του ενζύμου διϋδροφυλλικής αναγωγάσης, έτσι ώστε η κανονική αντιγραφή του DNA και του RNA καθώς και οι διαδικασίες μεταγραφής να μπορούν να προχωρήσουν.

## 4. Μεθοτρεξάτη

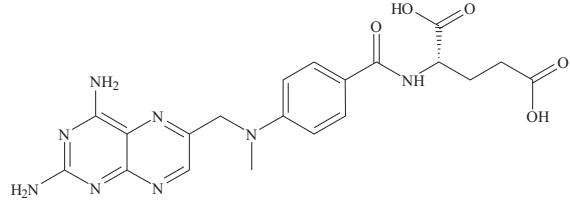
### Χημική δομή - μεταβολισμός

Η μεθοτρεξάτη, N- 4- [(2,4- διαμινο -6-πτεριδινυλο) μεθυλαμινο] βενζοϋλο]- L- γλουταμικό οξύ, είναι παράγωγο του φυλλικού οξέος και ανήκει στην ομάδα των αντιμεταβολιτών οι οποίοι αναστέλλουν την κυτταρική διάρεση. Το μόριο της μεθοτρεξάτης αποτελείται από ένα ετεροκυκλικό μόριο (2,4-διαμινο-υποκατεστημένο πτεριδινικό δακτύλιο) συνδεδεμένο με μια π-αμινοβενζοϋλο- ομάδα, η οποία με τη σειρά της συνδέεται αμιδικώς με γλουταμικό οξύ. Η χημική της δομή καθώς και η αναλογία της σε σχέση με το φυλλικό οξύ φαίνονται στο σχήμα 4 που ακολουθεί.

Όπως προκύπτει, οι κύριες δομικές διαφορές της μεθοτρεξάτης από το φυλλικό οξύ είναι ότι η πρώτη φέρει στο C-2 αμινομάδα αντί του υδροξυλίου και μεθυλού στο N<sup>10</sup>. Λόγω της υψηλής πολικότητάς της, η μεθοτρεξάτη στο ουδέτερο pH των βιολογικών υγρών εμφανίζεται κυρίως στην ανιονική της μορφή).

### Φαρμακολογική δράση

Η φαρμακολογική της χρήση έγκειται στη θεραπεία της παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ) (σχήμα 5), καθώς επίσης και σε έναν αριθμό από άλλες κακοήθεις και καλοήθεις νόσους. Σημαντικά μειονεκτήματα της θεραπείας με μεθοτρεξάτη αποτελούν η μεγάλη μεταβλητότητα της κλινικής εικόνας από ασθενή σε ασθενή και η απρόβλεπτη



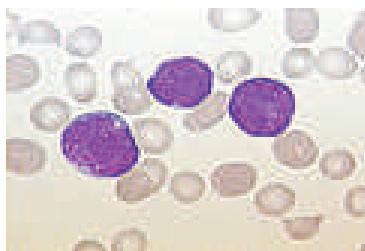
Μεθοτρεξάτη

### Σχήμα 4. Χημική δομή Φυλλικού οξέος και Μεθοτρεξάτης

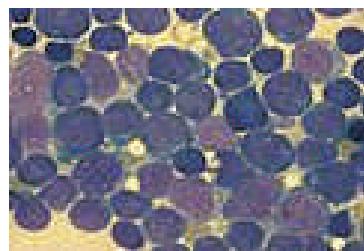
εμφάνιση ενός μεγάλου φάσματος παρενεργειών. Συμπληρώματα φυλλικών με τη μορφή του φυλλικού ή φυλλινικού οξέος, ανακουφίζουν από τη γαστρεντερική και ηπατική τοξικότητα επιτρέποντας σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα να συνεχίζουν την από του στόματος θεραπεία με μεθοτρεξάτη σε χαμηλές δόσεις, αν και πρόσφατη μελέτη συνιστά προσοχή και καταλήγει πως συμπληρώματα φυλλικού οξέος μπορεί να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της μεθοτρεξάτης. Για τη θεραπεία διαφόρων τύπων λευχαιμίας, χορηγείται ενδοφλέβια υψηλή δόση μεθοτρεξάτης ακολουθούμενη από θεραπεία με φυλλινικό οξύ (λευκοβορίνη). Τα επίπεδα του ορού της μεθοτρεξάτης πρέπει να παρακολουθούνται συχνά τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά τη χορήγηση του φυλλινικού οξέος και οι δόσεις και των δύο φαρμάκων πρέπει να προσαρμόζονται ατομικά καθώς μπορεί μεν η μεθοτρεξάτη να είναι βέλτιστης δοσολογίας σε πολλούς ασθενείς, η υπερβολική όμως δόση του φυλλινικού οξέος μπορεί να θέσει σε κίνδυνο το αποτέλεσμα της δράσης της μεθοτρεξάτης και να αυξήσει τον κίνδυνο υποτροπής.

### Μηχανισμός Δράσης

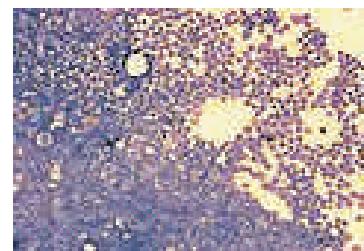
Η κυτταροστατική δράση της μεθοτρεξάτης οφείλεται στην αναστολή της διϋδροφυλλικής αναγωγάσης (DHFR), που είναι υπεύθυνη για το μετασχηματισμό του διϋδροφυλλικού οξέος (FH2), σε τετραϋδροφυλ-



Περιφερικό αίμα παιδιού με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΔ), κηλίδα Pappenheim (μεγέθυνση x100)



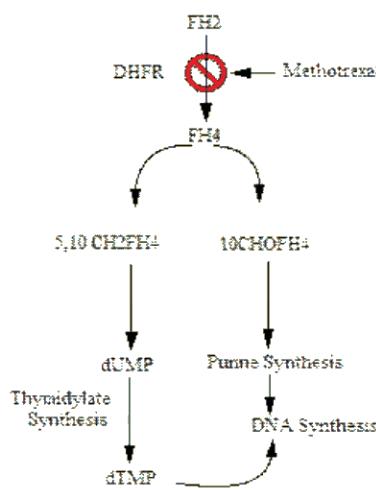
Επίχρισμα μυελού των οστών (μεγάλη μεγέθυνση) από έναν ασθενή με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία



Επίχρισμα μυελού των οστών από έναν ασθενή με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

### Σχήμα 5. Μικροσκοπικές φωτογραφίες περιστατικών οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

λικό οξύ (FH4)<sup>26-28</sup>. Ο μηχανισμός δράσης της μεθοτρεξάτης απεικονίζεται στο σχήμα 6.



### Σχήμα 6. Μηχανισμός δράσης της μεθοτρεξάτης

Η αναστολή της δράσης της DHFR έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της θυμιδυλάτης και των πουρινών και επομένως μείωση της σύνθεσης και της επιδιόρθωσης του DNA, καθώς και μείωση της κυτταρικής διαίρεσης. Η συγγένεια της DHFR με την μεθοτρεξάτη είναι κατά πολύ μεγαλύτερη (>1000) από τη συγγένεια της με το φυλλικό οξύ. Επομένως ακόμη και ταυτόχρονη χορήγηση φυλλικού οξέος δεν θα επηρεάσει την δράση της μεθοτρεξάτης.

Ο μηχανισμός δράσης της μεθοτρεξάτης, διαφοροποιείται από αυτόν του καθαρά κυτταροστατικού, όταν η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται σε χαμηλές δόσεις (low dose methotrexate) για τη θεραπεία ασθενειών όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της νόσου του Crohn και της ψωρίασης. Σε αυτές τις περιπτώ-

σεις, η αναστολή της διϋδροφυλλικής αναγωγάσης (DHFR) δεν θεωρείται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός δράσης της, αλλά μάλλον η αναστολή των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της πουρίνης διαδικασία που οδηγεί στην συσσώρευση της αδενοσίνης, και την αναστολή της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων<sup>29</sup>. Έτσι, στην περίπτωση των διαταραχών του ανοσοποιητικού, ο κλινικός στόχος του σχήματος χαμηλής δόσης μεθοτρεξάτης είναι να αναστέλλει την τρανσφορμούλαση (AICAR), η οποία οδηγεί σε αυξημένη ριβόζη AICA (τρανσφορμούλαση AICAR του υποστρώματος). Η ριβόζη AICA αναστέλλει την απαμινάση της αδενοσίνης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση εξωκυτταρικής αδενοσίνης. Η εξωκυτταρική αδενοσίνη αναστέλλει την έκφραση των IL-2 υποδοχέων στα κυκλοφορούντα T-λεμφοκύτταρα, προκαλώντας καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, και καταστέλουν τις επιπτώσεις της ανοσολογικής διαταραχής.

Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφέρουμε ότι τα τελευταία χρόνια σε αυτοάνοσες νόσους μαζί (ή και μόνα τους) με τη μεθοτρεξάτη χορηγούνται οι βιολογικοί παράγοντες infliximab, etanercept και το adalimumab,<sup>30-34</sup> που είναι αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και το anakinra, που είναι αναστολέας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1. Το Infliximab είναι ένα μονοκλωνικό IgG<sub>1</sub> αντίσωμα έναντι του TNF-α, που δεσμεύεται στον TNF-α προλαμβάνοντας τη δέσμευσή του με τον υποδοχέα του<sup>35-40</sup>. Το etanercept είναι ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αναστέλλει τη δραστικότητα του TNF-α δρώντας ως υποδοχέας του TNF-α. Το adalimumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον TNF και δεσμεύεται ειδικά στον κυκλοφορούντα και τον ευρισκόμενο

στην κυτταρική επιφάνεια TNF-α εμπο-δίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τους p55 και p75 υποδοχείς του TNF<sup>41-45</sup>.

### Απορρόφηση - Μεταβολισμός

Η απορρόφηση της μεθοτρεξάτης από το στόμα εξαρτάται από τη δόση. Από το στόμα απορροφάται το 60% σε δόσεις μεγαλύτερες από 30 mg/m<sup>2</sup>. Η απορρόφηση είναι σημαντικά μικρότερη με υψηλότερες δόσεις (>80 mg/m<sup>2</sup>). Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα παρατηρείται μετά από 1-2 ώρες. Το φάρμακο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη σε συγκεντρώσεις στον ορό <0,1 μmol/ml, και μεταφέρεται στα κύτταρα από ένα ειδικό, υψηλής συγγένειας σύστημα μεταφοράς. Στο εσωτερικό του κυττάρου, η MTX ακολουθεί τους ίδιους βιοχημικούς μηχανισμούς όπως το φυλλικό οξύ, δηλαδή σχηματισμός γονταμινικών παραγώγων από ειδικά ένζυμα (γ-γλουταμυλο-τρανσφεράσες του φυλλικού οξέος), οι οποίες προσθέτουν σε σειρά ένα έως τέσσερα (ή ακόμη περισσότερα) μόρια γλουταμινικού οξέος, τα οποία συνδέονται με έναν πεπτιδικό δεσμό στο γ-καρβοξύλιο. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατανέμεται στους νεφρούς, τη χοληδόχο κύστη, το σπλήνα, το ήπαρ και το δέρμα. Επίσης διανέμεται στα υγρά του τρίτου χώρου. Μικρές συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε ασθενείς με προηγηθείσα ακτινοβολία εγκεφάλου και ασθενείς με λέμφωμα κεντρικού νευρικού συστήματος, όπου υπάρχει διακοπή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η μεθοτρεξάτη δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος σε ποσοστό 50%. Μεταβολίζεται σε ποσοστό <10% στο ήπαρ και ενδοκυτταρικά. Απεκκρίνεται από τους νεφρούς μέσω σπειραματικής διήθησης και σωληναριακής έκκρισης. Αποβάλλεται από τα ούρα στο 80-90% και κατά 10% από τα κόπρανα. Ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής είναι 3-10 ώρες για δόσεις <30 mg/m<sup>2</sup> και 8-15 ώρες για υψηλότερες δόσεις<sup>46</sup>. Η μεθοτρεξάτη εξέρχεται αργά από τα διαμερίσματα του τρίτου χώρου με αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ημίσειας ζωής και απρόβλεπτη τοξικότητα. Οι ηλικιωμένοι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας λόγω της έκπτωσης της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας, καθώς και των ελαττωμένων αποθεμάτων φυλλικού. Η δόση πρέπει να μειώνεται και να παρακολουθούνται για πρώιμη

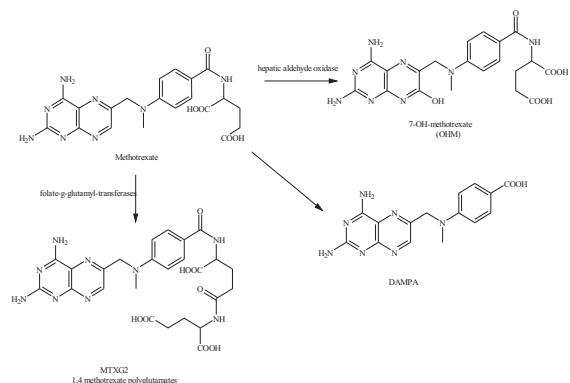
εμφάνιση τοξικότητας<sup>47</sup>.

Μερικοί από τους μεταβολίτες της μεθοτρεξάτης όπως η 7- υδροξυ-MTX, το 4-αμινο-4-δεοξυ-N10-μεθυλοπτεροϊκό οξύ (DAMPA) και το MTXG2 φαίνονται στο σχήμα 7.

