



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

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

ISSN 2241-3081

ΤΟΜΟΣ 26 | ΤΕΥΧΟΣ III | ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014
VOLUME 26 ISSUE III | JULY - SEPTEMBER 2014

ΣΥΝΤΗΤΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ: SILDENAFIL/PFIZER, ΕΠΙΧΑΛΥΜΜΕΝΑ ΜΕ ΛΑΤΟ ΥΜΕΝΙΟ ΔΙΣΚΙΑ 25, 50 και 100mg, ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ: Θεραπεύει άνδρες με δυσλειτουργία στύσης, η οποία είναι η ανακάλυψη να επιτυγχάνει να διατηρήσει ο ασθενής επαρκή στύση ώστε να έχει ικανοποιητική σεξουαλική δραστηριότητα. Για να φέρει αποτέλεσμα το Sildenafil/Pfizer πρέπει να υπάρχει σεξουαλική διέγερση. **ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΕΙΣ:** Υπερτασιογόνα από δράση οπτική ή σε οποιοδήποτε από τα όργανα. Σύμφωνα με τη γνώση επίδραση του επί της μεμβράνης οδού μονοφώσφο του αζώτου/κυκλικής μονοφωσφορικής γουανιλίνης (cGMP), το sildenafil έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει το υποστόμο αποτέλεσμα των νητρικών και επομένως αντενδείκνυται η συγχρήση του με άλλες μονοξείδι του αζώτου (ήπως τα νητρώα αζώτου) σε οποιαδήποτε μορφή. Τα φάρμακα για τη θεραπεία της δυσλειτουργίας στύσης, συμπεριλαμβανομένου του sildenafil, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται από άνδρες στους οποίους δεν συνιστάται η σεξουαλική δραστηριότητα (π.χ. ασθενείς με παρόχιες καρδιαγγειακές διαταραχές, όπως ασταθής στήθρα ή σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια). Το Sildenafil/Pfizer αντενδείκνυται σε ασθενείς με αστάθεια της όρασης στην ένα οφθαλμό λόγω μη-αρτηριακής παρόχιης ισχαιμικής οπτικής νευροπάθειας (NAION), ανεξάρτητα από το αν το συμβάν αυτό έχει συμβεί πρόσφατα ή όχι προηγούμενη χορήγηση ενός αναστολέα της PDE5 (βλέπε παράγραφο Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση). Η αστάθεια του sildenafil δεν έχει μελετηθεί στις ακόλουθες υποκατηγορίες ασθενών και επομένως αντενδείκνυται η χρήση του στους ασθενείς αυτούς: ασθενή ηπαιτική ανεπάρκεια, υποστάση (αρτηριακή πίεση < 90/50 mmHg), πρόσφατο ιστορικό εγκεφαλικού επεισοδίου ή εγκεφαλικού ισχαιμικού επεισοδίου, εγκεφαλική αμφιβληστροειδοπάθεια (μεταβολή των ασθενών αυτών παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες στις αμφιβληστροειδικές φωσφοδιεστεράσες). **ΕΙΔΙΚΕΣ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ:** Πρέπει να προηγείται κλινική ιστορικό και φυσική εξέταση του ασθενή, όπως ώστε να διαγνωστεί η δυσλειτουργία στύσης και να καθοριστούν τα πιθανά υποκείμενα αίτια, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο χορήγησης φαρμακευτικής αγωγής. Ο ιστός πρέπει να είναι κλειστή της καρδιαγγειακής κατάστασης του ασθενούς πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας για τη δυσλειτουργία στύσης, εφόσον υπάρχει κάποια πιθανότητα βλάβης καρδιαγγειακής επείγουσα σε συσχέτιση με την σεξουαλική δραστηριότητα. Το sildenafil παρουσιάζει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες που προκαλούν ήπια και παροδική μείωση της αρτηριακής πίεσης. Πριν τη συνταγογράφηση του sildenafil, ο ιστός πρέπει να εξεταστεί με προσοχή εάν ασθενείς με ορισμένες υποκείμενες νόσους θα μπορούσαν να επηρεαστούν δυσμενώς από παρόμοια αναοξυδοποιητική επίδραση του φαρμάκου και ιδιαίτερα σε συσχέτιση με σεξουαλική δραστηριότητα. Στους ασθενείς με αυξημένη ευαισθησία στα αγγειοδιασταλτικά συμπεριλαμβανομένων και αυτοί με αρτηριακές παθήσεις του γαλου ελεύθου της ερπυστικής νόσου (π.χ. σπασμό της στήθρα ή υπερτροφική αορτακή μοσχαρόβλεψη) ή εκείνοι με το υπόλοιπο σύνδρομο σπασμού πελκίανων ερπυστικών συστημάτων, που παρουσιάζουν σοβαρή αδυναμία εύλογου ελέγχου της αρτηριακής πίεσης. Το Sildenafil/Pfizer ενισχύει το υποστόμο αποτέλεσμα των νητρικών (βλ. παράγραφο Αντενδείξεις). Μία την κυκλοφορία του πρίοντος στην αγορά αναφερθηκαν σοβαρά καρδιαγγειακά συμβάντα, συστήζονμε να ταυτόχρονη χρήση του Sildenafil/Pfizer, συμπεριλαμβανομένων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου, αοστικών σπασμών, σπινθίου καρδιακού θανάτου, κοιλιακής αρρυθμίας, αγγειακής εγκεφαλικής αμωρικής, παροδική ισχαιμική επεισοδία, υπέρτασης και υποτάσης. Ως περιπτώσεις, αλλά όχι όλων, οι από ασθενείς αυτούς είχαν προ-υπάρχουσες καρδιαγγειακές παθήσεις κενό. Πολλά από τα συμβάντα αναφέρθηκαν ότι συνέβησαν κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής ή εμάς μετά από αυτή και μερικά αναφέρθηκαν ότι συνέβησαν μετά τη χρήση του Sildenafil/Pfizer, χωρίς σεξουαλική δραστηριότητα. Δεν είναι δυνατόν να προσδιοριθεί εάν τα συμβάντα αυτά συσχετίζονται άμεσα με τους παρόντες αυτούς ή άλλους παρόντες. Τα φάρμακα για την θεραπεία της δυσλειτουργίας στύσης, συμπεριλαμβανομένου του sildenafil, πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή σε ασθενείς με ανατομικές διαμορφώσεις του πέους (ήπως πύκνωση, λωπή που σπρινθύνουν σωματία ή σε ασθενείς που η κατάσταση τους μπορεί να προσβάλλεται για ημιασθέν (ήπως σε θρεπανάκωφες αναμία, παλκίαση μελέκω ή λευκωμία). Η αστάθεια και η ασταθευσιμότητα του sildenafil, σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους θεραπείας δυσλειτουργίας στύσης, δεν έχουν μελετηθεί. Κατά συνέπεια η εφαρμογή τέτοιων συνδυασμών δεν συνιστάται. Έχουν αναφερθεί διαταραχές της όρασης και περιπτώσεις μη αρτηριακής παρόχιης ισχαιμικής οπτικής νευροπάθειας με τη χορήγηση του sildenafil και των άλλων αναστολέων της PDE5. Ο ασθενής πρέπει να ενημερωθεί ότι σε περίπτωση οξείας διαταραχής της όρασης, πρέπει να σταματήσει τη λήψη του Sildenafil/Pfizer και να συμβουλευτεί άμεσα ιατρό (βλ. παράγραφο Αντενδείξεις). Δεν συνιστάται η συγχρήγηση sildenafil με αλκοόλη (βλ. παράγραφο Αντενδείξεις). Συνιστάται προσοχή, όταν το sildenafil χορηγείται σε ασθενείς που λαμβάνουν ένα άλλο αναστολέα, όπου η συγχρήγηση μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη υποτάση σε ορισμένους ευαίσθητους άτομα. Αυτό είναι πιθανότερο να συμβεί μετά σε διάστημα 4 ώρων μετά από τη χορήγηση του sildenafil. Προκειμένου να μειωθεί το ενδεχόμενο εμφάνισης ορθοστάσης υπότασης, ο ασθενής πρέπει να είναι συνδυασμένη σταθεροποιημένη στη θεραπεία με άλλο αναστολέα πριν από την έναρξη θεραπείας με sildenafil. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο έναρξης χορήγησης του sildenafil στη δόση των 25 mg. Επιπλέον, οι ιατροί θα πρέπει να συμβουλεύονται τους ασθενείς τι να κάνουν σε περίπτωση που εμφανιστούν συμπτώματα ορθοστάσης υπότασης. Μελέτες με ανδρώτα υποστάση υπαδεικνύουν ότι το sildenafil ενισχύει την αντιοξυδοποιητική επίδραση του νητρώα οξυγόνου νατρίου in vitro. Δεν υπάρχουν στοιχεία για την αστάθεια στη χρήση, όταν αφορά στη χορήγηση του sildenafil σε ασθενείς με προϋπάρχουσα υποτασική ή με ενεργό πεπτικό όργανο. Επομένως, το sildenafil πρέπει να χορηγείται σε αυτούς τους ασθενείς μόνο μετά από προσεκτική αξιολόγηση των αναμενόμενων ωφελών σε σχέση προς τους πιθανούς κινδύνους. Το κεντρικό υμένιο επικάλυψης του Sildenafil/Pfizer περιέχει κακάδι. Το Sildenafil/Pfizer δεν θα πρέπει να χορηγείται σε άνδρες με (2) άλλες οφθαλμικές δυσλειτουργίες στη γαλακτώδη, ανεπάρκεια της Lapp κακώσης ή δυστομορροσθή γλαυκώδη-γλακτώδη. Δεν ενδείκνυται η χρήση του Sildenafil/Pfizer από γυναίκες. **ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΥΗΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΧΙΑ:** Το Sildenafil/Pfizer δεν ενδείκνυται για χρήση στις γυναίκες. Σε μελέτες αναπαραγωγής σε αρουραίους και κανίους, μετά από χορήγηση sildenafil από το στόμα, δεν παρουσιάστηκαν σχετισμένες με το φάρμακο αναπληρωτικές ενέργειες. **ΑΝΕΠΙΣΤΗΜΕΝΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ:** Το προφίλ ασφαλείας του Sildenafil/Pfizer βασίζεται σε 8891 ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν το συνδυασμένο δοσολογικό σχήμα σε 67, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο, κλινικές μελέτες. Ως πιο συχνά αναφερόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς υπό θεραπεία με sildenafil, ήταν κεφαλαλγία, έλξη, δυστομία, ορθολογικές διαταραχές, ρινική συμφόρηση, άλγος ή ασταθής χρωματική παραμόρφωση. Ως ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά είναι: σκελετική, καλύτερο, μόνο περίοδο >9 ώρων, κατ' εξαίρεση. Επίσης δεν αναφέρονται όλες οι ανεπιθύμητες ενέργειες στο Κάτοχο Αδείας Κυκλοφορίας και δε συμπεριλαμβάνονται όλες στη βάση δεδομένων ασφαλείας, οι συσχετισμένες αυτών των συμβαμάτων δεν μπορούν να καθοριστούν με αξιοπιστία. Παρακάτω περιγράφονται ανά σύμπτωμα (πολύ συχνές (≥1/100), συχνές (≥1/100 έως <1/100), όχι συχνές (≥1/1.000 έως <1/100), σπάνιες (≥1/10.000 έως <1/1.000), όλες οι κλινικές σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες παρατηρήθηκαν σε κλινικές μελέτες, με επίσημη μεγαλύτερη από αυτή του εικονικού φαρμάκου. Επιπρόσθετα, καταγράφονται ως μη γνωστές, οι συσχετισμένες των κλινικών σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών που αναφέρονταν από την εμπειρία μετά την κυκλοφορία του πρίοντος στην αγορά. **Κλινικές σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρονταν με επίσημη μεγαλύτερη από ότι το εικονικό φάρμακο σε ελεγχόμενες κλινικές μελέτες, καθώς και μετά την κυκλοφορία του πρίοντος στην αγορά, πόλυ συχνές:** Κεφαλαλγία. Συχνές: Άλγος, οπτικές διαταραχές, σπαστική χρωματική παραμόρφωση, έλξη, ρινική συμφόρηση, δυστομία. **Όχι συχνές:** Υπέρταξη, υποτασική, διαταραχές του επιπεφυκτικού, ορθολογικές διαταραχές, διαταραχές δοκράσας, άλλες ορθολογικές διαταραχές, άλγος, εμβάζ, διάσπασή πάλιν, ταχυκαρδία, δερματικό εξάνθημα, μυαλγία, θωρακικό άλγος, κόπωση, αυξημένες καρδιακές ρυθμίες. **Σπάνιες:** Ανδροστική υπερτασική οπτική, σπαστικό εγκεφαλικό επεισόδιο, σπαστική κώωση, έμφραγμα μυοκαρδίου, κοιλιακή μοσχαρόβλεψη, υποτάση, υποτάση, επίθεση, έλξη, ναυτία, έρροσση. **Μη γνωστές:** Παροδική ισχαιμική επεισοδία, επιληπτική κρίση, υποστάση επιληπτικής κρίσης, μη αρτηριακή παρόχιη ισχαιμική αμφιβληστροειδοπάθεια (NAION), αοστική στην αμφιβληστροειδική αγγείων, έκλαμψη οπτικού πεδίου, κοιλιακή αρρυθμία, ασταθής στήθρα, σπινθίου καρδιακού θανάτου, σύνδρομο Stevens-Johnson, τοξική επιληπτική νεκρώση, πρησμός, παροσμωτική στίση. **ΚΑΤΟΧΟΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** Pfizer Hellas Ε.Α. Α.Μ.Α.συν. 2743, 154 511 Ν. Φωκιά, Ελλάδα, Τηλ.: 210 6785580. **ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** 25 mg: 21740/10/29-12/2011, 50 mg: 23252/10/29-12/2011, 100 mg: 23253/10/29-12/2011. **ΑΝΑΦΗΛΙΣΗ ΤΗΛΗ:** 4x25mg (π.χ.): 16.17, 4x50mg (π.χ.): 19.81, 4x100mg (π.χ.): 23.77. **ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΠΡΙΟΝ ΓΙΑ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΥΝΤΑΓΗ:** ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ (ΜΕΡΙΚΗΣ) ΑΝΑΒΕΒΛΗΤΗΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ: 06/2012. **ΓΙΑ ΠΛΗΡΕΣ ΣΥΝΤΑΓΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΑΡΑΚΑΛΕΙΣΤΕ ΝΑ ΑΠΕΥΘΥΝΕΤΕ ΣΤΗΝ ΕΤΑΙΡΙΑ.**

[illegible]

Εξέδρα Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων Μεσογείων 284 GR-15562 Χαλάνδρις, Αθήνα Φαξ: + 30 21 06549505, Τηλ: + 30 21 32040380/337 Ιστοτόπος: http://www.efpi.gr	Κόσμος Φαρμακοτεχνική Υπηρεσία Υπομονή Υγιεινή CY-1475 Λεωκωσία Φαξ: +357 22608649 Ιστοτόπος: http://www.moh.gov.cy/pms
--	---

ΚΑΤΑΧΩΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ/ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ: Pfizer Limited, Sandwich, Kent CT13 9NJ, Ηνωμένο Βασίλειο. EU/1/98/077/002-004, EU/1/98/077/013, EU/1/98/077/006-008, EU/1/98/077/014, EU/1/98/077/016-019, EU/1/98/077/010-012, EU/1/98/077/015. ΤΟΠΙΚΟΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟΣ: Pfizer Ελλάς Α.Ε., Μεσογείων 243, 154 51 Νέο Ψυχικό, Τηλ. + 30 210 6785800. ΔΙΑΜΗΚΕΣ ΤΙΜΕΣ: 4x25mg Α.Τ.: 20,21 €, 4x50mg Α.Τ.: 24,77 €, 4x100mg Α.Τ.: 29,70 €, 8x25mg Α.Τ.: 40,46 €, 8x50mg Α.Τ.: 49,54 €, 8x100mg Α.Τ.: 59,44 €. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ ΓΙΑ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΥΝΤΑΓΗ, ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗΣ (ΜΕΡΙΚΗΣ) ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ: 17 Απριλίου 2013. ΓΙΑ ΠΛΗΡΕΙΣ ΣΥΝΤΑΓΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΑΡΑΚΑΛΕΙΣΤΕ ΝΑ ΑΠΕΥΘΥΝΕΤΕ ΣΤΗΝ ΕΤΑΙΡΙΑ.

Η ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ VIAGRA®¹

τώρα διαθέσιμη και σε λευκό



Νέα όψη, απαράλλακτη ποιότητα VIAGRA®²

Παρασκευάζεται ακολουθώντας τα ίδια υψηλά πρότυπα
και την ίδια προσοχή στη λεπτομέρεια²

Sildenafil Pfizer®
(sildenafil citrate) tablets

Αυθεντική Ποιότητα από την Pfizer

Pfizer Limited 2013. All rights reserved.

Παραπομπή: 1. Kadioglu A, Grohmann W, Depko A et al. Quality of erections in men treated with flexible-dose sildenafil for erectile dysfunction: Multicenter trial with a double-blind, randomized, placebo-controlled phase and an open-label phase. J Sex Med. 2008;5:726–734. 2. Marketing Authorizations Viagra & Sildenafil Pfizer



Από τους παρασκευαστές του²

VIAGRA®
(sildenafil citrate) tablets
THINK HARD¹



Established Products

**Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και
Αναφέρετε
ΟΛΕΣ τις ανεπιθύμητες ενέργειες για
ΟΛΑ τα φάρμακα
Συμπληρώνοντας την «ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ»**

Η συντομευμένη Περίληψη Χαρακτηριστικών του Προϊόντος δημοσιεύεται σε επόμενη σελίδα του παρόντος.
Για περισσότερες πληροφορίες συμβουλευτείτε την Περίληψη Χαρακτηριστικών του Προϊόντος που διατίθεται από:

PFIZER HELLAS A.E. Λεωφ. Μεσογείων 243, 154 51 Ν. Ψυχικό, Τηλ.: 210 6785800, Τηλ. Παραγγελιών: 210 8199060

CollaZen™

www.collazen.eu

Η 3ηλή ασπίδα της ομορφιάς σας

COMPLETE FORMULA

Πόσιμο Συμπλήρωμα Διατροφής
με **Υδρολυμένο Κολλαγόνο**
500ml

**Κολλαγόνο τύπου 1
για Υγεία & Ομορφιά**



COLLAGEN CREAM

Ενυδατική Κρέμα προσώπου
με **Υδρολυμένο Κολλαγόνο**
50ml 1.7 fl OZ

Ιδανική για τη βραδινή σας ανάπληση!



HYALURONIC CREAM

Κρέμα προσώπου
Βαθείας Ενυδάτωσης
με **Υαλουρονικό Οξύ**
50ml 1.7 fl OZ

Ιδανική για την πρωινή σας ενυδάτωση!



Αποκλειστική διάθεση

ΦΑΡΜΕΞ ΑΕ

Λεωφ. Κηφισού 132 Τ.Κ. 121 31 Περιστέρι
Τηλ. κέντρο: 210 51 99 200 Fax: 210 51 44 279
e-mail: info@pharmex.gr www.pharmex.gr

Η εταιρεία ΦΑΡΜΕΞ Α.Ε. είναι πιστοποιημένη κατά
EN ISO 9001:2008

Διανομή
X Papharm

Λεωφ. Κηφισού 132 Τ.Κ. 121 31 Περιστέρι
Τηλ.: 210 5199290 Fax: 210 5768315
e-mail: info@papharm.gr www.papharm.gr

Information	Status
ΚΛΕΙΔΙΑ	DELAYED
ΟΝΟΜΑ ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗ	DELAYED
ΡΙΝ ΚΑΡΤΑΣ	DELAYED
ΩΡΑ MEETING	CANCELLED
ΜΕΡΟΣ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗΣ	DELAYED
ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ	CANCELLED
ΤΙΤΛΟΣ ΤΑΙΝΙΑΣ	DELAYED
PASSWORD ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ	DELAYED
ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΠΑΡΑΛΙΑΣ	DELAYED
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΠΕΛΑΤΗ	CANCELLED
ΣΥΝΑΝΤΗΣΗ ΓΟΝΕΩΝ	DELAYED
PANTEBOY ΩΡΛ	DELAYED
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΕΘΛΙΩΝ	DELAYED

Για να μην δουλεύει η μνήμη σας με καθυστέρηση...



NeuroAge Το νέο εξειδικευμένο συμπλήρωμα διατροφής που βοηθά καθημερινά:

- στη διατήρηση της λειτουργίας του εγκεφάλου
- στην ενίσχυση της μνήμης

Εκτεταμένες επιστημονικές έρευνες δείχνουν ότι το NeuroAge περιέχει έναν αποτελεσματικό συνδυασμό βασικών συστατικών που βοηθούν στην υποστήριξη ενός ώριμου εγκεφάλου. Τα κύρια πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν ενίσχυση:

- της νοητικής εγρήγορης
- της γνωστικής λειτουργίας
- της διανοητικής απόδοσης, όπως η συγκέντρωση, η μάθηση, η μνήμη και η λογική.



Εγκεκριμένα Συστατικά

● Σίδηρος:

- συμβάλλει στη φυσιολογική γνωστική λειτουργία

● Παντοθενικό Οξύ:

- συμβάλλει στη φυσιολογική διανοητική απόδοση
- EFSA COMMISSION REGULATION (EU) N° 432/2012

Κλινικά Ελεγμένα Συστατικά

● Ουριδίνη ● Κυτιδίνη ● (L)-Γλουταμίνη

- 3 συστατικά (Ουριδίνη + Κυτιδίνη + (L)-Γλουταμίνη) δοκιμάστηκαν εκτενώς σε 31 μελέτες όπου συμμετείχαν 2200+ εθελοντές.
- 6 διπλά τυφλές κλινικές μελέτες, ελεγχόμενες ως προς placebo, στις οποίες συμμετείχαν 500+ εθελοντές.

Συμπλήρωμα Διατροφής με σίδηρο και παντοθενικό οξύ. Λαμβάνεται 2 κάψουλες καθημερινά με το πρωινό γεύμα. Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ημερήσια δόση. Τα συμπληρώματα διατροφής δεν υποκαθιστούν την ισορροπημένη διατροφή και τον υγιεινό τρόπο ζωής. Φυλάσσεται μακριά από τα παιδιά.

Διατίθεται αποκλειστικά στα Φαρμακεία

NeuroAgeTM

Κρατά τη μνήμη σε εγρήγορη.

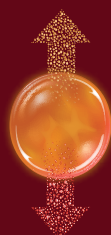
Αποκλειστικός Διανομέας για την Ελλάδα:
ELPEN Α.Ε. Φαρμακευτική Βιομηχανία
Τμήμα Consumer Health Care:
Λεωφ. Μαραθώνος 95, 190 09 Πικέρμι Αττικής, Τηλ.: 210 60 39 326,
Εθνικής Αντιστάσεως 114, 551 34 Θεσσαλονίκη, Τηλ.: 2310 459 920-1
www.elpen.gr, farmakeia@elpen.gr



Φροντίδα για τον άνθρωπο



GR1401167970



Galvus®
vildagliptin



Eucreas®
vildagliptin/metformin

 **NOVARTIS**

Novartis (Hellas) A.E.B.E.

120 χλμ. Εθνικής Οδού

Αθηνών-Λαμίας

144 51 Μεταμόρφωση

Τηλ.: 210 281 1712

Γραφείο Θεσσαλονίκης:

120 χλμ. Θεσ/νίκης - Ν. Μουδανιών

570 01 Θέρμη

Τηλ.: 2310 424 039

ΦΑΡΜΑΚΟΕΠΑΓΡΥΠΝΗΣΗ: 210 2828 812

onbrez[®]
breezhaler[®]

ultibro[®]
breezhaler[®]

seebri[®]
breezhaler[®]



 **NOVARTIS**
PHARMACEUTICALS

Novartis (Hellas) A.E.B.E.

12ο χλμ. Εθνικής Οδού Αθηνών-Λαμίας, 144 51 Μεταμόρφωση, Τηλ.: 210 281 1712

Γραφείο Θεσσαλονίκης:

12ο χλμ. Θεσσαλονίκης-Ν. Μουδανιών, 57 001 Θέρμη, Τηλ.: 2310 424 039

Φ Α Ρ Μ Α Κ Ο Ε Π Α Γ Ρ Υ Π Ν Η Σ Η : 2 1 0 2 8 2 8 8 1 2

ΕΛΕΥΘΕΡΩΣΤΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΝΟΗ ΤΟΥΣ



Seebri® Breezhaler® 44μg

 Το **Νέο Αντιχολινεργικό** με **Άμεσο** βρογχοδιασταλτικό αποτέλεσμα που **Διαρκεί**¹

 **NOVARTIS**
PHARMACEUTICALS

Once Daily
seebri®
breezhaler®
glycopyrronium bromide inhalation powder 

NEO



ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΠΑΞ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ ΔΙΠΛΟ ΒΡΟΓΧΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΟ

ULTIBRO® BREEZHALER®

ΙΣΧΥΡΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ¹
ΑΝΟΙΞΕ ΕΝΑ ΝΕΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤΗ ΧΑΠ

Στη Novartis δεν σταματάμε να προσπαθούμε να κάνουμε τη ζωή των ασθενών καλύτερη.

Για να το πετύχουμε, οφείλουμε να εξελισσόμαστε και να ανοίγουμε νέους δρόμους στη θεραπεία.

Σήμερα, σας παρουσιάζουμε μια τέτοια καινοτομία. Το Ultibro® Breezhaler®.

Το μοναδικό άπαξ ημερησίως χορηγούμενο διπλό βρογχοδιασταλτικό με ισχυρή αποτελεσματικότητα, κατάλληλο για θεραπεία συντήρησης για την ανακούφιση των συμπτωμάτων σε ενήλικες ασθενείς με ΧΑΠ.

 **NOVARTIS**
PHARMACEUTICALS

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ULTIMO® BREEZHAIR®

▼ Το πρόγραμμά αυτό εκτελεί μια διατηρησιακή παρεκκλιόμενη. Αυτό θα επιτύχει τον κατά προτεραιότητα νέων πληροφοριών ασφαλείας. Συνεπώς από τους επεξεργαστές του τομέα της υγιονομικής περιβάλλον να αναφέρουν αποκλειστικά πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των εγκαταστάσεων. Βλ. παράγραφο 4.8 για τον τρόπο αναφοράς των συμβουλών των εγκαταστάσεων.

1. ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΩΝΤΟΣ: U10b3 Breezhaler 85 μικρογραμμάρια/42 μικρογραμμάρια, κάψες για εισπνοή, 90/180 κάψες/κασέτιο.

2. ΠΟΤΟΤΙΚΗ/ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ: Καθε καφεΐνο περιέχει 143 μg γαλλικής νικοτερίνης ισοδύναμο με 110 μg νικοτερίνης κα 63 μg βραδείνης γαλλοπυριδινίου ισοδύναμο με 50 μg γαλλοπυριδινίου. Καθε περιεχόμενο δοσ. μορμ. (αέρας) σε αυτό το σπαστικό της πιέξης (σπαστικό) περιέχει 110 μg γαλλικής νικοτερίνης ισοδύναμο με 85 μg νικοτερίνης κα 54 μg βραδείνης γαλλοπυριδινίου ισοδύναμο με 43 μg γαλλοπυριδινίου. Έκδοση (1) με γυαλίνο άρτο. Καθε καφεΐνο περιέχει 23.5 mg λακτόζης (σε μονοϋδρίο). Για τον πληρότερο κατάλογο των συστατικών, δείτε παρακάτω 6.1.

3. **ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ.** Είναι για εσωτερική λήψη υπό μορφή κάψουλας. Κάψουλα με διαφανή κίτρινα καπάκια και γραμικό διαφανές σήμα που περιέχεται στο λήκη της, σε δύο δόσεις ανάληψης, με τον κυκλικό προεκτύπιο HEPITO-SOM ταυτισμένο με μικρό χρυσό καπάκι από ένα μίγμα ραβδίων στο σήμα και το λήκη της της στοιχείου ταυτισμένο με άλλο χρυσό καπάκι στο σήμα.

