

ȘCOALA DOCTORALĂ



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul analitic și al interacțiunilor benzodiazepinelor cu metadona

Doctorand **Cătălina Bogdan**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Felicia Loghin**

Cluj Napoca, 2013

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	13
1. Considerații generale	15
2. Studiul analitic al metadonei și al benzodiazepinelor	18
2.1. Metode analitice utilizate în dozarea benzodiazepinelor	18
2.2. Metode analitice utilizate în dozarea flunitrazepamului	19
2.2. Metode analitice utilizate în dozarea metadonei și a flunitrazepamului	29
3. Studiul interacțiunilor între flunitrazepam și metadonă	32
3.1. Studiul interacțiunilor farmacocinetice între flunitrazepam și metadonă	32
3.2. Studiul interacțiunilor farmacodinamice între flunitrazepam și metadonă	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	39
1. Ipoteza de lucru/ Obiective	41
2. Metodologie generală	41
3. Evaluarea prevalenței dependenței de benzodiazepine pe un eșantion de pacienți din farmaciile comunitare	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru	43
3.3. Materiale și metode	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	51
3.6. Concluzii	53
4. Studiul analitic al flunitrazepamului	54

4.1. Elaborarea metodei de dozare a flunitrazepamului și 7 amino-flunitrazepamului din plasmă	54
4.2. Optimizarea izolării flunitrazepamului și a 7-amino-flunitrazepamului din plasma umană	69
5. Studiul analitic al flunitrazepamului și al metadonei	80
5.1. Introducere	80
5.2. Ipoteza de lucru	80
5.3. Materiale și metode	81
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	94
5.6. Concluzii	95
6. Studiul interacțiunilor farmacocinetice între metadonă și flunitrazepam	96
6.1. Introducere	96
6.2. Ipoteza de lucru	96
6.3. Materiale și metode	97
6.4. Rezultate	99
6.5. Discuții	107
6.6. Concluzii	109
7. Mecanismele moleculare ale dependenței: sistemul cerebral de recompensă și medierea dopaminergică	112
7.1. Introducere	112
7.2. Ipoteza de lucru	113
7.3. Materiale și metode	114
7.4. Rezultate	116
7.5. Discuții	120
7.6. Concluzii	121
8. Concluzii generale	124
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	126
REFERINȚE	128

CUVINTE CHEIE: benzodiazepine, flunitrazepam, metadonă, dependență, analiză cromatografică, interacțiuni medicamentoase.

INTRODUCERE

Cercetarea desfășurată pentru realizarea prezentei teze de doctorat abordează un domeniu de actualitate în științele medicale, respectiv utilizarea deturnată de benzodiazepine în timpul tratamentului de substituție cu metadonă. Expunerea concomitentă la metadonă și la benzodiazepine este asociată cu riscuri terapeutice precum sedare severă, afectarea performanțelor motorii și cognitive, depresie respiratorie sau decesul pacientului.

Dintre benzodiazepine, flunitrazepamul reprezintă compusul cel mai frecvent utilizat de heroinomanii aflați în tratament de substituție cu metadonă, obținând cel mai înalt scor de apreciere din partea utilizatorilor, fiind urmat de triazolam, lorazepam și oxazepam. Utilizarea abuzivă a flunitrazepamului de către pacienții aflați în tratament de substituție se datorează efectului euforizant produs de asocierea flunitrazepam- metadonă, acest efect fiind similar cu cel produs de heroină. Mai multe studii evidențiază faptul că metadona poate amplifica efectele unor doze scăzute de flunitrazepam. Aceste aspecte determină riscuri asociate pentru pacienți, precum ingestia unor supradoze sau interacțiuni cu implicații clinice importante.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În partea generală s-a realizat o sinteză a metodelor de analiză existente în literatura de specialitate pentru flunitrazepam și metadonă, punându-se accent pe aplicabilitatea metodelor în scopul vizat de acest studiu. Întrucât tehnicile cromatografice, cu puține excepții, necesită izolarea prealabilă a analitilor, s-a realizat și un studiu bibliografic al metodelor de extracție pentru flunitrazepam și metadonă, urmărindu-se cu predilecție eficiența extracției și rapiditatea metodei de izolare.