### 5. Θεραπευτικά σχήματα

#### Θεραπευτικό σχήμα Μεθοτρεξάτης - Φυλλινικού Οξέος

Οι ενδείξεις για αυτό το θεραπευτικό σχήμα είναι, καρκίνοι ουροδόχου κύστεως, μαστού, στομάχου, κεφαλής και τραχήλου, χοριοκαρκίνωμα, λεπτομηνιγκές εντοπίσεις, οξεία λευχαιμία, λεμφώματα, σπογγοειδής μυκητίαση, νεοπλάσματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας, σάρκωμα, καρκίνος οισοφάγου, καρκίνος πνεύμονα, καρκίνος όρχεος. Το θεραπευτικό αυτό σχήμα στοχεύει στα εξής: Τερματισμό της αναπαραγωγής καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής



**Σχήμα 7.** Μεταβολίτες της μεθοτρεξάτης

της σύνθεσης του DNA, βασισμένη στην αντιμεταβολική δράση της μεθοτρεξάτης. Θεραπεία διάσωσης του μυελού των οστών και των κυττάρων του γαστρεντερικού βλεννογόνου, βασισμένη στην ικανότητα του φυλλινικού οξέος να βιοσυνθέτει ποσοστό πουρινών/πυριμιδινών Έτσι, σύμφωνα με τα ανωτέρω, η μεθοτρεξάτη που «μοιάζει» χημικά με το διϋδροφυλλικό οξύ, αναστέλλει το ένζυμο ακόμα και σε συγκεντρώσεις  $10^{-8}$  έως  $10^{-9}$  M. Επειδή το FH<sub>4</sub> και τα παράγωγα του απαιτούνται για τη σύνθεση πουρινών και θυμίνης, τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται γρήγορα έχουν μεγάλες ανάγκες για το ένζυμο αυτό. Βέβαια όλα τα κύτταρα απαιτούν

διύδροφυλλική αναγωγάση, για αυτό οι αντιφυλλικές ενώσεις είναι σε τελική ανάλυση τοξικές και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παρατεταμένη θεραπεία. Η λευκοβορίνη, παράγωγο του τετραϋδροφυλλικού οξέος, αν και ενδέχεται να εμποδίσει το αποτέλεσμα του φαρμάκου αν χορηγηθεί σύντομα μετά τη χορήγηση της μεθοτρεξάτης, δεδομένου ότι δεν χρειάζεται την DHFR για την ενεργοποίηση της, μέτριες ( $>100\text{mg}/\text{m}^2$ ) ή υψηλές δόσεις ( $>1.000\text{mg}/\text{m}^2$ ) μεθοτρεξάτης χορηγούμενες με λευκοβορίνη ως θεραπεία διάσωσης, χρησιμοποιούνται σε διάφορες νεοπλασίες, (αν και δεν αποτελεί αντίδοτο για τη μεθοτρεξάτη, το φυλλινικό οξύ μπορεί επίσης να χρησιμεύσει στην αντιμετώπιση της υπερδοσολογίας με μεθοτρεξάτη).

Η διάσωση με λευκοβορίνη είναι απαραίτητη σε δόσεις  $>500\text{ mg}/\text{m}^2$ , μπορεί όμως να γίνει και σε δόσεις  $100-500\text{ mg}/\text{m}^2$ <sup>48-53</sup>. Χορηγούνται  $10-25\text{ mg}/\text{m}^2$  λευκοβορίνης po/iv/im ανά 6ωρο για περίπου 8-10 δόσεις, αρχίζοντας την χορήγηση μετά την έναρξη της έγχυσης της μεθοτρεξάτης. Οι μετατροπές των δόσεων της λευκοβορίνης αρχίζουν την τρίτη ημέρα και βασίζονται στα πρωινά επίπεδα της μεθοτρεξάτης. Η μέτρηση των επιπέδων επαναλαμβάνεται κάθε πρωί και οι δόσεις της λευκοβορίνης καθορίζονται ανάλογα με τις μετρήσεις. Η χορήγηση της λευκοβορίνης συνεχίζεται μέχρι τα επίπεδα της μεθοτρεξάτης φθάσουν τα  $0,05\text{mmol}/\text{lt}$ . Δόσεις λευκοβορίνης  $>25\text{ mg}$  χορηγούνται iv.

Η μεθοτρεξάτη μπορεί να προκαλέσει αυτόματη αποβολή εγκυμοσύνης, ειδικά όταν χορηγείται κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης<sup>54</sup>. Μπορεί επίσης να προκαλέσει μείωση της γονιμότητας, ολιγοσπερμία και διαταραχές εμμήνου ρύσεως για ένα σχετικά μικρό διάστημα μετά την διακοπή της θεραπείας. Η τεκνοποίηση πρέπει να αποφεύγεται για μεν τους άνδρες κατά την διάρκεια και για 3 τουλάχιστον μήνες μετά την θεραπεία και για τις γυναίκες κατά την διάρκεια και για τουλάχιστον ένα κύκλο με ωορρηξία μετά την θεραπεία.

Μπορεί να χορηγηθεί υποδόρια ή ενδομυϊκά. Με απ' ευθείας ενδοφλέβια χορήγηση  $<10\text{ mg}$  σε 1 λεπτό. Με ενδοφλέβια έγχυση διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη σε 20 λεπτά της ώρας το 24ωρο. Με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση σε 24-42 ώρες. Ενδοραχιαία χορηγείται σε μικρό όγκο ( $5-10\text{ ml}$ ).

## Θεραπευτικό σχήμα Μεθοτρεξάτης

### Φυλλικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε η μεθοτρεξάτη σε σχήματα «Low Dose» δρα με διαφορετικό μηχανισμό. Θεραπείες με χαμηλής δόσης MTX δίνονται σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως η μυασθένεια Gravis, η πολυμοσίτιδα, η δερματομυοσίτιδα, η μυοσίτιδα από έγκλειστα, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η νόσος του Crohn, η ψωρίαση, η φλυκταινώδης ψωρίαση, η ψωριασική αρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η κοκκιωμάτωση Wegener, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το άσθμα, η σαρκοείδωση, η πρωτοπαθής χολική κίρρωση και η σκληροδερμία και συνήθως σε συνδυασμό με infliximab, etanercept και το adalimumab<sup>55</sup>.

Οι χαμηλές δόσεις μεθοτρεξάτης μπορεί να μειώσουν τα αποθέματα φυλλικού οξέος και να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες που είναι παρόμοιες με εκείνες που εμφανίζονται από την ανεπάρκεια φυλλικού οξέος. Εδώ συμπληρώματα φυλλικού οξέος προτιμώνται και μπορεί να συμβάλουν στη μείωση των τοξικών παρενεργειών της μεθοτρεξάτης, χωρίς να μειώνεται η αποτελεσματικότητά της, εφόσον η κύρια δράση της μεθοτρεξάτης δεν είναι η αναστολή της DHFR. Παράδειγμα αποτελεί η θεραπεία της νόσου Αδαμαντιάδη-Behcet όπου λαμβάνεται μεθοτρεξάτη έβδομαδιάως, και φυλλικό οξύ ημερησίως<sup>56</sup>.

## Methotrexate, an antimetabolite of folic acid, a brief throwback

Panagiotis Koufopantelis, Irene Panderi

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

### Summary

The history of methotrexate dates back to 1948 with the initial report by S. Farber and the successful use of aminopterin, an anti-folate in the treatment of childhood leukemia. Methotrexate is part of a general group of chemotherapy drugs known as anti-metabolites and it is used to treat

choriocarcinoma, leukemia, osteosarcoma, breast cancer, lung cancer, non-Hodgkin lymphoma, and neck cancers along with other non-cancerous conditions.

This review is a brief throwback to methotrexate and antimetabolites, and to folic and folinic acid as well. The pharmacological action and the metabolism of methotrexate along with the mechanisms of action and the main chemotherapy regimens are described in detail.

---

*Corresponding author:*

Irene Panderi email: ipanderi@pharm.uoa.gr

## Βιβλιογραφία

1. Bertino J.R. (2000) Methotrexate: historical aspects. In: Cronstein BN, Bertino JR. *Methotrexate*. Basel: Birkhäuser.
2. Meyer L.M., Miller F.R., Rowen M.J., Bock G., Rutzky J. Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid). *Acta Haematol.* 4, 157–67, 1950.
3. Messmann R.A., Allegra C.J. (2001) Antifolates. In: Chabner B.A., Longo D.L., eds. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott–Raven.
4. Mitchell H.K., Snell E.E., Williams R.J. The concentration of folic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 2284, 1941.
5. Bailey S.W., Ayling J.E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 15424–15429, 2009.
6. Τρακατέλλης Α. (2004) Βιοχημεία, τόμος Α', μέρος 2, 2<sup>η</sup> έκδοση Κυριακίδη, 623-632.
7. Γαλανόπουλος Π., Κούβαρη Λιάπη Χ., Κιούσης N., Γρίβας Γ., Σπανός Ν., Δερβένη Μ. (2005) Φαρμακολογία, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 200-492.
8. Komatsu M., Tsukamoto I., Effect of folic acid on thymidylate syntheses and thymidine kinase in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 289 -296, 1998.
9. Figueiredo J.C., Grau M.V., Haile R.W., Sandler R.S., Summers R.W., Bresalier R.S., Burke C.A., McKeown-Eyssen G.E., Baron J.A. Folic Acid and Risk of Prostate Cancer: Results From a Randomized Clinical Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 432-435, 2009.
10. Smith C., Lieberman M., Marks D.B., Marks A.D. (2007) Marks' essential medical biochemistry. Hagerstwon, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
11. Bailey S.W., Syslo M.C., Ayling J. An assay for dihydrofolate reductase in human tissues by HPLC with fluorometric detection. *FASEB J.* 16, A267, 2002.
12. Wright A.J., Dainty J.R., Finglas P.M. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br. J. Nutr.* 98, 667-675, 2007.
13. Robien K. Folate during antifolate chemotherapy: what we know and do not know. *Nutr. Clin. Pract.* 20, 411-422, 2005.
14. Goh Y.I., Koren G. Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *J. Obstet. Gynaecol.* 28, 3-13, 2008.
15. Hoffbrand A.V., Weir D.G. The history of folic acid. *Br. J. Haematol.* 113, 579-589, 2001.
16. Steegers-Theunissen R.P., Obermann-Borst S.A., Kremer D., Lindemans J., Siebel C., Steegers E.A., Slagboom P.E., Heijmans B.T. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One*, 4, e7845, 2009.

17. Scholl T.O., Johnson W. G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am. J.Clin.Nutr.* 7, 11295S-1303s, 2000.
18. Weinstein S.J., Hartman T.J., Stolzenberg-Solomon R., Pietinen P., Barrett M.J., Taylor P.R., Virtamo J., Albanes D. Null Association Between Prostate Cancer and Serum Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Homocysteine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 1271-1272, 2003.
19. Mulinare J., Cordero J.F., Erickson J.D., Berry R.J. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *J. Am. Med. Assoc.* 260, 3141-3145, 1988.
20. Morris M.S., Jacques P.F., Rosenberg I.H., Selhub J. Folate and vitamin B12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment among older Americans in the age of folic acid fortification, *Am. J.Clin. Nutr.* 85, 193-200, 2007.
21. Savage D., Gangaidzo I., Lindenbaum J. Vitamin B12 deficiency is the primary cause of megaloblastic anemia in Zimbabwe. *Br. J. Haematol.* 86, 844-850, 1994.
22. Keshava C., Keshava N., Whong W.Z., Nath J., Ong T.M. Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by folinic acid in V79 cells. *Mutat. Res.* 397, 221-8, 1998.
23. Therapeutic Information Resources Australia (2004) Calcium Folinate (Systemic) in AUSDI: Australian Drug Information for the Health Care Professional. Castle Hill: Therapeutic Information Resources Australia.
24. Ellis J.M., Tan H.K., Gilbert R.E., Muller D.P., Henley W., Moy R., Pumphrey R., Ani C., Davies S., Edwards V., Green H., Salt A., Logan S. Supplementation with antioxidants and folinic acid for children with Down's syndrome: randomised controlled trial. *BMJ* 336, 594-7, 2008.
25. Jardine L.F., Ingram L.C., Bleyer W.A. Intrathecal Leucovorin After Intrathecal Methotrexate Overdose. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 18, 302 - 304, 1996.
26. Mayne Pharma (2003) Apo-Methotrexate tablet product monograph. Montreal Quebec.
27. Methotrexate: Drug Information (2006) In: Rose B.D., ed. Up To Date. Wellesley, MA; UpToDate.
28. McEvoy G., ed. (2006) American Hospital Formulary Systems Drug Information. Bethesda, MD: American Society of Health System Pharmacists.
29. Johnston A., Gudjonsson J.E., Sigmundsdottir H., Ludviksson B.R., Valdimarsson H, The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol.* 114, 154-163, 2005.
30. Klareskog L., van der Heijde D., de Jager J.P., Gough A., Kalden J., Malaise M., Martin Mola E., Pavelka K., Sany J., Settas L., Wajdula J., Pedersen R., Fatenejad S., Sanda M. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 363 (9410), 675-81, 2004.
31. Taylor P.C. Anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Mol. Biotechnol.* 19, 153-168, 2001.
32. Weisman M.H. What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J. Rheumatol. (Suppl.)*, 65, 33, 2002.
33. Taylor P.C., Williams R.O., Maini R.N. Immunotherapy for rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 611-616, 2001.
34. Kalden J.R. Emerging role of anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatic diseases. *Arthritis Res.*, 4(suppl 2), S34, 2002.

35. Song X.Y., Fox F., Gallo M.A., Rosenberg A., Jordan R., Shealy D. Wagner C. Effects of 2 different antitumor necrosis factor-alpha agents in a primate model of subcutaneous abscess formation. *J. Infect Dis.* 185, 204-213, 2002.
36. Feldmann M., Maini R.N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Ann. Rev. Immunol.* 19, 163-196 2001.
37. Keating G.M., Perry C.M. Infliximab: An updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *BioDrugs*, 16,111-148, 2002.
38. Feagan B.G., Enns R., Fedorak R.N., Panaccione R., Pare P., Steinhart A.H., Wild.G. Infliximab for the treatment of Crohn's disease: Efficacy, safety and pharmacoeconomics. *Can. J. Clin. Pharmacol.* 8,188-198, 2001.
39. Hanauer S.B. Feagan B.G., Lichtenstein G.R., Mayer L.F., Schreiber S., Colombel J.F. Rachmilewitz D., Wolf D.C., Olson A., Bao W., Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: The ACCENT I randomised trial. *Lancet* 359, 1541-1549, 2002.
40. Case J. Old and new drugs used in rheumatoid arthritis: A historical perspective. *Am. J. Ther.* 8,163, 2001.
41. Keystone E., Kavanaugh A., Sharp J., Hua T., Teoh L., Fischkoff S. A. Chartash E.K. Adalimumab, a fully human anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: Ohe ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 48, 35-45, 2003.
42. Keystone E., Haraoui B. Adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 30, 349, 2004.
43. Fleischmann R.M., Schechtman J., Bennett R., Handel M.L., Burmester G.R., Tesser J. Modafferi D., Poulakos J., Sun G. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 48, 927-34, 2003.
44. Calabrese L.H. Anakinra treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Pharmacother.* 36,1204-9, 2002.
45. Kastanek L. Using anakinra for adult rheumatoid arthritis. *Nurse Pract.* 27, 62-65, 2002.
46. Bleyer W.A. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, 41, 36-51, 1978.
47. Gaies E., Jebabli N., Trabelsi S., Salouage I., Charni R., Lakhali M., Klouz A. Methotrexate Side Effects: Review Article *J. Drug Metab. Toxicol.* 3, 125-130, 2012.
48. Branda RF, Nigels E, Lafayette AR, Hacker M. Nutritional folate status influences the efficacy and toxicity of chemotherapy in rats. *Blood* 92, 2471-6, 1998.
49. Shiroky J.B. The use of folates concomitantly with low-dose pulse methotrexate. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 23, 969–80, 1997.
50. Keshava C., Keshava N., Whong W.Z., Nath J., Ong T.M. Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by folinic acid in V79 cells. *Mutat. Res.* 397, 221–8, 1998.
51. Morgan S.L., Baggott J.E. (1995) Folate antagonists in nonneoplastic disease: proposed mechanisms of efficacy and toxicity. In Bailey LB, Folate in Health and Disease, 405–33. New York, Marcel Dekker.
52. Morgan S.L., Baggott J.E., Alarcon G.S. Methotrexate in rheumatoid arthritis: folate supplementation should always be given. *BioDrugs* 8, 164–75, 1997.