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

Ανσθημάτων ενέργειες που αναφέρθηκαν στην κύρια 5-μην βόση δεδομένων ασφαλείας	Κατηγορία συχνότητας
Λοιμώδη του στομάχου αναπνευστικού συστήματος ¹	Πολύ συχνές
Ρινορροραγία ²	Ισυνές
Ουρολοίμωξη ³	Ισυνές
Παραρρινοκολπίτιδα ⁴	Ισυνές
Ριτίτιδα ⁵	Ισυνές
Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος	
Υπερευαισθησία ⁶	Όχι συνές
Διαταραχές του μεταβολισμού και της θρέψης	
Γαστρώδης διαβήτης και υπεργλυκαιμία ⁷	Όχι συνές
Ψευδοτρικλής διαταραχές	
Αιτία ⁸	Όχι συνές
Διαταραχές του καρμικού συστήματος	
Στάση ⁹	Ισυνές
Καρδιακή ληξία ¹⁰	Ισυνές
Παρασυστολή ¹¹	Όχι συνές
Οφθαλμικές διαταραχές	
Πλακώμα ¹²	Όχι συνές
Καρδιακές διαταραχές	
Ισομετρική καρδιοπάθεια ¹³	Όχι συνές
Κολπική μαρμαρυγή ¹⁴	Όχι συνές
Ταχυκαρδία ¹⁵	Όχι συνές
Αίσθημα παλμών ¹⁶	Όχι συνές
Διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος, του θώρακα και του μεταβολισμού	
Πήχας ¹⁷	Ισυνές
Συμπτωματογενής αλβός περιλαμβανομένου τραχήλου του λαιμού ¹⁸	Ισυνές
Παραδελός βρογχόσπασμος ¹⁹	Όχι συνές
Επίσταξη ²⁰	Όχι συνές
Διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος	
Δυσπεψία ²¹	Ισυνές
Γαστρίτιδα οξεία ²²	Ισυνές
Γαστρεντερική ²³	Ισυνές
Σπρωστικότητα ²⁴	Όχι συνές
Διαταραχές του δέρματος και του υποδόριου ιστού	
Κνησμός εξάνθημα ²⁵	Όχι συνές
Διαταραχές του μυοσκελετικού συστήματος και του συνδέσμου ιστού	
Μυοσκελετικός πόνος ²⁶	Ισυνές
Μυϊκές σπασμώδεις ²⁷	Όχι συνές
Μυαλγία ²⁸	Όχι συνές
Αλγες στο άνω και κάτω άκρο ²⁹	Όχι συνές
Διαταραχές των νυφών και των περιφερικών ειδών	
Ακρόρροξ ουροδόχου κύστης και κατακράτηση ούρων ³⁰	Όχι συνές
Γενικές διαταραχές και καταστάσεις της οδού χορήγησης	
Πυρεξία ³¹	Ισυνές
Θυροειδής αλβός ³²	Ισυνές
Παραφρενική οίδημα ³³	Όχι συνές
Κόπωση ³⁴	Όχι συνές

1. Jaundzīgais veģipants nav nepieciešams ja ir ūdens krāsošanas līdzeklis ja ir veģipants, marmors.

[illegible]

Τ. KATSOKE THY KAEIΣ KYKADOPHAIΣ: Novartis Europharm Limited, Wimbleshurst Road, Horsham, West Sussex, RH12 5RB, Ηνωμένο Βασίλειο

Β. ΑΡΙΘΜΟΣ(ΟΙ) ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ: ΕΥ13/13/882/001-006

10. КИЕВОМІНІА АНАТОПХІС ТОУ КІМІНОУ, 30.01.201

11. Bibliography:

1. Vogelmeier CF, Bateman SU, Pallante J, et al. Efficacy and safety of once-daily VX745 compared with twice-daily salmeterol/fluticasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease (ILLUMINATE): a randomised, double-blind, parallel-group study. *Lancet Respir Med*. 2013;1:51-60.

Ενδείκνυται A.T. Ultrabre[®] Breezhaler[®] 85µg/43µg, 70,93€, (σε περίπτωση τροποποίησης του A.T. ισχύει η ενδεικτική τιμή, σύμφωνα με την τιμή ΦΠΑ όπως ισχύει)

Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και
Αναφέρετε **ΟΛΕΣ** τις ανεπιθύμητες ενέργειες για **ΟΛΑ** τα φάρμακα
Συμπληρώνοντας την «**ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ**»

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΟΣ 26, ΤΕΥΧΟΣ III,
ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 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

Β. 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. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Επικ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή

Αναπλ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

E-mail για κατάθεση εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr , karikasg@teiath.gr

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

*Τα άρθρα που δημοσιεύονται στην "Φαρμακευτική"
καταχωρούνται στα Chemicals Abstracts, EMBASE και SCOPUS*

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS
VOLUME 26, ISSUE III,
JULY - SEPTEMBER 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**

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

CONTENTS / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

**Απόβλητα Φαρμακευτικών Δραστικών Ουσιών,
ένα Αναδυόμενο Περιβαλλοντικό Πρόβλημα
Φαρμακευτικές Ύλες, Αντιβιοτικά και Απολυμαντικά
στο Υδάτινο Περιβάλλον και Τοξικολογικές Επιπτώσεις**

*Αθανάσιος Βαλαβανίδης, Θωμαΐς Βλαχογιάννη, Σπυρίδων
Λωρίδας και Κωνσταντίνος Φιωτάκης* 78-98

**An Emerging Environmental Problem: Disposed
Medicinal Active Products Pharmaceuticals, Antibiotics,
and Disinfectants in the Aquatic Environment
and Toxicological Considerations**

*Athanasios Valavanidis, Thomais Vlachogianni, Spyridon
Loridas, Constantinos Fiotakis* 78-98

**Νέα φαρμακευτικά σκευάσματα στη μάχη για τον καρκίνο:
πώς οι αγωνιστές των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs)
ενισχύουν τη δράση των αντικαρκινικών εμβολίων**

*Πηνελόπη Σαμαρά, Σπυριδούλα-Αγγελική Νίκου, Σωτήριος
Φόρτης, Ιωάννης Βουτσάς, Κωνσταντίνος Μπαξεβάνης,
Ουρανία Τσιτσιλώνη* 99-114

**New pharmaceutical formulations in the fight against
cancer: how Toll-like receptor (TLR) agonists
enhance the activity of anticancer vaccines**

*Pinelopi Samara, Spyridoula-Aggeliki Nikou,
Sotirios Fortis, Ioannis Voutsas, Constantin Baxevas,
Ourania Tsitsilonis* 99-114

**Μέθοδος HPLC προσθήκης γνωστών ποσοτήτων
σε δείγματα πλάσματος εφήβων αθλητών κολύμβησης**

*Κωνσταντίνος Πίστος, Μυρσίνη Βλάχου, Βασιλική
Θειακοδημήτρη, Έλενα Φιλίππου, Μιχαήλ Πέτρου, Νίκος
Μίτλετον, Ειρήνη Παντερή, Ευάγγελος Γκίκας, Ιωάννης Παπου-
τσής, Χαρά Σπηλιοπούλου, Σωτήρης Αθανασέλης* 115-122

**Standard addition HPLC method for the determination of
a-tocopherol in plasma samples of adolescent swimmers**

*Constantinos Pistos, Myrsini Vlachou, Vassiliki Theiakodimitri,
Elena Philippou, Michael Petrou, Nikos Middleton, Irene
Panderi, Evangelos Gkikas, Ioannis Papoutsis, Chara
Spiliopoulou, Sotiris Athanaselis* 115-122

Εις Μνήμην 123-125

Memorial 123-125

Εκδηλώσεις 126-1267

Meetings 126-127

**Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας
Φαρμακοχημείας**

ZITA MEDICAL MANAGEMENT

1ο χλμ. Παιανίας - Μαρκοπούλου

19002, Παιανία, 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

E-mail: f.karaoulani@zita-management.com

An Emerging Environmental Problem

Disposed Medicinal Active Products

Pharmaceuticals, Antibiotics, and Disinfectants

in the Aquatic Environment and Toxicological Considerations

Athanasios Valavanidis, Thomais Vlachogianni, Spyridon Loridas, Constantinos Fiotakis

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

Summary

Medicinal active compounds, antibiotics and disinfectants are used in various medical and therapeutic applications in hospital and at home. Eventually, pharmaceuticals are disposed in thousands of tones every year in drains and eventually reach the aquatic environment causing substantial toxicological problems in aquatic organisms. The occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment has been recognized in the last decade as a serious emerging environmental problem in most developed countries. Recently, pharmaceuticals have been detected in surface water, ground water, drinking water and in rivers in many areas of the globe. The problem was not so well known due to limitations to analytical methodologies of polar compounds, but current advances in environmental residue and

metabolite analysis have improved the ability to measure extremely low concentrations. The most important classes of drugs found in sewage and surface waters are anti-inflammatory and analgesic drugs, beta-blockers, blood lipid lowering agents, neuroactive compounds, antibiotics, antineoplastic drugs, antidiabetics, steroidal hormones, etc. This review presents some of the important studies on the levels of pharmaceuticals in sewage treatment plants and surface waters, their biotransformations and removal by new techniques. Also, the review covers acute and chronic toxicological studies that established the hazardous levels of drugs in the aquatic environment. Finally, the review presents some ecotoxicological approaches to the emerging nature of pharmaceutical pollutants in relation to ecosystem's health.

Introduction

Medicinal active compounds, antibiotics and disinfectants are disposed in thousands of tones every year in drains and eventually reach the aquatic environment causing toxicological problems in aquatic organisms. Additionally, antibiotics and disinfectants disturb the wastewater treatment process and the microbial ecology in surface waters. The occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment has been recognized in the last

decade as one of the emerging environmental issues in most developed countries. Recently, pharmaceuticals have been detected in surface water, ground water and drinking water in many areas of the globe. However, only little is known about the toxicological significance and the adverse effects in the marine environment of pharmaceutical emissions from households and hospitals.^{1,2}

Already a great number of medicinal active compounds, several drug metabolites, antibiotics and high concentrations of disinfectants have been

* **Corresponding author:** Prof. A. Valavanidis, e-mail: Valavanidis@chem.uoa.gr

detected at concentrations up to the µg/L-level in sewage effluents and drinking water samples, as well as in several surface waters located downstream from municipal sewage treatment plants. Research data show that most of the pharmaceuticals originating from human therapy are not eliminated completely in the municipal treatment plants. Pharmaceuticals and metabolites have been reported in groundwater contaminated by landfill leachates or manufacturing residues.^{3,4}

Global production and consumption of pharmaceuticals

Global pharmaceutical sales increased to 856 billion \$USD (2012) compared to 456 \$ ten years ago (2002). The USA with 325.8 billion of \$USD in 2012 comes first with 34% of the total production. The other 36% of the total pharmaceutical production and sales are from the five most advanced industrial countries in the West Europe (Germany, UK, France, Italy and Spain), Japan and China. These countries have 70% of total global production and sales of medicinal active compounds.⁵

The World Pharmaceutical Market in the last years (1999-2012) was presented in a statistical table by IMS Health Market (June 2013). [322 billion US\$ (1999), 456 billion US\$ (2002), 600 billion US\$ (2006), and 856 billion US\$ (2012). The global Pharmaceutical market in 2012 by country is as follows: USA, 326.892 US\$ (millions), Japan, 112.067, China, 81,698, Germany, 42,333, France, 36,674, Brazil, 29,112, Italy, 26,231, Canada, 21,877, UK, 21,635 and Spain, 19,635. [Source: Global Pharmaceutical top markets (2012)].^{6,7}

The amounts (in terms of metric tonnes) of medicinal active products used on a global scale is very difficult to estimate quantitatively since there are not adequate data. Some production statistics exist in the European Union (EU) and in the USA in term of consumption and sales. It is estimated that more than 3.000 different pharmaceuticals are used as analgesics and antiinflammatory drugs, contraceptives, antibiotics, beta-blockers, lipid regulators, neuroactive compounds, anticancer drugs, etc. Also a large number of pharmaceuticals are used in veterinary medicine, among them antibiotics and anti-inflammatory drugs.⁸

The amounts of production for some well known

drugs are regularly documented by the industry but in a very rudimentary way. The total annual production of medicines do not account for how much pharmaceutical residues or metabolites are disposed as solid waste from industry, or disposed in drains from hospitals and homes. There are some examples of drug production (for example in 2001 in Germany), e.g. the antiinflammatory drug acetylsalicylic acid was produced in 836 tonnes, paracetamol in 622 tonnes ibuprofen 345 tonnes, diclofenac 86 tonnes, the oral antidiabetic metformin 517 tonnes and the antiepileptic carbamazepine in 88 tonnes. The drug carbamazepine produced in USA ranged from 43 tonnes in 2000 to 35 tonnes in 2003. Of course all these estimates are approximations not only for medical active compounds produced and annual consumption but also for their disposal in the environment.⁹

Medicinal active chemicals as emerging environmental pollutants

In the last decade antibiotics, analgesics, anti-inflammatory drugs, contraceptives, beta-blockers, lipid regulators, neuroactive compounds and many other pharmaceuticals have become emerging environmental pollutants in the aquatic environment. In addition, veterinary pharmaceuticals are used extensively in agriculture and may enter aquatic systems via manure application to fields and subsequent runoff. Also, large amounts of pharmaceuticals and antibiotics are used in aquaculture (fish farming).

Few decades ago the problem was not so well known due to limitations to analytical methodologies of polar compounds. But current investigations and advances in environmental residue analysis (particularly liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC-MS-MS, allowing the identification of trace quantities of polar organic pollutants without derivatization) the extent of aquatic pollution was investigated in a more detailed ways.^{10,11} These monitoring studies demonstrated that pharmaceutical residues in treated wastewater and surface water are very widespread.^{12,13} Although the environmental pollution problem has been thoroughly investigated, knowledge of ecotoxicological effects of pharmaceuticals on aquatic and terrestrial organisms and wildlife is very limited.

Aquatic organisms are particularly important targets, as they are exposed via wastewater residues for a long period of their lives. Acute ecotoxicity data have been reported for a number of pharmaceuticals, however, such data alone may not be suitable for addressing the environmental effects, and subsequently the hazard and risk assessments.^{14,15}

Environmental pollution by pharmaceuticals proved to be an emerging problem in the last years and contributed in reassessing issues of hazardous chemicals ecological risk. Requirements for ecotoxicity testing in the EU as a prerequisite for registration of pharmaceuticals was established in 1990s. The European Union (EU) Commission Directive 92/18/EEC of 20/3/1992 modifying the Annex to Council Directive 81/852/EEC, on the approximation of the laws of Member States relating to analytical, pharmacotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of veterinary medicinal products and the corresponding “Note for Guidance” (European Medicines Agency, EMEA, 1998) for veterinary pharmaceuticals. The European Commission released a draft guideline (Directive 2001/83/EC) [Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use, Official Journal L – 311, 28/11/2004] specifying that an authorization for a medicinal product for human use must be accompanied by an environmental risk assessment (EMA, 2005).¹⁶

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) published their own regulations for environmental pollution by pharmaceuticals. FDA has the authority to approve pharmaceuticals and medicinal activity products and cosmetics before they can be marketed and sold in the U.S. Part of that approval includes assessing the environmental impact (mainly aquatic pollution). Producers and pharmaceutical companies must provide environmental assessment reports on drugs when the expected concentration of the active ingredient of the pharmaceutical in the aquatic environment reached levels of $\geq 1 \mu\text{g/L}$.¹⁷ The FDA requires rigorous risk assessment motivating pharmaceutical companies to design less toxic drugs, less persistent in the environment where can bioaccumulate. Also, FDA has legislated for analysis and environmental assessments of residues of veterinary

pharmaceuticals in the aquatic environment since 1980.^{18,19}

Waste discharged from pharmaceutical manufacturing facilities and from hospitals is a significant source of active pharmaceutical ingredients in the environment and during runoff residues and metabolites of drugs accumulate in the aquatic environment. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has jurisdiction to control air and water emissions from production plants. More stringent regulations from EPA have been instrumental forcing companies to remove drugs from their waste stream or motivate them to adopt green chemistry principles and reduce biologically active waste products in the first place.^{20,21}

The current scientific knowledge provide able evidence that residues of pharmaceuticals, personal care products (PCPs) and medical active substances at trace quantities are widespread in aquatic systems (Figure 1). Pharmaceuticals in the environment are suggested to pose only a low risk for acute toxicity. For chronic effects, the situation may be different, but there is a considerable lack of information. Environmental assessment of drug residues and PCPs has started in the wastewater effluents, surface waters and sediments, but other aquatic sources (drinking water, underground water sources, etc) can be investigated. Also, hospital wastewater, wastewater from manufacturers and landfill leachates may contain significant concentrations of drug metabolites.^{22,23}

Additional information can be found in the links below for EMEA, FDA, EPA, The Swedish Association of Pharmaceutical Industry, US PhRMA, and Environment Agency (UK):

- EMEA Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, England, 2006 Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00 [<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>]

- FDA-CDER. Guidance for industry - environmental assessment of human drugs and biologics applications, FDA Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, U [<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.html>]

- The Swedish Association of the Pharmaceutical Industry (LIF) Environmental classification of

pharmaceuticals in www.fass.se – guidance for pharmaceutical companies, June 2012 (<http://www.fass.se>) [<http://www.fass.se/LIF/healthcarefacts?userType=0&docId=76074>]

■ Environmental Protection Agency (EPA, USA) Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) as Environmental Pollutants [<http://www.epa.gov/esd/chemistry/pharma/>]

■ US PhRMA Position on Pharmaceuticals in the Environment . [<http://www.phrma.org/mediaroom/press/releases///13.03.2002.366.cfm>]

■ PhRMA PhATE Model Screening Analysis of Human Pharmaceuticals in US Surface Waters [<http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/esthag/2004/38/i03/pdf/es034430b.pdf>]

■ Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment [<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.yrtph.2005.05.005>]. Literature Citations Relevant to Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) [<http://www.epa.gov/ppcp/lit.html>]

■ Environment Agency (UK). Environment Agency, Position Statement: Human Pharmaceuticals and their Impact on the Aquatic Environment, Environment Agency of England and Wales, Bristol, UK, 2003.

Sources and fate of pharmaceuticals entering the aquatic environment

The consumption of pharmaceuticals is substantial but figuring out the annual consumption of a certain drugs is difficult and often based on approximate estimates. According to newspaper reports based on statistical data (in 2012) Americans consume 80% percent of the world's supply of painkillers, more than 110 tons of pure, addictive opiates every year. Also, there are estimates that in 2010 American farmers used 11,000 metric tones of antimicrobial medication for the growth and protection of their animals. It is estimated that about more than 3,000 different substances are used in human medicine such as analgesics and antiinflammatory drugs, contraceptives, antibiotics, beta-blockers, lipid regulators, neuroactive compounds and many others. Also, veterinary medicine and fish farming in developed countries use a large number of antibiotics and antiinflammatory drugs.²⁴

Pharmaceuticals are excreted after application in



Figure 1. *Pharmaceuticals, their metabolites and degradation products have been detected as emerging contaminants in municipal wastewater and in the aquatic environment (surface, groundwater, drinking water, river, seawater)*

their original chemical form or as metabolites and enter aquatic systems via different ways. The main pathway from humans is ingestion following excretion and disposal via wastewater. Municipal sewage (or wastewater) treatment plant (STPs) is therefore the main route that brings human pharmaceuticals after normal use and disposal of unused medicines into the environment. Also, hospital wastewater, wastewater from medicinal manufacturers and landfill leachates may contain significant concentrations of pharmaceuticals.^{25,26} Although most drugs are soluble in water and gastric fluids, they do not readily degrade in the municipal sewage treatment plants. Inevitably, they are being discharged in treated effluents resulting in the aquatic pollution of rivers, lakes, estuaries and sometime groundwater and drinking water. Where sewage sludge is applied to agricultural fields, contamination of soil, runoff into surface water but also drainage may occur. In addition, antibiotic pharmaceuticals may enter aquatic systems via direct application in aquaculture (fish farming).^{27,28} Of environmental concern is not necessarily a high production volume of a certain pharmaceutical per se, but the environmental persistence and its toxic biological activity on marine organism and their development and reproduction. This problem has been exemplified by the synthetic steroid hormones in contraceptive pills because of persistency and strong biological activity. The 17 α -ethinylestradiol (EE2) was studied thoroughly, with an annual production of, approximately, 200 kg/year by the European drug

companies. This compound is very persistent, with high estrogenic activity in fishes at very low concentration (1-4 ng/L).²⁹ Knowledge on the behaviour and fate of medicinal active products and their metabolites in the soil and the aquatic environment and effects on fish is limited at present despite the numerous studies in the last decade.^{30,31}

Elimination processes of drugs in sewage and wastewater treatment plants. Is there efficient removal of residues?

Two elimination processes are generally important for drug degradation in sewage treatment plants (STPs) or wastewater treatment plants (WTPs): a) adsorption to suspended solids (sewage sludge) and b) biodegradation. Adsorption is dependent on both hydrophobic and electrostatic interactions of the pharmaceuticals with particulates and microorganisms. Acidic pharmaceutical (such as acetylsalicylic acid, ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, naproxen, diclofenac, etc) have little tendency of adsorption to the sludge. But adsorption can increase with lower pH. Pharmaceuticals in digested sludge and sediments are relatively low, as was demonstrated in several monitoring studies.³²⁻³⁴ In Figure 2 a view of a typical STP is illustrated.

Pharmaceuticals showed very different removal rates in wastewater treatment processes. The elimination of most of the pharmaceutical substances is incomplete and improvements of the wastewater treatment and subsequent treatments of the produced sludge are required to prevent the introduction of these micro-pollutants in the environment.³⁵ Biodegradation of active drug substances is the process occurring mainly in the dissolved aquatic phase. Biodegradation can occur either in aerobic zones in activated sludge treatment, or anaerobically in sewage sludge digestion. For example, diclofenac was shown to be significantly biodegraded only when the sludge retention time was at least 8 days.³⁶ There are many studies for the average removal rates of various pharmaceuticals under standard and advanced sewage treatment processes in STPs. The variations are part of chemical properties of substances and partly the construction, treatment technology and hydraulic retention time of STPs.³⁷⁻³⁹



Figure 2. Municipal wastewater or sewage treatment plants (STPs) play an important role in removing pharmaceuticals, personal care products and other chemical contaminants from municipal wastewater

Efficient removal of pharmaceuticals takes place mainly in the secondary treatment step, whereas primary treatment removes less than 50% of the contaminants. A recent study (2014) measured concentrations of 56 active pharmaceutical ingredients in effluent samples from 50 large wastewater treatment plants across the US. Some medications were identified in most STPs, such as hydrochlorothiazide (thiazide, diuretic) was found in every sample. Metoprolol, atenolol (drugs for hypertension treatment), and carbamazepine were found in over 90% of the samples. Estimates of potential risks from exposure to healthy human adults (from drinking water) to 6 anti-hypertensive drugs (lisinopril, hydrochlorothiazide, valsartan, atenolol, enalaprilat, and metoprolol) are considered generally very low. Estimates of potential risks to aquatic life were also low for most of pharmaceuticals.⁴⁰ Monitoring studies on the elimination rates of pharmaceuticals during the STP process are based on measurements of influent and effluent concentrations and they vary according to the type of construction, treatment technology, hydraulic retention time and season. Elimination efficiencies span a large range (0-99%) depending on the drug structure and biodegradability.^{41,42}

Very high to total elimination (94-100%) in STPs has been achieved for drugs like ibuprofen, and naproxen.⁴³ The variation in elimination rates is not surprising, since pharmaceuticals form a

heterogeneous group consisting of compounds with diverse chemical properties. But the chemical characteristics and the efficiencies of various STPs also vary. The wide spectrum of substances detected in receiving river waters indicates that municipal STP outlets are major contributors of pharmaceuticals in the aquatic environment. As for the hazard posed by pharmaceuticals in both surface and effluent wastewaters, it was assessed toward different aquatic organisms (algae, daphnids and fish). Results indicate that there is no significant risks by the presence of pharmaceuticals in those matrices. The dilution factor once pharmaceuticals are discharged in receiving river or sea water efficiently mitigate possible environmental hazards.⁴⁴

Biotransformations of pharmaceuticals in the surface water of various aquatic environments is mainly through photodegradation than hydrolysis. The efficiency of photodegradation depends, besides substance properties, on the strength of the solar irradiation, and therefore on latitude and season, and on constituents present in the water that may act as photosensitizers generating hydroxyl radicals and singlet oxygen.^{45,46} Numerous research projects investigated the environmental metabolites and transformation products of pharmaceuticals in the aquatic environment. The transformations can be biotic or non-biotic and most synthetic drugs change into new chemical entities with different properties. Pharmaceuticals residues have become another class of emerging pollutants (or contaminants at low concentrations) and their occurrence, effects and risk to aquatic biota has become an ecotoxicological issue.⁴⁷ Since the presence of pharmaceuticals and transformation products at (relative) low concentrations in the drinking water they are concerns for human health. Results from a toxicological assessment of a monitoring campaign in sources of drinking water in the Netherlands found no risk for adverse health effects of the studied drug compounds.⁴⁸ Analysis of pharmaceuticals and personal care products in surface water (used for drinking) in the USA found that the total average concentrations were in the nanogram range (~ 360 ng/L) and for endocrine disrupting compounds below 15 ng/L. The total concentrations after treatment in the finished drinking water was for pharmaceuticals

and personal care products at 98 ng/L. These concentrations are considered relatively low (1 ng=10⁻⁹ g) to have any measurable risk to human health, although there is no knowledge as to the synergistic effects of these substances and chronic toxicity.⁴⁹

Despite the numerous studies and toxicological evaluations, a recent review assessing exposure to pharmaceutical chemicals (at ng/L concentrations) in drinking water and health effects to humans reached the conclusion that at present specific adverse health problems are unknown.⁵⁰

Occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment

The occurrence of pharmaceuticals, steroid hormones (contraceptive pill), their metabolites and personal care products (PCP) in the STPs was reported in the 1970 and 1980s by researchers in the USA, UK and Canada.⁵¹ In the last decades new analytical techniques measuring traces of chemicals (down to picogram, pg=10⁻¹² g) in aquatic samples increased substantially the knowledge for the presence of metabolites and transformation substances and their removal from STPs. Environmental concentrations and data from were compiled and reviewed.⁵²⁻⁵⁴

Various studies reported concentrations of a wide range for >100 pharmaceuticals from many classes of drugs (anti-inflammatory, beta-blockers, sympathomimetics, antiepileptics, lipid regulators, antibiotics, etc.) and some of their metabolites in many countries in treated sewage, rivers and creeks, seawater, groundwater and even in drinking water. Surface water of Anacostia River (Washington, DC) was analysed for drugs and domestic-use chemicals. Median concentrations for all measured domestic-use chemicals in surface water ranged from nondetectable to 50 ng/L. In STPs samples, naproxen (*drug* to treat pain or inflammation by arthritis) was observed, with the highest concentration at 270 ng/L.⁵⁵ Pharmaceuticals residues in the Belgian aquatic marine ecosystems were investigated by using the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. No immediate risk for acute toxic effects of these compounds on *P. tricornutum* were apparent at the concentrations observed in the Belgian marine environment. In two

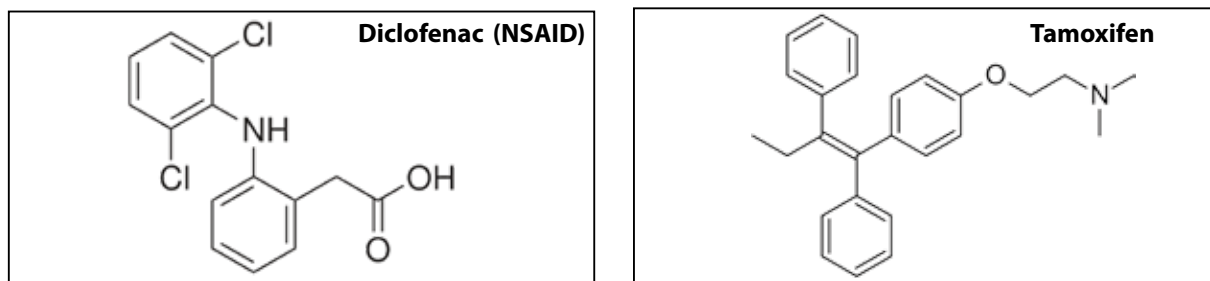


Figure 3. The chemical structure of Diclofenac and Tamoxifen

Belgian coastal harbours however, a potential chronic risk was observed for the β -blocker propranolol.⁵⁶

Chinese scientists have extended their monitoring and presented recently studies for pharmaceuticals and PCPs in Chinese aquatic environment, surface waters and sediments. More than 100 such chemicals were identified and the detected concentrations in waters and sediments in most cases were at ng/L and ng/g levels.⁵⁷ A Spanish study identified 60 pharmaceutically active compounds (PhACs), 20 metabolites and 8 PCPs in the aquatic environment in Spanish aquatic systems. Their predicted environmental concentrations were calculated and compared with measured environmental concentrations obtained from relevant published research. The highest occurrence in the aquatic environment was for drugs such as: acetaminophen glucuronide, Galaxolide®, Iso-E-super®, acetaminophen, valsartan, amoxicillin, 2-hydroxy-ibuprofen, iopromide, omeprazole, carbamazepine 10, acetylsalicylic acid, etc. These compounds have been estimated with releases (in the aquatic environment) between 5 and 600 tones/year. The predicted concentrations for drugs and PCPs that had a high occurrence in the aquatic environment were very close to the measured concentrations. Estimation for consumption can become a useful tool for identifying drugs in the aquatic environment and these estimations could be used to improve environmental risk assessment studies.⁵⁸

The occurrence of selected pharmaceuticals was also reported in the Tyne estuary in the U.K. The pharmaceutical compounds measured were acetyl-sulfamethoxazole, clofibric acid, clotrimazole, dextropropoxyphene, diclofenac, erythromycin, ibuprofen, mefenamic acid, paracetamol, propranolol, sulfamethoxazole, tamoxifen and trimethoprim. The

concentrations of drugs ranged from 4 to 2.370 ng/L.⁵⁹ Pharmaceutical residues were identified in STP effluents, in streams and in estuaries at concentrations generally in the ng/L to μ g/L range. In rivers, lakes and seawaters the concentrations were in the range of ng/L.⁶⁰⁻⁶² The chemical structures of diclofenac and tamoxifen are representatively depicted in Figure 3. A review in the USA identified pharmaceutical compounds of significance to water supplies. Available data on the use of prescription drugs indicated that approximately 40 compounds could be present in municipal wastewater effluent at concentrations above 1,000 ng/L, and at least 120 compounds could be present at concentrations above 1 ng/L. Important classes of prescription drugs include analgesics, beta-blockers, and antibiotics.⁶³

Effluents from 90 European wastewater TPs were analyzed for 156 polar organic chemical contaminants by LC-MS-MS or GC-HRMS (High resolution MS). The obtained results show the presence of 125 substances (80% of the target compounds) in European wastewater effluents, in concentrations ranging from low nanograms (ng/L) to highest milligrams per liter (μ g/L). The most highest median concentration levels were the artificial sweeteners acesulfame and sucralose, benzotriazoles (corrosion inhibitors), several organophosphate ester flame retardants and plasticizers (e.g. TCP) the insect repellent N,N-diethyltoluamide (DEET), the pesticides MCPA and mecoprop, caffeine, and gadolinium. Pharmaceutical at high concentrations found in STPs were carbamazepine, tramadol, telmisartan, venlafaxine, irbesartan, fluconazole, oxazepam, fexofenadine, diclofenac, citalopram, codeine, bisoprolol, eprosartan and the antibiotics trimethoprim, ciprofloxacin, sulfamethoxazole and clindamycin.⁶⁴

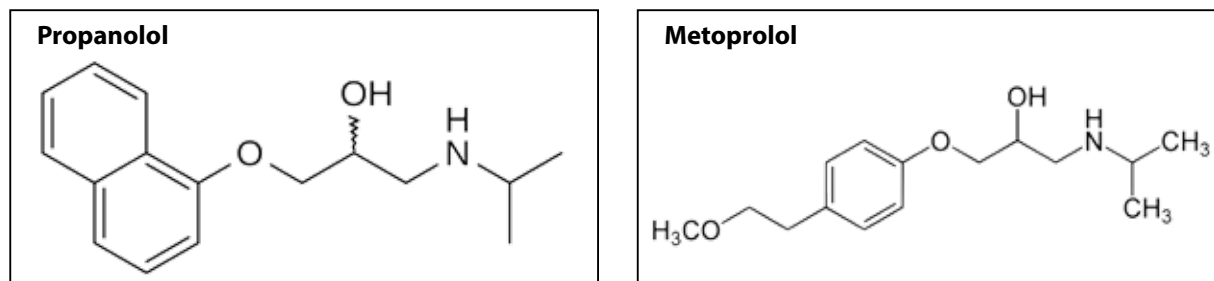


Figure 4. Chemical structures of β -blockers Propanolol and Metoprolol

Pharmaceuticals classes in sewage and surface waters

The most important classes of drugs found in sewage and surface waters, their metabolites and transformation products are considered: a) anti-inflammatory and analgesic drugs, b) beta-blockers (β -blockers, β -adrenergic blocking agents, β -antagonists etc, widely used class that target the beta receptors found on cells of the heart muscles, smooth muscles, airways, etc), c) blood lipid lowering agents, d) Neuroactive compounds (antiepileptics, antidepressants), e) antibiotics, f) antineoplastic and antitumour drugs, g) antidiabetics, h) steroid hormones. Some of the most widely used drugs were found in aquatic samples at increasing concentrations, such as atenolol and metoprolol (beta blockers), citalopram (antidepressant drug), diclofenac (analgesic), ibuprofen (analgesic), naproxen (anti-inflammatory), trimetoprim (antibiotic), citalopram (antidepressant drug) and propoxyphene (narcotic/anesthetic).