Partea generală a cuprins de asemenea un studiu bibliografic asupra interacțiunilor între metadonă și flunitrazepam. Mecanismele farmacologice care stau la baza interacțiunii dintre cei doi compuși sunt puțin cunoscute, iar studiile anterioare evidențiază existența unor posibile interacțiuni farmacocinetice sau farmacodinamice. Justificarea consumului de flunitrazepam în cazul pacienților aflați în tratament de substituție cu metadonă necesită cunoașterea bazelor farmacologice care determină utilizarea deturnată și care pot explica preferința consumatorilor pentru asocierea dintre opioide și sedativ-hipnotice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiectivele generale ale lucrării au fost atinse prin studiile experimentale redate în capitolele părții de *Contribuții personale* a tezei. Partea practică a lucrării este structurată în cinci capitole, fiecare dintre acestea abordând o etapă de cercetare distinctă. Primul capitol evaluează particularitățile consumului și ale gradului de dependență de benzodiazepine, studiu desfășurat pe un eșantion de consumatori de benzodiazepine, în farmaciile comunitare. Al doilea și al treilea capitol al tezei se referă la studiul analitic al flunitrazepamului și al metadonei, în timp ce ultimele două capitole abordează studiul interacțiunilor dintre cei doi compuși. Partea de contribuții personale se încheie cu un capitol de concluzii generale și un capitol dedicat originalității lucrării.

Evaluarea prevalenței dependenței de benzodiazepine pe un eșantion de pacienți din farmaciile comunitare

Obiectivul principal al studiului a fost stabilirea particularităților ce caracterizează consumul de benzodiazepine pe un eșantion de utilizatori de benzodiazepine; al doilea obiectiv al studiului a fost de a stabili o corelație între consumul de benzodiazepine, factorii socio-demografici și gradul de dependență de benzodiazepine cu ajutorul The Benzodiazepine Dependence Questionnaire (BDEPQ). Acest studiu asupra consumului de benzodiazepine și a dependenței asociate este primul de acest fel din România desfășurat în farmaciile comunitare.

Evaluarea utilizării benzodiazepinelor s-a efectuat pe baza unui chestionar complex, care cuprinde detalii socio-demografice, tipul benzodiazepinelor utilizate, durata și frecvența administrării. Cea de-a doua parte a chestionarului este reprezentată de "The Benzodiazepine Dependence Questionnaire" (BDEPQ) – un chestionar de referință, cu 30 de întrebări, menit să evalueze dependența de benzodiazepinele utilizate ca tranchilizante, sedative și hipnotice. Chestionarul a fost înmânat respondenților după eliberarea benzodiazepinelor prescrise, într-una din cele opt farmacii din Cluj-Napoca participante la studiu.

Populația țintă a studiului a fost compusă din pacienți care s-au prezentat cu prescripții medicale pentru una sau mai multe benzodiazepine în una din cele opt farmacii comunitare participante la studiu. Un număr total de 150 de chestionare a fost distribuit prin farmaciile participante la studiu, dintre care au fost returnate 68 de chestionare completate integral. Participarea la studiu a fost anonimă și voluntară. Pacienții care au declarat că se află sub tratament cu una sau mai multe benzodiazepine au fost considerați utilizatori de benzodiazepine. Respondenților li s-a cerut să răspundă la întrebări pe baza consumului de benzodiazepine din ultima lună.

Rezultatele obținute au fost interpretate statistic și au evidențiat că nevoia de consum reprezintă cel mai important aspect al dependenței de benzodiazepine. Principalul factor în utilizarea benzodiazepinelor îl reprezintă percepția pacienților că

nu pot funcționa fără benzodiazepine. Dintre benzodiazepinele utilizate, alprazolamul este cel mai frecvent folosit, iar scopul declarat este tratarea insomniei. De asemenea, s-a înregistrat o prevalență crescută a consumului de benzodiazepine la persoane de sex feminin și la vârstnici.