53. Morgan S.L., Baggott J.E., Lee J.Y., Alarcon G.S. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: Implications for cardiovascular disease prevention. *J. Rheumatol.* 25, 441–6, 1998.
54. Widemann B.C., Balis F.M., Kempf-Bielack B., Bielack S., Pratt C.B., Ferrari S., Bacci G., Craft A.W., Adamson P.C. High dose methotrexate induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* 100, 2222-32, 2004.
- 55 Morgan S.L. Baggott J.E., Vaughn W.H., Austin J.S., Veitch T.A., Lee J.Y., Koopman W.J., Krumdieck C.L., Alarcón G.S. Supplementation with Folic Acid during Methotrexate Therapy for Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* 121, 833-841, 1994.
56. Al-Araji A., Kidd D.P. Neuro-Behçet's disease: epidemiology, clinical characteristics, and management. *Lancet Neurol.* 8, 192–204, 2009.

# The alliance between nanotechnology, biosciences and regulatory agencies promotes innovative medicines. The signaling pathways from Greece

Costas Demetzos and Natassa Pippa

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,  
Panepistimioupolis Zografou 15771, University of Athens, Athens, Greece

## Summary

The purpose of this mini review is to address the role of the scientific excellence of innovative medicines through Nanotechnology and Bionanotechnology in Greece. More specifically, this mini review paper deals with the new technologies and the research activities of the scientists operating in Greece with an emphasis on nanotechnology, biotechnology and Systems Pharmacology through -omics. The development of new and innovative drugs in order to improve the health care and to rational design the frame by which the health expenditures meet social needs, is an issue which needs to merge innovations in pharmaceutical nanotechnology. Furthermore this article deals with the Greek scientific efforts which are focused on the innovation in science and in advanced Pharmaceutical technology and Bio- Nano- technology.

## Keywords

Innovative medicines, Nanotechnology, Biotechnology, Greece.

## Introduction

This article is to address the role of the scientific excellence of innovative medicines as the key element in the development process in Greece. The advances in Pharmaceutical nanotechnology and nanomedicine promote the personalized medicine and can fill the gap between technology and biosciences (Figure 1).<sup>1,2</sup>

Nanotechnology is the manipulation of matter on an atomic and molecular scale. The earliest, widespread description of nanotechnology referred to the particular technological goal of precisely manipulating atoms and molecules for fabrication of macroscale products, also now referred to as molecular nanotechnology. A more generalized description of nanotechnology was subsequently established by the National Nanotechnology Initiative, which defines nanotechnology as the manipulation of matter with at least one dimension sized from 1 to 100 nanometers. Bionanotechnology, nanobiotechnology, and nanobiology are terms that refer to the intersection of nanotechnology and biology. Given that the subject is one that has only emerged very recently, bionanotechnology and nanobiotechnology serve as blanket terms for various related technologies. This discipline helps to indicate the merger of biological research with various fields of nanotechnology. Concepts that are enhanced through nanobiology include: nanodevices, nanoparticles, and nanoscale phenomena that occurs within the discipline of nanotechnology. This technical approach to biology allows scientists to imagine and create systems that can be used for biological research. Biologically inspired nanotechnology uses biological systems as the inspirations for technologies not yet created.

The rearrangement of the current concept of the conventional classification of diseases to the new concept on 'disease classes', can provide new insights

Corresponding author: Costas Demetzos, tel.: +30 2107274596, fax: +30 2107274027, e-mail: demetzos@pharm.uoa.gr

for a better therapeutic approach through improvements in diagnosis. Consequently the misclassification of the data from the clinical or laboratory approaches could be avoided by the translations of data coming from the genotype profile of each patient. The discovery of new biological targets creates a new frame to explore new genome expressions which could be the platform for innovative drug development. It is of interest to point out that developing of *theragnostics* (which is a key part of personalized medicine and could be defined as the proposed process of diagnostic therapy for individual patients - to test them for possible reaction to taking a new medication and to tailor a treatment for them based on the test results) in terms of the technological evolution and ability to produce '*two in one*' diagnostic and therapeutic pharmaceutical products at nanoscale level is a challenge in the research and developing process.<sup>3</sup> Pharmaceutical nanotechnology is a multidisciplinary scientific platform that can provide advancements in therapeutics with accuracy, effectiveness and safety in clinical practice. The bio-inspired Pharmaceutical nanotechnology especially in the area of drug delivery nanosystems such as targeted drug carriers inspired by the new biological targets can produce innovative delivery nanosystems that are characterized as bio-inspired drug delivery nano systems (*bio-inspired* DDnSs). These systems have directions that contribute to create the systems technology that incorporate the art for producing nano-devices for diagnosis such as quantum dots and cantilevers as well as for producing accurate, effective and safe *bio-inspired* DDnSs.<sup>4</sup> According to the data base of scientific publications (National Science Indicators), we highlighted some of the scientific and technological efforts coming from the Greek scientific community, despite the huge crisis.<sup>5-8</sup>

## **2. In brief, the recent scientific excellence in Greece in the field of Nanotechnology and Biotechnology**

The concept to promote the integration between *-omics* and nanotechnology is presented in a review

article by Vizirianakis and Fatouros (2012) who noted that personalized nanomedicine improves the clinical outcome by crossing the borderlines of genomics with nanotechnology.<sup>9,10</sup> In this respect, recent technologies, such as nanotechnology, provide new opportunities for next generation scintillation devices and instruments. In medical imaging, detector technology has found widespread use, offering improved signal capabilities.<sup>11</sup> Novel aerosol therapeutic modalities have been investigated by Zarogouldis and his colleagues for lung cancer because inhaled gene therapy has presented safety and effectiveness previously in cystic fibrosis.<sup>12,13</sup> Tanner et al., reported a controllable strain gauge factor obtained using a two dimensional nanoparticles layer formed from platinum nanoparticles.<sup>14</sup> Radiopharmaceuticals are a key tool of molecular imaging in the field of nuclear medicine because molecular imaging of cancer using nanosized materials comprises an important part in systems diagnostics.<sup>15,16</sup> Magnetically and charged targeted drug delivery may be an ideal method of pharmaceutical treatment during the resuscitation efforts and post-resuscitation period, as well as in the detection of post-cardiac arrest brain injury.<sup>17,18</sup> Femtosecond laser assisted nanosurgery of microscopic biological specimens is a relatively new technique which allows the selective disruption of sub-cellular structures without causing any undesirable damage to the surrounding regions.<sup>19</sup> Open-ended, multi-wall carbon nanotubes (CNTs) with magnetic nanoparticles encapsulated within their graphitic walls were fabricated by a combined action of template growth and a ferrofluid catalyst/carbon precursor, and tested as drug hosts.<sup>20-22</sup> In their study, Karagkiozaki et al., (2010) presented an example of how nanomedicine can offer solutions for improving stent coating manufacturing, by producing nanomaterials with tailored and controllable properties.<sup>23-25</sup> Recently, the Modulatory Controlled Release nano Systems (MCRnS) used as drug delivery nano carrier, based on liposomal technology, has been proposed to classify in *hybrid* and *chimeric* systems based on the nature of bioelements used for producing the Drug Delivery nano System (DDnS) with modulatory properties.<sup>26-29</sup> Dinca et al. proposed a new

method for the precise, three-dimensional patterning of amyloid fibrils.<sup>30</sup> Oral transmucosal fentanyl citrate was proposed, too.<sup>31</sup> Polymeric self-assembled nanoparticles have been studied for their application of combined diagnosis (biosensors), and therapy through nanotechnology applications is attracting increasing attention worldwide.<sup>32-37</sup> It was also reported an easy and highly reproducible preparation route, using self-emulsifying technology, for an orally administered high quality magnetically responsive drug delivery system.<sup>38</sup> Stamopoulos and his colleagues presented an in vitro investigation on the biocompatibility of bare ferromagnetic nanoparticle-targeted.<sup>39,40</sup> It was investigated the influence of antigen entrapment in polymeric nanoparticles on the immune responses obtained after transcutaneous immunization.<sup>41</sup> The core-shell microgels comprise novel two-compartment nanostructures synthesized by Christodoulakis and Vamvakaki that exhibit contraphilic properties in the core and the shell of the particles in response to a single external stimulus.<sup>42</sup> In their recent publication, Kremmydas et al. noted the characterization of biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* strain X that reveals novel genes regulated by glucose.<sup>43</sup> A custom-made electroeluter that combines low-cost, high-recovery yields, short times of electroelution, and convenience in the manipulation of sensitive samples was described by Fadologlu.<sup>44</sup> Toliopoulos et al. designed a study in order to evaluate the effects of five homoeopathic complex preparations on functional activity natural killer cells in advanced cancer patients.<sup>45</sup> A causative relationship between mitochondrial biogenesis and dynamics in neurodegeneration was recently analyzed by Nikoletopoulou and Tavernarakis.<sup>46</sup> Makridakis et al. reported in their recent review article the main findings from the investigation of stem cell secretome by the use of contemporary proteomics methods and discuss the current status of research in the field.<sup>47</sup> Abatzoglou et al. noted the establishment and validation of a method for multi-dose irradiation of cells in 96-well microplates because microplates are useful tools in chemistry, biotechnology and molecular biology.<sup>48</sup> The purpose of Tsolis' et al. work was to

construct a consensus prediction algorithm of aggregation-prone peptides in globular proteins, combining existing tools.<sup>49</sup> Arampazti et al. proposed a novel chromatin anti-condensation role for this element in mitotic bookmarking and timing of post-mitotic transcriptional reactivation.<sup>50</sup> Tsakogiannis et al. identified of novel sequence variants of human papillomavirus 16.<sup>51</sup> The study of Papadodima et al. aimed to exploit bioinformatic tools in order to analyze microarray data of atherosclerotic aortic lesions.<sup>52</sup> Bitsika et al. in their review summarized various approaches where the tumor-homing capacities of fetal mesenchymal stem cells that can be utilized as delivery vehicles for cancer therapeutics.<sup>53</sup> Chondrogianni et al. investigated the protein damage, repair and proteolysis and highlighted that different drugs as well as natural compounds that interfere with proteolysis have been identified and/or developed resulting in homeostatic maintenance and/or the delay of disease progression.<sup>54</sup> Kourtis et al. have published their work concerning on small heat-shock proteins that protect from heat-stress-associated neurodegeneration.<sup>55</sup> The latest findings on biomarkers potentially beneficial in disease stratification based on aggressiveness and prognosis were reported by Frantzi et al.<sup>56,57</sup> According to Nikolouli and Mossialos, bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics, allowing the exploitation of so far untapped microbial resources in biotechnology and medicine.<sup>58</sup> Stefanou et al. developed and validated a simple, sensitive and rapid method for the quantitation of alkylating drug-induced DNA damage.<sup>59</sup> The findings of Pintzas et al. investigation provided mechanistic basis for a pharmacogenomic approach, which could be exploited further therapeutically, in order to reach novel personalized therapies for cancer patients.<sup>60</sup> Margoni et al. reviewed the roles of transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling pathway in adipocyte differentiation.<sup>61</sup> Koryllou et al. investigated the cell death of human origin and implication of RNA binding protein alterations.<sup>62</sup> Zoidakis et al. study involved the application of a fractionation method of urinary pro-

teins.<sup>63</sup> Vasilopoulos' et al. study was the first in the field of psoriasis demonstrating a strong association between genetic markers and positive response to drug treatment.<sup>64</sup> Mourtas et al. described describe here the preparation and characterization of new nanoparticles to be exploited as vectors for the targeted delivery of new diagnostic and therapeutic molecules for Alzheimer disease.<sup>65</sup> Recently, the fractal approach is included in many fields of Pharmaceutics.<sup>66-74</sup> The Pharmacovigilance is one of the most crucial topic in these research orientations.<sup>75</sup>

### 3. Conclusions

The scope of this mini review article is to address the role and to promote the alliance between advanced nanotechnology in Pharmaceutics, biosciences and regulatory authorities as the major initiators for health care, in Greece. The collected statistical data on research of innovative medicines pointed out that the Greek scientists could take advantage of the "**Horizon 2020**" on the continuity of their investigation, whilst how the accumulation of knowledge at Greek universities and research foundations could be translated into industrial health products with added value, safe and effective for the European consumers.