Analgesics and antiinflammatory drugs

The first studies in the 1990s detected in sewage and surface waters non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen, diclofenac and some of their metabolites at concentrations exceeding $0.1 \mu\text{g/L}$.^{65,66} The occurrence of these pharmaceuticals can be used as molecular markers of aquatic contamination with drugs.⁶⁷ Non-steroidal anti-inflammatory drugs have been found in Indian rivers.⁶⁸ More than 100 pharmaceuticals were detected in urban wastewater and effluent from activated sludge system. A review showed that the highest amounts discharged through secondary effluent contain several beta-

blockers, and analgesic anti-inflammatory drugs, but the highest risk (from the point of high concentrations) is posed by antibiotics, several psychiatric drugs and some analgesic drugs.⁶⁹ Acetylsalicylic acid (aspirin) has been found in many municipal wastewaters at levels from $4 \mu\text{g/L}$ to $60 \mu\text{g/L}$. Aspirin and acetaminophen (paracetamol) can be removed quite efficiently from STPs.³² However up to $10 \mu\text{g/L}$ paracetamol has been found in 24% of samples from streams in the USA.⁶¹ In many countries diclofenac (NSAID) and ibuprofen were frequently detected in wastewater in the $\mu\text{g/L}$ range, and in surface water at lower levels. Ibuprofen and its metabolite hydroxy-ibuprofen are significantly removed during sewage treatment.⁶¹ Naproxen (another well known NSAID) was also found in STP effluents with median levels of $12.5 \mu\text{g/L}$ and maximal levels of up to $33.9 \mu\text{g/L}$.⁷⁰ Moreover, several other analgesics have been detected in sewage and surface water, but also in ground water and drinking water samples.^{71,72}

Beta-blockers as contaminant in sewage and surface waters

Several beta-blockers (BB, beta-adrenergic blocking agents, used for the management of cardiac arrhythmias) were identified in wastewater and surface waters. Propanolol, bisoprolol and metoprolol were found at concentrations 0.59 - $2.9 \mu\text{g/L}$ in surface water. Beta blockers show great partitioning to sludge. Most of the removal of β -blockers in sewage is performed by microbial biodegradation.^{73,74} In Figure 4 the chemical structures of typical β -blockers are presented.

Beta-blockers are one of the most widely used pharmaceuticals whose presence in different environmental compartments has already been

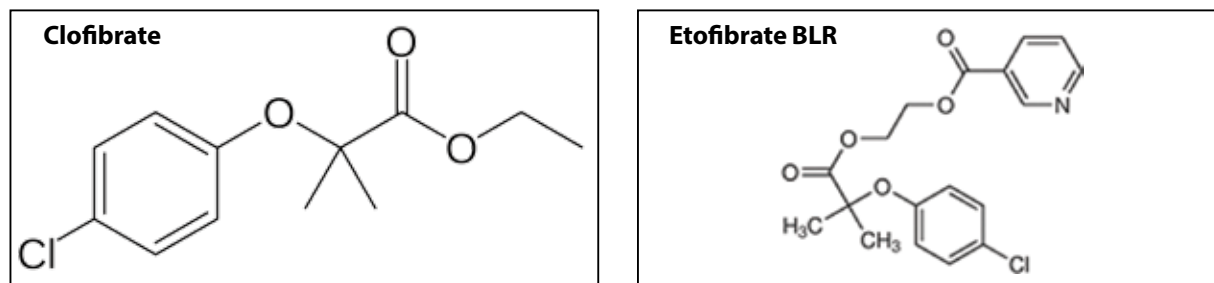


Figure 5. Chemical structures of Clofibrate and Etofibrate BLR

proven in concentrations of even up to a few $\mu\text{g/L}$. Propranolol, metoprolol and nadolol – the most commonly consumed BB drugs are inevitably detected in environmental samples.⁷⁵ Scientists performed ecotoxicity evaluation for BB in aquatic species. Tests were based on a flexible ecotoxicological test battery including organisms, representing different trophic levels and complexity: marine bacteria (*Vibrio fischeri*), soil/sediment bacteria (*Arthrobacter globiformis*), green algae (*Scenedesmus vacuolatus*) and duckweed (*Lemna minor*). Based on toxicological data from the green algae test (*S. vacuolatus*) propranolol and metoprolol can be considered to be harmful to aquatic organisms. However, sorption explicitly inhibits the hazardous effects of BB, therefore the risks posed by these compounds for the environment are of minor importance.⁷⁶

Blood lipid regulators in wastewater and surface waters

Monitoring studies have found widely used drugs for blood lipid regulators (BLR) : clofibrate, etofyllin clofibrate, etofibrate, and metabolites of fenofibrate gemfibrozil, clofibric acid and fenofibric acid. BLR concentrations in wastewater were at 0.35 to 4.6 $\mu\text{g/L}$, in groundwater in the range of 0.5 to 4 $\mu\text{g/L}$ and in drinking water 0.07-0.27 $\mu\text{g/L}$.⁷⁷⁻⁸⁰ Ecotoxicity assessments of some BLRs have been performed in various bioassays (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*) and their EC_{50} was established.⁸¹ The chemical structures of clofibrate and etofibrate are representatively depicted in Figure 5.

Antiepileptic and antidepressant pharmaceuticals in wastewater

The most frequently detected antiepileptic in the

aquatic environment was Carbamazepine at concentration 6.3 $\mu\text{g/L}$ in wastewater. Carbamazepine (Figure 6) was found to occur ubiquitously in the river Elbe and its tributaries (Germany) exceeding 1 $\mu\text{g/L}$. Also, it has been found in surface water and groundwater.⁸²

In U.S. rivers average levels of carbamazepine were 60 ng/L in water and 4.2 ng/mg in the sediment.⁹ The antidepressant drug fluoxetine (Figure 6) was also detected in STP effluents samples in Canada and in U.S. streams with median concentrations of 0.012 $\mu\text{g/L}$.^{61,70} The antiepileptic Primidone has been detected in sewage waters at concentrations up to 0.6 $\mu\text{g/L}$.⁵²

Antineoplastics and antitumour agents

Chemotherapeutic drugs for the treatment of various types of cancer occur mainly in hospital effluents and at lower concentrations in municipal sewage water. Two well known anticancer drugs, Ifosfamide and cyclophosphamide have been found in concentrations of up to 4.5 $\mu\text{g/L}$ in hospital wastewaters and at levels of ng/L in municipal wastewater.⁸³ The cancer drug and antiestrogen Tamoxifen (breast cancer therapy), has been detected at concentrations in STP effluents ranged between 146 and 369 ng/L.⁸⁴ In the last decades consumption trends at an international and national scale of anticancer drugs has increased substantially leading to increased levels released in the environment, especially in surface waters and in STPs. Furthermore, due to the rise of anticancer home treatments, anticancer prescribed drugs can be found in municipal wastewater and in hospital effluents.⁸⁵ Platinum anticancer drugs are widely used. Cancerostatic platinum compounds, such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin has been monitored in wastewater of an oncologic ward of the Vienna

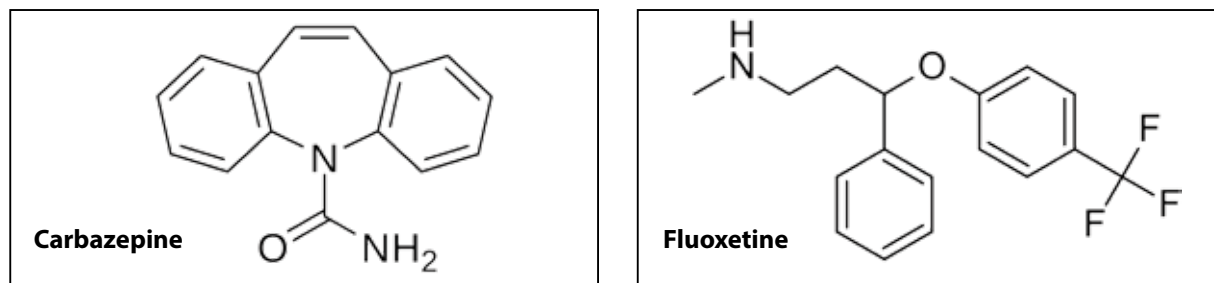


Figure 6. Chemical structures of Carbazepine and Fluoxetine

University Hospital. Concentration levels ranging from 4.7 to 145 µg/L were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).⁸⁶

Antibiotics in surface water and wastewater

The widespread use of antibiotics over 50 years in human medicine and in intensive animal husbandry has as a consequence the emergence of new antibiotic pollutants in the environment and their metabolites in surface and wastewater. The end result was the emergence of water bacteria resistant to antibiotics in aquatic areas. Many studies focused on the fate and metabolic transformations of several antibiotics in the aquatic environment, including sulfonamides, nitrofurans, terfenadines, cephalosporins and cyclosporins. The results of these studies showed that antibiotic metabolites are of considerable persistence and are localized to groundwater and drinking water supplies.⁸⁷ STPs are among the main sources of antibiotics' release into the environment. The occurrence of antibiotics in the aquatic environment and surface water can promote the selection of antibiotic resistance genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB), which can increase health risks to humans and animals. Despite Intense efforts by environmental scientists to control antibiotic resistance in the environment there are still important technological gaps.⁸⁸ Persistent antibiotics in municipal water recycling is known to facilitate the development of proliferation of resistant strains of bacteria. Although conventional biological STPs processes are effective for the removal of some antibiotics, many have been reported to occur at concentrations of 10-1000 ng/L in secondary treated effluents. The type of antibiotics found are beta-lactams, sulfonamides, trimethoprim,

macrolides, fluoroquinolones, and tetracyclines. The effectiveness of ATPs has increased substantially recently by including tertiary media filtration, ozonation, chlorination, UV irradiation, activated carbon adsorption, and NF/RO (nanofiltration/reverse osmosis membranes) techniques of advanced filtration with good elimination results.^{89,90}

Hospital wastewater. Disinfectants, diagnostic aids and drugs in wastewater effluents

In the last decades large volumes of disinfectants, detergents, chemical reagents and radioactive elements (diagnostic aids in hospitals) are disposed in the wastewater from hospitals. The concentrations of these compounds in the hospital effluents vary from ng/L to µg/L. Many of these chemical compounds resist normal wastewater treatment and end up in surface waters where they can influence the aquatic ecosystem and interfere with the food chain. Aware of this problem, hospitals in the developed countries are giving increasing attention to the nature of their wastewater effluents and their impact on the environment, by implementing more efficient effluent management policies. Hospital wastewater contains also microbial agents and multiresistant microbial strains. Separating hospital wastewater from public sewers warrants in-depth evaluation by technologists and ecotoxicologists as well as public health specialists.⁹¹

Studies in a big hospital (e.g. Lyon, France) showed that they are using around a thousand different chemicals, disinfectants and pharmaceuticals. A great number of these chemical substances are excreted as non-metabolized drugs finding their way to the hospital wastewater. Seventy (70) of them have the

potential to bioaccumulate in the aquatic species.⁹² Analytical procedures and toxicological measurements were applied to the wastewater treated effluents under various conditions. Halogenated compounds and heavy metals were measured. For toxicity assessment of wastewater, the bioluminescence assay using *Vibrio fischeri* photobacteria, 72-h EC_{50} algae growth *Pseudokirchneriella subcapitata* and 24-h EC_{50} on *Daphnia magna* were used. This methodology is considered as a semi-quantitative risk evaluation of hospital effluents.⁹³ In the other hand hospital effluents and urban wastewater have some common characteristics of emerging micropollutants and advanced treatment methodologies can be applied effectively in both cases.⁹⁴

Ecotoxicological effects of pharmaceuticals and medical active compounds

Toxicological studies of pharmaceuticals in the aquatic environment have their own problems. Medicinal active substances at environmental conditions may affect the same pathways in experimental animals having identical or similar target organs, tissues, cells or biomolecules. Certain receptors in lower animals resemble those in humans, others however, are different or lacking, which means that dissimilar modes of actions may occur. Ecotoxicity testing merely provided indications of acute effects *in vivo* in organisms of different trophic levels after short-term exposure or long-term (chronic) exposures. These data are ultimately used for ecological risk assessments. *In vitro* toxicological tests are becoming more important, but they are not sufficient for assessing the toxicological profiles of a drug, particularly as a basis for risk analysis. In the last decade mathematical models are used for estimation/prediction of ecotoxicity of hazardous chemicals under environmental conditions. The most often applied programme by toxicologists is Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR or ECOSAR).^{95,96}

Most of the scientific literature about ecotoxicological effects of pharmaceutical residues and their metabolites focused on acute toxicity in standardized tests on aquatic organisms. Ecotoxicologists suggest that transformation products of drugs in the aquatic environment may have higher toxicity to aquatic

species due to speciation, solubility and lipophilicity. For example, phototransformation products of the drug naproxen showed higher toxicities than the parent compound.⁹⁷ Chronic effects of drug residues are less investigated although often are not related to short-term exposures. However, long-term exposures are needed for an accurate environmental and ecotoxicological risk assessment.⁹⁸ Drugs, antibiotics and other medicinal active compounds are assessed for acute toxicity by using established biotests (these tests have been approved by OECD, EPA and other toxicological institutes) in laboratory organisms, such as algae, zooplankton, invertebrates and fish.

Acute toxicity tests of drugs and standardized bioassays

Acute toxicity data of more than 100 drugs were compiled in a list from different sources. The toxicity data suggested that algae were more sensitive to the pharmaceuticals than *Daphnia magna*, and fish were even less sensitive. The most toxic classes of drugs were antidepressants, antibacterials and antipsychotics. There are various considerations among toxicologists as to the suitability of biotests for risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic organisms.^{99,100}

A series of aquatic organisms are used for ecotoxicity tests (Figure 7). Acute toxicity tests were performed for caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin at environmental occurring concentrations, using 4 organisms including bioluminescence response in *Vibrio fischeri* (is an oxidase-positive, Gram-negative bacteria), growth inhibition in *Ischochrysis galbana* (marine water) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (fresh water) and fertilization and embryo-larval development in *Paracentrotus lividus* (is a species of purple sea urchin). Results indicated that acute toxicity was found above environmental concentrations in the order of mg/L for bacteria bioluminescence, microalgae growth inhibition and sea urchin fertilization. The risk calculated for drugs suggested they are harmless for aquatic environment except when applying the embryo-larval development endpoint.¹⁰¹

Diclofenac is a drug that has one the highest acute toxicity within the class of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID). Short-term acute toxicity

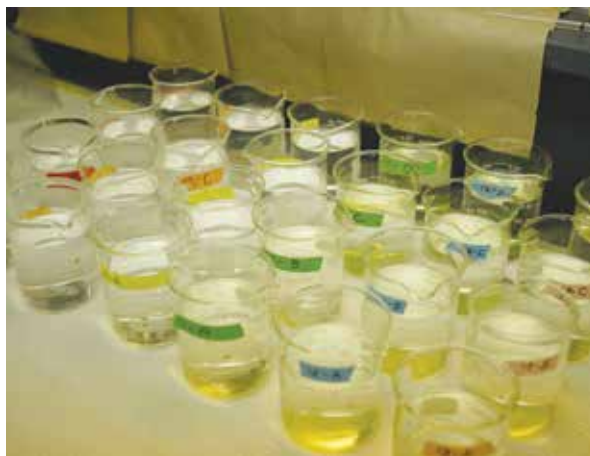


Figure 7. *Daphnia magna* is used for a standardized ecotoxicity test. *D. magna* is specified to be used in the OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Tests No. 202 and test 211

for diclofenac were performed in algae, invertebrates and phytoplankton.^{102,103} Experiments with zebrafish exposed to 320 µg/L in diclofenac did not notice any adverse effects. This NOEC indicates that there is sufficient safety margin for fish populations, because concentrations in European rivers have been in the range of ng/L or low µg/L.¹⁰⁴

Frequently measured pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac, metoprolol) in aquatic environmental samples were tested for acute toxicity in fish embryo. These toxicity tests with *Danio rerio* are based on the draft of OECD test protocol. The results showed critical effects on growth retardation above 30.6 mg/L for carbamazepine, on hatching, yolk sac and tail deformation above 1.5 mg/L for diclofenac, and on scoliosis and growth retardation above 12.6 mg/L for metoprolol. Scoring all effect parameters, the 72-h-EC₅₀ values were: for carbamazepine 86.5 mg/L, for diclofenac 5.3 mg/L and for metoprolol 31.0 mg/L (mean measured concentrations).¹⁰⁵ The acute toxicity of beta-blockers propranolol, metoprolol and verapamil were studied in *Daphnia magna* presenting the highest acute toxicity among BBs.¹⁰⁶ Biotests with β-blockers metoprolol and verapamil caused the acceleration of the heart beat rate at low concentration, but lowered it at high concentrations in *Daphnia magna*.¹⁰⁷ A study (*Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays) found that toxicity was reduced in the range from 30% to 100% after photodegradation methods were used to reduce the concentration in sewage.¹⁰⁸

Similar acute toxicities are found in blood-lipid lowering agents. Clofibrate showed LC50 values in the range of 7.7–39.7 mg/L which can be classify the drug as harmful to aquatic organisms. Another bioassay, with fish *Gambusia holbrooki* (a sensitive organisms used in biotests) established an LC50 (96 hours bioassay) of 7.7 mg/L.¹⁰⁹ Neuroactive compounds (antiepileptics and antidepressants), such Fluoxetine (serotonin re-uptake inhibitor), were observed in toxicity bioassays to have high acute toxicity, ranging from EC₅₀ (48 hour, algae bioassay) 0.024 mg/L to LC50 (48 h) 2 mg/L.^{2,110} Diazepam and carbamazepine (antiepileptics) are classified as potentially harmful to aquatic organisms, because most of the acute toxicity data are below 100 mg/L (experiments in *Daphnia magna*). Acute toxicity of carbamazepine was found at 17.2 mg/L in *Daphnia magna*.⁹

Cytostatic and anticancer drugs showed acute toxicity at environmental concentrations. In a recent research paper 6 anticancer drugs (5-fluorouracil, capecitabine, cisplatin, doxorubicin, etoposide, and imatinib) were tested in crustaceans, such as *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, etc. Acute ecotoxicological effects occurred at concentrations in the order of mg/L, higher than those predicted in the environment, and the most acutely toxic drugs among those tested were cisplatin and doxorubicin for most aquatic organisms. For chronic toxicity, cisplatin and 5-fluorouracil showed the highest toxic potential in all test organisms, inducing 50% reproduction inhibition in crustaceans

Table 1. Ratio between acute and chronic toxicity in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* (48 h/21 days).^{99,117-119}

Pharmaceutical	Acute toxicity (mg/L)	Chronic toxicity (mg/L)	Ratio
Acetylsalicylic acid	1293.1	1.4	924
Salicylic acid	1031.7	13.3	77
Clofibrate	28.2	0.01	2820
Naproxen	66.4	0.33	201
Naproxen Na	43.6	0.68	64

at concentrations on the order of $\mu\text{g/L}$. Rotifers were less susceptible to these pharmaceuticals. On the basis of chronic results, the low effective concentrations suggest a potential environmental risk of cytostatics. Thus, this study could be an important starting point for establishing the real environmental impact of cytostatic substances.¹¹¹

Chronic toxicity tests and standardized bioassays

Chronic toxicity tests are less frequently performed compared to acute toxicity. They measure continuous exposures to medicinal active compounds in aquatic organisms over long periods of time for single substance and mixtures of drugs. These studies indicate that chronic exposure of fish to pharmaceutical mixtures and wastewater impacts reproduction and induces histopathological changes, similar to what we have previously seen with single compound exposures. These data suggest that fish populations exposed to pharmaceuticals discharged in wastewater are at risk of negative impacts to their reproductive capacity and health.¹¹² Chronic toxicity studies with ibuprofen on freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* used a series of biomarkers. These results pointed out a slight cytogenotoxicity on zebra mussel hemocytes at the IBU concentration of $0.2 \mu\text{g/L}$, with higher IBU concentrations able to significantly increase both genetic and cellular damage. In addition, ibuprofen seems to have a considerable effect on the activities of antioxidant and detoxifying enzymes as shown in the exposed specimens' notable oxidative status imbalances.¹¹³

Chronic toxicity tests were conducted for a long period of time with the synthetic steroid EE2 (17 α -ethinylestradiol, active substance in contraceptive

pills) at extremely low and environmentally relevant concentrations. This steroid has been shown in many fish to induce estrogenic effects. Exposure of fathead minnows over their life cycle indicates reproductive effects at low concentrations of EE2.¹¹⁴ Male fish exposed to EE2 at 4 ng/L failed to develop normal secondary sexual characteristics and the sex ratio was altered. Another study showed vitellogenin (VTG) induction in fathead minnows with an EC_{50} value as low as 1 ng/L ; EE2 was 25–30 times more potent than estradiol, confirming previous reports on VTG induction at concentrations between 0.1 and 1 ng/L .^{115,116}

Toxicologists use very often for their evaluation of hazard and risk assessment, the ratio between acute to chronic toxicity of chemical pollutants/contaminants. For pharmaceuticals, this is difficult, because only very rarely, a systematic analysis of a given drug in both acute and chronic toxicity in a single species is performed. Apart from EE2, there are only a few examples of chronic toxicity tests. Studies until now showed that for similar drugs, these ratios in *Daphnia magna* vary by two orders of magnitude. For all other drugs, only partial information is available on a given species. The examples presented in Table 1 confirm that chronic toxicity cannot be derived from acute toxicity by simple calculations.

There are limited toxicological studies dealing with the effects of mixtures of pharmaceuticals in the aquatic environment and their ecological potential for damage to ecosystems. In a toxicity study a mixture of NSAID drugs (diclofenac, ibuprofen, naproxen, acetylsalicylic acid) has been evaluated using acute *Daphnia magna* and algal tests. Toxicity of the mixture was found at concentrations at which the single compound showed no or only little effects. The mixture toxicity followed the concept of concentration addition, which means that

the concentrations of each compound behaved in an additive fashion. The anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen act unspecific by non-polar narcosis. The measured toxicities of the tested pharmaceuticals showed that acute effect of single substances in the aquatic environment are very unlikely, but there are possibilities for considerable combination or additive effects at chronic toxicity studies. Most measurements of mixture of drugs in aquatic samples showed that they have much higher toxic potential.¹²⁰⁻¹²²

A number of toxicological studies with pharmaceutical residues were conducted on marine fish. A critical review collected data on a series of pharmaceuticals, such as NSAID drugs, BBs, azoles and antibiotics, and selective serotonin reuptake inhibitors. Water concentrations were between $\mu\text{g/L}$ and mg/L , typically at least 1 order of magnitude higher than concentrations normally found in surface waters (ng/L). Adverse biological effects on fish in the laboratory tests were similar to other mammals. Although generally effect levels for pharmaceuticals are higher than those found in the environment, the risks to wild fish populations have not been thoroughly characterised (especially chronic exposure). Scientists suggest that as global consumption of pharmaceuticals rises, an inevitable consequence is an increased level of pollution of surface and ground waters with these active drugs, and thus in turn a greater potential for adverse effects in aquatic wildlife.¹²³

A recent review presented the occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater (more than 100 priority drugs at high concentrations) and their environmental risk in the aquatic environment after secondary treatment. The highest amounts discharged through secondary effluent pertain to one antihypertensive, and several beta-blockers and analgesics/anti-inflammatories, while the highest risk is posed by antibiotics and several psychiatric drugs and analgesics/anti-inflammatories.⁹⁴ The presence of 10 anticancer drugs was studied along the entire urban water cycle—from hospital effluents through urban WTPs till surface waters—and their potential environmental risk was assessed. Azathioprine, etoposide, docetaxel, paclitaxel, methotrexate, cyclophosphamide, tamoxifen and ciprofloxacin were detected in hospital effluent and in the urban influent of the STPs although most of them were totally eliminated after treatment. Tamoxifen and

ciprofloxacin (veterinary practices), were also detected in the river upstream the sewage discharge. In addition, they both were considered to pose a potential risk to the environment based on the levels found in sewage effluent together with their ecotoxicological impact in selected organisms.¹²⁴

Conclusions and future directions

The presence of medicinal active compounds, as residues and metabolites, in sewage treatment plants (STPs) and subsequently in the aquatic systems has increased scientific awareness about emerging environmental pollutants and threats to quality of aquatic systems, adverse health effects to aquatic organisms and ecosystems. There is a need to increase the knowledge about the fate of pharmaceuticals during sewage treatment for implementation of better removal techniques. Future work on STP treatment optimization will show to what extent pharmaceuticals can be removed from wastewater and to what extent the implementation of an improved technology is feasible, taking into account other macro- and micro-pollutants as well as the broad variety of complex wastewater matrices. Our present knowledge about residues of pharmaceuticals in aquatic systems indicate that they are unlikely to pose a risk for acute toxicity. Environmental concentrations are in the range of 10^3 (mg/L) to 10^7 (100 ng/L) times lower than known LC_{50} or EC_{50} values. In the other hand, there is a general lack of chronic toxicity data on pharmaceuticals, particularly in fish. Many pharmaceuticals need more investigation about potential long-term ecotoxicological effects, particularly with respect to potential disturbances in hormonal homeostasis (endocrine disruption), immunological status, or gene activation. Current data on acute and chronic toxicity of pharmaceuticals support to the conclusion that more target- or biomolecule-oriented, or mode-of-action-based investigations, will allow more relevant insights into effects on survival, growth and reproduction than traditional standard ecotoxicity testing. Unless more is known about possible chronic effects of individual pharmaceuticals and mixtures, conclusions concerning hazards or risks of pharmaceuticals to the aquatic ecosystem are premature. □

Απόβλητα Φαρμακευτικών Δραστικών Ουσιών, ένα Αναδυόμενο Περιβαλλοντικό Πρόβλημα

Φαρμακευτικές Ύλες, Αντιβιοτικά και Απολυμαντικά στο Υδάτινο Περιβάλλον και Τοξικολογικές Επιπτώσεις

Αθανάσιος Βαλαβανίδης, Θωμαΐς Βλαχογιάννη, Σπυρίδων Λωρίδας και Κωνσταντίνος Φιωτάκης

* Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784

Περίληψη

Medicinal active compounds, antibiotics and disinfectants are used in various medical and therapeutic applications in hospital and at home. Eventually, pharmaceuticals are disposed in thousands of tonnes every year in drains and eventually reach the aquatic environment causing substantial toxicological problems in aquatic organisms. The occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment has been recognized in the last decade as a serious emerging environmental problem in most developed countries. Recently, pharmaceuticals have been detected in surface water, ground water, drinking water and in rivers in many areas of the globe. The problem was not so well known due to limitations to analytical methodologies of polar compounds, but current advances in environmental residue and metabolite analysis have improved the

ability to measure extremely low concentrations. The most important classes of drugs found in sewage and surface waters are anti-inflammatory and analgesic drugs, beta-blockers, blood lipid lowering agents, neuroactive compounds, antibiotics, antineoplastic drugs, antidiabetics, steroid hormones, etc. This review presents some of the important studies on the levels of pharmaceuticals in sewage treatment plants and surface waters, their biotransformations and removal by new techniques. Also, the review covers acute and chronic toxicological studies that established the hazardous levels of drugs in the aquatic environment. Finally, the review presents some ecotoxicological approaches to the emerging nature of pharmaceutical pollutants in relation to ecosystem's health.