Studiul desfășurat a evidențiat faptul că, în ciuda precauțiilor, avertismentelor și încercărilor de a limita consumul, există încă un procent însemnat de consumatori de benzodiazepine pe termen lung.

Studiul analitic al flunitrazepamului

Studiul analitic al flunitrazepamului a presupus elaborarea și validarea unei metode de dozare a flunitrazepamului și a 7-aminoflunitrazepamului din plasmă. Etapa de analiză propriu-zisă a fost precedată de o etapă de izolare, care a implicat utilizarea unei metode de extracție. În vederea optimizării extracției s-a comparat eficiența extracției lichid-lichid cu extracția pe fază solidă a flunitrazepamului și a metabolitului acestuia din plasma umană. S-a optat pentru extracția lichid-lichid utilizând ca solvent acetatul de etil, după o prealabilă alcalinizare a probei cu hidroxid de amoniu 10%. Această extracție a garantat absența interferențelor la timpii de retenție ai flunitrazepamului și 7-aminoflunitrazepamului și a conferit un randament de extracție mare, care a permis cuantificarea analiților.

Analiza flunitrazepamului și a metabolitului acestuia, 7-aminoflunitrazepam, din plasma umană a presupus utilizarea unei metode UPLC cu detecție UV. Detecția UV s-a efectuat la 2 lungimi de undă - 242 nm pentru 7-aminoflunitrazepam și 314 nm pentru flunitrazepam. Timpii de retenție corespunzători 7-aminoflunitrazepamului, flunitrazepamului și standardului intern în condițiile cromatografice date au fost 2,3 și respectiv 3,3 și 3,5, iar durata unei analize a fost de 6 minute. Pentru flunitrazepam, limita de cuantificare a fost determinată ca fiind 5,02 ng/mL, iar pentru 7-aminoflunitrazepam 5,17 ng/mL.

Metoda a fost validată în conformitate cu ghidul de validare a metodelor bioanalitice. Metoda elaborată a fost aplicată cu succes pentru analiza flunitrazepamului și a 7-aminoflunitrazepamului din probe reale. Rezultatele obținute au dovedit că metoda descrisă poate fi aplicată în practica clinică în vederea analizei flunitrazepamului și 7-aminoflunitrazepamului din probe biologice reale.

Studiul analitic al flunitrazepamului și al metadonei

Scopul acestui studiu a fost de a elabora o metodă LC-MS/MS rapidă, sensibilă și selectivă pentru analiza concomitentă a flunitrazepamului, 7-aminoflunitrazepamului, metadonei și EDDP (etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidina) din plasmă umană, de șobolan și de iepure.

Limita inferioară de cuantificare a fost aproximativ 0,5 ng/mL plasmă în cazul fiecărui analit, iar durata analizei a fost de 3 minute. Metoda elaborată a fost aplicată în analiza unor probe reale în cadrul studiului interacțiunilor farmacocinetice.

Metoda a fost validată în conformitate cu ghidul de validare a metodelor bioanalitice, fiind testați parametrii principali ai validării pentru a asigura acuratețea, precizia, specificitatea, reproductibilitatea și robustețea metodei pentru intervalul de concentrație în care pot fi studiați analiții.

Studiul interacțiunilor farmacocinetice între metadonă și flunitrazepam

Studiul interacțiunilor farmacocinetice între flunitrazepam și metadonă și-a propus evidențierea unor eventuale interacțiuni la nivel farmacocinetic între flunitrazepam și metadonă. Metodologia s-a bazat pe analiza farmacocinetică noncompartimentală având scopul de a estima parametrii farmacocinetici după administrarea medicamentelor în doză unică sau în asociere.

Rezultatele preliminare au confirmat existența unei interacțiuni farmacocinetice la nivel metabolic, care se explică prin competiția între cele două substanțe pentru izoenzimele CYP3A4 și CYP2B6, ce conduce la creșterea semnificativă a concentrației maxime a flunitrazepamului precum și a AUC_{total} , în timp ce volumul de distribuție în stare staționară și timpul mediu de rezidență sunt crescute pentru metadonă.