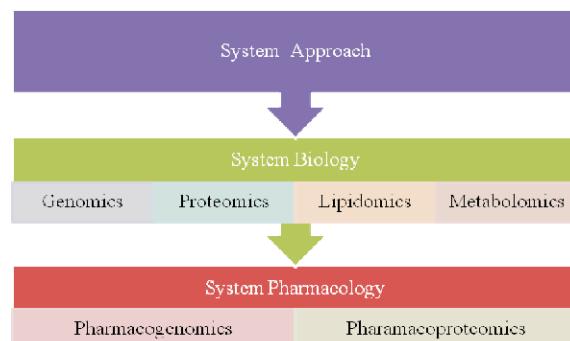


Figure 1. The system approach in Pharmaceutical Sciences

**Η συμμαχία Νανοτεχνολογίας, Βιοεπιστημών και Ρυθμιστικών Οργανισμών με στόχο τα καινοτόμα φάρμακα. Η συμβολή της Ελλάδας**

**Κώστας Δεμέτζος, Νατάσσα Πίππα**  
Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784, Αθήνα

### Περίληψη

Ο σκοπός αυτού του άρθρου είναι να εξεταστεί ο ρόλος της επιστημονικής αριστείας στον τομέα των καινοτόμων φαρμάκων μέσω της Νανοτεχνολογίας και της Βιονανοτεχνολογίας στην Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα, αυτό η ανασκόπηση ασχολείται με τις νέες τεχνολογίες και τις ερευνητικές δραστηριότητες των επιστημόνων που δραστηριοποιούνται στην Ελλάδα, με έμφαση στον τομέα της Νανοτεχνολογίας, της Βιοτεχνολογίας και της Συστημικής Φαρμακολογίας μέσω της προσέγγισης των -omics. Η ανάπτυξη των καινοτόμων φαρμάκων, προκειμένου να βελτιωθεί η δημόσια υγεία και την ορθολογική σχεδίαση του πλαισίου με το οποίο οι δαπάνες υγείας συγκλίνουν με τις κοινωνικές ανάγκες, είναι ένα ζήτημα που πρέπει να θιοθετήσει τις καινοτομίες στον τομέα της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας. Επιπλέον, αυτό το άρθρο ασχολείται με τις ελληνικές επιστημονικές εργασίες, οι οποίες επικεντρώνονται στην καινοτομία της επιστήμης και της προηγμένης φαρμακευτικής τεχνολογίας και της Βιονανοτεχνολογίας.

Συγγραφέας αλληλογραφία:  
Κώστας Δεμέτζος, demetzos@pharm.uoa.gr

## References

1. Gaspar R., Aksu B., Cuine A., Danhof M., Takac M.J., Linden H.H., Link A., Muchitsch E.M., Wilson C.G., Ohrngren P., Dencker L. Towards a European strategy for medicines research (2014-2020): The EUFEPS position paper on Horizon 2020. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47,979-98, 2012.
2. Crommelin D.J., Florence A.T., Towards more effective advanced drug delivery systems. *Int. J. Pharm* 454, 496-511, 2013.
3. Gaspar R., Regulatory issues surrounding nanomedicines: settling the scene for the next generation of nanopharmaceuticals. *Nanomedicine (Lond)* 2,143-147, 2007.
4. Lin Y., Mao C., Bio-inspired supramolecular self-assembly towards soft nanomaterials. *Front. Mater. Sci* 5, 247-265, 2011.
5. Tzenou G., Malliou N., Sachini E. Scientific excellence in EU convergence regions, 2007-2012: the case of Greece. National Documentation Centre (in Greek), 2013.
6. Pascual C., Sachini E. 5 years of Excellence in the European Research Area 2007-2012: the case of Greece. National Documentation Centre, 2012.
7. Sachini E., Malliou N., Houssos N. Greek Scientific Publications 1996-2010: A Bibliometric analysis of Greek publications in international scientific journals. National Documentation Centre, 2012.
8. Sachini E., Malliou N., Houssos N., Karaiskos D. Greek Scientific Publications 2000-2010 in the field of Natural Sciences (in Greek). National Documentation Centre, 2012.
9. Vizirianakis I.S. Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine* 7, 11-7, 2011.
10. Vizirianakis I.S., Fatouros D.G. Personalized nanomedicine: paving the way to the practical clinical utility of genomics and nanotechnology advancements. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 64,1359-62,2012.
11. Liaparinos P.F. Optical diffusion performance of nanophosphor-based materials for use in medical imaging. *J. Biomed. Opt.* 17, 126013, 2012.
12. Zarogouldis P., Karamanos N.K., Porpodis K., Domvri K., Huang H., Hohenforst-Schmidt W., Goldberg E.P., Zarogoulidis K. Vectors for inhaled gene therapy in lung cancer. Application for nano oncology and safety of bio nanotechnology. *Int. J. Mol. Sci* 13,90828-62, 2012.
13. Zarogoulidis P., Chatzaki E., Porpodis K., Domvri K., Hohenforst-Schmidt W., Goldberg E.P., Karamanos N., Zarogoulidis K. Inhaled chemotherapy in lung cancer: future concept of nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine*, 7,1551-72, 2012.
14. Tanner J.L., Mousadakos D., Giannakopoulos K., Skotadis E., Tsoukalas D. High strain sensitivity controlled by the surface density of platinum nanoparticles. *Nanotechnology* 23, 285501, 2012.
15. Mironidou-Tzouveleki M., Tsartsalis S. Nanotechnology and radiopharmaceuticals: diagnostic and therapeutic approaches. *Curr. Drug Deliv.* 7, 168-74, 2010.
16. Psimadas D., Oliveira H., Thevenot J., Lecommandoux S., Bouziotis P., Varvarigou A.D., Georgoulas P., Loudos G. Polymeric micelles and vesicles: biological behavior evaluation using radiolabeling techniques. *Pharm. Dev. Technol.* 2013 In press.
17. Tang J., Verrelli E., Tsoukalas D. Assembly of charged nanoparticles using self-electrodynamic focusing. *Nanotechnology* 20, 365605, 2009.
18. Xanthos T., Chatzigeorgiou M., Johnson E.O.,

- Chalkias A. Magnetically targeted drug delivery during cardiopulmonary resuscitation and the post-resuscitation period. *Resuscitation* 83,803-5, 2012.
19. Tserevelakis G.J., Pscharakis S., Resan B., Brunner F., Gavgiotaki E., Weingarten K., Filippidis G. Femtosecond laser nanosurgery of sub-cellular structures in HeLa cells by employing Third Harmonic Generation imaging modality as diagnostic tool. *J. Biophotonics* 5, 200-7, 2012.
20. Pagona G., Tagmatarchis N., Carbon nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications. *Curr. Med. Chem.* 13, 1789-98, 2006.
21. Spitalsky Z., Tsoukleri G., Tasis D., Krontiras C., Georga S.N., Galiotis C. High volume fraction carbon nanotube-epoxy composites. *Nanotechnology* 20, 405702, 2009.
22. Vermisoglou E.C., Pilatos G., Romanos G.E., Devlin E., Kanellopoulos N.K., Karanikolos G.N., Magnetic carbon nanotubes with particle-free surfaces and high drug loading capacity. *Nanotechnology* 22, 355602, 2011.
23. Karagkiozaki V., Logothetidis S., Lousinian S., Giannoglou G. Impact of surface electric properties of carbon-based thin films on platelets activation for nano-medical and nanosensing applications. *Int. J. Nanomedicine* 3,461-9, 2008.
24. Karagkiozaki V., Logothetidis S., Kalfagiannis N., Lousinian S., Giannoglou G. Atomic force microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. *Nanomedicine* 5,164-72, 2009.
25. Karagkiozaki V.C., Logothetidis S.D., Kassavetis S.N., Giannoglou G.D., Nanomedicine for the reduction of the thrombogenicity of stent coatings. *Int. J. Nanomedicine* 5, 239-48, 2010.
- 26.Gardikis K., Tsimplouli C., Dimas K., Micha-Scretta M., Demetzos C. New chimeric advanced drug delivery nanosystems (Chi-aDDnSs) as doxorubicin carriers. *Int. J. Pharm.* 402, 231-237, 2010.
27. Gardikis K., Hatziantoniou S., Signorelli M., Pusceddu M., Micha-Scretta M., Schiraldi A., Demetzos C., Fessas D. Thermodynamics and structural characterization of liposomal locked-in dendrimers as drug carriers. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 81, 11-19, 2010.
28. Gardikis K., Dimas K., Georgopoulos A., Pispas S., Kaditi E., Demetzos C.,  $\beta$ -lactam functionalized poly (isoprene–b–ethylene oxide) amphiphilic block copolymer micelles as a new nanocarrier system for curcumin. *Curr. Nanosci.* 6, 277-284, 2010.
29. Gardikis K., Hatziantoniou S., Bucos M., Fessas D., Signorelli M., Felekitis T., Zervou M., Screttas C., Steele B., Ionov M., Scretta M., Klajnert B., Bryszewska M., Demetzos C. New drug delivery nanosystem combining liposomal and dendrimeric technology (liposomal locked-in dendrimers) for cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* 99, 3561-71, 2010.
30. Dinca V., Kasotakis E., Catherine J., Mourka A., Ranella A., Ovsianikov A., Chichkov B.N., Farsari M., Mitraki A., Fotakis C. Directed three-dime-nsional patterning of self-assembled peptide fibrils. *Nano Lett* 8, 538-543, 2008.
31. Mystakidou K., Tsilika E., Tsiatas M., Vlahos L. Oral transmucosal fentanyl citrate in cancer pain management: a practical application of nanotechnology. *Int. J. Nanomedicine* 2, 49-54, 2007.
32. Yannopoulos S.N., Zouganelis G.D., Nurmohamed S., Smith J.R., Bouropoulos N., Calabrese G., Fatouros D.G., Tsibouklis J. Physisorbed o-carbo-rane onto lyso-phosphatidylcholine-functionalized, single-walled carbon nanotubes: a potential carrier system for the therapeutic delivery of boron. *Nanotechnology* 8,85101, 2010.
33. Elenis D.S., Ioannou P.C., Christopoulos T.K., A

- nanoparticle-based sensor for visual detection of multiple mutations. *Nanotechnology* 22, 155501, 2011.
34. Liandris E., Gazouli M., Andreadou M., Sechi L.A., Rosu V., Ikonomopoulos J. Detection of pathogenic mycobacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation. *PLoS One* 6, e20026, 2011.
35. Papadimitriou S.A., Achilias D.S., Bikaris D.N. Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripo-lyphosphate as protein delivery systems. *Int. J. Pharm.* 430, 318-27, 2012.
36. Skarmoutsou A., Charitidis C.A., Gnanappa A.K., Tserepi A., Gogolides E., Nanomechanical and nanotribological properties of plasma nanotextured superhydrophilic and superhydrophobic poly-meric surfaces. *Nanotechnology* 23, 505711, 2012.
37. Psimadas D., Georgoulas P., Valotassiou V., Loudos G. Molecular nanomedicine towards cancer: <sup>111</sup>In-labeled nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, 101, 2271-80, 2012.
38. Bakandritsos A., Zboril R., Bouropoulos N., Kallinteri P., Favretto M.E., Parker T.L., Mullertz A., Fatouros D.G. The preparation of magnetically guided lipid based nanoemulsions using self-emulsifying technology. *Nanotechnology* 21, 055104, 2010.
39. Stamopoulos D., Manios E., Gogola V., Benaki D., Bouziotis P., Niarchos D., Pissas M., Bare and protein-conjugated Fe(3)O(4) ferromagnetic nanoparticles for utilization in magnetically assisted hemodialysis: biocompatibility with human blood cells. *Nanotechnology* 19, 505101, 2008.
40. Stamopoulos D., Bouziotis P., Benaki D., Zirogiannis P.N., Kotsovassis K., Belessi V., Dalamagas V., Papadopoulos K. Nanobiotechnology for the prevention of dialysis-related amyloidosis. *Ther. Apher. Dial.* 13, 34-41, 2009.
41. Mattheolabakis G., Lagoumintzis G., Panagi Z., Papadimitriou E., Partidos C.D., Avgoustakis K. Transcutaneous delivery of a nanoencapsulated antigen: induction of immune responses. *Int. J. Pharm* 385, 187-193, 2010.
42. Christodoulakis K.E., Vamvakaki M. Amphoteric core-shell microgels: contraphilic two-compartment colloidal particles. *Langmuir* 26, 639-647, 2010.
43. Kremmydas G.F., Tampakaki A.P., Georgakopoulos D.G. Characterization of the Bio-control Activity of *Pseudomonas fluorescens* Strain X Reveals Novel Genes Regulated by Glucose. *PLoS One* 8, e61808, 2013.
44. Fadouoglou V.E. Electroelution of nucleic acids from polyacrylamide gels: A custom-made, aga-rose-based electroeluter. *Anal. Biochem* 437, 49-51, 2013.
45. Toliopoulos I.K., Simos Y., Bougiouklis D., Oikonomidis S. Stimulation of natural killer cells by homoeopathic complexes: An in vitro and in vivo pilot study in advanced cancer patients. *Cell Biochem. Funct.* 31, 713-18, 2013.
46. Nikoletopoulou V., Tavernarakis N. Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Neurodegeneration: A Causative Relationship. *Neurochem. Res.* 39, 542-5, 2014.
47. Makridakis M., Roubelakis M.G., Vlahou A. Stem cells: Insights into the secretome. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2380-84, 2013.
48. Abatzoglou I., Zois C.E., Pouliiou S., Koukourakis M.I. Establishment and validation of a method for multi-dose irradiation of cells in 96-well microplates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 456-459, 2013.
49. Tsolis A.C., Papandreou N.C., Iconomidou V.A., Hamodrakas S.J. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in glo-bular proteins. *PLoS One* 8, e54175, 2013.