* **Αλληλογραφία:** Αθανάσιος Βαλαβανίδης,
E-mail: valavanidis@chem.uoa.gr

References

1. Kümmerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, 957-969, 2001.
2. Kümmerer K. (Ed) (2008). *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2004. (3rd revised,).
3. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131, 5-17, 2002.
4. Crane M., Watts C., Boucard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Review Sci. Total Environ.* 367, 23-41, 2006.
5. IMS Institute for Healthcare Informatics 2012 (856 US \$ bn) sales for the Global pharma markets. [<http://pharmexpand.com/wordpress/?p=223>].
6. IMS Health Market (June 2013) [<http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global>].
7. IMS World Review Analyst 2013 [<http://www.abpi.org.uk/industry-info/knowledge-hub/global-industry/Pages/industry-market.aspx>].
8. Huschek G, Hansen P.D., Maurer H.H., Kregel D., Kayser A. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environ. Toxicol.* 19, 226-240, 2004.
9. Thaker P.D. Pharmaceutical data elude researchers. *Environ. Sci. Technol.* 139, 193A-194A, 2005.

10. Kümmerer K. Pharmaceuticals in the environment. *Ann. Rev. Environ./Resources* 35, 57-75, 2010..
11. Robles-Molina R., Lara-Ortega F., Gilbert-Lopez B., Garcia-Reyes J.F., Molina-Diaz J. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1350, 30-43, 2014.
12. Baker D.R., Kaspzyk-Hordern B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Sci. Total Environ.* 454-455, 442-456, 2013.
13. Yu Y., Wu L., Chang A.C. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 442,310-316, 2013.
14. Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. In Vitro*, 15, 477-488, 2001.
15. Fent K., Weston A.A., Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicol.* 76, 122-159, 2006.
16. EMEA. *Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use*, CMPC/SWP/4447/draft. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London, 2005.
17. Food and Drug Administration-CDER. *Guidance for Industry-Environmental Assessment of Human Drugs and Biologics Applications, Revision 1*. FDA Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, USA, 1998.
18. Boxall A.B., Kolpin D.W., Halling-Sorensen B., Tolls J. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* 37, 286A-294A, 2003.
19. Wu M. Without prescription: A framework for preventing pharmaceutical contamination of our nation's drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 45, 366-367, 2011.
20. National Environmental Policy Act. *U.S. Code*, Section 4321 et seq., Title 42; Environmental Impact Considerations. *U.S. Code*, Section 25.10, Title 21. 1970.
21. Phillips P.J. Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4910-4916, 2010.
22. Spellman F.R. (2014) *Personal Care Products and Pharmaceuticals in Wastewater and the Environment*. DE Stech Publications, Lancaster, PA, USA.
23. Hemando M.D., Mazcua M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69,334-342, 2006.
24. Aga D.S (Ed). (2010) *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Holm J.V., Rugge K., Bjerg P.L., Christensen T.H. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci.Technol.* 29, 1415-1420, 1995.
26. Sim W-J, Lee J-W, Lee E-S, Shin S-K, Hwang S-R, Oh J-E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures *Chemosphere* 82, 179-186, 2011.
27. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere* 75, 435-441, 2009.
28. Rico A., Oliveira R., McDonough S., Matser A., Khatikarn J., et al. Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. *Environ. Pollut.* 191, 8-16, 2014.
29. Aris A.Z., Shamsuddin A.S., Praveena S.M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 69, 104-119, 2014.
30. Brausch J.M., Connors K.A., Brooks B.W., Rand G.M. Human pharmaceuticals in the aquatic environment. A review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Reviews Environ. Contam. Toxicol.* 219,1-89, 2010.
31. Corcoran J., Winter M.J., Tyler C.R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Reviews Toxicol.* 40, 287-304, 2010.
32. Ternes T., Jos A, Siegrist H. Scrutinizing pharma-

- ceutical and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 393–339, 2004.
33. Ternes T., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.-J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3855–3863, 2002.
 34. Urase T., Kikuta T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res.* 39, 1289–1300, 2005.
 35. Jelic A., Gross M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M., Barcelo D.. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Res.* 46, 1165–1176, 2011.
 36. Kreuzinger N., Clara M., Strenn B., Kroiss H. Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Water Sci. Technol.* 50, 149–156, 2004.
 37. Lindqvist N., Tuhkanen T., Kronberg L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res.* 39, 2219–2228, 2005.
 38. Verlicchi P., Al Aukidy M., Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–156, 2012.
 39. Yang, X., Flowers R.C., Weinberg H.S., Singer P.C. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Res.* 45, 5218–5128, 2011.
 40. Kostich M.S., Batti A.L., Lazorchak J.M. Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environ. Pollut.* 184, 354–359, 2014.
 41. Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926, 2004.
 42. Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001–1012, 2007.
 43. Thomas P.M., Foster G.D. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs, caffeine, and triclosan in wastewater by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health A* 39, 1969–1978, 2004.
 44. Gros M., Petrović M., Ginebreda A., Barceló D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36, 15–26, 2010.
 45. Roberto Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330, 2003.
 46. Calisto V., Domingues M.R.M., Esteves V.I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments—Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 45, 6097–6106, 2011.
 47. Michael I., Vasquez M.I., Hapeshi E., Haddad T., Barinska I., Kummerer K., Fatta-Kassinos D. (2014) Metabolites and transformation products of pharmaceuticals in the aquatic environment as contaminants of emerging concern. In: Labropoulou D.A., Nollet L.M.L. (Eds). *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment. Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK, pp. 413–457.
 48. de Jongh C.M., Kooij, P.J.F., ter Laak, T.L., Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. *Sci. Total Environ.* 427–428, 70–77, 2012.
 49. Padhye, L.P., Yao, H., Kung'u F.T., Huang, C-H. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Res.* 51, 266–276, 2014.
 50. Villanueva, C.M., Kogevinas, M., Cordier, S., Templeton, M.R., Vermeulen R., et al. Assessing exposure and health consequences of chemicals in drinking water: Current state of knowledge and research needs. *Environ. Health Perspect.* 122, 213–221, 2014.
 51. Rogers, I.H., Birtwell, I.K., Kruznyski G.M. Organic extractables in municipal wastewater of Vancouver,

- British Columbia. *Water Pollut. Res. J. Can.* 21, 187–204, 1986.
52. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17, 2002.
 53. Pal A., Gin K.Y., Lin A.Y., Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 408, 6062–6069, 2010.
 54. Li W.C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201, 2014.
 55. Shala L., Foster G.D. Surface water concentrations and loading budgets of pharmaceuticals and other domestic-use chemicals in an urban watershed (Washington, DC, USA). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 551–561, 2010.
 56. Claessens M., Vanhaecke L., Wille K., Janssen C.R. Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. *Mar. Pollut. Bull.* 71, 41–50, 2013.
 57. Bu Q., Wang B., Huang J., Deng S., Yu G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: a review. *J. Hazard Mater.* 262, 189–211, 2013.
 58. Ortiz de García S., Pinto Pinto G., García Encina P., Irusta Mata R. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Sci. Total Environ.* 444, 451–465, 2013.
 59. Roberts P.H., Thomas K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 256, 143–153, 2006.
 60. Ashton D., Hilton M., Thomas K.V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184, 2004.
 61. Kolpin D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber L.B., Buxton H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211, 2002.
 62. Thomas K.V., Hilton M.J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436–444, 2004.
 63. Sedlak D.L., Pinkston, K.E. Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *J. Contemp. Water Res. Educ.* 152, 56–64, 2011.
 64. Loos R., Raquel Carvalho R., António D.A., Comero, S., Locoro G., Tavazzi S., Paracchini B., Ghiani M., Lettieri T., Blaha L., Jarosova B., Voorspoels S., Servaes K., Haglund P., Fick J., Lindberg R.H., Schwesig D., Gawlik B.M. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 47, 6475–6487, 2013.
 65. Ternes T., Hirsch R., Mueller J., Heberer K. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and alpha 2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* 362, 329–340, 1998.
 66. Gross B., Montgomery-Brown J., Naumann A., Reinhard M. Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2074–2083, 2004.
 67. Tran N.H., Li J., Hu J., Ong S.L. Occurrence and suitability of pharmaceuticals and personal care products as molecular markers for raw wastewater contamination in surface water and groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 4727–4740, 2014.
 68. Shanmugam G., Sampath S., Selvaraj K.K., Larsson D.G., Ramaswamy, B.R. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 921–931, 2014.
 69. Verlicchi P., Al Aukidy M., Galletti A., Petrovic M., Zambello E. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 430, 109–118, 2012.
 70. Metcalfe C.D., Koeni B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A., Hirsch R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2872–2880, 2003.
 71. Kosjek T., Heath E., Krbavcic A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) resi-

- dues in water samples. *Environ. Int.* 31, 679-685, 2005.
72. Ziylan A, Ince N.H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. *J. Hazard Mater.* 187, 24-36, 2011.
 73. Gabet-Giraud V., Miège C., Choubert J.M., Ruel S.M., Coquery M. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 408, 4257-4269, 2010.
 74. Scheurer M., Ramil M., Metcalf C.D., Groh, S., Ternes T.A. The challenge of nalyszing beta-blocker drugs in sludge and wastewater. *Anal.Bioanal. Chem.* 396,845-856, 2010.
 75. Maszkowska J., Stolte S., Kumirska J., Łukaszewicz P., Mioduszevska K. Puckowski A, Caban M, Wagil M, Stepnowski P, Białk-Bielińska A. Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis study. *Sci. Total Environ.* 493,1112-21, 2014.
 76. Maszkowska J., Stolte S., KumirskaJ., Łukaszewicz P., Mioduszevska K, Puckowski A, Caban M, Wagil M, Stepnowski P, Białk-Bielińska A. Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Sci. Total Environ.* 493,1122-26, 2014.
 77. Heberer T., Stan H.J. Determination of clofibric acid and *N*-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 67,113-123, 1997.
 78. Farré M.L., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras L., Olivella L, Tirapu L, Vilanova M, Barceló D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A*, 938,187-197, 2001.
 79. Heberer T., Reddersen K., Mechlinski A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.*, 46, 81-88, 2002.
 80. Golovko O., Kumar V., Fedorova G., Randak T., Grabic, R. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 111, 418-426, 2014.
 81. Rosal R., Rodea-Palmonares J., Boltes K., Fernandez-Pinas F., Leganés F, Gonzalo S, Petre A. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17,135-144, 2010.
 82. Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Löffler J., Reincke H, Schmidt R, Stachel B, von Tümpling W, Wanke A. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, 57,107-126, 2004.
 83. Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 174-179, 1997.
 84. Roberts P.H.,Thomas K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 356,143-153, 2006.
 85. Besse J.-P., Latour, J-F., Garric J. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ. Int.* 39, 73-86, 2012.
 86. Lenz, K., Hann S., Koellensperger G., Stefanka Z., Stinger G., Weissenbacher N., Mahnik S.N., Fuerhacker M. Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital waste water and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Sci. Total Environ.* 345,141-152, 2005.
 87. Manzetti S., Ghisi R. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 7-15, 2014.
 88. Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci.Total Environ.* 447, 345-360, 2013.
 89. Le-Minh N., Khan S.J., Drewes J.E., Stuetz R.M. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res.* 44, 4295-4323, 2010.
 90. Kimura K., Amy G., Drewes J.E., Heberer T., Kim T.-U., Watanabe Y. Rejection of organic micropollutants (disinfection by-products, endocrine disrupting compounds, and pharmaceutically active compounds) by NF/RO membranes. *J. Membrane Sci.* 227,113-121, 2002.

91. Pauwels B., Verstraete W. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J. Water Res.* 4, 405-416, 2006.
92. Jean J., Perrodin Y., Pivot C., Trepo D., Perraud M., et al. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J. Environ. Manag.* 103, 113-121, 2012..
93. Emmanuel E., Perrodin Y., Keck G., Blanchard J.M., Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J. Hazard Mater.* 117, 1-11, 2005.
94. Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *J. Hydrol.* 389, 416-428, 2010.
95. Sanderson H., Johnson D.J., Reitsma T., Brain R.A., Wilson C.J., Solomon K.R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul. Toxicol. Pharm.* 39, 158-183, 2004.
96. Bradbury S.P. Quantitative structure-activity relationships and ecological risk assessment: an overview of predictive aquatic toxicology research. *Toxicol. Lett.* 79, 229-237, 1995.
97. Isidori M., Lavorgna A., Nardelli A., Parrella L., Previtera L., Rubino M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348, 93-101, 2005.
98. Ferrari B., Paxéus N., Giudice R.L., Pollio A., Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359-370, 2003.
99. Webb S.F. (2001) A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 319-343.
100. Brausch J.M., Connors K.A., Brooks B.W., Rand G.M. Human pharmaceuticals in the aquatic environment./ A review of recent toxicological studies and consideration for toxicity tests. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 218, 1-89, 2012.
101. Aguirre-Martínez G.V., Owuor M.A., Garrido-Pérez C., Salamanca M.J., Del Valls T.A., Martín-Díaz M.L. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 2014 Epub ahead of print
102. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309-315, 2004.
103. Ferrari B., Paxéus N., Lo Giudice L., Pollio A., Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359-370, 2003.
104. Memmert U., Armin Peither A., Burri R., Weber K., Schmidt T., Sumpter J.P., Hartmann A., Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 442-452, 2013.
105. van den Brandhof E.-J. Montforts M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1862-1866, 2010.
106. Hernando M.D., Petrovic M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D. Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for beta-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *J. Chromatogr. A*, 1046, 133-140, 2004.
107. Villegas-Navarro A. Rosas-L E., Reyes J.L. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comp. Biochem. Phys. C*, 136, 127-134, 2003.
108. Czech B., Joško I., Oleszczuk P. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 247-253, 2014.
109. Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere* 57, 1581-1589, 2004.
110. Brooks B.W., Foran C.M., Richards S.M., Weston J., Turner P.K., Stanley J.K., Solomon K.R., Slattery M., La Point T.W. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett* 142, 169-183, 2003.
111. Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C. Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans. *Chemosphere*, 2014. In press

112. Galus M., Jeyaranjaan J., Smith E., Li H., Metcalfe C., Wilson J.Y. Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 132-133, 212-222, 2013.
113. Parolini M., Binelli A., Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1586-1594, 2011.
114. Länge R., Hutchinson T.H., Croudace C.P., Siegmund F. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216-1227, 2001.
115. Brian J.V., Harris C.A., Scholze M., Backhaus T., Booy P., Lamoree M., Pojana G., Jonkers N., Runnalls T., Bonfà A., Marcomini A., Sumpter J.P. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ. Health Perspect.* 113, 721-728, 2005.
116. Pawlowski S., van Aerle R., Tyler C.R., Braunbeck T. Effects of 17alpha-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 330-345, 2004.
117. Marques C.R., Abrantes N., Goncalves F. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans. I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environ. Toxicol.* 19, 518-526, 2004.
118. Marques C.R., Abrantes N., Goncalves F. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans. II. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites. *Environ. Toxicol.* 19, 527-540, 2004.
119. Isidori M., Lavoragna M., Nardelli A., Parrella A., Previtera L., Rubino M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348, 93-101, 2005.
120. Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-194, 2003.
121. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309-315, 2004.
122. Cleuvers M. (2008) Chronic mixture toxicity of pharmaceuticals to *Daphnia*-The example of non-steroidal anti-inflammatory drugs. In : Kummerer K (Ed). *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects, Risk*. Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, 3rd revised ed., chapter 17, pp.277-284.
123. Corcoran J., Winter M.J., Tyler C.R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Rev. Toxicol.* 40, 287-304, 2010.
124. Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environ. Pollut.* 193, 216-223, 2014.

Νέα Φαρμακευτικά Σκευάσματα στη Μάχη για τον Καρκίνο: πώς οι Αγωνιστές των Υποδοχέων Τύπου Toll (TLRs) Ενισχύουν τη Δράση των Αντικαρκινικών Εμβολίων

Πηνελόπη Σαμαρά¹, Σπυριδούλα-Αγγελική Νίκου¹, Σωτήριος Φόρτης^{1,2},
Ιωάννης Βουτσάς², Κωνσταντίνος Μπαξεβάνης², Ουρανία Τσιτσιλώνη^{1*}

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσια, 15784, Αθήνα

²Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας», Λεωφ. Αλεξάνδρας 171, 11522, Αθήνα

Περίληψη

Οι αγωνιστές των υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), προάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών τύπου T_H1 και ενισχύοντας τις αποκρίσεις των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων. Οι μέχρι σήμερα προκλινικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι οι αγωνιστές των TLRs μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων αντικαρκινικού εμβολιασμού. Σήμερα, τρεις TLR αγωνιστές έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ για κλινική χρήση στον άνθρωπο. Όμως, η ευρεία εφαρμογή τους συνοδεύεται από περιορισμούς, κυρίως λόγω της εμφάνισης τοξικότητας ως αποτέλεσμα της συστηματικής παραγωγής αυξημένων συγκεντρώσεων κυτταροκινών. Στην επισκόπηση αυτή, χρησιμοποιώντας επιλεγμένα παραδείγματα από προκλινικές και

κλινικές μελέτες, παρουσιάζουμε συνοπτικά, τα μέχρι τώρα δεδομένα για την ανοσοενισχυτική δράση των TLR αγωνιστών, ως συστατικών των αντικαρκινικών εμβολίων.

Επίσης, κάνουμε αναφορά στην προοπτική της κλινικής χρησιμοποίησης ενός νέου TLR αγωνιστή, της προθυμοσίνης α, η οποία προάγει την ωρίμανση των DCs και σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου σε πειραματόζωα δείχθηκε να ενισχύει τη λειτουργικότητα των ογκοδραστικών εκτελεστικών κυττάρων, χωρίς την εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών.

Λέξεις-κλειδιά

Αγωνιστές υποδοχέων τύπου Toll (TLRs), Ανοσοενισχυτικά, Αντικαρκινικός εμβολιασμός, DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), Προθυμοσίνη α

1. Εισαγωγή

Οι πρόσφατες επιτυχίες των αντικαρκινικών ανοσοθεραπευτικών κλινικών δοκιμών δείχνουν ότι ο τομέας της ανοσοθεραπείας του καρκίνου έχει πλέον «ωριμάσει». Πράγματι, σύμφωνα με τις τελευταίες εξελίξεις, φαίνεται ότι η επαγωγή μίας ισχυρής ογκοδραστικής

ανοσολογικής απόκρισης *in vivo*, οδηγεί και σε αντικειμενικά, κλινικά μετρήσιμα, αποτελέσματα. Η παραγωγή και η ρύθμιση των αντικαρκινικών ανοσοαποκρίσεων είναι ένα διαδοχικό, πολυπαραγοντικό και σχετικά περίπλοκο γεγονός. Ξεκινά από την παρουσία και την κατάλληλη παρουσίαση των αντιγόνων του όγκου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

* **Συγγραφέας αλληλογραφίας:** Ουρανία Τσιτσιλώνη, τηλ: 210- 7274215, fax: 210-7274635, e-mail: rtsitsil@biol.uoa.gr

και, θεωρητικά, ολοκληρώνεται με την επαγωγή παρατεταμένης διάρκειας προστατευτικής αντικαρκινικής απόκρισης μνήμης. Μία από τις πιο δημοφιλείς αντικαρκινικές ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις είναι ο εμβολιασμός με πεπτίδια που προέρχονται από καρκινικές πρωτεΐνες. Όπως και στην περίπτωση των εμβολίων εναντίον συνήθων παθογόνων μικροοργανισμών, τα αποτελεσματικά αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια περιλαμβάνουν τόσο το/τα αντιγόνο/α όσο και ανοσοενισχυτικά, τα οποία πρέπει να χορηγούνται ταυτόχρονα με το αντιγόνο και μέσω της ίδιας οδού. Κάποιοι από τους συνδέτες (αγωνιστές) των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) έχουν ήδη δείξει σημαντική επαγωγή ανοσοενίσχυσης και βελτιωμένη ικανότητα ενεργοποίησης δραστικών κυττάρων με θεραπευτικό όφελος στον καρκίνο¹. Αρκετοί TLR αγωνιστές βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών, και ακόμη περισσότεροι μελετώνται. Στην παρούσα επισκόπηση, θα αναφερθούμε περιληπτικά σε TLR αγωνιστές που χρησιμοποιούνται σήμερα ως συστατικά των εμβολίων κατά του καρκίνου και θα συζητήσουμε για έναν νέο TLR-4 αγωνιστή, το πολυπεπτίδιο του θύμου αδένος προθυμοσίνη α (προΤα). Θα παρουσιάσουμε τον τρόπο δράσης της προΤα και θα προτείνουμε τρόπους ώστε το πολυπεπτίδιο, ή/και θραύσματα αυτού, να μπορέσουν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για τη βελτίωση της σύνθεσης των αντικαρκινικών εμβολίων.

2. Τα βασικά χαρακτηριστικά των TLRs

Οι TLRs είναι μέλη μίας εξελικτικά συντηρημένης οικογένειας υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων και εκφράζονται σε ποικιλία κυττάρων, ιδιαίτερα του φυσικού σκέλους της ανοσίας. Το γονίδιο Toll ανακαλύφθηκε το 1985 στη *Drosophila*, όπου δείχθηκε να ρυθμίζει τον κεφαλουραίο άξονα ανάπτυξης κατά την εμβρυογένεση και τις λειτουργίες του φυσικού σκέλους της ανοσίας². Το ανθρώπινο ομόλογο της πρωτεΐνης Toll της *Drosophila* ταυτοποιήθηκε το 1997 από τους Medzhitov και συνεργάτες, οι οποίοι έδειξαν ότι το μονοπάτι σηματοδότησης Toll-NF-κΒ είναι συντηρημένο στον άνθρωπο, και ότι οι προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις ενεργοποιούνται μέσω σηματοδότησης από τους TLRs³.

Οι TLRs έχουν εξελιχθεί για να αναγνωρίζουν ξένα (μη εαυτά) στοιχεία, κυρίως μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με

παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) ή μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με μικρόβια (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs), και να εκκινούν ανοσολογικές αποκρίσεις του φυσικού σκέλους της ανοσίας. Τα PAMPs είναι συντηρημένα μοτίβα κοινά σε ιούς, βακτήρια, πρωτόζωα και μύκητες. Παραδείγματα PAMPs αποτελούν ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS, ο οποίος αναγνωρίζεται από τον TLR-4), συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (πεπτιδογλυκάνες, λιποπρωτεΐνες ή σωματίδια *zymosan*, που αναγνωρίζονται από τον TLR-2 μετά τον ετεροδιμερισμό του με τους TLR-1 ή -6), συστατικά των βακτηριακών μαστιγίων (φλαγγελίνες, που αναγνωρίζονται από τον TLR-5), μη μεθυλιωμένα βακτηριακά ή ιικά CpG DNA (που αναγνωρίζονται από τον TLR-9), και ιικά RNA (μονόκλωνα και δίκλωνα [dsRNA], που αναγνωρίζονται από τους TLR-7/8 και TLR-3, αντίστοιχα). Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί δέκα λειτουργικοί TLRs στον άνθρωπο, εκ των οποίων οι TLR-1, -2, -4, -5, -6 και -10 βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια και οι TLR-3, -7/8 και -9 στα ενδοσώματα. Όλοι ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση και φαγοκυττάρωση παθογόνων ή των προϊόντων τους, ενώ σε μερικές περιπτώσεις, οι TLRs της κυτταρικής επιφάνειας, μπορούν να ενδοκυτταρωθούν μετά τη δέσμευση του συνδέτη τους, όπως για παράδειγμα ο TLR-2 που εντοπίζεται στα φαγοσώματα των μακροφάγων. Επιπλέον, ορισμένοι TLRs (π.χ. TLR-2 και -4) δεσμεύουν και μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs). Τα DAMPs αποτελούν μία οικογένεια ενδοκυτταρικών μορίων με ποικίλες λειτουργίες, τα οποία, όταν απελευθερώνονται ή εκκρίνονται από τα κύτταρα, λειτουργούν ως ενδογενή σήματα κινδύνου⁴.

Οι TLRs δομικά ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων TIR (TLR-IL-1), που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I. Διαθέτουν ένα κυτταροπλασματικό μοτίβο TIR για καταρροϊκή σηματοδότηση και ένα εξωκυττάριο τμήμα που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, πλούσιες σε λευκίνες, για την πρόσδεση του συνδέτη τους⁵. Η ενεργοποίηση των TLRs, οδηγεί στη στρατολόγηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-προσαρμογών με μοτίβα TIR, όπως οι MyD88 (myeloid differentiation factor-88), TIRAP (TIR-associated protein), TRIF (TLR-associated-activator of interferon) και TRAM (TLR-associated molecule) (Εικόνα 1). Όλοι οι TLRs απαιτούν τον MyD88 για τη σημα-

τοδότηση, με εξαίρεση τον TLR-3, ο οποίος σηματοδοτεί αποκλειστικά μέσω TRIF, και τον TLR-4, ο οποίος στρατολογεί τόσο τον MyD88 όσο και τον TRIF. Η ενεργοποίηση του MyD88 οδηγεί σε φωσφορυλίωση των MAP κινασών (ERK, JNK, P88), στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και στην έκφραση γονιδίων που προάγουν τη φλεγμονή. Η TIRAP ενεργοποιεί το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι καταρροϊκά των TLR-2 και -4, ενώ ο TRIF μεσολαβεί, μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού, την ενεργοποίηση των MAP κινασών, του IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3) και του NF-κΒ, καταρροϊκά των TLR-3 και -4. Η ενεργοποίηση του IRF-3 είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή ιντερφερονών (IFNs) τύπου Ι. Τέλος, το TRAM ενεργοποιεί το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι καταρροϊκά του TLR-4. Όλα τα παραπάνω γεγονότα οδηγούν στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF)-α, ιντερλευκίνης (IL)-1β, IL-12 και IL-6), IFNs τύπου Ι, και χημειοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν τη συντονισμένη ενίσχυση των λειτουργιών του φυσικού και ειδικού σκέλους της ανοσίας (Εικόνα 1).

Οι TLRs εκφράζονται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα εκφράζουν όλους τους TLRs εκτός του TLR-3, τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα εκφράζουν λειτουργικό TLR-1 και τα Β κύτταρα εκφράζουν κυρίως τους TLR-9 και -10, και σπανιότερα τους TLR-1, -3, -6 και -7. Τα ενεργοποιημένα Τ και τα Τ κύτταρα μνήμης εκφράζουν τον TLR-2, ο οποίος χρησιμεύει ως συνδιεγερτικός υποδοχέας για την ανάπτυξη αντιγονοειδικών Τ κυτταρικών αποκρίσεων και τη διατήρηση των Τ κυττάρων μνήμης. Τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) εκφράζουν τους TLR-8 και -10. Τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) εκφράζουν τους περισσότερους TLRs, ανάλογα με τον υπότυπό τους. Τα πλασματοκυτταρικά DCs (pDCs) εκφράζουν τους TLR-7, -9 και -10, ενώ τα μυελοειδή DCs εκφράζουν όλους τους TLRs εκτός του TLR-9. DCs που διαφοροποιούνται από μονοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα των TLR-2 και -4, χαμηλά επίπεδα των TLR-1, -3, -5, -6, -7 και -8, αλλά δεν εκφράζουν TLR-9 και -10⁶. Η ενεργοποίηση των TLRs επηρεάζει πολλαπλές λειτουργίες των DCs, όπως την πρόσληψη των αντιγόνων, την επεξεργασία και την παρουσίασή τους. Τα διεγερμένα, μέσω των TLRs, DCs εκφράζουν υποδοχείς χημειοκινών, μεταναστεύουν στο σημείο της μόλυνσης και συμβάλλουν στην επαγωγή αντιγονοειδικών Τ κυτταρικών αποκρίσεων.