Mecanismele moleculare ale dependenței: sistemul cerebral de recompensă și medierea dopaminergică

Obiectivul propus în acest capitol a constat în studiul modificărilor concentrației de dopamină în anumite zone cerebrale precum striatul, după administrarea concomitentă de metadonă și flunitrazepam la șobolani. Dopamina a fost solubilizată din matricea biologică în acid formic 10mM și cuantificată printr-o metodă UPLC utilizând o coloană HSS T3 și detecție prin spectrometrie de masă cu sursa de ionizare ESI operată în modul de ionizare pozitiv. Metoda a fost liniară pe domeniul de concentrație testat și ulterior a fost aplicată pentru analiza unor probe reale.

Studiul desfășurat a evidențiat faptul că administrarea subacută de flunitrazepam și metadonă la șobolani induce modificări semnificative ale nivelului de dopamină din striat după administrarea de metadonă, printr-un mecanism comun tuturor substanțelor cu potențial de dependență, care vizează sistemul dopaminergic mezolimbic. Evidențierea unor concentrații crescute de neurotransmițători în cazul asocierii celor două substanțe relevă existența unor neuroadaptări precum plasticitatea sinaptică. Această adaptare stă la baza comportamentului adictiv și explică preferința utilizatorilor pentru asocierea metadonă-flunitrazepam și prevalența crescută a consumului asociat.

CONCLUZII GENERALE

Concluziile ce derivă din întreaga activitate de cercetare doctorală demonstrează că dezideratul tezei de doctorat a fost atins prin realizarea mai multor obiective specifice.

Studiul analitic al benzodiazepinelor și al metadonei a presupus elaborarea și validarea unor metode cromatografice utile în analiza flunitrazepamului și a metadonei. Combinarea capacității de separare a cromatografiei de lichide, care a permis obținerea de compuși puri și care au fost ulterior introduși în spectrometrul de masă, și a capacității de identificare a spectrometriei de masă a crescut selectivitatea și specificitatea determinărilor și în plus, cuplajul UPLC-MS/MS a permis analiza simultană a mai multor compuși cu o acuratețe crescută, micșorând timpul de analiză. Metodele elaborate s-au dovedit exacte pe un interval extins de concentrații și pot fi utilizate atât în analize toxicologice (abuz de substanțe, agresiuni sexuale), când sunt determinate concentrații crescute, dar și studii farmacocinetice, când concentrațiile determinate sunt foarte scăzute.

Cercetările întreprinse evidențiază existența unei interacțiuni la nivel farmacodinamic între flunitrazepam și metadonă. Interacțiunea farmacodinamică este agravată de interacțiunea farmacocinetică care conduce la creșterea nivelelor de flunitrazepam și la instalarea mai rapidă a modificărilor care sunt asociate cu dependența.

Evidențierea acestei interacțiuni impune precauții la prescrierea flunitrazepamului la pacienții aflați în tratament de substituție cu metadonă. În această situație se recomandă doze mai mici decât cele uzuale și monitorizarea concentrațiilor plasmatiche ale flunitrazepamului și ale metabolitului. În cazul utilizării deturnate, în scop recreațional, de flunitrazepam în timpul tratamentului de substituție cu metadonă, asocierea flunitrazepam-metadonă poate crește riscul de morbiditate și mortalitate.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI

Contribuțiile inovatoare ale tezei sunt evidențiate prin rezultatele obținute în cadrul cercetărilor experimentale. Studiului care s-a efectuat pentru stabilirea particularităților ce caracterizează consumul de benzodiazepine și dependența asociată, pe un eșantion de utilizatori de benzodiazepine este primul de acest fel din România desfășurat în farmaciile comunitare. De asemenea, utilizarea unui chestionar de referință, The Benzodiazepine Dependence Questionnaire (BDEPQ), pentru evaluarea dependenței la nivelul pacienților din farmaciile de circuit deschis, reprezintă o noutate în domeniu.