50. Arampatzis P., Gialitakis M., Makatounakis T., Papamatheakis J., Gene-specific factors determine mitotic expression and bookmarking via alternate regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 41, 2202-2215, 2013.
51. Tsakogiannis D., Kyriakopoulou Z., Amoutzias G., Ruether I.G., Dimitriou T.G., Panotopoulou E., Markoulatos P. Identification of novel E6-E7 sequence variants of human papillomavirus 16. *Arch. Virol.* 158, 821-8, 2013.
52. Papadodima O., Sirsjö A., Kolisis F.N., Chatziioannou A. Application of an integrative computational framework in transcriptomic data of atherosclerotic mice suggests numerous molecular players. *Adv. Bioinformatics.* 453513, 2012.
53. Bitsika V., Vlahou A., Roubelakis M.G. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 8, 133-43, 2013.
54. Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Catalgol B., Friguet B., Grune T., Gonos E.S. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol. Aspects Med.* 35, 1-71, 2014.
55. Kourtis N., Nikoletopoulou V., Tavernarakis N. Small heat-shock proteins protect from heat-stroke-associated neurodegeneration. *Nature* 490, 213-8, 2012.
56. Frantzi M., Makridakis M., Vlahou A. Biomarkers for bladder cancer aggressiveness. *Curr. Opin. Urol.* 22, 390-6, 2012.
57. Frantzi M., Bitsika V., Charonis A., Vlahou A. Proteomics approaches in the quest of kidney disease biomarkers. *Prilozi.* 32, 33-51, 2011.
58. Nikolouli K., Mossialos D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol. Lett.* 34, 1393-403, 2012.
59. Stefanou D.T., Episkopou H., Kyrtopoulos S.A., Bamias A., Gkotzamanidou M., Bamia C., Liakou C., Bekyrou M., Sfikakis P.P., Dimopoulos M.A., Souliotis V.L. Development and validation of a PCR-based assay for the selection of patients more likely to benefit from therapeutic treatment with alkylating drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 74, 842-53, 2012.
60. Pintzas A., Zhivotovsky B., Linardopoulos S., Martinou J.C., Lacal J.C., Robine S., Nasioulas G., Andera L. Sensitization of (colon) cancer cells to death receptor related therapies: a report from the FP6-ONCODEATH research consortium. *Cancer Biol. Ther.* 13, 458-66, 2012.
61. Margoni A., Fotis L., Papavassiliou A.G. The transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling pathway in adipogenesis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 44, 475-9, 2012.
62. Koryllou A., Patrinou-Georgoula M., Dimozi A., Kyrtopoulos S.A., Pletsas V. Investigation of cell death induced by N-methyl-N-nitrosourea in cell lines of human origin and implication of RNA binding protein alterations. *Anticancer Res.* 31, 4291-9, 2011.
63. Zoidakis J., Makridakis M., Zerefos P.G., Bitsika V., Esteban S., Frantzi M., Stravodimos K., Anagnou N.P., Roubelakis M.G., Sanchez-Carbayo M., Vlahou A. Profilin 1 is a potential biomarker for bladder cancer aggressiveness. *Mol. Cell Proteomics.* 11, M111.009449, 2012.
64. Vasilopoulos Y., Manolika M., Zafiriou E., Sarafidou T., Bagiatis V., Krüger-Krasagaki S., Tosca A., Patsatsi A., Sotiriadis D., Mamuris Z., Roussaki-Schulze A. Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Mol. Diagn. Ther.* 16, 29-34, 2012.
65. Mourtas S., Canovi M., Zona C., Aurilia D., Niarakis A., La Ferla B., Salmona M., Nicotra F., Gobbi M., Antimisiaris S.G. Curcumin-decorated

- nanoliposomes with very high affinity for amyloid- $\beta$ 1-42 peptide. *Biomaterials* 32, 1635-45, 2011.
66. Pippa N., Pispas S., Demetzos C. The fractal hologram and elucidation of the structure of liposomal carriers in aqueous and biological media. *Int. J. Pharm.* 430, 65-73, 2012.
67. Pippa N., Pispas S., Demetzos C. The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media: physicochemical and self-assembly studies. *Int. J. Pharm.* 437, 264-274, 2012.
68. Pippa N., Kaditi E., Pispas S., Demetzos C. PEO-b-PCL/DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug incorporation. *Soft Matter* 9, 4073-4082, 2013.
69. Pippa N., Merkouraki M., Pispas S., Demetzos C. DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nanosystems (chi-aDDnSs): physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies. *Int. J. Pharm.* 450:1-10, 2013.
70. Pippa N., Kaditi E., Pispas S., Demetzos C. DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) chimeric nanostructures as potential drug nanocarriers. *J. Nanopart. Res.* 15, 1685, 2013.
71. Pippa N., Psarommati F., Pispas S., Demetzos C. The shape/morphology balance: A study of stealth liposomes via fractal analysis and drug encapsulation. *Pharm. Res.* 30, 2385-95, 2013.
72. Dokoumetzidis A., Karalis V., Iliadis A., Macheras P. The heterogeneous course of drug transit through the body. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 140-6, 2004.
73. Dokoumetzidis A., Macheras P. The changing face of the rate concept in biopharmaceutical sciences: from classical to fractal and finally to fractional. *Pharm. Res.* 28, 1229-1232, 2011.
74. Pippa N., Dokoumetzidis A., Demetzos C., Macheras P. On the ubiquitous presence of fractals and fractal concepts in Pharmaceutical Sciences: A Review. *Int. J. Pharm.* 456, 340-52, 2013.
75. Toska A., Geitona M., Souliotis K., Saridi M., Demetzos C. Adverse Drug Reaction Reporting Related to the Administration of Antibiotics in Hospitalized Pediatric Patients in Greece. *Curr. Drug Saf.* 9, 49-55, 2014.

# Overcoming insufficient fragmentation in single quadruple MS by combining HPLC-UV/Vis with LC/MS: The case of risperidone in terms of the identification point system

Christoforos Labrinea<sup>1,2</sup>, Eleftherios Varverakis<sup>1,2</sup>, Constantinos Pistos<sup>1\*</sup>, Ioannis Dotsikas<sup>2</sup>, Evangelos Gikas<sup>1</sup>, Ioannis Papoutsis<sup>1</sup>, Chara Spiliopoulou<sup>1</sup>, Sotiris Athanasielis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Athens, School of Medicine, Department of Forensic Medicine and Toxicology, Micras Asias 75, Goudi, Athens, Greece

<sup>2</sup>University of Athens, School of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry, Panepistimiopolis – Zografou, 157 71 Athens, Greece

## Abstract

Risperidone has been widely used in the treatment of schizophrenia. From toxicological point of view, risperidone appears to be involved in a number of clinical cases related to abnormal use or overdosage. Although a number of articles report the determination of this drug in biological fluids, until today no study has been conducted to address the problem of limited fragmentation of a single quadrupole mass spectrometer (HPLC–MS/ESI) when assaying risperidone and its active metabolite (9-OH risperidone). In this case confirmation of the analytes is insufficient. In this study, we propose an off-line combined HPLC and LC/MS method in order to collect the appropriate identification points and meet the confirmation criteria as they are set by the EU guidelines. A simple HPLC method has been validated for the determination of Rs and 9-OH Rs in human plasma, using an ODS X'Terra® analytical column. The chromatographic run time is less than 13 min using a mobile phase of 40:60 (v/v) acetonitrile–triethylamine 0.02%, at 1 mL/min flow rate and UV/Vis detection at 280 nm. The method is linear in the concentration range of 3–100 ng/mL for each analyte. The LC/MS

separation of the analytes was performed on a X'Terra® C<sub>8</sub> MS analytical column, using 0.05% formic acid-acetonitrile as mobile phase, under gradient conditions. After extraction of the analytes with Bond Elut certify SPE cartridges, samples were simultaneously off-line injected in the HPLC and LC/MS systems. The method was applied in a clinical sample of toxicological interest and is proposed when inadequate mass fragmentation in a single quadrupole LC/MS does not provide appropriate information to meet confirmation criteria but also for TDM and pharmacokinetic studies.

## Keywords

risperidone; 9-hydroxyrisperidone; HPLC; LC/MS.

## 1. Introduction

Risperidone (Rs) is used in the treatment of schizophrenia and other psychotic syndromes. It is reported that it is effective in the treatment of both positive and negative symptoms of schizophrenia, and that, as other atypical antipsychotics, it is less likely to produce extrapyramidal side effects when compared with classical antipsychotics. The advantages of the thera-

Corresponding Author: Constantinos Pistos, e-mail: cpistos@med.uoa.gr

peutic profile of this drug have led to increasing use of them in treatment of schizophrenic patients<sup>1,2</sup>. However, high doses of this atypical antipsychotic are suspected to pose an increased risk for extrapyramidal side effects or other side effects<sup>3,4</sup>.

Several analytical methods, for the determination of Rs and its active metabolite (9-OH risperidone; 9-OH Rs) in human plasma have been introduced using HPLC-UV/Vis<sup>5-12</sup>, LC with tandem mass spectrometry<sup>13-23</sup> or single quadrupole MS 24, or HPLC-EC detection<sup>25-28</sup>. While UV/Vis and electrochemical detection are known for their selectivity limitations in order to meet the confirmation criteria as they are set in EU guidelines<sup>29</sup>, tandem mass spectrometer appears to be a highly sensitive but high cost solution for a number of laboratories. In this case, LC single-quadrupole MS provides an alterarnative solution for the determination of Rs and 9-OH Rs in biological fluids. However, the only reported method using LC single quadrupole MS does not describe how to overcome the inadequate LC-MS fragmentation of both analytes in human plasma, since in cases of toxicological interest the confirmation of the presence of analytes is a prerequisite.

This paper describes an off-line combined HPLC UV/Vis and LC/MS method for the determination of Rs and 9-OH Rs (Fig. 1A, Rs; 1B, 9-OH Rs) in human plasma by collecting the appropriate identification points (IP; n=4). Initially, the use of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was investigated for the assay of these analytes, without success. GC-MS appears to be problematic for the detection of Rs and 9-OH Rs since both compounds undergo thermal degradation in the gas chromatograph and are not detected in the routine screen<sup>30</sup>. The next step was to investigate the mass fragmentation procedure of both compounds in a liquid chromatography single quadrupole mass spectrometer. The result was a poor number of fragments (1 quantifier ion and 1 qualifier ion for each analyte) and thus we decided to develop a supplementary HPLC UV/Vis method for the determination of these compounds and use it in combination with LC-MS. Using this combined method, the presence of Rs and 9-OH Rs is confirmed by gathering

3.5 IPs (quantifier ion: 1 IP; product ion: 1.5 IPs; retention time: 1 IP) for each analyte from LC/MS (*m/z* 411191, Rs; 427207, 9-OH Rs) [17, 31] and 1 IP (retention time) from HPLC-UV/Vis. The developed HPLC method covers both therapeutic and toxic levels and can be used also for the therapeutic drug monitoring (TDM) and pharmacokinetic studies of Rs.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Reference standards of risperidone, 9-OH risperidone, midazolam (internal standard for HPLC; IS<sub>1</sub>) and imipramine (internal standard for LC/MS; IS<sub>2</sub>) were obtained from LGC Promochem (Molsheim, France). Acetonitrile and MeOH were of HPLC grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was deionized and further purified by means of a Direct-Q water purification system from Millipore SA (Molsheim, France). Formic acid, triethylamine (TEA), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and acetic acid were of analytical grade and were obtained also from Merck. Drug free human plasma was obtained from plasma units of the blood bank of Aglaia Kyriakou Pediatric Hospital (Athens, Greece). X'Terra® C<sub>18</sub> and X'Terra® C<sub>8</sub> MS analytical columns were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

### 2.2. HPLC-UV/Vis conditions

Chromatography was performed with a HPLC system consisting of a Jasco Model 880 PU pump fitted with a model 880-2 Ternary Gradient Unit and a Model 875 UV variable wavelength UV/Vis from Japan Spectroscopic Co. Ltd. (Tokyo, Japan). The pump was used under isocratic conditions on manual mode and detector was operated at 280 nm. The system fitted with a Model 7125 manual injector Rheodyne (Cotati, CA, USA) and a 50 µL sample loop. Samples were chromatographed on a X'Terra® C<sub>18</sub> reversed-phase column (250 × 4.6 mm, 5 µm). Mobile phase was consisted of ACN:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v) with the addition of 0.02% TEA. Flow rate was adjusted at 1.0 mL/min. A Hewlett Packard HP 3394A integrator from Hewlett Packard Company (Avondale, PA, USA) was used to record

chromatograms, at peak area mode (chart speed 0.2 cm/min). A Millipore filtration system from Millipore SA (Molsheim, France) with type HV Millipore filters (pore size 0.45 mm) was used, for degassing the mobile phase under vacuum. Vortex was supplied by Heidolph Instruments GMBH & Co KG (Schwabach, Germany). A Fisher isotemp dry bath Model 145 from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) was used for the evaporation of the extraction solvents.

### 2.3. LC/MS conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a LC 20AB pump equipped with a DGU 20A<sub>s</sub> degasser and a SIL 20AC autosampler, was used for the LC/MS chromatographic separation. Chromatographic separations were achieved on a X'Terra® MS C<sub>8</sub> analytical column (250 x 2.1 mm i.d., 5µm). The mobile phase was consisted of 0.05% formic acid (solvent A), acetonitrile (solvent B) and eluted under the following linear gradient conditions: (A:B; v/v) from 1:99 to 25:75 in 15 min, fast gradient to 1:99 in 15.01 min and then isocratic elution until 40.0 min for re-equilibration. The flow rate was constant (0.25 mL/min) for the first 5 min, increased to 0.4 mL/min from 5.01 min to 25 min and return to 0.25 mL/min for re-equilibration. The analysis run time was 40 min and the injection volume was 10 µL.

The mass spectrometer was a single quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, LCMS 2010EV, Kyoto, Japan) with an electrospray ionization (ESI) source operating in positive mode. Nitrogen was used as drying and nebulizer gas and the instrument parameters were optimized by tuning the [M+H]<sup>+</sup> and product ions of the analytes, by direct infusion of their standard solutions. The Nebulizer gas flow was set to 1.5 L/min. CDL and Heat Block temperatures were optimized and kept at 230C. The appropriate CDL, Q-array DC and Q-array RF voltages were adjusted to 3, 5, 5, and 140V, respectively. Rs and 9-OH Rs were detected using their pseudo-molecular ions [M+H]<sup>+</sup> as quantifier ions (*m/z* 411 for Rs; *m/z* 427 for 9-OH Rs) and their single product ions as qualifier ions (*m/z* 191 for Rs; *m/z* 207 for 9-OH Rs). Imipramine was

detected using its [M+H]<sup>+</sup> (*m/z* 281). Internal standard in LC/MS was switched to imipramine since midazolam appeared to be chromatographically not accepted. The mean retention times of Rs, 9-OH Rs and imipramine were 15.2 for Rs and 9-OH Rs and 16.9 min for imipramine. The data were acquired and processed using the LCMSsolution software (version 3, Shimadzu).

### 2.4. Stock and working standard solutions

A mixed working standard solution of Rs and 9-OH Rs at 10 µg/mL was prepared from their appropriate separate stock solutions of 1 mg/mL. Working solutions at a calibration range of 30-1000 ng/mL were prepared by appropriate dilutions of the 10 µg/mL mixed standard solution with ultrapure water. Working solutions were prepared also for quality control (QC) samples by appropriate dilutions of different batches of stock solutions to obtain final concentrations of 90, 300, and 800 ng/mL. Working standard solution of midazolam (IS) was prepared at 1 µg/mL by dilution of 10 µg/mL standard solution with ultrapure water.