3. Λειτουργίες των TLRs που σχετίζονται με τους κακοήθεις όγκους

3.1. Ο εξωγενής ρόλος των TLRs στον καρκίνο

Εκτός από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, TLRs εκφράζονται και σε άλλα κύτταρα, όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και τα νευρικά κύτταρα. Ο εξωγενής ρόλος των TLRs τεκμηριώνεται επιπλέον από την έκφρασή τους σε κύτταρα που συμμετέχουν στη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Ενδεικτικά αποτελέσματα σε *in vivo* μοντέλα ποντικών έχουν δείξει ότι:

- Η χορήγηση συνδετών του TLR-3 αύξησε τη διείσδυση ενεργοποιημένων Τ και ΝΚ κυττάρων σε όγκους προστάτη σε ποντίκια, μείωσε τον αριθμό των Tregs και συνέβαλε στην υποστροφή των όγκων⁷,

- Μικρομοριακοί αγωνιστές των TLR-7/8 προκάλεσαν ανοσοαπόκριση τύπου T_H1 , αύξησαν τον αριθμό των ογκοειδικών δραστικών κυττάρων που εκκρίνουν IFN-γ και των λεμφοκυττάρων που διηθούν τους όγκους, ενώ μείωσαν τα CD4+CD25+Foxp3+ Tregs, συμβάλλοντας έτσι, στην αποτροπή δημιουργίας μεταστάσεων από καρκινώματα εντέρου και πνεύμονα⁸,

- Η χορήγηση αγωνιστών του TLR-9 σε pDCs προκάλεσε την επαγωγή μακρόχρονης αντικαρκινικής ανοσίας, η οποία προστάτευσε τα ποντίκια σε μεταγενέστερη χορήγηση κυττάρων μελανώματος⁹.

Στον άνθρωπο όμως, σε αντίθεση με τη διεγερτική δραστηριότητα των TLR συνδετών στον ποντικό, ανθρώπινα pDCs που διηθούσαν τους όγκους παρουσίαζαν CrpG, παρήγαγαν λιγότερη IFN-α και δεν ήταν λειτουργικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η λειτουργική ανεπάρκεια αυτών των pDCs πιθανόν σχετιζόταν με την επαγόμενη από τον όγκο υποέκφραση του TLR-9 σε αυτά¹⁰.

3.2. Ο ενδογενής ρόλος των TLRs στον καρκίνο

Τα καρκινικά κύτταρα επίσης εκφράζουν TLRs, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει και ενδογενής ρόλος των υποδοχέων αυτών στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η ενεργοποίηση των TLRs των καρκινικών κυτ-

τάρων έχει χαρακτηριστεί ως «δίκωπο μαχαίρι», καθώς μπορεί να ενισχύει την ανοσία του ξενιστή έναντι του όγκου, αλλά μπορεί να προάγει και την ανάπτυξη του όγκου. Σε σχέση με τη δεύτερη περίπτωση, πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του TLR-4 με LPS επάγει τη σύνθεση και έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών (IL-6, επαγόμενων ριζών οξειδίου του αζώτου και IL-12) και την έκφραση συνδιεγερτικών επιφανειακών μορίων (B7-H1/PD1 και CD40), τα οποία καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση και στη λύση από κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTLs), και επάγουν την ανέργεια των NK κυττάρων. Επιπλέον, σε όγκους μολυσμένους με βακτήρια, η διέγερση των TLRs προκαλεί τη διαρκή ενεργοποίηση του NF-κΒ, οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε βιοψίες ανθρώπινων γαστρικών καρκινωμάτων, κυρίως όταν ο καρκίνος σχετίστηκε με προϋπάρχουσα λοίμωξη από *Helicobacter pylori*¹¹.

Η διαφορική έκφραση TLRs στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα περιπλέκει ακόμη περισσότερο την τρέχουσα άποψη μας για το αντικαρκινικό όφελος που επάγεται από την ενεργοποίηση των TLRs. Για παράδειγμα, ο TLR-9 υπερεκφράζεται σε χαμηλά διαφοροποιημένους καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών, αλλά υποεκφράζεται σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας. Τα CpG ολιγονουκλεοτίδια, που είναι αγωνιστές του, αυξάνουν τη διήθηση ή/και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη, αστροκυτώματος και γλοιοβλαστώματος. Ωστόσο, σε καρκίνους των ωοθηκών, του πνεύμονα, του εντέρου και σε νευροβλαστώματα, η CpG-επαγόμενη ενεργοποίηση του TLR-9 ανέστειλε την ανάπτυξη των όγκων, προάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω μονοπατιού εξαρτώμενου από τις κασπάσες¹².

Η σύνδεση των poly-I:C ή dsRNA στον TLR-3 καρκινικών κυττάρων νεφρού, προστάτη, τραχήλου της μήτρας και εντέρου, καθώς και σε καρκινικά κύτταρα μαστού και μελανώματος, έδειξε πιο ομοιογενή αποτελέσματα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του TLR-3 προκάλεσε την επαγωγή κυτταροστατικών σημάτων και ανέστειλε την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Αντίστοιχα, ο TLR-5, ο οποίος υπερεκφράζεται σε καρκίνους του μαστού, όταν ενεργοποιήθηκε από τη φλαγγελίνη, ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό

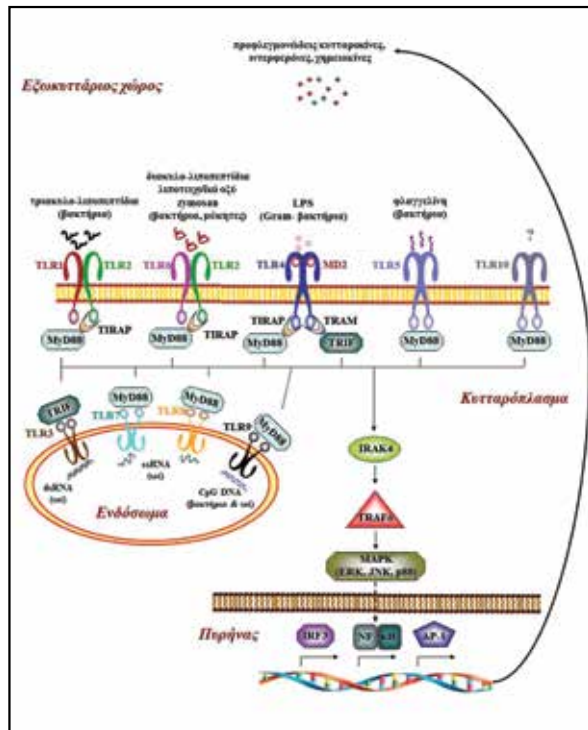
των καρκινικών κυττάρων, τόσο *in vitro*, όσο και σε μοντέλο ξеноμοσχεύματος σε ποντίκια¹².

Αντίθετα, η ενεργοποίηση του TLR-4 από τον LPS σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών δείχθηκε να δημιουργεί ένα προφλεγμονώδες περιβάλλον και να επάγει χημειοανθεκτικότητα. Το ίδιο καταγράφηκε σε πλακώδη καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου, όπου η σηματοδότηση TLR-4/LPS αύξησε τη παραγωγή των IL-6, IL-8, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του αυξητικού παράγοντα κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), και ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, παρέχοντάς τους προστασία από τη λύση από NK κύτταρα¹³. Και στους δύο αυτούς τύπους καρκίνου παρατηρήθηκε προϊούσα νόσος.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν το διττό ρόλο των TLRs στην πρόοδο/αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου και, όπως φαίνεται, η ενεργοποίηση διαφορετικών TLRs μπορεί να επηρεάσει ποικιλοτρόπως το τελικό κλινικό αποτέλεσμα.

4. Η χρήση των TLR αγωνιστών στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Η ιστορία της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου με τη χρήση μολυσματικών παθογόνων στελεχών ξεκίνησε το 1868, όταν ο Busch προκάλεσε ερυσίπελας σε ασθενή με σάρκωμα μαλακών μορίων του τραχήλου και στη συνέχεια, παρατήρησε ταχεία υποστροφή του όγκου του. Λίγο αργότερα, ο Coley ανακοίνωσε τη θεραπεία ασθενούς με εκτεταμένο λέμφωμα τραχήλου, μετά από τοπικές ενέσεις αποικιών στρεπτόκοκκου¹⁴. Μετά την εμφάνιση ερυσίπελας, ο όγκος νεκρώθηκε και ο ασθενής παρέμεινε ελεύθερος νόσου για 8 χρόνια. Χρησιμοποιώντας το σκεύασμα που αργότερα ονομάστηκε «τοξίνη του Coley» (ένα μείγμα από δύο θερμικά αδρανοποιημένα βακτήρια του γένους *Streptococcus* και *Serratia*), ο Coley παρατήρησε ότι ακόμη και μία μόνο ένεση σε περιοχή ανατομικά απομακρυσμένη από τον όγκο, μπορούσε να οδηγήσει σε υποστροφή της καρκινικής μάζας. Το συμπέρασμα από αυτές τις πρώτες θεραπείες για τον καρκίνο υπέδειξε ότι η μείωση της ανάπτυξης του όγκου ήταν αποτέλεσμα της μόλυνσης, η οποία προκάλεσε συστηματική και ιδιαίτερα έντονη ενεργοποίηση



Εικόνα 1. Μονοπάτια σηματοδότησης των υποδοχέων τύπου Toll. Η σύνδεση των TLRs με τον κατάλληλο αγωνιστή τους ενεργοποιεί την προσέλκυση των ενδοκυτταρικών προσαρμογέων (MyD88, TRAP, TRIF, TRAM), τη φωσφορυλίωση των IRAK4, TRAF6 και MAPK, την ενεργοποίηση του NF-κB και την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, οδηγώντας στην παραγωγή και την εξωκυτταρική έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερφερονών τύπου I και χημειοκινών. *: άγνωστος συνδέτης/ες, LPS: λιποπολυσακχαρίτης, TLR: υποδοχέας τύπου Toll (Προσαρμοσμένο από Baxevanis et al., 2013)¹²

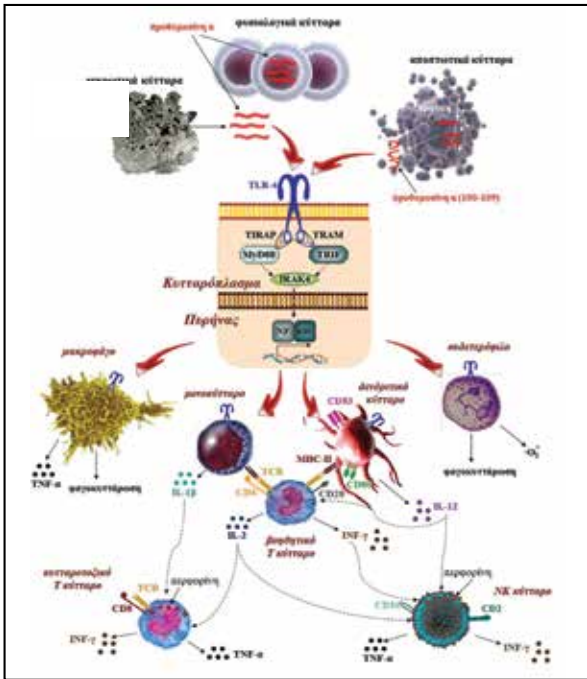
του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

Σήμερα, οι TLR αγωνιστές χρησιμοποιούνται ως ανοσοενισχυτικά σε αντικαρκινικά ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Οι TLR αγωνιστές προάγουν την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των DCs και άλλων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs), αυξάνοντας την έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), των συνδιεγερτικών σημάτων (CD80, CD86 και CD40) και των υποδοχέων χημειοκινών (CCR7). Ενισχύουν επίσης τη φαγοκυττάρωση και τη μετανάστευση των APCs στους σύστοιχους λεμφαδένες. Συνεπώς, εξασφαλίζουν τη βέλτιστη παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων στα T κύτταρα, την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-12 και TFN-α) και

IFNs τύπου I, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντικαρκινικής δραστηριότητας διάφορων εκτελεστικών κυττάρων (π.χ. NK, NKT και γδΤ κυττάρων). Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα APCs ενεργοποιούν τόσο τις χυμικές όσο και τις μεσολαβούμενες από T_H1 κύτταρα αντικαρκινικές αποκρίσεις, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας και της κυτταροτοξικής ικανότητας των CTLs, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο (NCI) των ΗΠΑ, οι αγωνιστές των TLR-3, -4, -7/8 και -9 κατατάσσονται μεταξύ αυτών που έχουν το καλύτερο αντικαρκινικό δυναμικό¹⁵. Μερικοί από τους πιο υποσχόμενους, που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως ανοσοενισχυτικά σε αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια, παρατίθενται παρακάτω.

4.1. Ο πολλαπλός (multi)-TLR (-2, -4, -1/6) αγωνιστής, ο βάκιλλος Calmette–Guérin (BCG)

Μετά τις πρώτες παρατηρήσεις του Coley, διάφορα εξασθενημένα βακτηριακά στελέχη και παρασκευάσματά τους προτάθηκαν ως ανοσοενισχυτικά αντικαρκινικών εμβολίων, μεταξύ των οποίων ο BCG, το *Corynebacterium parvum*, το στρεπτοκοκκικό παρασκεύασμα OK432 και το Biostim® (Sanofi-Aventis, Paris, France). Ο BCG είναι το μόνο παθογόνο που εγκρίθηκε για χρήση στον άνθρωπο το 1990¹⁶ και έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές ανοσοθεραπευτικές μελέτες. Σε μία από τις πρώτες κλινικές δοκιμές, ο συνδυασμός BCG με εμβόλιο από αυτόλογα καρκινικά κύτταραδείχθηκε να είναι ασφαλής και κλινικά ωφέλιμος σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου σταδίου II¹⁷. Στη σημαντική κλινική δοκιμή των Sharma και συνεργατών¹⁸, καταγράφηκαν οι αποκρίσεις ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο που εμβολιάστηκαν με NY-ESO-1, σε συνδυασμό με GM-CSF και BCG. Το εμβόλιο προκάλεσε την επαγωγή ισχυρών αντι-NY-ESO-1 χυμικών και $CD4^+$ T κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων. Μέχρι σήμερα, εκτός από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες *in situ* θεραπείες του μεταβατικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης με ενδοκυστεϊκή έγχυση BCG, βρίσκονται σε εξέλιξη ή έχουν ολοκληρωθεί κλινικές δοκιμές για την αξιολόγηση της ανοσοενισχυτικής χρήσης του στη θεραπεία διάφορων συμπαγών όγκων (π.χ. μαστού, πνεύμονα, εντέρου και ωοθηκών)¹⁹.



Εικόνα 2. Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στην ενίσχυση διαφόρων βιολογικών φαινομένων. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η πυρινηκή προθυμοσίνη α (προΤα) ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κατά την κυτταρική νέκρωση ή απόπτωση, η ακέραια προΤα ή το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), αντίστοιχα, απελευθερώνονται εξωκυτταρικά. Τόσο η προΤα όσο και το προΤα(100-109) σηματοδοτούν μέσω του υποδοχέα τύπου Toll-4 (TLR-4) και, καταρροϊκά αυτού, ενεργοποιούν κύτταρα της φυσικής ανοσίας (π.χ. μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα). Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα αυξάνουν τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα και παράγουν TNF-α και ενεργές ρίζες οξυγόνου ($\cdot\text{O}_2^-$), αντίστοιχα. Παρουσία αντιγόνου, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων MHC τάξης II (MHC-II), αυξάνουν την αντιγόνοπαρουσιαστική τους ικανότητα και παράγουν IL-1β και IL-12, αντίστοιχα. Η ενίσχυση της σύντηξης μονοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων με τα βοηθητικά (CD4+) T κύτταρα, μέσω του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (TCR), οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, τα οποία παράγουν κυτταροκίνες τύπου T_H1 (π.χ. IL-2 και IFN-γ), δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον που ενισχύει τις ειδικές για το αντιγόνο, αλλά και τις μη ειδικές δραστηριότητες κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. κυτταροτοξικότητα). Τα ενεργοποιημένα εκτελεστικά κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8+) και τα NK κύτταρα (CD56+) παράγουν λυτικά μόρια (περφορίνη), εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (CD2) και εκκρίνουν TNF-α και IFN-γ (Προσαρμοσμένο από Ιωαννου et al., 2012 ⁴⁰)

4.2. Ο TLR-4 αγωνιστής, το μονοφωσφορυλο-λιπίδιο A (MPL)

Η διαπίστωση της σχέσης των TLRs με συγκεκριμένα βακτηριακά προϊόντα οδήγησε στην παραγωγή καθαρών συνδετών των TLRs για χρήση, ως ανοσοενισχυτικά, σε κλινικές δοκιμές ⁵. Έτσι, ταυτοποιήθηκε ένα από τα τρία συστατικά του LPS, το βιολογικά δραστικό μόριο γνωστό ως λιπίδιο A, το οποίο, όπως και ο LPS, ενεργοποιεί τον TLR-4. Το παράγωγο του 3-O-διακυλο-4'-μονοφωσφορυλο-λιπίδιο A (MPLA ή MPL) διατηρεί τις κύριες ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες του LPS, αλλά είναι πολύ λιγότερο τοξικό, όπως δείχθηκε σε κλινικές μελέτες στο άνθρωπο ²⁰.

Μείγματα του MPL με άλλους ανοσοδραστικούς παράγοντες, που ονομάζονται ανοσοενισχυτικά συστήματα (adjuvant systems, AS), έδειξαν εξίσου αξιόλογα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, το AS02B, το οποίο περιέχει MPL και QS21, μία σαπωνίνη που εκχυλίζεται από το δέντρο της Νότιας Αμερικής *Quillaja Saponaria Molina*, χρησιμοποιήθηκε, μαζί με το καρκινικό αντιγόνο Mage-A3 για τον εμβολιασμό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το AS02B προκάλεσε την ανάπτυξη Mage-A3-ειδικών ανοσοαποκρίσεων και οι χειρουργημένοι ασθενείς με NSCLC σταδίων IB-IIIa έδειξαν σημαντική ελεύθερης νόσου παράταση της επιβίωσής τους ²¹. Σήμερα, είναι σε εξέλιξη κλινική μελέτη για την ασφάλεια, την ανοσογονικότητα και την κλινική δραστηριότητα του AS02B σε ασθενείς με ανεγχείρητο μεταστατικό δερματικό μελάνωμα σε προϊούσα φάση ^{19, NCT00086866}.

Η κλινική δοκιμή φάσης I με το σύνθετο παρασκεύασμα AS15, ένα μείγμα MPL, QS21, CpG και λιποσωμάτων, έδειξε ότι ήταν πιο ανοσογονικό από το AS02B. Σε αυτήν, ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που υπερέκφραζε την ογκοπρωτεΐνη HER-2, ανοσοποιήθηκαν με ανασυνδυασμένη HER-2. Το εμβόλιο, σε συνδυασμό με τον αναστολέα lapatinib, οδήγησε σε μακρόχρονη παράταση της επιβίωσής τους ²². Σε τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II, η ανοσοποίηση ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα (ανεγχείρητο ή σταδίου III/IV) με Mage-A3 σε συνδυασμό με AS15 ή AS02B, έδειξε ότι ο συνδυασμός Mage-A3/AS15 προκάλεσε την επαγωγή ενισχυμένων ανοσολογικών και κλινικών αποκρίσεων, σε σύγκριση με το συνδυασμό Mage-A3/AS02B ²³. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, βρίσκονται

σε εξέλιξη μεγαλύτερες διπλά-τυφλές κλινικές δοκιμές φάσης ΙΙΙ που μελετούν το συνδυασμό MAGE-A3/AS15 σε χειρουργηθέντες ασθενείς με NSCLC σταδίου ΙΒ–ΙΙΙΑ (AJCC TNM V6; MAGRIT)^{19, NCT00480025} ή σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα (σταδίου ΙΙΒ–C-Tx) (AJCC/VICC 2010; DERMA)^{19, NCT00796445}.

Το AS04 περιέχει MPL και υπεροξειδίο του αλουμινίου και έχει αναφερθεί να ενισχύει τη χυμική ανοσία και την παραγωγή Β κυττάρων μνήμης, καθώς και την ενεργοποίηση των APCs και την ταχεία τοπική παραγωγή κυτταροκινών, τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους που έχουν εμβολιαστεί με προσομοιάζοντα με τον HPV16/18 σωματίδια (virus-like particles)²⁴. Λόγω της εξαιρετικής ασφάλειας και της αποτελεσματικότητάς του, το AS04 είναι το πρώτο ανοσοενισχυτικό εμβολίων που περιέχει TLR αγωνιστή που εγκρίθηκε στις ΗΠΑ και την ΕΕ (το 2007) για χρήση σε δύο κυκλοφορούντα στο εμπόριο εμβόλια για τον HBV (Fendrix™, GlaxoSmithKline) και τον HPV (Cervarix™, GlaxoSmithKline).

Τέλος, στο DETOX™ (Ribi ImmunoChemResearch, Inc, MT, USA), το MPL συνδυάζεται με το εκχύλισμα του τοιχώματος του *Mycobacterium phlei*. Κλινικές δοκιμές φάσης Ι που θα αξιολογήσουν την ασφάλεια της χορήγησης DNA εμβολίων/DETOX σε ασθενείς με HPV16+ υψηλού βαθμού δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου, είναι στο στάδιο επιλογής των ασθενών^{19, NCT00788164 και NCT00988559}.

4.3. Οι TLR-9 αγωνιστές, τα CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια

Τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια δεοξυκυτοσίνης-δεοξυγουανίνης (deoxycytidyl-deoxyguanosin oligodeoxynucleotides, CpG ODNs) είναι μικρές συνθετικές DNA αλληλουχίες που περιέχουν μη μεθυλιωμένα CpG μοτίβα. Αν και χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες (Α, Β και C ανάλογα με τον τύπο των ανοσοκυττάρων που διεγείρουν και το ποσό της IFN-α που παράγεται²⁵), όλα ενεργοποιούν τον TLR-9, με αποτέλεσμα την ωρίμανση των DCs.

Το CpG-7909 αναμεμειγμένο με ένα πεπτιδικό ανάλογο από το καρκινικό αντιγόνο Melan-A δοκιμάστηκε σε ασθενείς με μελάνωμα, όπου ενίσχυσε σημαντικά τις αντιγονοειδικές αποκρίσεις των CD8+ Τ κυττάρων, ενώ σε πρόσφατη κλινική δοκιμή φάσης Ι σε 14 ασθενείς με διάφορους καρκίνους, ο εμβολιασμός με CpG-7909 και

το πεπτίδιο p157-165 της NY-ESO-1, όχι μόνο οδήγησε στην επαγωγή CD8+ Τ κυτταρικών αποκρίσεων σε 9 από αυτούς, αλλά σε 6 από τους 9 ασθενείς η επιβίωση παρατάθηκε κατά περίπου 39 μήνες²⁶.

Ένα διαφορετικό CpG ODN, το CpG PF-3512676, όταν χορηγήθηκε ενδο-ογκικά σε 15 ασθενείς με χαμηλής κακοήθειας Β κυτταρικό λέμφωμα, οδήγησε ακόμη και σε υποστροφή μεγάλων και διάχυτων εστιών [27]. Πιο πρόσφατα, δοκιμή φάσης Ι σε ασθενείς με όγκους Wilms 1 (WT1) αξιολόγησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής χρήσης GM-CSF ή CpG με ένα WT1 πεπτίδιο. Η χορήγηση CpG/WT1 βελτίωσε τις κλινικές αποκρίσεις στο 60% των ασθενών, έναντι του 25% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με GM-CSF/WT1²⁸.

Σήμερα, βρίσκονται σε εξέλιξη μία ανοικτή κλινική μελέτη φάσης ΙΙ, η οποία δοκιμάζει την υποδόρια χορήγηση CpG σε συνδυασμό με trastuzumab σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, καθώς και μία τυχαioποιημένη κλινική δοκιμή σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σταδίου ΙΙ ή ΙΙΙ, που συνδυάζει το CpG με πεπτιδικά εμβόλια από τις MUC1 και HER-2/neu^{19, NCT00824733 και NCT00640861}.

4.4. Ο TLR-3 αγωνιστής, το poly-I:C

Το poly-I:C προσδένεται στον TLR-3 και ωριμάζει τα DCs επάγοντας τις ανάλογες φαινοτυπικές (έκφραση των μορίων MHC τάξης Ι/ΙΙ, CD83, CCR7, CD86 και CD40) και λειτουργικές (παραγωγή κυτταροκινών τύπου T_H1) αλλαγές. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει χορηγηθεί στον άνθρωπο, τα έως τώρα αποτελέσματα των *in vitro* προκλινικών μελετών με poly-I:C είναι ελπιδοφόρα²⁹. Σήμερα, κλινικές μελέτες σε καρκινοπαθείς είναι σε εξέλιξη (προστάτης, μαστός και μελάνωμα)^{19, NCT00694551, NCT00374049, NCT01008527, NCT01079741, NCT00986609 και NCT01437605} ή στο στάδιο συλλογής των ασθενών (NSCLC)^{19, NCT01720836}. Επιπλέον, βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές δοκιμές φάσης Ι/ΙΙ σε καρκίνο μαστού και εντέρου με το μη τοξικό ανοσοενισχυτικό poly-I:C12U, ένα ανάλογο του poly-I:C (Ampligen®, Hemispherx Biopharma, Inc., PA, USA)^{19, NCT01355393 και NCT01545141}.

4.5. Ο TLR-7 αγωνιστής, το imiquimod

Το imiquimod είναι συνθετική ιμιδαζοκινολίνη που στοχεύει τον TLR-7. Έχει δειχθεί να ενισχύει τη δερμα-

τική ανοσοαπόκριση επάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των IFN- α , TNF- α , IL-1 α , IL-6 και IL-8. Τα πρώτα αποτελέσματα σε ποντίκια με μελάνωμα έδειξαν ότι η τοπική χρήση του imiquimod οδήγησε στην υποστροφή ή ακόμη και εξάλειψη των όγκων, στρατολογώντας στην περιοχή pDCs και προάγοντας την απελευθέρωση αυξημένων ποσοτήτων IFN- α ³⁰. Το 2004, το imiquimod εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία της ακτινικής κεράτωσης και του επιφανειακού βασικοκυτταρικού επιθηλιώματος/καρκινώματος στον άνθρωπο, ενώ παράλληλα έχει δοκιμαστεί ευρέως ως συστατικό εμβολίων. Οι Adams και συνεργάτες³¹ ανέφεραν ότι η τοπική χορήγηση imiquimod σε συνδυασμό με NY-ESO-1 σε ασθενείς με μελάνωμα, προκάλεσε στους περισσότερους από αυτούς, τόσο χυμικές όσο και κυτταρομεσολαβητικές αποκρίσεις. Στη δοκιμή φάσης I/II των Feyerabend και συνεργατών³² σε ασθενείς με ορμονο-ευαίσθητο καρκίνο του προστάτη, ένα πολυδύναμο εμβόλιο από πολλαπλούς επιτόπους σε συνδυασμό με imiquimod σταθεροποίησε ή επιβράδυνε το χρόνο διπλασιασμού του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) σε 3 από τις 19 περιπτώσεις. Αρκετές κλινικές δοκιμές με τη χρήση του imiquimod σε ασθενείς με μελάνωμα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, όγκους του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, γλοίωμα, και νευροβλάστωμα είναι σε εξέλιξη [π.χ.¹⁹, NCT00899574].

5. Η χρήση των TLR αγωνιστών σε αντικαρκινικά εμβόλια που βασίζονται σε DCs

Εκτός από τα καρκινικά αντιγόνα/πεπτίδια, στο θεραπευτικό αντικαρκινικό εμβολιασμό έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως οχήματα τα DCs. Για τη βέλτιστη ενεργοποίησή τους έχουν και εδώ δοκιμαστεί οι αγωνιστές των TLRs. Μερικά θετικά παραδείγματα περιλαμβάνουν τη μελέτη των Trakateli και συνεργατών³³, όπου ο εμβολιασμός ασθενών με μελάνωμα με αυτόλογα DCs ενεργοποιημένα με poly-I:C και φορτωμένα με ένα καρκινικό αντιγόνο, ενίσχυσε σημαντικά τις CD8+ T κυτταρικές αποκρίσεις σε 3 από τους 8 ασθενείς. Οι Czerniecki και συνεργάτες³⁴ εμβολίασαν 11 HER-2/neu+ ασθενείς με *in situ* πορογενές καρκίνωμα του μαστού με DCs ενεργοποιημένα με LPS και φορτωμένα με πεπτίδια της HER-2/neu. Σε 7 από τους 11 καταγράφηκε μείωση του

μεγέθους του όγκου, συνοδευόμενη από την παραγωγή HER-2/neu-ειδικών ανοσοαποκρίσεων. Τέλος, οι Wilgenhof και συνεργάτες³⁵, χορήγησαν σε 17 ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα αυτόλογα DCs που είχαν ηλεκτροδιατρηθεί με mRNA που κωδικοποιούσε για τα μόρια CD40L, TLR-4, CD70 και ένα μελανωματικό αντιγόνο. Ήταν αξιοσημείωτο ότι εκτός από την αυξημένη ανοσογονικότητα και ασφάλεια του εμβολίου, ένας ασθενής ανταποκρίθηκε μερικώς και σε 5 ασθενείς η νόσος σταθεροποιήθηκε. Σήμερα, βρίσκεται στο στάδιο συλλογής των ασθενών κλινική δοκιμή φάσης II σε ασθενείς με κακόηθες γλοίωμα, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αυτόλογων DCs φορτωμένων με κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων τους, παρουσία των TLR αγωνιστών imiquimod και poly-I: C¹⁹.