Metodele cromatografice prezentate în cadrul cercetărilor doctorale sunt originale și permit detecția analiților într-un domeniu larg de concentrații. Sensibilitatea ridicată a metodelor elaborate este utilă în analize de toxicologie

medico-legală sau în cazul unor studii farmacocinetice sau de bioechivalență când concentrațiile detectate sunt foarte scăzute. Întrucât metodele elaborate permit cuantificarea inclusiv a metaboliților, acestea își pot dovedi utilitatea în analize medico-legale, când prelevarea probelor se face la un interval mare după ingestie, intervenind astfel metabolizarea extensivă a compusului părinte la metaboliți activi.

Un alt aspect inovator al tezei este reprezentat de evidențierea unei interacțiuni la nivel farmacocinetic între flunitrazepam și metadonă, fapt semnalat pentru prima dată în literatură. Lucrarea de față reprezintă primul studiu referitor la modificările de la nivelul sistemului dopaminergic, care pot explica activarea sistemului de recompensă și instalarea mai rapidă a dependenței. Existența unei interacțiuni la nivel farmacodinamic este pentru prima dată semnalată în literatura de specialitate privind cercetările din acest domeniu.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ¹ Compton WM, Volkow ND. Abuse of prescription drugs and the risk of addiction. *Drug and Alcohol Dependence*. 2006; 83(1):S4-S7.
- ⁴ Laqueillea X, Launayb C, Dervauxa A, Kanita M. Abuse of alcohol and benzodiazepine during substitution therapy in heroin addicts: A review of the literature. *Encephale*. 2009; 35(3): 220-225.
- ¹⁶ Borron SW, Monier C, RiseÁde P, Baud FJ. Flunitrazepam variably alters morphine, buprenorphine, and methadone lethality in the rat. *Human & Experimental Toxicology*. 2002; 21: 599 – 605.
- ²⁴ Farré M, Terán MT, Roset PN, Mas M, Torrens M, Camí J. Abuse liability of flunitrazepam among methadone-maintained patients. *Psychopharmacology*. 1998; 140:486-495.
- ³⁴ Ferrari A, Coccia CPR, Bertolini A, Sternieri E. Methadone—metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacological Research*. 2004; 6:551-559.
- ⁶⁵ Gunn J, Kriger S, Terrell AR. Simultaneous Determination and Quantification of 12 Benzodiazepines in Serum or Whole Blood Using UPLC/MS/MS, Clinical Applications of Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2010; 603:107-119.
- ⁸¹ Sauve EN, Langødegård M, Ekeberg D, Øiestad AM. Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Feb 1; 883-884:177-188.
- ¹²⁷ Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1:3-8.
- ¹³⁰ Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13; 108(37):15037-15042.
- ¹⁵⁵ Tan KR, Rudolph U, Lüscher C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci*. 2011 Apr; 34(4):188-197.
- ¹⁵⁷ Tan KR, Brown M, Labouèbe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, et al. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*. 2010 Feb 11; 463(7282):769-774.
- ¹⁷³ Kan CC, Van der Ven AHGS, Breteler MHM, Zitman FG. Latent Trait Standardization of the Benzodiazepine Dependence Self-Report Questionnaire using the Rasch Scaling Model. *Compr Psychiatry*. 2001; 42(5):424-432.
- ²¹⁵ Lawford BR, Young RMD, Noble EP, Sargent J, Rowell J, Shadforth S. The D2 Dopamine Receptor A1 Allele and Opioid Dependence: Association With Heroin Use and Response to Methadone Treatment. *Am J Med Genet*. 2000; 96:592-598.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Analytical and drug interaction studies regarding benzodiazepines and methadone