### 2.5. Calibrator and quality control samples

Plasma standards for calibration curves and QC were prepared by spiking 0.9 mL aliquots of drug free human plasma with 100 µL of the appropriate mixed standard solution of Rs and 9-OH Rs, providing a calibration range between 3-100 ng/mL and QC levels at 9, 30, and 80 ng/mL.

### 2.6. Sample extraction

50 µL of midazolam (1 µg/mL) was added to 1 mL of human plasma and the sample was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was extracted in Bond Elut Certify SPE cartridges. The columns were conditioned with 1mL MeOH, 1mL water and 1 mL acetic acid 1M. After loading of sample, the cartridges were washed with 4mL acetic acid and 1mL of butyl-acetate before drying them for 10min. Analytes were eluted with 3mL of MeOH/NH<sub>3</sub> (97/3, v/v). The eluent was then transferred into a 10 mL conical glass tube and evaporated to dryness at room temperature under a

gentle stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 150 µL of ACN:H<sub>2</sub>O 50:50, v/v. An aliquot of 50 µL was injected into the HPLC system and another aliquot of 10 µL was injected into the LC/MS system.

### 2.7. Validation procedure

Calibration graphs of the recovered standards were prepared for each of the three days of analysis to establish linearity and reproducibility of the HPLC system. Graphs were constructed of the analytes versus the IS peak area against drug concentration according to European Union criteria<sup>29</sup>. Spiked human plasma calibrator at seven concentration levels, were prepared and analyzed in three different analytical runs. Weight (1/x<sup>2</sup>) least square linear regression was used to obtain the equations of the calibration curves. QC samples were processed in three replicates at each concentration for three different analytical runs in order to evaluate the intra- and inter-assay precision and accuracy. Specificity was tested by analyzing human plasma spiked with drugs that could be co-administered with Rs (codeine, phenobarbital, clozapine, olanzapine, carbamazepine, venlafaxine, paroxetine, citalopram, clomipramine, mirtazapine, amitriptyline, biperiden, and haloperidol). Concentrations in these mixtures were 1 µg/mL. In addition, six different blank human plasma were analyzed in order to evaluate the absence of interfering peaks in the chromatographs of the analytes and the IS. Carry over was examined each working day by analyzing blank sample after a calibration spiked standard with concentration 100 ng/mL. The recovery was investigated at three levels for Rs and 9-OH Rs (9, 30, and 80 ng/mL) and was calculated by the comparison of six extracted spiked samples to unextracted aqueous standard solutions of the same concentration.

### 2.8. Matrix effects

For the investigation of the signal suppression caused by co-eluting matrix substances in LC/MS, six different blank plasma samples spiked with the analytes at two concentration levels (9, 80 ng/mL) were analyzed. The absolute and relative responses of

Rs and 9-OH Rs in the spiked plasma samples were compared with the results obtained from aqueous standard samples spiked at the same concentration levels.

### 2.9. Application in real samples

A human plasma obtained from clinical case was further assayed according to the proposed HPLC and LC/MS method, in order to investigate its applicability for confirmation purposes.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. HPLC chromatographic conditions optimization

During the preliminary experiments, several combinations of mobile phase composition (ACN:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ACN:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ACN:TEA, MeOH:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MeOH:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MeOH:TEA) and pH (3, 6, 10.5) were investigated, in order to obtain the optimum separation of Rs and 9-OH Rs. It was observed that pH affected the retention times of the analytes and their separation. Decreasing the pH value resulted in an overlapping between the analyte peaks, which consequently led to a separation failure. At higher pH values (>10) 9-OH Rs was sufficiently separated due to the de-protonation of the hydroxy group that led to increased polarity. Therefore, pH 10.5 with the addition of 0.02% TEA was chosen as the optimum value. In addition, as the percentage of acetonitrile decreased, the retention times for the drugs were longer while the separation of the analytes were sufficient until 40% of ACN. At higher values, retention time of the analytes was too short and metabolite's peak overlapped with endogenous compounds. Consequently, the best separation of Rs, 9-OH Rs and midazolam (IS) on the X'Terra® C<sub>18</sub> column was achieved using a mobile phase of 40:60 (v/v) acetonitrile:water with the addition of 0.02% TEA to obtain retention times of 9.8, 7.2 and 12.1 min, respectively.

### 3.2. Sample extraction optimization

Liquid-liquid extraction is known to yield increased ion suppression in LC/MS due to the limited removal

of endogenous components from the plasma matrix. Thus, solid-phase extraction (SPE) was selected in order to achieve the appropriate sensitivity with minimum ion suppression effect. SPE was tested using different columns ( $C_{18}$ , Oasis HLB, ABS Elut Nexus LRC, ISOLUTE® HCX and Bond Elut LRC Certify).  $C_{18}$  columns which favor non-polar interactions, provided increased interferences that prevented the

proper quantitation of the compounds. The same results were obtained even when wash step was modified. OASIS HLB and ABS Elut Nexus cartridges provided low extraction efficiency (<20%) and were rejected. Both columns are characterized by a combination of hydrophilic and lipophilic interactions. Oasis HLB is a hydrophilic-lipophilic balanced, water-wettable made from two monomers; the hydrophilic N-vinylpyrrolidine and the lipophilic divinylbenzene. Bond Elut NEXUS is an ultra-clean polymeric sorbent which has bi-modal porosity and a high surface area. NEXUS offers a non-polar retention mechanism. The optimum recovery was achieved with ISOLUTE® HCX and Bond Elut LRC Certify columns. Both cartridges possess mixed-mode sorbent combining non-polar ( $C_8$ ) and strong cation exchange retention ( $\text{SO}_3^-$ ) mechanisms to isolate basic analytes. Bond Elut LRC Certify columns were finally selected since they require less solvent volume. When using Bond Elut LRC Certify cartridges, the chromatogram was free of interferences and recovery

was found to be 86.95% and 97.52% for Rs and 9-OH Rs, respectively.

### 3.3. Selectivity - Specificity

No endogenous plasma components were eluted at the retention time of the analytes, while none of the spiked drugs interfered with the analyte peaks.

### 3.4. Linearity

The calibration curves were linear in the corresponding dynamic ranges with square correlation coefficient ( $r^2$ ) 0.994 and 0.986 for Rs and 9-OH Rs, respectively (Table 1), while the % RSD of the slopes was 6.73. Figure 2A represents a typical chromatogram of blank plasma sample with the addition of IS while Figure 2B represents a typical chromatogram of spiked plasma sample.

### 3.5. Limits of detection and quantification

LOD and LOQ levels were found to be 1 ng/mL ( $S/N > 3$ ) and 3 ng/mL ( $S/N > 10$ ), respectively, for both analytes (Table 1).

### 3.6. Precision and accuracy

The %RSD of intra- and interday precision were found to be less than 8.3 and less than 11.7, respectively, for both analytes. The % of intra- and interday accuracy were found to be less than 6.4 and less than -9.0, respectively, for both analytes (Table 2).

**Table 1.** Analytical parameters of the calibration equations for the determination of Rs and 9-OH Rs in human plasma  
Mean of three calibration curves; calibration range: 3-100 ng/mL

| Regression equation <sup>a</sup>  | $r^2$ <sup>b</sup> | s.d. <sup>c</sup>    |                      | LOD <sup>d</sup> | LOQ <sup>e</sup> |
|---|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|
|   |                    | Slope                | Intercept            |                  |                  |
| $Rs = 4.7 \times 10^{-2} \times C_{Rs} + 1.4 \times 10^{-2}$                            | 0.994              | $1.3 \times 10^{-2}$ | $1.1 \times 10^{-2}$ | 1.0              | 3.0              |
| $9\text{-OH } R_s = 4.2 \times 10^{-2} \times C_{9\text{-OH } Rs} + 0.7 \times 10^{-2}$ | 0.986              | $1.5 \times 10^{-2}$ | $1.2 \times 10^{-2}$ | 1.0              | 3.0              |

<sup>a</sup> Ratio of the peak area amplitude of the analyte to that of the internal standard, (risperidone,  $Rs$ ; 9-OH risperidone, 9-OH  $Rs$ ) vs. the corresponding concentration;  $C_{Rs}$  is the concentration of risperidone;  $C_{9\text{-OH } Rs}$  is the concentration of 9-OH risperidone

<sup>b</sup> Square correlation coefficient

<sup>c</sup> Standard deviation of slope and intercept

<sup>d</sup> Limit of detection

<sup>e</sup> Limit of quantitation

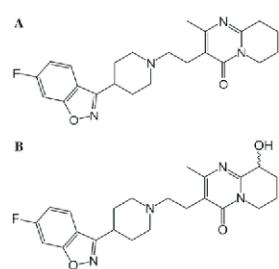
**Table 2.** Intraday and interday accuracy and precision data for risperidone (Rs) and 9-OH risperidone (9-OH Rs) in spiked plasma samples ( $n = 9$ )

| Conc.Added<br>(ng/mL) | Conc. Found<br>(ng/mL) | % R.S.D. | % Er    | Conc. found<br>(ng/mL) | %R.S.D. | % Er |
|-----------------------|------------------------|----------|---------|------------------------|---------|------|
| Rs                    |                        |          | 9-OH Rs |                        |         |      |
| <b>Intraday</b>       |                        |          |         |                        |         |      |
| 9                     | $9.2 \pm 0.7$          | 7.7      | 2.2     | $9.4 \pm 0.86$         | 9.1     | 4.4  |
| 30                    | $28.6 \pm 2.4$         | 8.3      | -4.7    | $27.3 \pm 3.2$         | 11.7    | -9.0 |
| 80                    | $83.7 \pm 4.6$         | 5.5      | 4.6     | $84.7 \pm 6.1$         | 7.2     | 5.9  |
| <b>Interday</b>       |                        |          |         |                        |         |      |
| 9                     | $9.4 \pm 0.7$          | 7.9      | 4.4     | $9.7 \pm 0.91$         | 9.4     | 7.8  |
| 30                    | $29.3 \pm 2.4$         | 8.2      | -2.3    | $27.8 \pm 3.1$         | 11.1    | -7.3 |
| 80                    | $85.1 \pm 5.6$         | 6.6      | 6.4     | $83.8 \pm 6.5$         | 7.8     | 4.8  |

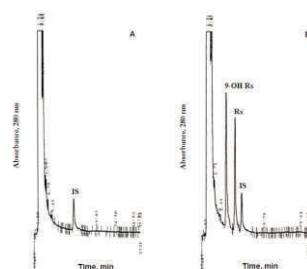
### 3.7. Matrix effect

An important issue in method development of a qualitative or quantitative analysis in biological matrix using LC/MS, is the potential occurrence of matrix effects, defined as the effect of co-eluting residual matrix components on the ionization of the target analyte. Although the interferences may remain

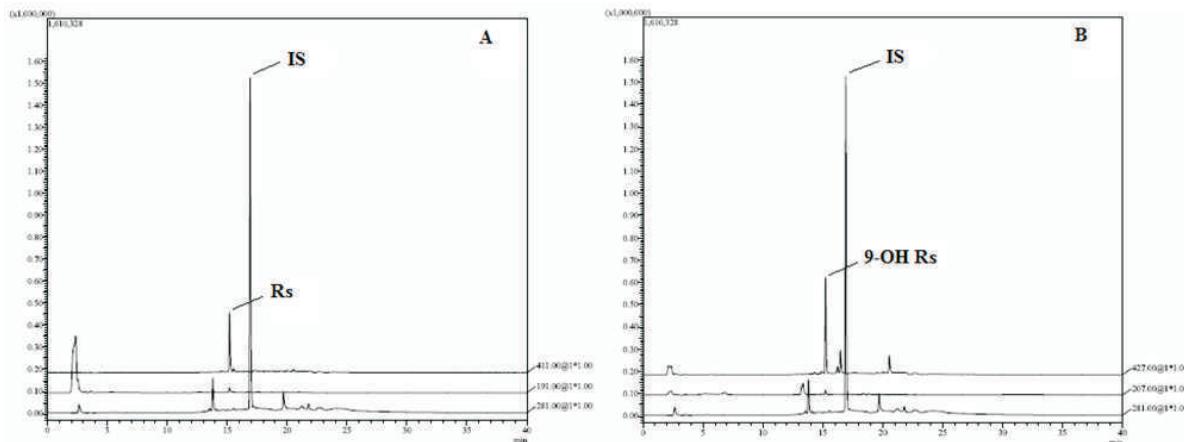
undetected because of the selectivity of the MS detection, they do affect the reproducibility and accuracy of the developed procedure<sup>32,33</sup>.



**Figure 1.** Chemical structure of A: risperidone, Rs and B: 9-OH risperidone, 9-OH Rs



**Figure 2.** Representative HPLC chromatogram obtained from the analysis of A) blank plasma sample; midazolam (IS) ( $t_r=12.2$  min), and B) spiked plasma sample with risperidone (Rs;  $t_r=9.8$  min), 9-OH risperidone (9-OH Rs;  $t_r=7.2$  min) and midazolam (IS;  $t_r=12.2$  min)



**Figure 3.** LC/MS chromatogram obtained from the analysis of a clinical plasma sample (Risperidone, Rs,  $t_r = 12.5$  min,  $m/z$  411191; 9-OH Risperidone, 9-OH Rs,  $t_r = 12.5$  min,  $m/z$  427207; Imipramine, IS,  $t_r = 16.9$  min,  $m/z$  281)

In this study, the responses of Rs and 9-OH Rs were affected by the matrix no more than 20% while plasma components did not appear to affect the column efficacy. In this case the use of an internal standard is equally affected by fluctuations in detector response and ionization efficiency as the analytes and the IS and the analytes possess similar physicochemical characteristics.

### 3.8. Clinical case

In voluntary drug intoxications, the ingested dose and the beginning of intoxication are often unknown. Nevertheless, the expected concentrations are generally above the therapeutic concentration. The therapeutic concentrations of Rs and 9-OH Rs range between 4-30 ng/mL and 12-60 ng/mL, respectively<sup>34</sup>. By using the proposed method we were able to confirm the presence of Rs and 9-OH Rs in a clinical sample and manage a case of Rs poisoning by a child. A typical patient LC/MS chromatogram is shown in Fig 3.