NCT01204684

6. Νέοι αγωνιστές των TLR σε στάδιο ανάπτυξης και κλινικού ελέγχου

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η σύνδεση των TLRs με PAMPs ή MAMPs επάγει την παραγωγή ογκοδραστικών ανοσοαποκρίσεων *in vivo*, οι οποίες αναμένεται να έχουν και θεραπευτικό όφελος για τους ασθενείς. Δυστυχώς, κλινική βελτίωση εμφανίζεται σποραδικά και σε περιορισμένο αριθμό καρκινοπαθών που εμβολιάζονται με τους διαθέσιμους αγωνιστές των TLRs. Για τη βελτίωση του ανοσοενισχυτικού αποτελέσματος, πρόσφατα απομονώθηκαν, σχεδιάστηκαν και τροποποιήθηκαν παράγωγα των γνωστών TLR αγωνιστών. Πάνω από 20 νέες ουσίες δοκιμάζονται σε προκλινικές μελέτες σε ζώα ή/και σε κλινικές δοκιμές με μικρούς αριθμούς ογκολογικών ασθενών. Αυτές περιλαμβάνουν νέα μικροβιακά σκευάσματα (π.χ. το SMP-105 από το κυτταρικό τοίχωμα του *Mycobacterium Bovis*, το OK-432/picibanil από τον *Streptococcus pyogenes*, τα Cadi-05, IMM-101 και SRL172 από διαφορετικά στελέχη *Mycobacterium*) ή πεπτίδια (π.χ. CBLB502 από τη *Salmonella enterica*), τροποποιημένα λιπίδια (π.χ. OM-174 από την *Escherichia coli*), παράγωγα ιμιδαζοκινολίνης (resiquimod R-848, 852A), συνθετικά παράγωγα του poly-I:C (Ampligen, Hiltonol) ή μιμητές των dsRNA (IPH-3102, poly-A:U), μη μεθυλιωμένα CpGs (CpG-28, CpG-685, CpG-7909/Agatolimod) ή μιμητές αυτών (IMO-2055, MGN-1703, MGN-1706)³⁶.

Τα DAMPS είναι μία πολλά υποσχόμενη οικογένεια ποικίλων μορίων που επίσης ενεργοποιούν τους TLRs

και επειδή «θέτουν σε συναγερμό» (alarm) το ανοσοποιητικό σύστημα, χαρακτηρίζονται ως «αλαρμίνες» (alarmins). Οι πρωτεΐνες θερμικού shock (HSPs) 60 και 70 ήταν οι πρώτες αλαρμίνες, οι οποίες, μετά την απελευθέρωσή τους από κύτταρα που πεθαίνουν και την πρόσδεσή τους στους TLR-2 και -4, επάγουν την εμφάνιση στείρας φλεγμονής³⁷. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά DAMPs, μεταξύ των οποίων η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A και το ουρικό οξύ που είναι αγωνιστές των TLR-2 και -4, η θειική ηπαρίνη, το υαλουρονικό οξύ, η φιμπρονεκτίνη, το ινωδογόνο και η πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (HMGB1), που πιθανόν συνδέονται στον TLR-4. Ειδικότερα η HMGB1 είναι πυρηνική πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA και φυσιολογικά επηρεάζει τη μεταγραφή και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε καρκινοπαθείς υπό χημειοθεραπεία η οποία που προκαλεί «ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο» (immunogenic cell death) στα καρκινικά κύτταρα (π.χ. με ανθρακυκλίνες), η HMGB1 απελευθερώνεται εξωκυτταρικά και «αδειοδοτεί» τα DCs ώστε να επεξεργαστούν και να παρουσιάσουν τα καρκινικά αντιγόνα στα T κύτταρα, οδηγώντας στη διέγερση των T κυττάρων και στην επαγωγή ενισχυμένων αντικαρκινικών ανοσοαποκρίσεων³⁸. Παρά το γεγονός ότι τα DAMPs παρουσιάζουν κοινούς ανοσορυθμιστικούς μηχανισμούς δράσης με τα PAMPs/MAMPs (δηλαδή διεγείρουν κύτταρα της φυσικής ανοσίας μέσω των TLRs), κανένα DAMP δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί και αξιοποιηθεί ως ανοσοενισχυτικό σε κλινικές δοκιμές ανοσοθεραπείας του καρκίνου.

7. Η προθυμοσίνη α: ένα DAMP που σηματοδοτεί μέσω του TLR-4

Η προθυμοσίνη α (προΤα) είναι ένα μικρό και ιδιαίτερα όξινο πολυπεπτίδιο, το οποίο στον άνθρωπο αποτελείται από 109 αμινοξικά κατάλοιπα. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1984 από θύμο αδένα αρουραίου³⁹. Παρουσιάζει υψηλή συντηρητικότητα ως προς την πρωτοταγή της δομή στα θηλαστικά και γενικότερα ανευρίσκεται σε όλα τα λεμφικά, αλλά και σε μη λεμφικά όργανα. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, δύο διακριτοί ρόλοι έχουν αποδοθεί στην προΤα ανάλογα με το πού εντοπίζεται: ενδοκυτταρικά, ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ εξωκυτταρικά, δρα ανοσορυθμιστικά⁴⁰.

Η πλειοτροπική δράση της προΤα στα ανοσοκύτταρα είχε δειχθεί νωρίς μετά την απομόνωσή της, και το μόριο εντάχθηκε στην ευρεία οικογένεια των βιολογικών ανοσοτροποποιητών⁴⁰. Σε περαιτέρω σειρά μελετών σε ανοσοεπαρκή ποντίκια ενοφθαλμισμένα με λευχαιμικά κύτταρα, η ομάδα μας έδειξε ότι η χορήγηση προΤα στα ζώα ανέστειλε την ανάπτυξη ασκίτη και παρέτεινε την επιβίωσή τους⁴¹. Οι μηχανισμοί που συνέβαλλαν σε αυτό το αποτέλεσμα περιελάμβαναν:

- την αυξημένη έκκριση TNF-α από τα κύτταρα του περιτοναϊκού εξιδρώματος και την επακόλουθη ενίσχυση της κυτταροτοξικότητάς τους,

- την αυξημένη έκκριση IL-2, με αποτέλεσμα την έκπτυξη και ενεργοποίηση των NK και των T κυττάρων, και

- την *in vivo* παραγωγή MHC-περιορισμένων, ειδικών για τα λευχαιμικά κύτταρα βοηθητικών CD4+ και κυτταροτοξικών CD8+ T κυττάρων, αλλά και μη MHC-περιορισμένων NK και ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (LAK) κυττάρων⁴¹.

Παράλληλα, η ομάδα μας μελέτησε την ικανότητα της προΤα να αποκαθιστά τις ανοσοανεπάρκειες των λεμφοκυττάρων που συνήθως εμφανίζονται σε ασθενείς με καρκίνο, ως αποτέλεσμα της νόσου. Πράγματι, η προΤα ενίσχυσε την κυτταρολυτική ικανότητα και τη δραστηριότητα των NK κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με κακοήθειες προχωρημένου σταδίου⁴². Ειδικότερα σε ασθενείς με μελάνωμα και καρκίνο του παχέος εντέρου, η προΤα ενίσχυσε την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β και TNF-α), μείωσε την έκκριση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β και της προσταγλανδίνης E2 και, κατά συνέπεια, αποκατέστησε τη λειτουργικότητα των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, καθώς και την LAK κυτταροτοξικότητα⁴³.

Η προΤα, παρότι είναι η ίδια δραστική, έχει δοκιμαστεί σε συνδυασμό και με άλλα ανοσοενισχυτικά μόρια. Η ομάδα μας αλλά και άλλοι ερευνητές, συνδύασαν την προΤα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μορίου CD3⁴⁴ ή με χαμηλή δόση IL-2⁴⁵ και έδειξαν ότι οι συνδυασμοί αυτοί οδήγησαν σε πολλαπλασιασμό των CD4+ T κυττάρων και στην παραγωγή αυτόλογων MHC τάξης Ι-περιοριζόμενων ογκοειδικών CTLs. Στη μελέτη των Voutsas και συνεργατών⁴⁶ διεκρινίστηκε ότι η ευεργετική επίδραση της προΤα στα CTLs ήταν αποτέλεσμα της ταυτόχρονης παρουσίας στις καλλιέργειες αυτόλογων βοηθητικών CD4+ T κυττάρων και μονοκυττάρων, υποδηλώνοντας

ότι η επαγόμενη από την προΤα ανοσοδιέγερση απαιτεί τη συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ CD4⁺, CD8⁺ T κυττάρων και APCs. Για να εξηγήσουμε τον ακριβή τρόπο δράσης της προΤα, χρησιμοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση και καταγράψαμε την αλληλουχία των ενδοκυτταρικών αλλαγών που επάγονται στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος μετά από διέγερσή τους με προΤα για 3 ημέρες⁴⁷. Το μοντέλο που προτείνουμε ήταν ότι αρχικά η προΤα προκαλεί την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων μέσω πρόσδεσής της σε TLRs και σηματοδότησης καταρροϊκά αυτών. Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα υπερεκφράζουν μόρια MHC τάξης II στην επιφάνειά τους, και έτσι ενισχύεται η αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα και η σύναψή τους με τα T λεμφοκύτταρα. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1), ενώ τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα παράγουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται, εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων προσκόλλησης (CD2) και ενδοκυτταρικών κυτταρολυτικών μορίων (περφορίνη), και γίνονται πιο κυτταροτοξικά. Αυτό το σενάριο δράσης της προΤα επιβεβαιώθηκε αργότερα από τους Mosioian και συνεργάτες⁴⁸, οι οποίοι έδειξαν ότι η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR-4, επάγοντας την παραγωγή IFNs τύπου I από τα μακροφάγα. Πιο πρόσφατες μελέτες από την ομάδα μας έδειξαν ότι, εκτός των DCs, και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εκφράζουν TLR-4 διεγείρονται παρουσία προΤα. Ειδικότερα στα ουδετερόφιλα, η προΤα αύξησε τη φαγοκυτταρική ικανότητα, την παραγωγή και απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου, και ενίσχυσε την αντικαρκινική κυτταροτοξικότητά τους⁴⁹. DCs προερχόμενα από μονοκύτταρα που είχαν ωριμάσει με προΤα ήταν φαινοτυπικά⁵⁰ και λειτουργικά⁵¹ ανοσοϊκανά, παρήγαγαν κυτταροκίνες τύπου T_H 1, και παρουσία καρκινικών αντιγόνων, προκάλεσαν την *in vitro* παραγωγή και έκπτυξη αντιγονοδραστικών και ειδικών για τον όγκο CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων.

Για να αποκαλύψουμε το ανοσολογικά δραστικό τμήμα της προΤα, κατεργαστήκαμε το μόριο με θρυψίνη και ελέγξαμε τη δραστηριότητα κάθε θραύσματος ξεχωριστά. Έτσι, προσδιορίσαμε το καρβοξυτελικό δεκαπεπτίδιο προΤα (100-109), ως το πεπτιδικό τμήμα που παρουσιάζει την ίδια ανοσοτροποποιητική δράση με το ακέραιο πολυπεπτίδιο⁵⁰. Δείξαμε ότι το προΤα (100-109) αποκαθιστά τις λειτουργίες των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων ασθενών με καρκίνο, επάγει την ωρίμανση των DCs και ενεργοποιεί τα T κύτταρα

έναντι καρκινικών αντιγόνων⁴⁹⁻⁵¹. Σε πρόσφατη δημοσίευση της ομάδας μας, για πρώτη φορά δείξαμε ότι λεμφοκύτταρα από ασκίτικο υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, όταν ενεργοποιηθούν *ex vivo* με προΤα (100-109) και στη συνέχεια χορηγηθούν *in vivo* σε ανοσοανεπαρκή (SCID) ποντίκια που φέρουν ανθρωπινούς όγκους ωοθηκών, εκδηλώνουν ενισχυμένη κυτταροτοξικότητα και καθυστερούν την ανάπτυξη των όγκων στα πειραματόζωα⁵². Μέχρι σήμερα, είναι γνωστός ένας τουλάχιστον τρόπος παραγωγής του προΤα (100-109) *in vivo*, μέσω θραυσματοποίησης της προΤα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες κατά την κυτταρική απόπτωση⁵³. Πιθανολογούμε ότι το προΤα (100-109) εξωκυτταρώνεται από τα αποπτωτικά κύτταρα με έναν άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό, και δρώντας ως αλαρμίνη (DAMP), επάγει ανοσοδραστικές λειτουργίες.

Ο διπλός λειτουργικός ρόλος της προΤα μέσα και έξω από το κύτταρο δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου. Αντίστοιχοι ρόλοι έχουν αποδοθεί και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως στην HSP90 και στην HMGB1. Φυσιολογικά, τόσο η HSP90 όσο και η HMGB1 επιτελούν συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές λειτουργίες (ως μοριακή συνοδός και ως ρυθμιστικό μόριο της μεταγραφής, αντίστοιχα), ενώ εξωκυτταρικά και οι δύο επιτελούν ανοσορρυθμιστικό ρόλο ως μεσολαβητές της προφλεγμονώδους αντίδρασης⁵⁴. Οι HSP90 και HMGB1 αλληλεπιδρούν με τον TLR-4⁵⁵, ενεργοποιούν τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας (π.χ. τα DCs) και επάγουν αποκρίσεις από το ειδικό σκέλος της ανοσίας. Η προΤα παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά και τρόπους δράσης με τις HSPs και HMGB, προσδένεται στον TLR-4, ενεργοποιεί το εξαρτώμενο από τον TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι, οδηγώντας σε παραγωγή IFNs τύπου I και δημιουργεί το κατάλληλο μικροπεριβάλλον από κυτταροκίνες για τη ενίσχυση των λειτουργιών των δραστικών ανοσοκυττάρων (Εικόνα 2)^{48, 51}. Με βάση συνεπώς όλα τα παραπάνω στοιχεία, η αρχική μας υπόθεση ότι η προΤα και το προΤα (100-109) λειτουργούν ως DAMPs/αλαρμίνες υποστηρίζεται πλέον και με πειραματικά δεδομένα.

8. Συμπεράσματα

Το πλεονέκτημα της χρήσης των TLR αγωνιστών ως ανοσοενισχυτικά στον αντικαρκινικό εμβολιασμό έχει τεκμηριωθεί τόσο σε προκλινικά *in vivo* πειράματα σε ζώα,

όσο και σε κλινικές μελέτες. Οι TLR αγωνιστές είναι ανοσοδιεγερτικά μόρια και στα πλαίσια του θεραπευτικού αντικαρκινικού εμβολιασμού που βασίζεται στη χορήγηση πεπτιδίων, η ικανότητά τους να ωριμάζουν τα DCs, να προωθούν αποκρίσεις τύπου T_H1 και να αυξάνουν τη δράση των κυτταροτοξικών κυττάρων αξίζει να μελετηθεί εκτενέστερα. Τρεις TLR αγωνιστές (BCG, MPL και imiquimod) χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική, ως ανοσοενισχυτικά σε αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια, στοχεύοντας να μιμηθούν μία μικροβιακή μόλυνση και να «αφυπνίσουν» τους αντικαρκινικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, ο βέλτιστος τρόπος ενορχήστρωσης του αντικαρκινικού μηχανισμού *in vivo* δεν έχει ακόμα επιτευχθεί.

Σε αυτά τα πλαίσια, η χρησιμοποίηση των DAMPs αντί των PAMPs για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αποδειχθεί πιο ευεργετική. Τα DAMPs είναι εξ'ορισμού εαυτά συστατικά του οργανισμού, τα οποία κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο, εντοπίζονται σε διαφορετική θέση (δηλαδή εξωκυτταρικά) από αυτή στην οποία λειτουργούν φυσιολογικά (δηλαδή ενδοκυτταρικά). Στην περίπτωση του καρκίνου, παραδοσιακές θεραπείες όπως η ραδιοθεραπεία και η χημειοθεραπεία με συγκεκριμένα φάρμακα (π.χ. ανθρακυκλίνες ή αλκυλιωτικούς παράγοντες) οδηγούν σε «ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο» και επάγουν την χωροχρονική απελευθέρωση τόσο καρκινικών αντιγόνων όσο και DAMPs. Τα DAMPs ενεργοποιούν τα DCs ώστε να επεξεργαστούν τα καρκινικά αντιγόνα, και στη συνέχεια να τα παρουσιάσουν στα T λεμφοκύτταρα. Αυτή η εναρμονισμένη και ελεγχόμενη διαδικασία μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, μας παρέχει έναν εναλλακτικό τρόπο βελτίωσης των στρατηγικών αντικαρκινικού εμβολιασμού, όπου τα DAMPs μπορούν να υποκαταστήσουν τα PAMPs. Εκτός από τις HSPs και HMGB1, η προΤα και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο προΤα (100-109) δρουν ως TLR αγωνιστές, έχουν δειχθεί να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον του καρκίνου και είναι υποσχόμενα μόρια για μελλοντική χρήση τους ως ανοσοενισχυτικά.

9. Προτάσεις και μελλοντικές προοπτικές

Η χρησιμοποίηση των TLR αγωνιστών ως ανοσοενισχυτικά για την ωρίμανση των DCs είτε *ex vivo* είτε *in situ*,

είναι μία ελκυστική μέθοδος για την επαγωγή ή/και την ενίσχυση των αντικαρκινικών αποκρίσεων μετά από εμβολιασμό. Ένα βασικό ερώτημα το οποίο εξακολουθεί να προβληματίζει το χώρο της ανοσοθεραπείας του καρκίνου είναι η επιλογή του καταλληλότερου TLR αγωνιστή που, μαζί με το εμβόλιο, θα προκαλέσει τις πιο αποτελεσματικές αντικαρκινικές αποκρίσεις. Αρχικά, η επιλογή αυτή δε φαίνεται εύκολη, κυρίως γιατί οι δοκιμασίες ελέγχου των κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων παράγουν μη επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η εφαρμογή προτυποποιημένων δοκιμασιών μέσω πολυκεντρικών μελετών, ίσως βοηθήσει στην ανεύρεση και καθιέρωση ενός σταθερά επαναλήψιμου βιοδείκτη κυτταρικής ανοσοαπόκρισης. Πιο πρακτικό, ίσως, θα ήταν να αναπτυχθούν δοκιμασίες που θα εξετάζουν κατευθείαν την ικανότητα διάφορων TLR αγωνιστών να ενεργοποιούν τη φυσική ανοσία, αλλά, δυστυχώς, προς το παρόν, τέτοιες δοκιμασίες ελέγχου της ανοσοενισχυτικότητας δεν υπάρχουν. Η μόνη σχετική κλινική δοκιμή που σχεδιάστηκε μέχρι τώρα είναι η GSK1203486A σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα. Σε αυτήν, συγκρίθηκε η ικανότητα του TLR-4 αγωνιστή MPL και του συνδυασμού MPL/CpG να ενισχύουν τις ανοσοαποκρίσεις του αντικαρκινικού εμβολίου MAGE-A3, αξιολογώντας παράλληλα και την κλινική τους αποτελεσματικότητα²³. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, σχεδιάστηκαν και είναι σε εξέλιξη δύο μεγάλες κλινικές δοκιμές φάσης III, οι DERMA και MAGRIT, σε ασθενείς με μελάνωμα και NSCLC, αντίστοιχα^{19, NCT00796445 και NCT00480025}.

Ένα δεύτερο πρόβλημα πηγάζει από το γεγονός ότι η ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων συνήθως είναι διαδικασία εμπειρική και η ανοσοεπιτήρηση του όγκου του κάθε ασθενούς απαιτεί την επαγωγή διαφορετικού τύπου ανοσοαποκρίσεων. Επομένως, είναι αδύνατη η εκ των προτέρων εξασφάλιση της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας ενός συγκεκριμένου TLR αγωνιστή από τους ήδη διαθέσιμους.

Ένας τρίτος περιοριστικός παράγοντας είναι η ανοσοκαταστολή που επάγεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και η οποία πρέπει να αναστραφεί, ώστε τα αντικαρκινικά εμβόλια σε συνδυασμό με τα ανοσοενισχυτικά, να εκδηλώσουν όλο το φάσμα της δραστηριότητάς τους. Υπάρχουν δύο τρόποι πιθανής παράκαμψης της επαγόμενης από τον όγκο ανοσοκαταστολής. Ο πρώτος είναι ο σχεδιασμός συνδυαστικών θεραπειών, που θα περιλαμβάνουν μετρονομική χορήγηση χημει-

οθεραπευτικών, ακτινοθεραπεία, ή/και απενεργοποίηση των αναστολέων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέτοιοι συνδυασμοί στοχεύουν στην ανάπτυξη αντικαρκινικής ανοσίας τύπου T_H1 ⁵⁶ και επομένως, θα μπορούσαν να βελτιώσουν ουσιαστικά την κλινική αποτελεσματικότητα αντικαρκινικών εμβολίων/TLR αγωνιστών. Ο δεύτερος τρόπος είναι να εμβολιάζεται επιλεγμένος πληθυσμός ασθενών. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ασθενείς με ικανοποιητική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και μειωμένο καρκινικό φορτίο έχουν περισσότερες πιθανότητες να ωφεληθούν από το θεραπευτικό εμβολιασμό^{57,58}. Τέλος, η ανάπτυξη θεραπευτικά χρήσιμων TLR αγωνιστών θα πρέπει επίσης να στοχεύει στη σύνθεση νέων ανοσοδιεγερτικών μορίων, όπως η νέα τάξη των CpG ODNs, η P-τάξη, που συνδυάζει τις βέλτιστες ιδιότητες των γνωστών τάξεων CpG ODN και η *in vivo* χρήση της δείχθηκε να ενεργοποιεί την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών⁵⁹.

Οι υπάρχουσες κλινικές δοκιμές με TLR αγωνιστές (όπως παρουμενίσουμε και σε αυτή την επισκόπηση), αν και προς το παρόν δεν έχουν επιδείξει την αναμενόμενη αποτελεσματικότητα, υποστηρίζουν ότι τα μόρια αυτά μπορεί να αποτελέσουν ασφαλή και αποτελεσματικά ανοσοενισχυτικά εμβολίων. Επιπλέον, οι δοκιμές αυτές μας παρέχουν πρώιμα, αλλά και πολύτιμα, στοιχεία για την ιδανική δοσολογία, τη διάρκεια και τον τρόπο χορήγησης διαφόρων TLR αγωνιστών συγχρόνως με αντικαρκινικά εμβόλια. Ακόμα πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τους μηχανισμούς δράσης των TLR αγωνιστών παρέχεται από πρόσφατες αναφορές που περιγράφουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια τους, τα οποία επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Μία εξίσου σημαντική ερευνητική προσπάθεια μελετά τη συνδυασμένη χρήση των TLR αγωνιστών για την περαιτέρω ενίσχυση της ανοσογονικότητας των εμβολίων. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ορισμένοι συνδυασμοί TLR αγωνιστών δρουν συνεργιστικά ως

προς την ικανότητά τους να ωριμάζουν τα DCs και να ενισχύουν τις T λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις, ενώ άλλοι συνδυασμοί είναι ανοσοκατασταλτικοί. Για παράδειγμα, DCs που ενεργοποιήθηκαν με poly-I:C προκάλεσαν ενισχυμένες προφλεγμονώδεις αποκρίσεις και οδήγησαν στην παραγωγή ογκοειδικών CD8⁺ T κυττάρων. Η ταυτόχρονη χορήγηση αγωνιστών των TLR-7/-8 αύξησε περαιτέρω αυτές τις αποκρίσεις, αλλά αντίθετα, η σύγχρονη χορήγηση poly-I:C και LPS κατέστειλε την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών^{60,61}. Επιπλέον, το imiquimod βρέθηκε να καταστέλλει την ανοσοδιεγερτική ικανότητα του GM-CSF σε προκλινικό μοντέλο καρκίνου σε ποντίκια, ενεργοποιώντας τα Tregs και τα μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα μέσω της παραγωγής IL-10⁶².

Τέλος, είναι ιδιαίτερα σημαντική η ανακάλυψη νέων TLR αγωνιστών με ισχυρότερη ανοσοδιεγερτική ικανότητα. Προς αυτή την κατεύθυνση, η προTa είναι ένα υποψήφιο μόριο για μελλοντική χρήση ως ανοσοενισχυτικό σε κλινικά πρωτόκολλα αντικαρκινικού εμβολιασμού. Όπως έχει ήδη δείχθει *in vitro*, αλλά και σε ζώα *in vivo*, η χορήγηση προTa ενισχύει την αποτελεσματικότητα των DCs να επάγουν την έκπτυξη ογκοειδικών δραστικών κυττάρων, μέσω της δημιουργίας ενός κατάλληλου περιβάλλοντος κυτταροκινών. Επιπλέον, όπως γνωρίζουμε από τη μέχρι σήμερα εμπειρία μας, η χορήγηση σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων προTa σε ζώα στερείται τοξικότητας και σοβαρών ανεπιθύμητων παρενεργειών. Ως επόμενο βήμα επομένως, προτείνουμε το σχεδιασμό κλινικών μελετών όπου είτε ολόκληρο το πολυπεπτίδιο είτε, κατά προτίμηση, το ανοσοδραστικό του θραύσμα θα χορηγηθούν ως ανοσοενισχυτικά, σε ανοσοθεραπευτικά σχήματα κατά του καρκίνου.

Χρηματοδότηση

Η έρευνα αυτή υποστηρίχθηκε μερικώς από το FP7-REGPOT-CT-2011-284460 (*INsPiRE*). □

New Pharmaceutical Formulations in the Fight Against Cancer: How Toll-Like Receptor (Tlr) Agonists Enhance the Activity of Anticancer Vaccines

Pinelopi Samara¹, Spyridoula-Aggeliki Nikou¹, Sotirios Fortis^{1,2}, Ioannis Voutsas², Constantin Baxevanis², Ourania Tsitsilonis¹ *

¹Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Ilissia, 15784, Athens

²Cancer Immunology and Immunotherapy Center, "St. Savas" Cancer Hospital, 171 Alexandras Avenue, 11522, Athens

Summary

Toll-like receptor (TLR) agonists are characterized by their ability to activate dendritic cells (DCs), promoting the production of T_H 1 type cytokines and enhancing the immune responses of cytotoxic T cells. To date, a series of preclinical and clinical studies are conducted, suggesting that TLR agonists can improve the efficacy of anticancer vaccination protocols. Currently, three TLR agonists have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States of America for clinical use in humans. However, their abundant application encounters limitations, mainly due to the occurrence of toxicity, evoking from the systemic production of increased cytokine concentrations. In this review article, using selected examples of preclinical and clinical studies, we briefly present existing knowledge on the adjuvant

effect of TLR agonists, as anticancer vaccine components. We also provide evidence on the potential clinical use of a novel TLR agonist, namely of prothymosin α , which reportedly promotes DC maturation and, both *in vitro* and *in vivo* cancer models in animals, has been shown to enhance the functionality of tumor-reactive effector cells without causing severe adverse effects.