PhD Student: **Cătălina Bogdan**

PhD Scientific Coordinator: Prof. Dr. **Felicia Loghin**

SUMMARY

INTRODUCTION	11
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	13
1. General considerations	15
2. Analytical study of methadone and benzodiazepines	18
2.1. Analytical methods for benzodiazepines quantification	18
2.2. Analytical methods for flunitrazepam quantification	19
2.2. Analytical methods for methadone and flunitrazepam quantification	29
3. Interactions between flunitrazepam and methadone	32
3.1. Study of pharmacokinetic interactions between flunitrazepam and methadone	32
3.2. Study of pharmacodynamic interactions between flunitrazepam and methadone	34
PERSONAL CONTRIBUTION	39
1. Working hypothesis/ Objectives	41
2. Methodology	41
3. Assessment of the particularities of the benzodiazepine consumption in a sample of drug users taking benzodiazepines	43
3.1. Introduction	43
3.2. Working hypothesis	43
3.3. Materials and methods	44
3.4. Results	46
3.5. Discussion	51
3.6. Conclusions	53
4. Analytical study of flunitrazepam	54
4.1. Development of an isolation method of flunitrazepam and its main	

metabolite 7-aminoflunitrazepam from human plasma	54
4.2. Optimization of the isolation method of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam from human plasma	69
5. Analytical study of flunitrazepam and methadone	80
5.1. Introduction	80
5.2. Working hypothesis	80
5.3. Materials and methods	81
5.4. Results	86
5.5 Discussion	94
5. 6. Conclusions	95
6. Study of pharmacokinetic interactions between flunitrazepam and methadone	96
6.1. Introduction	96
6.2. Working hypothesis	96
6.3. Materials and methods	97
6.4. Results	99
6.5. Discussion	107
6.6. Conclusions	109
7. Molecular mechanisms of dependence: cerebral reward system and dopaminergic mediation	112
7.1. Introduction	112
7.2. Working hypothesis	113
7.3. Materials and methods	114
7.4. Results	116
7.5. Discussion	120
7.6. Conclusions	121
8. Overall conclusions of the Thesis	124
9. Originality and innovative input of the Thesis	126
REFERENCES	128

KEYWORDS: benzodiazepines, flunitrazepam, methadone, dependence, chromatographic analysis, drug interactions.

INTRODUCTION

The main aim of the experimental research was to assess the usage and dependence of benzodiazepines in patients under methadone substitution treatment, a new and important research subject in biomedical sciences. Concomitant exposure to methadone and benzodiazepines is associated with risks such as severe sedation, impaired motor and cognitive performance, respiratory depression or death of the patient.

Between benzodiazepines, flunitrazepam is the main drug used by heroin dependent patients under methadone substitution treatment, scoring the highest points of appreciation by users, followed by triazolam, lorazepam and oxazepam. Abusive administration of flunitrazepam by patients under substitution treatment is due to the euphoric effect caused by flunitrazepam-methadone association, similar with heroin effect. A number of studies show that methadone can boost the effects of low doses of flunitrazepam. This implies associated risks for patients, like ingestion of overdoses or interactions with important clinical implications.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

In the first part of the study, a synthesis of the main analytical methods for flunitrazepam and methadone described in the scientific literature was done, including an evaluation of the method's applicability for the current research. As chromatographic techniques, with few exceptions, need a preliminary isolation of the analytes, a literature study for extraction methods of flunitrazepam and methadone, with focus on extraction efficiency and isolation time was also carried out.

The general part also includes a literature study of interactions between flunitrazepam and methadone. The pharmacological mechanisms at the base of interactions between the two substances are little known and previous studies show that there is the possibility of pharmacological or pharmacokinetic interactions. In order to justify the flunitrazepam usage by patients under methadone substitution treatment, it is important to know the pharmacological basis of the administration, which could also explain the preference of consumers for the association between opioids and sedative-hypnotics.

PERSONAL CONTRIBUTION

The main objectives of the thesis were achieved by experimental studies presented in the *Personal Contributions* section. The experimental part of the study consists of five chapters, each one addressing a distinctive step of research. The first chapter includes the assessment of consumption specificity and benzodiazepine dependence, study conducted on a group of drug users taking benzodiazepines. The second and the third chapters refer to the analytical study of flunitrazepam and

methadone, while the last two chapters are focused on the study of the interactions between the two compounds. The last chapters are represented by the overall conclusions of the thesis and a statement of the originality of the studies.