## Conclusions

In general unknown screening where any prior use of medications is not known, HPLC-UV/Vis cannot be used alone since other drugs may interfere with Rs and 9-OH Rs. In addition, the fact that the identification of Rs and 9-OH Rs in plasma using GC-MS is problematic has led the toxicologists to the application

of LC-MS or LC-MS/MS instrumentation for this assay. Today, most toxicological laboratories analyze Rs and 9-OH Rs in human plasma using high cost instrumentation such as LC tandem MS systems. LC interfaced with single quadrupole MS usually provides insufficient fragmentation to analytes which does not allow the proper meet of the confirmation criteria. In such a case the use of an additional technique is commonly used in order to collect the required identification points. In this, study, we report for first time a simplified combined HPLC with LC/MS method which allows the simultaneous off-line detection and confirmation of the presence of Rs and 9-OH Rs in human plasma. The proposed method can be used for the toxicological investigation of Rs intoxication cases. For TDM or/and pharmacokinetic studies where any prior use of medication can be controlled, the calibration range of the HPLC-UV/Vis assay allows additionally the determination of Rs and 9-OH Rs levels without interfering of any other undesirable drugs.

## **Overcoming insufficient fragmentation in single quadruple MS by combining HPLC-UV/Vis with LC/MS: The case of risperidone in terms of the identification point system**

**Χρ. Λαμπρινέας<sup>1,2</sup>, Ε. Βαρβεράκης<sup>1,2</sup>, Κ. Πίστος<sup>1\*</sup>, Ι. Ντότσικας<sup>2</sup>, Ε. Γκίκας<sup>2</sup>, Ι. Παπουτσής<sup>1</sup>, Χ. Σπηλιοπούλου<sup>1</sup>, Σ. Αθανασέλης<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργ. Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, M. Ασίας 75, 11527-Γούδη, Αθήνα, Ελλάδα<sup>2</sup> Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Πανεπιστημιούπολη-Ζωγράφου, 15771-Αθήνα, Ελλάδα*

### **Περίληψη**

Η Ρισπεριδόνη (Rs) χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας. Η εμπλοκή της σε μεγάλο αριθμό κλινικών περιστατικών σχετίζεται με μη φυσιολογική χρήση ή υπερδοσολογία με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός της στα βιολογικά υγρά να αποκτά ιδιαίτερο τοξικολογικό ενδιαφέρον. Παρά το γεγονός ότι μια σειρά από επιστημονικές δημοσιεύσεις αναφέρουν τον προσδιορισμό της ρισπεριδόνης και του ενεργού μεταβολίτη της (9-OH ρισπεριδόνη, 9-OH Rs), μέχρι σήμερα δεν έχει διεξαχθεί μελέτη για την αντιμετώπιση του προβλήματος της περιορισμένης θραυσματοποίησης τους όταν αντή εμφανίζεται σε φασματοφωτόμετρο μαζών απλού τετραπόλου (HPLC-MS/ESI). Σε αυτή την εργασία, προτείνουμε μια συνδυαστική μέθοδο υγρο-χρωματογραφίας υπερώδωνυζορατού (HPLC-UV/Vis) και υγροχρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών (LC/MS), προκειμένου να συλλεχθεί ο κατάλληλος αριθμός σημείων ταυτοποίησης για την κάλυψη των κριτηρίων ταυτοποίησης όπως αυτά καθορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Επικυρώθηκε μία απλή μέθοδος

HPLC-UV/Vis για τον προσδιορισμό της Rs και της 9-OH Rs σε πλάσμα, με χρήση της αναλυτικής στήλης X-Terra® ODS. Ο χρωματογραφικός χρόνος ανάλυσης είναι μικρότερος από 13 λεπτά χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση 40:60 (v/v) ακετονιτρίλιο-τριαιθυλαμίνη 0.02%, με ρυθμό ροής 1 mL/λεπτό. Ο ανιχνευτής UV/Vis ρυθμίστηκε στα 280 nm. Η μέθοδος είναι γραμμική σε εύρος 3-100 ng/mL για κάθε αναλύτη. Ο διαχωρισμός των αναλύτων στο σύστημα LC/MS πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη X-Terra® C<sub>8</sub> MS, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση 0,05% μυρμηκικό οξύ-ακετονιτρίλιο και βαθμιδωτή έκλουση. Οι αναλύτες εκχυλίστηκαν με χρήση στηλών Bond Elut certify και στη συνέχεια εγχύθηκαν ταυτόχρονα στα συστήματα HPLC και LC/MS. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε κλινικό δείγμα με τοξικολογικό ενδιαφέρον και προτείνεται όταν η περιορισμένη θραυσματοποίηση σε απλό τετραπόλο LC/MS δεν επιτρέπει την πλήρη ταυτοποίηση των αναλύτων, για την παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων του φαρμάκου και φαρμακοκινητικές μελέτες.

---

**Συγγραφέας αλληλογραφία:**  
Κωνσταντίνος Πίστος ([cpistos@med.uoa.gr](mailto:cpistos@med.uoa.gr))

### **References**

1. Li K.Y., Li H.D. An Atypical Antipsychotic of Pharmacokinetics of Quetiapine. *Chin. J. Clin. Pharmacol.* 3, 227231, 2002.
2. Ereshefsky L. Pharmacokinetics and drug interactions: update for new antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry.* 57, 12-25, 1996.
3. Davis P.C., Wong J., Gefvert O. Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 271-282, 1999.

4. Raggi M.A. Therapeutic drug monitoring: chemical-clinical correlations of atypical antipsychotic drugs. *Curr. Med. Chem.* 14, 1397-1349, 2002.
5. Titier K., Déridet E., Cardone E., Abouelfath A., Moore N. Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 772, 373-378, 2002.
6. Olesen O.V., Linnet K.J. Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in serum from patients comedicated with other psychotropic drugs. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 698, 209-216, 1997.
7. Mercolini L., Grillo M., Bartoletti C., Boncompagni G., Raggi M.A. Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 235-243, 2007.
8. Titier K., Bouchet S., Péhourcq F., Moore N., Molimard M. High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 788, 179-185, 2003.
9. Nagasaki T., Ohkubo T., Sugawara K., Yasui N., Furukori H., Kaneko S. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to therapeutic drug monitoring in Japanese patients with schizophrenia. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 595-601, 1999.
10. LLerena A., Berecz R., Dorado P., de la Garza C.S., Norberto M.J., Cáceres M., Gutiérrez J.R.. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of CYP2D6 drug interactions. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 783, 213-219, 2003.
11. Avenoso A., Facciola G., Salemi M., Spina E. Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 746, 173-181, 2000.
12. Jones T., Van Breda K., Charles B., Dean A.J., McDermott B.M., Norris R. Determination of risperidone and 9-Hydroxyrisperidone using HPLC, in plasma of children and adolescents with emotional and behavioural disorders. *Biomed. Chromatogr.* 23, 929-934, 2009.
13. Fisher D.S., Partridge S.J., Handley S.A., Couchman L., Morgan P.E., Flanagan R.J. LC-MS/MS of some antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and heamolysed whole blood. *Forensic Sci. Int.* 229, 145-150, 2013.

14. De Meulder M., Remmerie B.M., de Vries R., Sips L.L., Boom S., Hooijsscher E.W., van de Merbel N.C., Timmerman P.M. Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 870, 8-16, 2008.
15. Huang M.Z., Shentu J.Z., Chen J.C., Liu J., Zhou H.L. Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9, 114-120, 2008.
16. Kousoulos C., Dotsikas Y., Loukas Y.L. Turbulent flow and ternary column-switching on-line clean-up system for high-throughput quantification of risperidone and its main metabolite in plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study. *Talanta.* 72(2):360-367, 2007.
17. Čabovska B., Cox S.L., Vinks A.A. Determination of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 852, 497-504, 2007.
18. Bhatt J., Subbaiah G., Singh S. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2109-2114, 2006.
19. Moody D.E., Laycock J.D., Huang W., Foltz R.L. A high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometric method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *J. Anal. Toxicol.* 28, 494-497, 2004.
20. Flarakos J., Luo W., Aman M., Svinarov D., Gerber N., Vouros P. Quantification of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma and saliva from adult and pediatric patients by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1026, 175-183, 2004.
21. Kratzsch C., Peters F.T., Kraemer T., Weber A.A., Maurer H.H. Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 38, 283-295, 2003.
22. Remmerie B.M., Sips L.L., de Vries R., de Jong J., Schothuis A.M., Hooijsscher E.W., van de Merbel N.C. Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 783, 461-472, 2003.
23. Aravagiri M., Marder S.R. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 35, 718-724, 2000.

24. Zhou Z., Li X., Li K., Xie Z., Cheng Z., Peng W., Wang F., Zhu R., Li H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 802, 257-262, 2004.
25. Locatelli I., Mrhar A., Grabnar I. Simultaneous determination of risperi-done and 9-hydroxyrisperidone enantio-mers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 905-910, 2009.
26. Aravagiri M., Marder S.R., Wirshing D., Wirshing W.C. Plasma concentrations of risperidone and its 9-hydroxy metabolite and their relationship to dose in schizo-phrenic patients: simultaneous determi-nation by a high performance liquid chro-matography with electrochemical detection. *Pharmacopsychiatry.* 31, 102-109, 1998.
27. Le Moing J.P., Edouard S., Levron J.C. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chro-matogr.* 614, 333-339, 1993.
28. Aravagiri M., Marder S.R., Van Putten T., Midha K.K. Determination of risperidone in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to therapeutic drug monitoring in schizophrenic patients. *J. Pharm. Sci.* 82, 447-449, 1993.
29. Commission decision (2002/657/EC) concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities* L221, 8-36, 2002, Brussels, Belgium.
30. Springfield A.C., Bodiford E. An over-dose of risperidone. *J. Anal. Toxicol.* 20, 202-203, 1996.
31. Borova V.L., Maragou N.C., Gago-Ferrero P., Pistros C., Thomaidis N.S. Hi-ghly sensitive determination of 68 psycho-active pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014 (in press; PMID: 24788889).
32. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019-3030, 2003.
33. Annesley T.M., Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 49, 1041, 2003.
34. Drug concentration list. Available from Internet: <http://www.tiaft.org/> (TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists; member login page) (Accessed 6 May 2014).

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ 26, ΙΙ, 2014

PHARMAKEFTIKI 26, II, 2014

**August 31-September 4, 2014**  
St. Petersburg, Russia.**20th EuroQSAR**  
**Understanding Chemical-Biological Interactions**  
Info: [www.euroqsar2014.org](http://www.euroqsar2014.org)

\* \* \*

**September 7-11, 2014**  
Lisbon, Portugal.**XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry.**  
Info: [www.efmc-ismc.org](http://www.efmc-ismc.org)

\* \* \*

**September 8-10, 2014,**  
Antalya, Turkey.**17th International Pharmaceutical Technology Symposium - IPTS2014 - Pharmaceutical Nanotechnology: Innovations, Therapeutic Possibilities and Technological Challenges.**  
Info: [www.ips-hacettepe.org](http://www.ips-hacettepe.org)

\* \* \*

**September 10-11, 2014,**  
Munich, Germany**Introduction to Quantitative Pharmacology and PK/PD.**  
Info: [www.lakemedelsakademien.se/munich2014](http://www.lakemedelsakademien.se/munich2014)**September 12, 2014,**  
Lisbon**EFMC-YMCS 1st Young Medicinal Chemist Symposium**  
University of Lisbon, Faculty of Pharmacy, Portugal  
Info: [www.efmc-ymcs.org](http://www.efmc-ymcs.org)

\* \* \*

**September 23-25, 2014**  
Rimini, Italy.**Summer School in Pharmaceutical Analysis (SSPA)**  
Info: [www.users2.unimi.it/SSPA/](http://www.users2.unimi.it/SSPA/)

\* \* \*

**October 9-11, 2014**  
Patra, Greece.**2nd Pharmaceutical Sciences Conference: of Research In Society**  
Info: [www.pharmacy.upatras.gr](http://www.pharmacy.upatras.gr)

\* \* \*

**November 13-15, 2014**  
Royal Olympic Hotel Athens, Greece.Organizers: Hellenic Pharmaceutical Society, Hellenic Society of Medicinal Chemistry, International Liposome Society  
Contact Person: Mrs. Irene Katti, tel.: 0030 211 100 1783, [i.ka@zita-congress.gr](mailto:i.ka@zita-congress.gr)

\* \* \*

**June 7-11, 2015**  
Athens, Greece.**IX Joint Meeting on Medicinal Chemistry**  
Info: [www.jmmc2015.gr](http://www.jmmc2015.gr)

## Νέα από την ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ



### ΗΜΕΡΙΔΕΣ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗΣ & ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

**Φαρμακοποιών Φαρμακείων από την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία**



Κωνσταντίνος Δεμέτζος  
Πρόεδρος ΕΦΕ

Ολοκληρώθηκε ο Α κύκλος των Ημερίδων Επιμόρφωσης και Εκπαίδευσης Φαρμακοποιών Φαρμακείου' που διοργάνωσε η Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία (Ε.Φ.Ε) σε συνεργασία με τους τοπικούς Φαρμακευτικούς Συλλόγους. Η πρωτοβουλία αυτή της Ε.Φ.Ε. εντάσσεται στα πλαίσια των στόχων της για την προώθηση της δια βίου εκπαίδευσης των φαρμακοποιών σε μια εποχή δραματικών εξελίξεων στην Επιστήμη και Τεχνολογία αλλά και στις κοινωνικές απαιτήσεις της πρωτοβάθμιας περιθαλψης . Οι εξελίξεις αυτές επιβάλλουν όσο ποτέ την ανάδειξη του επιστημονικού ρόλου του φαρμακοποιού προς όφελος της αποτελεσματικότερης και ασφαλούς θεραπείας των ασθενών, αλλά και της δημόσιας υγείας γενικότερα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 9 ημερίδες από το Μάρτιο μέχρι το Μάιο 2014 μετά από αίτημα των τοπικών φαρμακευτικών Συλλόγων και τη συμβολή της εταιρείας Zita-Congress όσον αφορά στο οργανωτικό σκέλος . Αναλυτική αναφορά στις τρεις πρώτες ημερίδες που έλαβαν χώρα σε Τρίπολη, Κομοτηνή και Ναύπλιο σε συνεργασία με τους Φαρμακευτικούς Συλλόγους Αρκαδίας, Έβρου και Αργολίδας αντίστοιχα, φιλοξενείται στη 'Φαρμακευτική' 25, I, 2014.