Key words

Toll-like receptor (TLR) agonists, Adjuvants, Anticancer vaccination, DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), Prothymosin α

*Author for correspondence:

Ourania Tsitsilonis, tel: 210-7274215, fax: 210-7274635, e-mail: rtsitsil@biol.uoa.gr

Βιβλιογραφία

1. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautes-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 894-907, 2012.
2. Anderson K.V., Bokla L., Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-8, 1985.
3. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-7, 1997.
4. Kono H., Rock K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 279-89, 2008.
5. Goutagny N., Estornes Y., Hasan U., Lebecque S., Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Target Oncol.* 7, 29-54, 2012.
6. Schreiber G., Tel J., Sliepen K.H., Benitez-Ribas D., Figdor C.G., Adema G.J., de Vries I.J. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1573-82, 2010.
7. Chin A.I., Miyahira A.K., Covarrubias A., Teague J., Guo B., Dempsey P.W., Cheng G. Toll-like receptor 3-mediated

- suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res.* 70, 2595-603, 2010.
8. Wang D., Precopio M., Lan T., Yu D., Tang J.X., Kandimala E.R., Agrawal S. Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1788-97, 2010.
 9. Nierkens S., den Brok M.H., Garcia Z., Togher S., Wagenaar J., Wassink M., Boon L., Ruers T.J., Figdor C.G., Schoenberger S.P., Adema G.J., Janssen E.M. Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res.* 71, 6428-37, 2011.
 10. Hartmann E., Wollenberg B., Rothenfusser S., Wagner M., Wellisch D., Mack B., Giese T., Gires O., Endres S., Hartmann G. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63, 6478-87, 2003.
 11. Huang B., Zhao J., Shen S., Li H., He K.L., Shen G.X., Mayer L., Unkeless J., Li D., Yuan Y., Zhang G.M., Xiong H., Feng Z.H. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell Toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 67, 4346-52, 2007.
 12. Baxevas C.N., Voutsas I.F., Tsitsilonis O.E. Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy* 5, 497-511, 2013.
 13. Szczepanski M.J., Czystowska M., Szajnik M., Harasymczuk M., Boyiadzis M., Kruk-Zagajewska A., Szyfter W., Zeromski J., Whiteside T.L. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 69, 3105-13, 2009.
 14. Coley W. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105, 487-511, 1893.
 15. Cheever M.A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol. Rev.* 222, 357-68, 2008.
 16. Lockyer C.R., Gillatt D.A. BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. R. Soc. Med.* 94, 119-23, 2001.
 17. Vermorken J.B., Claessen A.M., van Tinteren H., Gall H.E., Ezinga R., Meijer S., Scheper R.J., Meijer C.J., Bloemena E., Ransom J.H., Hanna M.G. Jr, Pinedo H.M. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353, 345-350, 1999.
 18. Sharma P., Bajorin D.F., Jungbluth A.A., Herr H., Old L.J., Gnjatic S. Immune responses detected in urothelial carcinoma patients after vaccination with NY-ESO-1 protein plus BCG and GM-CSF. *J. Immunother.* 31, 849-57, 2008.
 19. Clinical trials database. www.clinicaltrials.gov
 20. Cluff C.W. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv. Exp. Med. Biol.* 667, 111-23, 2010.
 21. Vansteenkiste J., Zielinski M., Linder A., Dahabreh J., Gonzalez E.E., Malinowski W., Lopez-Brea M., Vanakasa T., Jassem J., Kalofonos H., Perdeus J., Bonnet R., Basko J., Janilionis R., Passlick B., Treasure T., Gillet M., Lehmann F.F., Brichard V.G. Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J. Clin. Oncol.* 31, 2396-403, 2013.
 22. Hamilton E., Blackwell K., Hobeika A.C., Clay T.M., Broadwater G., Ren X.R., Chen W., Castro H., Lehmann F., Spector N., Wei J., Osada T., Lyerly H.K., Morse M.A. Phase I clinical trial of HER2-specific immunotherapy with concomitant HER2 kinase inhibition. *J. Transl. Med.* 10, 28, 2012.
 23. Kruit W., Suciu S., Dreno B., Mortier L., Robert C., Chiaron-Sileni V., Maio M., Testori A., Dorval T., Grob J.J., Becker J.C., Spatz A., Eggermont A.M., Louahed J., Lehmann F.F., Brichard V.G., Keilholz U. Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the EORTC melanoma group in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 2413-20, 2013.
 24. Giannini S.L., Hanon E., Moris P., Van Mechelen M., Morel S., Dessy F., Fourneau M.A., Colau B., Suzich J., Losonksy G., Martin M.T., Dubin G., Wettendorff M.A. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24, 5937-49, 2006.
 25. Badie B., Berlin J.M. The future of CpG immunotherapy in cancer. *Immunotherapy* 5, 1-3, 2013.
 26. Karbach J., Gnjatic S., Bender A., Neumann A., Weidmann E., Yuan J., Ferrara C.A., Hoffmann E., Old L.J., Altorki N.K., Jäger E. Tumor-reactive CD8+ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and montanide ISA-51: association with survival. *Int. J. Cancer* 126, 909-18, 2010.

27. Brody J.D., Ai W.Z., Czerwinski D.K., Torchia J.A., Levy M., Advani R.H., Kim Y.H., Hoppe R.T., Knox S.J., Shin L.K., Wapnir I., Tibshirani R.J., Levy R. In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *J. Clin. Oncol.* 28, 4324-32, 2010.
28. Ohno S., Okuyama R., Aruga A., Sugiyama H., Yamamoto M. Phase I trial of Wilms' tumor 1 (WT1) peptide vaccine with GM-CSF or CpG in patients with solid malignancy. *Anticancer Res.* 32, 2263-9, 2012.
29. Wieckowski E., Chatta G.S., Mailliard R.M., Gooding W., Palucka K., Banchereau J., Kalinski P. Type-1 polarized dendritic cells loaded with apoptotic prostate cancer cells are potent inducers of CD8+ T cells against prostate cancer cells and defined prostate cancer-specific epitopes. *Prostate* 71, 125-33, 2011.
30. Palamara F., Meindl S., Holcmann M., Luhrs P., Stingl G., Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* 173, 3051-61, 2004.
31. Adams S., O'Neill D.W., Nonaka D., Hardin E., Chiriboga L., Siu K., Cruz C.M., Angiulli A., Angiulli F., Ritter E., Holman R.M., Shapiro R.L., Berman R.S., Berner N., Shao Y., Manches O., Pan L., Venhaus R.R., Hoffman E.W., Jungbluth A., Gnjatich S., Old L., Pavlick A.C., Bhardwaj N. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J. Immunol.* 181, 776-84, 2008.
32. Feyerabend S., Stevanovic S., Gouttefangeas C., Wernet D., Hennenlotter J., Bedke J., Dietz K., Pascolo S., Kuczyk M., Rammensee H.G., Stenzl A. Novel multi-peptide vaccination in HLA-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *Prostate* 69, 917-27, 2009.
33. Trakatelli M., Tounouz M., Blocklet D., Dadoo Y., Gordower L., Laporte M., Vereecken P., Sales F., Mortier L., Mazouz N., Lambermont M., Goldman S., Coulie P., Goldman M., Velu T. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 469-74, 2006.
34. Czerniecki B.J., Koski G.K., Koldovsky U., Xu S., Cohen P.A., Mick R., Nisenbaum H., Pasha T., Xu M., Fox K.R., Weinstein S., Orel S.G., Vonderheide R., Coukos G., DeMichele A., Araujo L., Spitz F.R., Rosen M., Levine B.L., June C., Zhang P.J. Targeting HER 2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res.* 67, 1842-52, 2007.
35. Wilgenhof S., Van Nuffel A.M., Corthals J., Heirman C., Tuyaerts S., Benteys D., De Coninck A., Van Riet I., Verfaillie G., Vandeloo J., Bonehill A., Thielemans K., Neyns B. Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *J. Immunother.* 34, 448-56, 2011.
36. Galluzzi L., Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial watch: experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 699-716, 2012.
37. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 826-37, 2010.
38. Fucikova J., Kralikova P., Fialova A., Brtnicky T., Rob L., Bartunkova J., Spisek R. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* 71, 4821-33, 2011.
39. Haritos A.A., Goodall G.J., Horecker B.L. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1008-11, 1984.
40. Ioannou K., Samara P., Livaniou E., Derhovanesian E., Tsitsilonis O.E. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 599-614, 2012.
41. Baxevas C.N., Gritzapis A.D., Spanakos G., Tsitsilonis O.E., Papamichail M. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* 40, 410-18, 1995.
42. Baxevas C.N., Reclos G.J., Papamichail M. sin alpha restores depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer-cell activity in patients with cancer. *Int. J. Cancer* 53, 264-8, 1993.
43. Eckert K., Grunberg E., Garbin F., Maurer H.R. Preclinical studies with prothymosin alpha1 on mononuclear cells from tumor patients. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 493-500, 1997.
44. Baxevas C.N., Spanakos G., Voutsas I.F., Gritzapis A.D., Tsitsilonis O.E., Mamalaki A., Papamichail M. Increased generation of autologous tumor-reactive lymphocytes by anti-CD3 monoclonal antibody and prothymosin

- alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 71-84, 1999.
45. Cordero O.J., Sarandeses C., Lopez-Rodriguez J.L., Nogueira M. The presence and cytotoxicity of CD16+ CD2-subset from PBL and NK cells in long-term IL-2 cultures enhanced by prothymosin-alpha. *Immunopharmacology* 29, 215-23, 1995.
 46. Voutsas I.F., Baxevas C.N., Gritzapis A.D., Missitzis I., Stathopoulos G.P., Archodakis G., Banis C., Voelter W., Papamichail M. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 49, 449-58, 2000.
 47. Skopeliti M., Kratzer U., Altenberend F., Panayotou G., Kalbacher H., Stevanovic S., Voelter W., Tsitsilonis O.E. Proteomic exploitation on prothymosin alpha-induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 7, 1814-24, 2007.
 48. Mosoian A., Teixeira A., Burns C.S., Sander L.E., Gusella G.L., He C., Blander J.M., Klotman P., Klotman M.E. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 10178-83, 2010.
 49. Samara P., Ioannou K., Neagu M., Arnogiannaki N., Aravanis A., Voelter W., Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin alpha is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 15, 50-7, 2013.
 50. Skopeliti M., Ionomidou V.A., Derhovanessian E., Pawelec G., Voelter W., Kalbacher H., Hamodrakas S.J., Tsitsilonis O.E. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol. Immunol.* 46, 784-92, 2009.
 51. Ioannou K., Derhovanessian E., Tsakiri E., Samara P., Kalbacher H., Voelter W., Trougakos I.P., Pawelec G., Tsitsilonis O.E. Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance Th1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol.* 14, 43, 2013.
 52. Voutsas I.F., Pistamaltzian N., Tsiatas M.L., Skopeliti M., Katsila T., Mavrothalassiti I., Spyrou S., Dimopoulos M.A., Tsitsilonis O.E., Bamias A. Ovarian malignant ascites-derived lymphocytes stimulated with prothymosin alpha or its immunoactive decapeptide lyse autologous tumour cells in vitro and retard tumour growth in SCID mice. *Eur. J. Cancer* 49, 1706-14, 2013.
 53. Evstafieva A.G., Belov G.A., Rubtsov Y.P., Kalkum M., Joseph B., Chichkova N.V., Sukhacheva E.A., Bogdanov A.A., Pettersson R.F., Agol V.I., Vartapetian A.B. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp. Cell Res.* 284, 211-23, 2003.
 54. Aguilera R., Saffie C., Tittarelli A., Gonzalez F.E., Ramirez M., Reyes D., Pereda C., Hevia D., Garcia T., Salazar L., Ferreira A., Hermoso M., Mendoza-Naranjo A., Ferrada C., Garrido P., Lopez M.N., Salazar-Onfray F. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 2474-83, 2011.
 55. Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A., Lotze M.T. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 2836-48, 2007.
 56. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59-73, 2008.
 57. Baxevas C.N. Outlining novel scenarios for improved therapeutic cancer vaccines: the PANVAC paradigm. *Expert Rev Vaccines* 11, 275-7, 2012.
 58. Gulley J.L., Madan R.A., Schlom J. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Curr. Oncol.* 18, e150-7, 2011.
 59. Samulowicz U., Weber M., Weeratna R., Uhlmann E., Noll B., Krieg A.M., Vollmer J. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* 20, 93-101, 2010.
 60. Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. Selected Toll like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6, 769-76, 2005.
 61. Bogunovic D., Manches O., Godefroy E., Yewdall A., Gallois A., Salazar A.M., Marie I., Levy D.E., Bhardwaj N. TLR4 engagement during TLR 3-induced proinflammatory signaling in dendritic cells promotes IL 10-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Res.* 71, 5467-76, 2011.
 62. Dang Y., Wagner W.M., Gad E., Rastetter L., Berger C.M., Holt G.E., Disis M.L. Dendritic cell-activating vaccine adjuvants differ in the ability to elicit antitumor immunity due to an adjuvant-specific induction of immunosuppressive cells. *Clin. Cancer Res.* 18, 3122-31, 2012.

Standard Addition HPLC Method for the Determination of α -Tocopherol in Plasma Samples of Adolescent Swimmers

Constantinos Pistos^{1*}, Myrsini Vlachou^{1,2}, Vassiliki Theiakodimitri^{1,2}, Elena Philippou³, Michael Petrou⁴, Nicos Middleton⁵, Irene Panderi², Evangelos Gkikas², Ioannis Papoutsis¹, Chara Spiliopoulou¹, Sotiris Athanaselis¹

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

²University of Athens, School of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry, Panepistimopolis-Zografou, 157 71 Athens, Greece

³Department of Life & Health Sciences, University of Nicosia (UNIC), Cyprus

⁴Centre for Leisure, Tourism & Sport Research & Development, UNIC, Cyprus

⁵Department of Nursing, School of Health Sciences, Cyprus University of Technology, Cyprus

Summary

Vitamin E (a-tocopherol, a-Toc) has been widely used as a powerful antioxidant that protects against oxidation of cellular components. It is used to treat muscular dystrophies, menstrual cycle disorders, risks of pregnancy interruption and abnormalities of gonadal function in men. It is also used frequently from athletes as nutritional supplement for performance enhancing. A simple HPLC method has been validated for the determination of a-Toc in human plasma, using a Nova-Pack analytical column. The chromatographic run time was less than 12 minutes using a mobile phase of Acetonitrile-Methanol 85:15 (v/v), at 0.999 mL/min flow rate while UV/Vis detector was adjusted

at 292 nm. The purpose of this study was to evaluate two different approaches for the construction of the calibration curve and further quantify samples from swimmer athletes in order to investigate potential quantification differences. It was shown that the existence of a-Toc as endogenous compounds might affect the actual concentrations and should be considered as an essential parameter during the development of a bioanalytical method for the determination of a-tocopherol in human plasma.

Keywords

a-tocopherol; HPLC; plasma; standard addition

Introduction

Tocopherols (both alpha-tocopherol and gamma-tocopherol) are the major antioxidants found in plasma and are commonly referred to as Vitamin E. There are eight naturally occurring Vitamin E compounds: four tocopherols and four tocotrienols. Among them, a-tocopherol (a-Toc, Fig. 1) is the most active form of Vitamin E in human ¹ and is responsible for most of the antioxidant activity in animal tissues ². Disorders

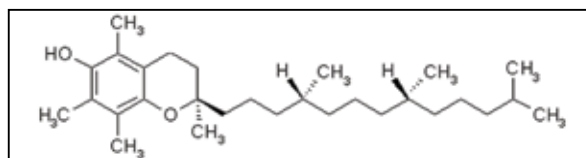


Figure 1. Chemical structure of α -tocopherol

of antioxidant balance involving tocopherols may be involved in the pathogenesis of some of the toxic effects of radiotherapy ^{3,4} or chemotherapy ⁵. Alpha-tocopherol

* **Corresponding Author:** Constantinos Pistos (cpistos@med.uoa.gr)

may have chemopreventive activity and may also alleviate toxicity of retinoic acid administration. Normal concentrations of α -Toc in human plasma appear to range between 5-20 $\mu\text{g/mL}$ ⁶.

A significant number of athletes, including elite athletes, consume vitamin supplements seeking beneficial effects on performance ⁷. In particular, supplementation with different types of antioxidants such as tocopherols, has been variably shown to have positive effects, no effect, even negative effects on training adaptation ⁸⁻¹¹. Because intensive exercise generates stress in the working muscles ¹⁰, it appears that antioxidant supplementation could beneficially reduce this stress. It has become clear that cellular stress, which includes increased production of free radicals and oxidative stress, in fact works as a signal to induce important adaptations in muscle cells, including mitochondrial biogenesis and myofiber hypertrophy ¹². Thus, if the cells are exposed to high concentrations of antioxidants this signaling may be blunted or blocked, which in turn may inhibit physiological adaptations. Thus, antioxidant vitamins such as tocopherol are necessary for quenching free radicals. For this reason, tocopherols are frequently studied antioxidants in exercise research and there is a requirement for reliable bioanalytical methods.

A number of analytical methods, for the determination of α -Toc in human plasma have been introduced using HPLC-UV/Vis ¹³⁻²². Of interest, most of them validate their method by constructing calibration curves without considering the appearance of α -Toc as an endogenous compound ^{8,11,13,16}. Only Nirungsan ¹³ used the approach of standard addition while other authors used ethanol as a surrogate matrix in order to substitute plasma matrix ⁹. In such a case, the endogenous molecule contributes to the detectors response thus affecting the final quantitative data and the traditional preparation of the calibration curve appears to be problematic ²³. The literature propose three alternative approaches ^{24,25} in order to overcome this problem. Quantitation using surrogate matrix and authentic analyte ⁹, quantitation using authentic matrix and surrogate analyte ²⁶ and the standard addition method ^{27,28}. In this study, the authors evaluated two different approaches for the construction of the calibration curve and further quantified real samples in order to investigate potential quantification differences. The results of our study showed that the existence of α -Toc as endogenous compounds might affect the actual concentrations

and should be considered as an essential parameter for the development of a bioanalytical method for the determination of α -tocopherol on human plasma.

2. Material and methods

2.1 Chemical and reagents

Reference standards of α -tocopherol and tocopherol acetate were obtained from Sigma Aldrich Chemistry (St. Louis, USA). Acetonitrile, methanol, ethanol, n-hexane were of HPLC grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). N-hexane of analytical grade was also purchased by Merck (Darmstadt, Germany). Water was deionized and further purified by means of a Direct-Q water purification system from Millipore SA (Molsheim, France). Human plasma was obtained from plasma units of the blood bank of Aglaia Kyriakou Pediatric Hospital (Athens, Greece). Nova-Pak analytical column was purchased from Waters (Milford, MA, USA).

2.2 HPLC-UV/VIS conditions

Chromatography was performed using 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 adjusted at 292 nm. The system was fitted with a Model 7125 manual injector Rheodyne (Cotati, CA, USA) and a 50 μL sample loop. Samples were chromatographed on a Nova-Pak C18 reversed-phase column (250 $\times$ 4.6 mm, 4 μm). Mobile phase consisted of ACN/MeOH (85/15, v/v) and 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 μm) 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 extracted solvents.

2.3 Stock and working standard solutions

A mixed working standard solution of 250ng/mL a-Toc and 125ng/mL tocopherol acetate was prepared from their appropriate separate stock solutions of 1mg/mL in ethanol. This mixture was used for the development of the chromatographic separation of both analytes. In addition, working solutions at a calibration range of 50-200 µg/mL (50, 70, 100, 150, and 200 µg/mL) were prepared by appropriate dilutions of the 1mg/mL stock solution with ethanol. Working solutions were prepared also for quality control (QC) samples by appropriate dilutions of different batches of stock solutions to obtain final concentrations of 80, 120, and 180 µg/mL.

2.4 Calibration and quality control samples

Plasma standards for calibration curves and QCs were prepared by spiking 0.45 mL aliquots of drug free human plasma with 50 µL of the appropriate mixed standard solution of a-Toc, providing a calibration range between 5-20 µg/mL (5, 7, 10, 15, and 20 µg/mL) and QC levels at 8, 12 and 18 µg/mL.

2.5 Sample extraction

The extraction procedure was based on a liquid-liquid extraction (LLE) to an organic phase as proposed by Kaprinska et al.¹⁷ with modification. In brief, 500 µL of methanol were added in 1 mL plasma for protein precipitation and 750 µL of n-hexane were then added for liquid-liquid extraction. After 2 min of intense vortex, samples were centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes. The supernatant layer was transferred to a clean glass tube and an additional amount of 750 µL n-hexane was added again in the remaining aquatic layer. The same procedure was replicated and the final organic layer was combined with the initial amount. The combined supernatant organic layers were evaporated with 200µL of mobile phase and 50 µL were finally injected into the HPLC system.

2.6 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 internal standard (IS) peak area against drug concentration according to European Union criteria²⁹.

Our attempts to quantitatively measure plasma a-Toc, were based on two approaches: Firstly to prepare a calibration curve by spiking different concentrations of a-Toc in samples from donor with minimum amount of the analyte and secondly to prepare a standard addition curve by spiking different concentrations of a-Toc in the same donor sample.

For the construction of the calibration curve, spiked human plasma calibrators at five concentrations (5, 7, 10, 15, 20 µg/mL), were prepared and analyzed in three different analytical runs. Weight ($1/x^2$) least square linear regression was used to obtain the equations of the calibration curves. QC samples (8, 12, 18 µg/mL) 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. In this case, endogenous a-Toc concentration was determined from the regression equation, representing the relationship between the added standard a-Toc concentration and the analytical response of peak area ratio of a-Toc and IS.

For the standard addition approach, spiked plasma samples at three concentrations (5, 10, 20 µg/mL), and a fourth sample (*zero*) without the addition of a-Toc, were prepared and analyzed in three different analytical runs. In the standard addition method, endogenous a-Toc concentration was determined from the regression equation, extrapolated to the x axis. In both cases, selectivity was evaluated by analyzing six different blank human plasma in order to evaluate the absence of interfering peaks in the chromatographs of the analyte and the IS.

2.7 Endogenous a-Toc determination in plasma of adolescent swimmers

The reliability of the two approaches to quantify endogenous plasma a-Toc was investigated by analyzing the analyte in the plasma of adolescent swimmers ($n = 6$). The results of endogenous a-Toc from this population were calculated from both calibration curves (calibration curve, standard addition).

Table 1. Analytical parameters of the calibration equations for the determination of a-Toc in human plasma using standard calibration curve (A) and standard addition method (B) (Mean of three calibration curves; calibration range: 5-20 µg/mL)

Regression equation ^a	r^{2b}	s.d ^c		LOD ^d	LOQ ^e
		Slope	Intercept		
(A) $\alpha\text{-Toc} = 4.1 \times 10^{-4} \times C_{\alpha\text{-toc}} + 0.9 \times 10^{-4}$	0.993	1.5×10^{-4}	1.2×10^{-4}		5.0
(B) $\alpha\text{-Toc} = 4.4 \times 10^{-4} \times C_{\alpha\text{-toc}} + 1.1 \times 10^{-4}$	0.991	1.6×10^{-4}	0.9×10^{-4}	1.5	5.0

^a Ratio of the peak area amplitude of the analyte to that of the internal standard, (a-tocopherol, a-toc) vs. the corresponding concentration; $C_{\alpha\text{-toc}}$ is the concentration of a-tocopherol.
^b Square correlation coefficient.
^c Standard deviation of slope and intercept.
^d Limit of detection
^e Limit of quantitation

3. Results and discussion

3.1 HPLC chromatographic conditions optimization

During the preliminary experiments, several combinations of mobile phase composition (ACN/H₂O and ACN/MeOH) in Nova-Pak C₁₈ analytical column were investigated, in order to obtain the optimum separation of a-Toc and tocopherol acetate. In mobile phase A (ACN/H₂O) increasing the percentage of ACN, did not facilitate the elution of a-Toc and tocopherol acetate. By increasing the elution power of the mobile phase by replacing the water with the less polar methanol (mobile phase B), the analytes were eluted at sufficient retention time. Consequently, the best separation of a-Toc and IS on the Nova-Pak C₁₈ column was achieved using a mobile phase of acetonitrile:methanol 85:15 (v/v) to obtain retention times of 10.08 and 11.52 min, respectively.

3.2 Sample extraction optimization

Liquid-liquid extraction was selected due to the simplicity of the technique and its ability to remove most of the endogenous components of plasma matrix allowing thus the detection of a-tocopherol and tocopherol acetate. For the liquid-liquid extraction, the method of Kaprinska was adopted with slight modifications¹⁷. According to this method, 500 µL of methanol for protein precipitation and 750 µL of n-hexane were added in 250 µL of human plasma.

After intense vortex for 2 minutes, the samples were centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes. The supernatant organic layer of n-hexane was transferred to a clean glass tube and the procedure was replicated to the remaining sample. The supernatant n-hexane of this second procedure was combined with the first amount of the solvent and it was evaporated to dryness using nitrogen air. The samples were reconstituted with 200 µL of mobile phase and 50 µL were injected into the chromatographic system. According to this liquid-liquid extraction procedure, the chromatogram was free of interferences and recovery was found to be 106.42% for a-Toc.

3.3 Selectivity

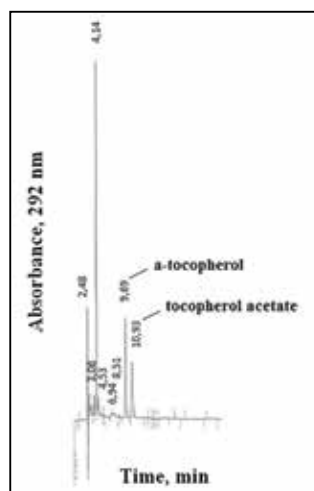
No endogenous plasma components were eluted at the retention time of a-Toc.

3.4 Linearity

Calibration curves were constructed by reporting the nominal a-Toc concentration in spiked calibration samples on the x-axis and on the y-axis the peaks areas ratio between a-Toc and the internal standard. At the first consideration of calibration curve, these samples yielded calibration curves with excellent linearity. However, when plasma samples from different donors, with same a-Toc amount spiked, were analyzed, the

Table 2. Comparison between quantification approaches of *α*-Toc: calibration curve and standard addition method

Conc. Added (µg/mL)	% R.S.D.	% Er	% R.S.D.	% Er
	Calibration curve		Standard addition method	
Intraday (n=3)				
8	35.6	34.7	12.6	12.2
12	18.2	21.8	9.4	10.9
20	6.4	9.3	8.6	8.7
Intraday (n=9)				
8	39.4	37.3	11.5	11.9
12	17.3	20.3	8.9	10.5
20	7.1	11.2	8.1	8.6

**Figure 2.** Representative HPLC chromatogram obtained from the analysis of a blank plasma sample; endogenous *α*-tocopherol ($t_R=9.69$ min) and tocopherol acetate (IS) ($t_R=10.93$ min)

slopes and the intercepts of the calibration curves obtained from these three different plasma samples varied considerably (Curve A, Table 1).

This fact confirms the necessity of relying upon an analytical method independent from interference due to the biological matrix. Hence, the traditional calibration curve strategy was abandoned in favor of the standard addition approach that compensated for differences in the plasma matrix. This technique is suitably used when a blank matrix is not available²⁸. Samples were analyzed

and the peak areas ratio between *α*-Toc and the internal standard were recorded versus the added concentrations. The calibration curves were linear in the corresponding dynamic ranges with square correlation coefficient ($r^2 \geq 0.991$)³ for *α*-Toc, while the % RSD of the slopes was ≤ 7.31 (Curve B, Table 1). Figure 2 represents a typical chromatogram of blank plasma sample with the addition of IS. The corresponding chromatogram of a plasma sample spiked with *α*-Toc (5 μg/mL) and tocopherol acetate is practically the same (Figure not shown).

3.5 Precision and accuracy

The percent inaccuracy (% Error) and precision (RSD%) were evaluated in both curves approaches (Curve A and B).

For the calibration curve (Curve A), the %RSD of intra- and interday precision were found to be between 6.4 and 39.4%, for all concentration levels. The % of intra- and interday accuracy were found to be between 9.3 and 37.3%, for all concentration levels (Table 2). It appears that at lower concentrations, the % error increased probably due to the existing endogenous concentration of *α*-Toc which affects the reliability of the measurement.

For standard addition curve (Curve B), the %RSD of intra- and interday precision were found to be between 8.6 and 11.5%, for all concentrations. The % of intra- and interday accuracy were found to be between 8.7 and 11.9%, for all concentrations (Table 2). The results indicate that standard addition curve provides more

Table 3. Comparison of *a*-tocopherol levels using standard calibration curve and standard addition method in plasma of adolescent swimmers (*n*=6)

Calibration curve	Standard addition method
21.7	13.2
11.3	5.9
14.2	7.4
16.7	11.8
18.1	8.4
12.6	5.7

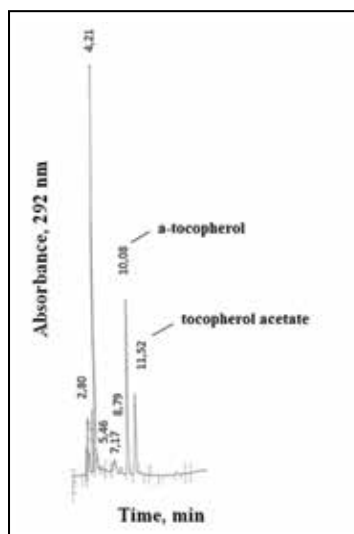


Figure 3. Representative HPLC chromatogram obtained from the analysis of a typical swimmer plasma sample (*a*-tocopherol, *t*_R=10.08 min, tocopherol acetate *t*_R=11.52 min)

accurate determinations compared to the standard calibration curve.

3.6 Endogenous *a*-Toc determination in plasma of healthy adolescent swimmers

The method was further applied to the plasma samples of adolescent swimmers. The results of this study do not fall in the scope of this article. Six plasma samples from the above population were quantified using both curves (A and B). Using Curve A, all samples provided higher concentrations than Curve B. This is in line with the observed results of method accuracy which showed increased % error in Curve A, due to the presence of *a*-Toc as endogenous compound. On the other hand Curve B, provided lower concentrations, which are also in line with the obtained results of method accuracy (Table 3). A typical adolescent swimmer HPLC chromatogram is shown in Fig. 3.