Assessment of the particularities of the benzodiazepine consumption in a sample drug users taking benzodiazepines

The first objective of this study was to assess the particularities of the benzodiazepines consumption in a sample of Romanian drug users consuming BDZs; the second objective was to set a correlation between the use of the BDZs, the sociodemographic factors and the level of dependency on BDZs quantified through The Benzodiazepine Dependence Questionnaire (BDEPQ). To our knowledge, this is the first reported study in Romania developed through community pharmacies, on benzodiazepine use and dependency associated with this use.

A questionnaire was compiled, which sought information on socio-demographic details, the type of the BDZ used, the frequency and the duration of use. The second part of the questionnaire was represented by The Benzodiazepine Dependence Questionnaire (BDEPQ) - a 30-item self report questionnaire for measuring dependence on BDZ tranquilizers, sedatives and hypnotics. The respondents received the questionnaire while they presented a prescription for one or more BDZs in one of eight community pharmacies in Cluj participating in the study.

The target population was composed by patients who came with a prescription for one or more BDZs in one of eight community pharmacies in Cluj included in the study. A total of 150 questionnaires were distributed throughout participating pharmacies and 68 questionnaires completely filled were returned. The participation in the study was anonymous and voluntarily. The respondents were asked to respond to questions thinking about their experience on BDZs usage in the last month.

The results were subjected to appropriate statistical tests and showed that the most important aspect of dependence is given by perceived need in patients. The main factor of the BDZ use is the belief of the patients that they cannot function without BDZs. Alprazolam is the most frequently used BDZ and the declared purpose of the use is the management of insomnia. The frequency of benzodiazepine usage was higher among elderly and women.

The results showed that, despite precautions, warnings and attempts to limit use, there still remain a high percentage of long-term BDZ users, especially in the elderly population.

Analytical study of flunitrazepam

The analytical study of flunitrazepam implied the development and validation of a method for the analysis of FNZ and its major metabolite, 7-aminoflunitrazepam in human plasma. The quantitative analysis was preceded by an isolation step which required the use of an extraction method. In order to optimize the extraction, the efficiency of liquid-liquid extraction was compared with the solid phase extraction of flunitrazepam and its metabolite from human plasma. Liquid-liquid extraction was chosen, using as solvent ethyl acetate, after a preliminary alkalization of the sample with ammonia hydroxide 10%. This method guaranteed no interferences at the retention time for flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam and high extraction efficiency which allowed the quantification of analytes.

In order to quantify flunitrazepam and its major metabolite, we applied an UPLC-UV method. The UV detection was performed at two wavelengths, 242 nm for 7-aminoflunitrazepam and 314 nm for flunitrazepam, respectively. Retention times for 7-aminoflunitrazepam, flunitrazepam and internal standard in the given chromatographical conditions were 2.3 and respectively 3.3 and 3.5 minutes. The time required for analysis was 6 minutes. For flunitrazepam, the determined quantification limit was 5.02 ng/mL and for 7-aminoflunitrazepam it was 5.17 ng/mL.

The method was validated in accordance with the bioanalytical methods validation guide. The developed method was successfully applied for the analysis of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in real samples. The obtained results proved that the described method can be applied in clinical practice for the analysis of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam from real biological samples.

Analytical study of flunitrazepam and methadone

The aim of the study was to was to elaborate a rapid, sensitive and selective LC-MS/MS method for the simultaneous assay of flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, methadone and EDDP (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidone) in human, rat and rabbit plasma.

The lower quantification limit was approximately 0.5 ng/mL plasma in the case of each analyte and the time for analysis was 3 minutes. The elaborated method was applied for the analysis of real samples in the pharmacokinetic interactions study.

The assay was fully validated according to current acceptance criteria for bioanalytical methods validation, being tested the main parameters of validation in order to ensure the accuracy, precision, specificity, reproducibility and robustness for the concentration interval in which the analytes can be studied.