**Ακολούθησαν οι εξής εκδηλώσεις με μεγάλη συμμετοχή φαρμακοποιών :**

**Κυριακή 30 Μαρτίου, Βραχάτι , σε συνεργασία με τον Φ.Σ. Κορινθίας. Ιδιαίτερα σημαντική η υποστήριξη της Προέδρου του Συλλόγου κ. Μπάρτζη, αλλά και των κ. Δημητρίου, Κεχαγιά και Κλοκώνη.**

**Αναπτύχθηκαν τα εξής θέματα:**

- *Η συμβολή των εκδόχων στη θεραπευτική αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, από τον Καθηγητή κ. Δεμέτζο Κων/vo.*



Φ.Σ. Κορινθίας, 30/03/2014

- Η φαρμακοεπαγρύπνηση και η θέση της μέσα στο κοινοτικό φαρμακείο, από τον φαρμακοποιό κ. Παπαδόπουλο Ιωάννη.
- Φαρμακευτικό Φροντιστήριο: Σταθερότητα Φαρμακοτεχνικών Προϊόντων & Ιδιοσκευασμάτων, από την Επικ. Καθηγήτρια κ. Χατζηαντωνίου Σοφία.  
Ομιλία AstraZeneca: Άσθμα: Βασικές αρχές στη διάγνωση και θεραπεία, από την κα Χριστάρα Αθανασία.

**Κυριακή 6 Απριλίου, Καστοριά,** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Καστοριάς, και την ιδιαίτερα σημαντική υποστήριξη του Προέδρου κ. Παπαλάμπρου και του κ. Μπαϊρακτάρη.



Φ.Σ. Καστοριάς, 06/04/2014

#### Η θεματολογία ήταν η ακόλουθη:

- Τα φυσικά προϊόντα στο φαρμακείο και η ασφαλής χρήση τους. Νέα προοπτική ανάπτυξης και ανάδειξης του ρόλου του φαρμακοποιού, από την Καθηγήτρια κα Χήνου Ιωάννα.
- Η φαρμακοεπαγρύπνηση και η θέση της μέσα στο κοινοτικό φαρμακείο, από τον Φαρμακοποιό κ. Παπαδόπουλο Ιωάννη.  
Ομιλία Pfizer: Σεξουαλική Δυσλειτουργία στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας - Ο ρόλος του φαρμακοποιού, από την Καθηγήτρια κ. Κούβελα Δημήτρη.

**Κυριακή 27 Απριλίου, Μυτιλήνη,** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Λέσβου και την πολύτιμη βιοήθεια του Προέδρου κ. Βαλτά Αποστόλου καθώς και της την κας Πιπεράκη.



Φ.Σ. Λέσβου, 27/04/2014

#### Αναπτύχθηκαν τα εξής θέματα:

- Η συμβολή των εκδόχων στην θεραπευτική αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, από τον Καθηγητή κ. Δεμέτζο Κωνσταντίνο.
- Τα φυτικής προέλευσης σκευασμάτα στο φαρμακείο. Ρυθμιστικό πλαίσιο και ασφάλεια χρήσης, από την Καθηγήτρια κα Χήνου Ιωάννα.
- Φαρμακευτικό Φροντιστήριο: Σταθερότητα φαρμακευτικών προϊόντων, από την Καθηγητή κ. Δεμέτζο Κωνσταντίνο.  
Ομιλία AstraZeneca: Άσθμα: Βασικές αρχές στη διάγνωση και θεραπεία, από τον κ. Θεοδοσίου Παναγιώτη.

**Κυριακή 11 Μαΐου, Αλεξανδρούπολη,** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Έβρου και το Προέδρου κ. Τερζή και το Αντιπροέδρου κ. Παπανδρέου.

#### Αναλύθηκαν τα εξής θέματα:

- Παρακολούθηση των θεραπευτικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων. Πρακτικές αρχές



Φ.Σ. Έβρου, 11/05/2014

για την εφαρμογή της στην κλινική πράξη, από την Αναπλ. Καθηγήτρια κα Αττά-Πολίτου Τζούλια.

- **Καινοτόμα Φάρμακα, από τον Φαρμακοποιό κ. Μποσκόπουλο Πάρη-Γρηγόρη.**
- **Φαρμακευτικό Φροντιστήριο: Η σημασία της πρωτεϊνικής σύνδεσης στη θεραπευτική παρακολούθηση της στάθμης των φαρμάκων, από την Αναπλ. Καθηγήτρια κα Αττά-Πολίτου Τζούλια.**

Ομιλία AstraZeneca: **Άσθμα: Βασικές αρχές στην διάγνωση και θεραπεία, από τον Επικ. Καθηγητή κ. Στειρόπουλο Πασχάλη.**

**Σάββατο 17 Μαΐου, Τρίκαλα,** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Τρικάλων και τη θερμή υποστήριξη του Προέδρου κ. Μάνου.



Φ.Σ. Τρικάλων, 17/05/2014

#### **Αναπτύχθηκαν τα ακόλουθα θέματα:**

- **Φαρμακευτική Φροντίδα – Ορθή Φαρμακευτική Πρακτική, από την Καθηγήτρια κα Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα.**
  - **Διακοπή Καπνίσματος: Νέες εξελίξεις. Ο ρόλος του φαρμακοποιού, από τον κ. Παπαχρήστο Απόστολο.**
  - **Φαρμακευτικό Φροντιστήριο: Καινοτόμα Φάρμακα, από τον κ. Μποσκόπουλο Πάρη-Γρηγόρη.**
- Ομιλία AstraZeneca: **Άσθμα: Βασικές αρχές στην διάγνωση και θεραπεία, από την Αναπλ. Καθηγήτρια κα Δανιήλ Ζωή.**
- Ομιλία Blesstia Pharmaceutical: **Σύγχρονες Ομοιοπαθητικές Εφαρμογές, από τη Φαρμακοποιό κα Στεργίου Ελευθερία**

**Σάββατο 24 Μαΐου, Βόλος,** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Μαγνησίας και Αλμυρού και τη θερμή υποστήριξη του Πρόεδρο κ. Ματσιόλη.

#### **Αναλύθηκαν τα εξής θέματα:**

- **Φαρμακοεπαγρύπνηση. Ηλεκτρονική Υγεία, από τον Καθηγητή κ. Δεμέτζο Κωνσταντίνο.**
- **Εισαγωγή στα Καινοτόμα Φάρμακα, από το Φαρμακοποιό κ. Μποσκόπουλο Πάρη-Γρηγόρη.**
- **Φαρμακευτικό Φροντιστήριο: Ο ρόλος των εκδόχων, από τον Καθηγητή κ. Δεμέτζο Κωνσταντίνο.**

Ομιλία Pfizer: **Σεξουαλική Δυσλειτουργία στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας- Ο ρόλος του φαρμακοποιού, από τον Καθηγητή κ. Κούβελα Δημήτρη.**

Ομιλία AstraZeneca: **Άσθμα: Βασικές αρχές στην διάγνωση και θεραπεία, από την λέκτορα κα Κερενίδη Νόρα.**

Ομιλία KaboNatura: **Καινοτόμα Ιατροτεχνολογικά Προϊόντα από την Aboca. Μια**

**ασφαλής & αποτελεσματική προσέγγιση σε απλές καθημερινές ανάγκες, από τον κ. Λουκά Βαγγέλη.**

Ομιλία abcKinitron: *Hyaluron* (Βιοσυνθετικό Υαλουρονικό οξύ πολύ υψηλού μοριακού βάρους) «Ελιξήριο Ζωής», ή ένα ακόμα προϊόν μόδας; , από τον Μοριακό Βιολόγο κ. Γιαννόπουλο Γεώργιο.

Ομιλία BLESSTIA: *Σύγχρονες Ομοιοπαθητικές Εφαρμογές*, από τον Φαρμακοποιό κ. Τσιούτσια Βασίλειο.

**Μετά την επιτυχία του Α' κύκλου των Ημερίδων Επιμόρφωσης και Εκπαίδευσης Φαρμακοποιών Φαρμακείου' η ΕΦΕ προχωρεί στη διοργάνωση του Β' κύκλου ο οποίος ξεκινά το Σεπτέμβριο του 2014.**

**Το πρόγραμμα έχει διαμορφωθεί ως εξής:**

- **Κυριακή 21/9/2014, Χανιά**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Χανίων και τον Φ.Σ. Ρεθύμνου.
- **Κυριακή 5/10/2014, Ιωάννινα**, σε συνεργασία με τον Φ.Σ. Ιωαννίνων.
- **Κυριακή 12/10/2014, Πάτρα**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Πατρών.
- **Κυριακή 19/10/2014, Λάρισα**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Λάρισας.
- **Σάββατο 1/11/2014, Μεσολόγγι**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Αιτωλοακαρνανίας.
- **Σάββατο 8/11/2014, Σέρρες**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Σερρών.
- **Κυριακή 23/11/2014, Κέρκυρα** σε συνεργασία με το Φ.Σ. Κέρκυρας.
- **Σάββατο 29/11/2014, Θεσσαλονίκη**, σε συνεργασία με το Φ.Σ. Θεσσαλονίκης.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις Ημερίδες και τη συμμετοχή σε αυτές επισκε-φτείτε την **ιστοσελίδα** της ΕΦΕ [www.efe.org.gr](http://www.efe.org.gr) ή επικοινωνήστε με την κ. Φοίβη Καραουλάνη στο τηλ. **211 100 1764** ή ηλεκτρονικά στη διεύθυνση [f.karaoulanis@zita-management.com](mailto:f.karaoulanis@zita-management.com).



Διοργανώτρια εταιρεία  
**ZITA MEDICAL MANAGEMENT**  
1ο χλρ. Λεωφ. Παιανίας Μαρκοπούλου, Παιανία, τ.κ.19002  
Τ: 211 1001777 - Φ: 210 6642116  
[info@zita-congress.gr](mailto:info@zita-congress.gr) - [www.zita-congress.gr](http://www.zita-congress.gr)

Ευχαριστούμε θερμά τις εταιρείες, οι οποίες μέσω της ενεργούς παρουσίας και συμμετοχής τους στις Επιμορφωτικές Ημερίδες της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας συμβάλλουν στην προώθηση της Επιστημονικής Γνώσης.

### ΧΡΥΣΟΙ ΧΟΡΗΓΟΙ



### ΑΡΓΥΡΟΙ ΧΟΡΗΓΟΙ



### ΧΟΡΗΓΟΙ



## ΧΟΡΗΓΟΙ



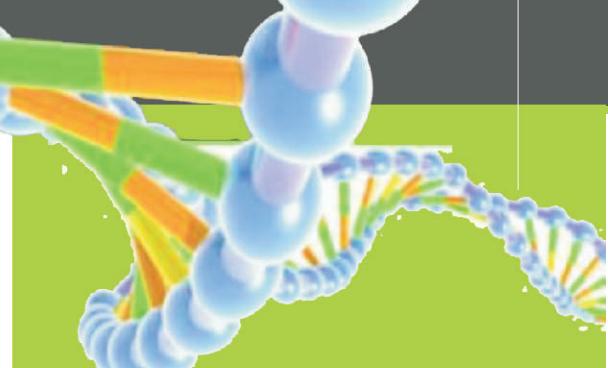
HERBS / COOPERATIONS / EXTRACtIONS / RESEARCH  
**KORRES**



## ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΗΣ

## ΧΟΡΗΓΟΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ





# 1<sup>st</sup> International Congress: from drug discovery to drug delivery

**Chair of the Congress:**  
Prof. Gregory Gregoriadis

**Co-chairs:**  
Prof. Costas Demetzos  
Prof. A. Tsantili-Kakoulidou

## Organizers:



Hellenic Pharmaceutical Society



Hellenic Society of Medicinal Chemistry



International Liposome Society

13-15  
November  
2014  
Royal Olympic Hotel  
Athens, Greece



Organizational Support

Contact: Mrs. Irene Katti,  
tel. 0030 211 1001783,  
[i.ka@zita-congress.gr](mailto:i.ka@zita-congress.gr)



**32  
years**

**of top quality services in tourism**

congresses, corporate events & incentives, travel & yachting, association management

## **ZITA CONGRESS & TRAVEL**

unique offers and packages for airflight - boat reservations & hotel bookings around the world



1st km. Peanias - Markopoulou Avenue, 19002 - Peania, Attica - GREECE  
t: +30 211 100 1777, f: +30 211 100 1779

[www.zita-congress.gr](http://www.zita-congress.gr)

**FOLLOW  
LIKE  
SHARE US**



LinkedIn YouTube



We've made it a science!



from vision to reality...

- Sponsorship
- Scientific Journals
- Website & Digital Marketing
- Financial
- Graphic Design
- Media Office
- Congress Organization
- Travel Services

[www.zita-management.com](http://www.zita-management.com)

FOLLOW

LIKE  
SHARE

US



LinkedIn

YouTube



# transit ELUSANES

Συμπλόκωμα διατροφής  
Ακαία-Δαμάσκηνο-Οξφούλικας  
(tamarin)  
100% φυσικής προέλευσης

# URISANOL gelules

Συμπλόκωμα διατροφής  
Cranberry  
36 mg προαγθοκανδινών



► Δύο νέα προϊόντα

από την



Pierre Fabre  
PHARMA S.A.

Τηλ. 210 72 34 582



ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ

ΦΑΡΜΑΣΕΡΒ-ΛΙΛΛΥ Α.Ε.Β.Ε.



Αναγεννητικός παράγοντας  
που επουλώνει τα έλκη διαβητικού ποδιού αποτελεσματικά<sup>1</sup>

# CACIPLIQ<sup>®</sup> RGTA<sup>®</sup>



A.K.P.Cat 12\_2013

ADMININE / ▶H<sup>®</sup> dicas art:

Τώρα γίνεται.

◎ Σε σύντομο χρονικό διάστημα ◎ Με εύκολη εφαρμογή ◎ Μειώνοντας δραστικά τον πόνο

1. I.Slim et al, Journal of Wound Technology 2012;17



ΦΑΡΜΑΣΕΡΒ - ΛΙΛΛΥ Α.Ε.Β.Ε. 15ο χλμ. Εθνικής Οδού Αθηνών-Λαμίας, 14564 Κηφισιά,  
τηλ.: 210 6294600 fax: 210 6294610, Τ.Θ. 51288

Γραφεία Θεσσαλονίκης: Αδριανουπόλεως 24, 551 33 Καλαμαριά, Θεσσαλονίκη τηλ.: 2310 480160  
Για παραγγελίες: τηλ.: 210 6294629 fax: 210 6294630 e-mail: [orders@lilly.gr](http://orders@lilly.gr) [www.lilly.gr](http://www.lilly.gr)