4. Conclusions

A number of articles in the literature present the development and validation of HPLC methods for the quantitation of *a*-Toc in human plasma. Interestingly, most of them validate their method by constructing calibration curves without considering the appearance of *a*-Toc as an endogenous compound. In this case, the final quantified concentrations of *a*-Toc might be different from the actual. In this study, the authors evaluated two different approaches for the construction of the calibration curve and further quantified real samples in order to investigate potential quantification differences. The results of our study showed that the existence of *a*-Toc as endogenous compound might affect the actual concentrations and should be considered as an essential parameter for the development of a method. □

References

1. J. S. Garrow, J. W. P. and A. Ralph (2000). *Human Nutrition and Dietetics*, 10th edn. Churchill Livingstone: Edinburgh, p. 226.
2. C. Debier, Y. Larondelle. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br. J. Nutr.* 93, 153 – 174, 2005.
3. S. Delanian, R. Porcher, S. Balla-Mekias, J. L. Lefaix. Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis, *J. Clin. Oncol.* 21, 2545 – 2550, 2003.
4. M. Erhola, M. M. Nieminen, A. Ojala. Human plasma antioxidant capacity during radiotherapy for lung cancer: a clinical Study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 17, 325 – 330, 1998.
5. A. Pace, A. Savarese, M. Picardo, V. Maresca, U. Pacetti, G. Del Monte, A. Biroccio, C. Leonetti, B. Jandolo, F. Cogentti, L. Bove. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 21, 927 – 931, 2003.
6. European Commission, Health & Consumer protection Directorate-General/Directorate C - Scientific Opinions/Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin E (http://www.google.gr/url?url=http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out195_en.pdf&rc=j&frm=1&q=&src=s&sa=U&ei=s2j8U4P7le-WR0AWG5oDACA&ved=0CBIQFjAA&usg=AFQjCN-GR2AFSsoC4p6SzP0wA7qVK51tWrg) (accessed: 23 September 2014).
7. J. Sobal and L. F. Marquart. Vitamin/mineral supplement use among athletes: a review of the literature, *Inter. J. Sport Nutr.* 4, 320–334, 1994.
8. T.T. Peternelj, J.S. Coombes. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med.* 41, 1043–1069, 2011.
9. M.G. Nikolaidis, C.M. Kerkisick, M. Lamprecht, S.R. McNulty. Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxid Med. Cell. Longev.* 2012, ID707941, 2012.
10. K. Fisher-Wellman, R.J. Bloomer. Acute exercise and active stress: a 30 year history. *Dyn. Med.* 8, 1-25, 2009
11. J.A. Warren, R.R. Jenkins, L. Packer, E.H. Witt, R.B. Armstrong. Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. 72, 2168–2175, 1992.
12. J.A. Hawley, L.M. Burke, S.M. Phillips, L.L. Spriet. Nutritional modulation of training-induced skeletal muscle adaptations. *J. Appl. Physiol.* 110, 834–845, 2011.
13. K. Nirungsan and P. Thongnopnua. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for endogenous α-tocopherol determination in human plasma, *Biomed. Chromatogr.* 20, 774–781, 2006.
14. P. F. Chatzimichalakis, V. F. Samanidou, I. N. Papadoyannis. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, 805, 289–296, 2004.
15. D. Talwar, T. K. K. Ha, J. Cooney, C. Brownlee, D. St. JO'Reilly. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α-tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC, *Clin. Chim. Acta* 270, 85–100, 1998.
16. T. Julianto, K. H. Yuen, A. M. Noor. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of α-tocopherol in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 732, 227–231, 1999.
17. J. Kaprinska, B. Mikoluc, R. Motkowski, J. Piotrowska-Jastrzebska. HPLC method for simultaneous determination of retinol, α-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 232-236, 2006.
18. L. Krčmová, L. Urbánek, D. Solichová, M. Kačparová, H. Vlčková, B. Melichar, L. Sobotka, P. Solich. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *J. Sep. Sci.* 32, 2804 – 2811, 2009.
19. J. M. Mata-Granados, J. M. Quesada-Gómez, M. D. Luque de Castro. Fully automatic method for the determination of fat soluble vitamins and vitamin D metabolites in serum, *Clin. Chim. Acta* 403, 126–130, 2009.
20. H. Ortega, J. L. Coperías, P. Castilla, D. Gómez-Coronado, M. A. Lasunción. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of dif-

- ferent lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins, *J. Chromatogr. B*, 803, 249–255, 2004.
21. M. Richelle, I. Tavazzi, L. B. Fay. Simultaneous determination of deuterated and non-deuterated α -tocopherol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 794, 1–8, 2003.
 22. J. A. Vinson, H. Al Kharrat, L. Andreoli. Effect of Aloe vera preparations on the human bioavailability of vitamins C and E, *Phytomedicine* 12, 760–765, 2005.
 23. V. P. Shah, K. K. Midha, R. D. Mcdowall, K. A. Pittman, S. Spector. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Sci.*, 81, 309–312, 1992.
 24. N. C. van de Merbel. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques *Trends Anal.Chem.* 27, 924–933, 2008.
 25. J. W. Lee, V. Devanarayan, YC Barrett, R Weiner, J Allinson, S Fountain, S Keller, I Weinry, M Green, L Duan, JA Rogers, R Millham, PJ O'Brien, J Sailstad, M Khan, C Ray, JA Wagner. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm. Res.* 23, 312–328, 2006.
 26. W. Li and L. H. Cohen. Quantitation of endogenous analytes in biofluid without a true blank matrix, *Anal. Chem.* 75, 5854–5859, 2003.
 27. P. Bailicata, N. Miraglia, M. Pieri, A. Acampora, L. Soleo, N Sannolo. Application of the standard addition approach for the quantification of urinary benzene. *J. Chromatogr. B* 818, 293–299, 2005
 28. M. Bader. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis, *J. Chem. Educ.* 57, 703–705, 1980.
 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.

Το άλας της γης ή ο Παύλος της καρδιάς μας

Πέμπτη, 16 Οκτωβρίου 2014, ώρα 01:00



Ο αγαπημένος μας Δάσκαλος, ο πολύτιμος Συνεργάτης, ο Φίλος μας, Ομότιμος Καθηγητής του Τμήματός μας Παύλος Κορδοπάτης πέρασε ήρεμα στη μέριμνα του Ιστορικού χρόνου.

Γεννημένος την Πρωταπριλιά του 1947 στην σπαρσόμενη πρωτεύουσα του υπό ανασυγκρότηση Ελληνικού κράτους, ολοκλήρωσε τα μαθητικά του χρόνια αποφοιτώντας από το Η΄ Γυμνάσιο το 1965. Στη συνέχεια μετακόμισε στην πόλη που τότε φαινόταν ως προσωρινή διαμονή για σπουδές, την Πάτρα. Τόσο προσωρινή, όσο πολλές φορές η Ζωή αποδεικνύει με σαδιστική επάρκεια το αντίθετο. Το νεοπαγές Χημικό Τμήμα του μόλις πριν ένα χρόνο ιδρυθέντος Πανεπιστημίου Πατρών, υποδέχθηκε μεταξύ άλλων πολλά υποσχόμενων εφήβων και τον δεκαοχτάχρονο Παύλο και τον εμβολίασε ανεξίτηλα τόσο με την γοητευτική Επιστήμη της Χημείας, όσο και με την απαστράπτουσα τήβεννο του Ακαδημαϊκού γίνεσθαι. Δύσκολα, όμορφα χρόνια, σε μια πόλη που προσπαθούσε επιδεικτικά να ισορροπήσει μεταξύ της εκλεπτυσμένης αρχοντιάς και του επιδεικτικού βερμπαλισμού, μεταξύ της Επτανησιακής κομψότητας και του υπερφίαλου νεοπλουτισμού. Ο Παύλος άρχισε σταδιακά να νιώθει μέρος αυτής της γρήγορα και ιδιαίτερα εξελισσόμενης κοινωνίας αξιοποιώντας την ορμέφυτη εξωστρέφεια

του και την άκρατη προσαρμοστικότητα του. Ολοκληρώνοντας τις σπουδές του κατατάσσεται στην Πολεμική Αεροπορία, περίοδο κατά την οποία, όντας Δωρικά γήινος, απέκτησε τον λογικό φόβο για τις πτήσεις, τον οποίο δυστυχώς (για τον γράφοντα που ακόμα επιμένει) εγκατέλειψε τα τελευταία χρόνια. Το 1973 επιστρέφει ως πολίτης πια, εκεί όπου βιωματικά έμελλε να περιελίξει την υπόλοιπη ζωή του, στο Πανεπιστήμιο της Πάτρας.

Ξεκινά την εκπόνηση της Διδακτορικής του Διατριβής και έρχεται σε στενότερη επαφή με Καθηγητές υψηλού Επιστημονικού διαμετρήματος και Ακαδημαϊκού ήθους οι οποίοι υπηρετώντας Εθνικό σκοπό εκλήθησαν και υπερήφανα απεδέχθησαν να οργανώσουν το Πανεπιστήμιο Πατρών θυσιάζοντας λαμπρές καριέρες και αμοιβές σε φημισμένα ιδρύματα της αλλοδαπής. Δημήτρης Θεοδωρόπουλος και Ανδρέας Γαληνός επικεφαλής της λίστας αείμνηστων παιδαγωγών που ενέπνευσαν τη μετεξέλιξη του νεαρού απόφοιτου σε πολλά υποσχόμενο ερευνητή και θιασώτη της Πανεπιστημιακής ευταξίας.

Το 1976 υποστηρίζει με επιτυχία τη Διδακτορική του Διατριβή και ως μεταδιδακτορικός ερευνητής εκπαιδεύεται σε διεθνώς καταξιωμένα εργαστήρια. Βέλγιο, Γαλλία και Ελβετία, Πανεπιστήμιο Mons, CEN Saclay

και Πανεπιστήμιο Βασιλείας αντίστοιχα. Τέσσερα χρόνια στην καρδιά της Ευρώπης, οσμίζεται την επερχόμενη αύρα του σοσιαλιστικού μετασχηματισμού και κατά πάσα βεβαιότητα ωριμάζει μέσα του ο θρησκευτικός φανατισμός για το μεγάλο ρόλο που μπορούσε και έπρεπε να διαδραματίσει η Γηραιά Ήπειρος. Συνειδητοποιεί (και αυτό δεν έπαψε ποτέ να το εκφράζει με κάθε δυνατό τρόπο) πως είναι πλέον ιστορική ανάγκη ο Ευρωπαίος Φάουστ να επιχειρήσει ένα νέο ταξίδι στη χώρα του μέτρου και της ισορροπίας για να γεννήσει εκ νέου τον Ευφορίωνα. Μιλά εξαιρετικά Γαλλικά και Αγγλικά και ούτω πως, επιτρέπει στην αισθητική και καλλιτεχνική του διάσταση να δέχονται αλληπάλληλα εναργή ραπίσματα από τη Ζωγραφική, την Ποίηση, την Λογοτεχνία, τη Μουσική. Ο μετέπειτα υπέροχα ώριμος *bon viveur* πολλές φορές αναζήτησε την άκρη του νήματος σε εκείνη την περίοδο.

Επιστρέφει στην Πάτρα ως Υφηγητής το σωτήριο έτος 1981. Σωτήριο, γιατί επιτέλους ξεκινά αυτό που είναι για τον Παύλο η πεμπτούσια της επαγγελματικής του αναζήτησης, αυτό που θα υπηρετήσει με ασίγαστο πάθος μέχρι τέλους και τον επόμενο χρόνο προάγεται σε Εντεταλμένο Υφηγητή που την ίδια χρονιά μετονομάζεται σύμφωνα με το νέο Νόμο-Πλαίσιο σε Επίκουρος Καθηγητής.

Την ίδια περίοδο, ένας πρόσφατα επιτυχών στις πανελλήνιες εξετάσεις έφτανε στην Πάτρα ως φοιτητής του Τμήματος Φαρμακευτικής, ο οποίος μετά από μια αυθαίρετη αλλά εξόχως διδακτική από βιωματικής απόψεως ετήσια άδεια από τις φοιτητικές υποχρεώσεις, αποφάσισε να ασχοληθεί με τα μαθήματά του. Εκεί γνώρισε για πρώτη φορά τον Παύλο. Αρχικά από έδρας, αργότερα εκτός έδρας. Ένας νεαρός καθηγητής δίδασκε Φαρμακογνωσία, αλλά πολύ αργότερα ο ίδιος φοιτητής συνειδητοποιούσε πως ουσιαστικά εισέπραττε κάτι πολύ περισσότερο. Πίσω και πέρα από τις παράξενες Δρόγες και τα αβάσταχτα Λεμονένια υπήρχε το πάθος για τη Γνωσιακή Μύηση, η προτροπή για την Αξιολογική ικανότητα και η γοητεία της Αισθητικής καλλιέργειας.

Μια δεκαετία αργότερα και ενώ ήδη από το 1988 είχε ήδη εκλεγεί Καθηγητής Φαρμακογνωσίας στο Τμήμα Φαρμακευτικής, ο Παύλος συμμετείχε ενεργά και με θέρμη στην έναρξη της Ακαδημαϊκής καριέρας του τότε φοιτητή και νυν υπογράφοντα το αδιανόητο τούτο κείμενο.

Και όταν δυο δεκαετίες αργότερα έδειξα στον Παύλο ένα εισαγωγικό σημείωμα για τον οδηγό σπουδών που ως νέος πρόεδρος του Τμήματος είχα συντάξει, μου χαμογέλασε με το ιδιαίτερο Εκείνο αφοπλιστικό χαμόγελο και μου είπε: «Όλα καλά, αλλά δε γράφεις τίποτα για το Χρόνο. Προσπάθησε να εξηγήσεις το Χρόνο. Στους φοιτητές μας απευθύνεσαι...». Το μόνο που έκανα ήταν να το προσπαθήσω. Και όταν την επόμενη μέρα του έδειξα την προσπάθειά μου «...Ο χρόνος είναι αμείλικτος, τρέξτε πιο γρήγορα από αυτόν και προσπαθήστε να νικήσετε την ανηθικότητα που εμπεριέχει: πάντα θα σας κυνηγά και ποτέ δε θα σας χαριστεί.», αυτή τη φορά δε χαμογέλασε, παρά μόνο σηκώθηκε από το γραφείο του και κοίταξε από το απέναντι παράθυρο τον Πατραϊκό που αιμορραγούσε από τα δάκρυα του δύνοντος ηλίου και με διακριτικότητα συμπορεύτηκε μαζί του.

Πίσω στο Τμήμα Φαρμακευτικής, στα τέλη της δεκαετίας του 80, που τότε απαριθμούσε μόλις 4 μέλη ΔΕΠ, ενώ το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων δεν ήταν παρά μόνο ιδέες, προσδοκίες και όνειρα που χόρευαν ακατάπαυστα ασφυκτιώντας μέσα σε ένα από τα προκατασκευασμένα κτίρια, φτιαγμένα από ατόφιο τσιμέντο και περίσσεια σιδήρου από την MOMA της επταετίας. Στα επόμενα 4 χρόνια ο νεαρός Καθηγητής, λειτουργώντας καταλυτικά ανάμεσα σε προσωπικότητες με δυναμική ολετήρα και επιδιώκοντας την ειλικρινή σύνθεση είδε με την προσήκουσα αυταρέσκεια το Τμήμα του να υπερδιπλασιάζει τα μέλη ΔΕΠ και να δραπετεύει οριστικά από τα νηπιακά σύνδρομα. Όσο για το Εργαστήριο του, στο ίδιο χρονικό διάστημα, διεκδικώντας και αξιοποιώντας την χρηματοδότηση των άρτι αφιχθέντων ανταγωνιστικών Ευρωπαϊκών προγραμμάτων, κατάφερε να μετατρέψει τον άχαρο τσιμεντένιο κύβο σε σύγχρονη και λειτουργική κυψέλη έρευνας και διδασκαλίας. Στα χρόνια που ακολούθησαν στον ίδιο αυτό χώρο, καταθέτοντας την ψυχή του και ...διδάσκων αεί γηρασκόμενος, όπως εκλεπτυσμένα παρέφραζε τον Σόλωνα, παρήχθησαν πάνω από 180 πρωτότυπες ερευνητικές δημοσιεύσεις, εκπονήθηκαν με επιτυχία 18 Διδακτορικές Διατριβές και 40 Μεταπτυχιακά Διπλώματα, με την πλειοψηφία των κατόχων αυτών να σταδιοδρομούν σε εξαιρετικές θέσεις και να μεταλαμπαδεύουν την σπίθα που τους εμφύτευσε στο μυαλό και στην καρδιά τους.

Για σχεδόν δεκαπέντε χρόνια ηγήθηκε του Τμήματος και συμμετείχε ενεργά στο Ακαδημαϊκό γίγνεσθαι

του Πανεπιστημίου Πατρών. Ο Λόγος του εμπεριείχε και εξέφραζε τον στοχασμό του, την ενόραση του, την προσδοκία του για το ρηξικέλευθο, την αβάσταχτη αυτοπειθαρχία του στην Ακαδημαϊκότητα. Και είναι πλέον πανθομολογούμενο στην δική μας κοινότητα πως το Πανεπιστήμιο ατύχησε που, με την επικράτηση καταστροφικών πολώσεων και την δια τούτων επιλογή των μετρίων, δεν τον αξιοποίησε στις ανώτατες θέσεις Διοίκησης.

Το Τμήμα μας αναπτυσσόταν διάσπαρτο στα ίδια προκατασκευασμένα και υπέργηρα κτίρια, και με προσωπικές παρεμβάσεις δημιούργησε το έδαφος για τον ερχομό εξαιρετικών συναδέλφων, η δυναμική των οποίων κυριολεκτικά μας απογείωσε τα επόμενα χρόνια. Ίσως με την αμετροέπεια του ευεργετηθέντος, επιτρέψτε μου τώρα να καταθέσω τη συγκίνηση και την ευφορία που εξέπεμψε διαβάζοντας την εξαιρετική έκθεση της Εξωτερικής Αξιολόγησης το 2012. Εκείνο το λαμπύρισμα στα μάτια του ήταν το συνώνυμο της ολβίστης δικαίωσης. Και επειδή ένας απεριόριστα γενναιοόδωρος άνθρωπος σαν τον Παύλο δεν εφείδετο κόπων και ονείρων, διεκδίκησε ισχυρά, έπεισε και κατάφερε εν μέσω επώδυνων στιγμών, ζηλόφθονων αντιρρήσεων,

πολυκέλαδων διαδικασιών και την πάροδο σχεδόν εικοσαετίας την ανέγερση του Νέου Κτιρίου της Φαρμακευτικής. Λίγους μήνες μετά την μετεγκατάσταση του εκεί, έφυγε.

Φεύγοντας άφησε πίσω του, εκτός από την ερεβώδη σιωπή του και το άδειο γραφείο του, σημαντικές παρακαταθήκες. Στην οικογένεια του, στους φίλους του, στους συναδέλφους του, στους μαθητές του, στον κόσμο μας, ο γοητευτικός και χαρισματικός αυτός Άνθρωπος κατέθεσε τα διάφανα διαπιστευτήρια του διεμβολίζοντας ανεξίτηλα τις καρδιές μας.

Είθε το νυκτιφάεξ περί γαίαν αλώμενον αλλότριον φως να τις φωτίζει, να τις παρηγορεί, να τις εμπνέει. Όλοι νοιώθουμε ότι ο Παύλος μας είναι πλέον κομμάτι του. Με την ελπίδα της επόμενης συνάντησής μας, ει και εν ετέρα μορφή...

Σωτηρης Στ. Νικολαροπουλος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος

Τμήματος Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Πανεπιστήμιο Πατρών

Ημερίδες Επιμόρφωσης & Εκπαίδευσης Φαρμακοποιών Φαρμακείου από την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία



1. Φ.Σ. Κορινθίας, 30/03/2014, 2. Φ.Σ. Καστοριάς, 06/04/2014, 3. Φ.Σ. Έβρου, 11/05/2014, 4. Φ.Σ. Τρίκάλων, 17/05/2014, 5. Φ.Σ. Λέσβου, 27/04/2014,

Συνεχίστηκαν με επιτυχία οι Επιμορφωτικές Ημερίδες Φαρμακοποιών που διοργάνωσε η Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία σε συνεργασία με τοπικούς Φαρμακευτικούς Συλλόγους και την υποστήριξη της Εταιρείας Zita Congress. Η πρωτοβουλία αυτή της ΕΦΕ εντάσσεται στα πλαίσια των στόχων της για την υπεύθυνη δια βίου μάθηση των φαρμακοποιών και ιδιαίτερα αυτών που στηρίζουν την πρωτοβάθμια φαρμακευτική περίθαλψη της χώρας μέσω της λειτουργίας φαρμακείων ανοιχτών στο κοινό. Ήδη ολοκληρώθηκε ο Α΄ Κύκλος Επιμορφωτικών Ημερίδων που ξεκίνησε στην Τρίπολη στις 23/2/2014. Ακολούθησαν οι ημερίδες στην

Κομοτηνή στις 9/3/2014, στο Ναύπλιο στις 16/3/2014, στο Βραχάτι στις 30/3/2014, στην Καστοριά στις 6/4/2014, στη Λέσβο στις 27/4/2014, στην Αλεξανδρούπολη στις 11/5/2014, στα Τρίκαλα στις 17/5/2014 και στον Βόλο στις 24/5/2014. Στις ημερίδες συμμετείχαν φαρμακοποιοί που λειτουργούν φαρμακείο ανοιχτό στο κοινό καθώς και άλλοι επαγγελματίες υγείας αλλά και ευρύτερο κοινό. Οι ημερίδες περιελάμβαναν κεντρικές ομιλίες σε επίκαιρα φαρμακευτικά θέματα και φαρμακευτικό φροντιστήριο από καταξιωμένους επιστήμονες καθώς και σύντομες ενημερωτικές ομιλίες από φαρμακευτικές εταιρίες-χορηγούς των εκδηλώσεων.



6. Φ.Σ. Χανίων, 21/09/2014, 7, 8. Φ.Σ. Ιωαννίνων, 05/10/2014, 9. Οργανωτική υποστήριξη Zita Medical Management

Μετά το έντονο ενδιαφέρον που εκδηλώθηκε από τους φαρμακευτικούς συλλόγους ξεκίνησε ο Β΄ Κύκλος των Επιμορφωτικών Ημερίδων και ήδη πραγματοποιήθηκαν δυο Ημερίδες:

- Ημερίδα Χανίων στις 21/9/2014 σε συνδιοργάνωση με τους Φαρμακευτικούς Συλλόγους Χανίων & Ρεθύμνης. Τα θέματα που αναπτύχθηκαν στις κεντρικές ομιλίες ήταν τα εξής:
 - Βιοτεχνολογικά Φάρμακα, από τον Καθηγητή κ. Κ. Δεμέτζο
 - Συμπληρώματα Διατροφής στο Φαρμακείο & ΜΥΣΥΦΑ, από την Καθηγήτρια κ. Ι. Χήνου
- Ημερίδα Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Φαρμακευτικό Σύλλογο Ιωαννίνων και την εξής θεματολογία:
 - Προϊόντα Φυτικής Προέλευσης στο Φαρμακείο – Ασφάλεια στη Χρήση, από την επίκουρη καθηγήτρια κ. Μ. Λάζαρη
 - Οι πιο κοινές Ανεπιθύμητες Ενέργειες και ο Ρόλος του Φαρμακοποιού, από τον φαρμακοποιό κ. Γ. Παπαδόπουλο.

Θα ακολουθήσουν 5 ακόμη ημερίδες Β΄ Κύκλου σύμφωνα με το εξής πρόγραμμα.

- Κυριακή 12/10/2014, Πάτρα, σε συνεργασία με Φ.Σ. Πατρών
- Σάββατο 1/11/2014, Μεσολόγγι, σε συνεργασία με Φ.Σ. Αιτωλοακαρνανίας
- Σάββατο 8/11/2014, Σέρρες, σε συνεργασία με Φ.Σ. Σερρών
- Κυριακή 23/11/2014, Κέρκυρα, σε συνεργασία με Φ.Σ. Κέρκυρας
- Σάββατο 30/11/2014, Θεσσαλονίκη, σε συνεργασία με Φ.Σ. Θεσσαλονίκης
- Κυριακή 14/12/2014, Λάρισα, σε συνεργασία με Φ.Σ. Λάρισας

Για οποιαδήποτε περαιτέρω πληροφορία σχετικά με τη θεματολογία και τον χώρο διεξαγωγής της κάθε Ημερίδας ανά νομό παρακαλούμε επικοινωνήσετε με την κ.Φοίβη Καραουλάνη στο τηλ. 211 1001764 ή ηλεκτρονικά στη διεύθυνση f.karaoulani@zitamanagement.com.

Η Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία ευχαριστεί θερμά τις εταιρείες, οι οποίες μέσω της ενεργούς παρουσίας και συμμετοχής τους στις Επιμορφωτικές Ημερίδες της ΕΦΕ συμβάλλουν στην προώθηση της Επιστημονικής Γνώσης

ΧΡΥΣΟΙ ΧΟΡΗΓΟΙ



ΑΡΓΥΡΟΙ ΧΟΡΗΓΟΙ



ΧΟΡΗΓΟΙ



ΧΟΡΗΓΟΙ



Pharmaceutical Laboratories S.A.



ΒΟΤΑΝΑ / ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ / ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ / ΕΡΕΥΝΑ

KORRES



Ο ειδικός στη φυτοθεραπεία

l'Entreprise de l'Année 2013



ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΗΣ



ΧΟΡΗΓΟΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ





Symbicort®
budesonide/formoterol

Ποιοτική & Ποσοτική Σύνθεση

Symbicort® Turbuhaler® 160 µg/4,5 µg/εισπνοή, κόνις για εισπνοή.

Κάθε εισπνεόμενη δόση (δηλαδή η δόση που απελευθερώνεται από το επιστόμιο της συσκευής) **περιέχει:**

βουδεσονίδη 160 μικρογραμμάρια/εισπνοή και διυδρική φουμαρική φορμοτερόλη 4,5 μικρογραμμάρια/εισπνοή.

Κάθε μετρούμενη δόση περιέχει: βουδεσονίδη 200 μικρογραμμάρια/εισπνοή και διυδρική φουμαρική φορμοτερόλη 6 μικρογραμμάρια/εισπνοή.

Έκδοχα: Λακτόζη μονοϋδρική 730 μικρογραμμάρια ανά δόση.

Symbicort® Turbuhaler® 320 µg/9µg /εισπνοή, κόνις για εισπνοή.

Κάθε εισπνεόμενη δόση (δηλαδή η δόση που απελευθερώνεται από το επιστόμιο της συσκευής) **περιέχει:**

βουδεσονίδη 320 μικρογραμμάρια/εισπνοή και διυδρική φουμαρική φορμοτερόλη 9 μικρογραμμάρια/εισπνοή.

Κάθε μετρούμενη δόση περιέχει: βουδεσονίδη 400 μικρογραμμάρια/εισπνοή και διυδρική φουμαρική φορμοτερόλη 12 μικρογραμμάρια/εισπνοή.

Έκδοχα: Λακτόζη μονοϋδρική 491 μικρογραμμάρια ανά δόση.

Για περισσότερες πληροφορίες, παρακαλούμε να απευθυνθείτε στην εταιρεία AstraZeneca

AstraZeneca 

Θεοτοκοπούλου 4 & Αστροναυτών, 151 25 Μαρούσι, Τηλ.: 210 68 71 500, Fax: 210 68 59 195,
Τηλ. Παραγγελιών: 210 55 96 970-2, Fax: 210 55 96 973, www.astrazeneca.gr

Symbicort®
budesonide/formoterol

HM/AHE 03.15

SYM00129/1/0313

JUST

Welcome ΔΥ

ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΥΓΕΙΑ ΟΜΟΡΦΙΑ

Έρχεται για να αλλάξει τη ζωή μας!

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΟ
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ
& ΕΝΤΥΠΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ

1ο τεύχος
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2015

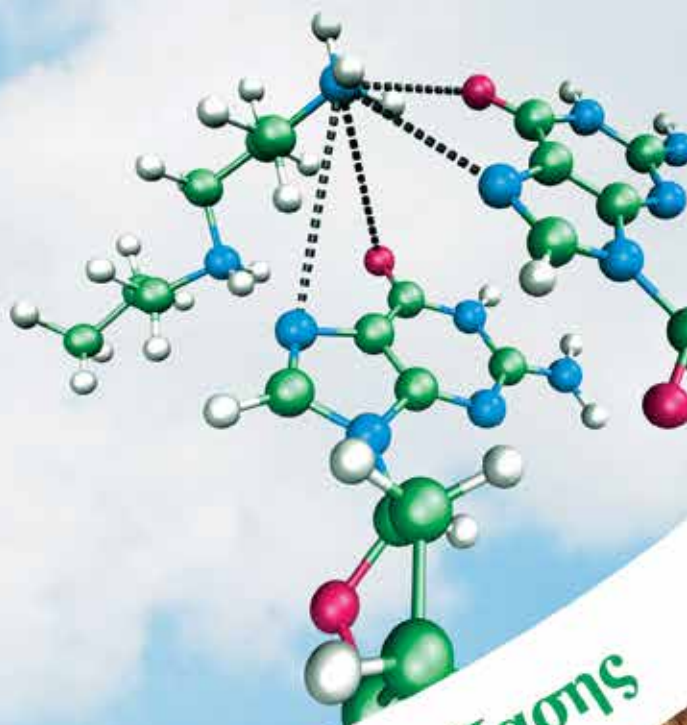
Με την επιστημονική υποστήριξη
των εταιρειών:

- Αθλητιατρική Ελλάδος
- Άνοιας
- Ακαδημία Αντιγήρανσης
- Διαβήτη, Μεταβολικού
Συνδρόμου και Παχυσαρκίας
- Ελληνικής Διατροφολογικής
- Ιατρικής Γενετικής
- Ελληνικής Μαιευτικής και Γυναικολογικής
- Ελληνικής Ουρολογικής
- Ελληνικής Φαρμακευτικής





Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ύψης



Galenica a.e.

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