Study of pharmacokinetic interactions between flunitrazepam and methadone

Pharmacokinetic interaction study between flunitrazepam and methadone aimed at highlighting the possible influence of flunitrazepam on methadone's pharmacokinetics and vice-versa. The methodology was based on a noncompartmental pharmacokinetic analysis with the purpose to estimate the pharmacokinetic parameters after the administration of drugs in a single dose - alone, or associated.

Preliminary results showed the existence of some metabolic pharmacokinetic interactions, explained by the competition of both drugs for the isoenzymes CYP3A4 and CYP2B6, which leads to a significant increase in the flunitrazepam's concentration but also in the AUC_{total} , while the distribution volume in stationary phase and mean residence time are high for methadone.

Molecular mechanisms of addiction: the brain reward system and dopaminergic mediation

The objective proposed in this chapter consisted in studying the changes in dopamine concentration in certain areas of the brain such as striatum, after co-administration of methadone and flunitrazepam in rats. The dopamine was solubilized from the biological matrix in 10mM formic acid and quantified by an UPLC method using an HSS T3 column and detection by mass spectrometry with ESI ionization source operated in positive ionization mode. The method was linear for the tested concentration range and was subsequently applied to the analysis of real samples.

The conducted study showed that subacute administration of flunitrazepam and methadone in rats induces significant changes in the levels of dopamine in striatum after the administration of methadone, via a mechanism common to all substances with addictive potential, targeting the mesolimbic dopamine system. Emphasis of increased levels of neurotransmitters in the event of combination of both substances reveals the existence of some neuroadaptations such as synaptic plasticity. This adaptation is underlying the addictive behavior and explains the user preference for associating methadone with flunitrazepam and high prevalence of consumption associated with this combination.

GENERAL CONCLUSIONS

Conclusions derived from the whole doctoral research activity demonstrate that the desideratum of the doctoral thesis has been achieved by attaining several specific objectives.

Analytical study of benzodiazepines and of methadone implied the development and validation of certain chromatographic methods useful in analyzing

flunitrazepam and methadone. Combining the separation ability of liquid chromatography, which allowed obtaining pure compounds which were subsequently introduced into the mass spectrometer, and the identification ability of mass spectrometry, increased the selectivity and specificity of the analysis and in addition, UPLC-MS/MS allowed simultaneous analysis of several compounds with high accuracy, reducing the time of analysis.

The methods developed proved to be accurate on a broad range of concentrations and can be used both in toxicological analysis (substance abuse, sexual assault), when the expected concentrations are high, and pharmacokinetic studies, when expected concentrations are low.

Undertaken research highlights the existence of an interaction at a pharmacodynamic level between flunitrazepam and methadone. The pharmacodynamic interaction is aggravated by the pharmacokinetic interaction which leads to increase the levels of flunitrazepam and speed up the installation of changes that are associated with addiction.

Highlighting this interaction imposes caution upon prescribing flunitrazepam to patients receiving substitution treatment with methadone. In this situation there is highly recommended to administrate lower doses than usual and to monitor the plasma concentrations of flunitrazepam and its metabolite. When administrated for recreational purposes along with methadone substitution treatment, flunitrazepam may increase the risk of morbidity and mortality.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Innovative contributions of the thesis are highlighted by the results obtained in experimental research. The benzodiazepines consumption study is the first reported study in Romania developed through community pharmacies, on benzodiazepine use and dependency associated with this use. Also, using a reference questionnaire, The Benzodiazepine Dependence Questionnaire (BEDPQ), to evaluate patients' dependence in community pharmacies, represents an innovation in the pharmaceutical domain.

Chromatographic methods presented in the doctoral research are original and allow detection of analytes in a wide range of concentrations. High sensibility of the methods developed is useful in forensic toxicology as well as in pharmacokinetic or bioequivalence studies when the assayed concentrations are very low. As the methods developed allow also the quantification of metabolites, they may prove useful in forensic analysis, when the sampling is done sometimes at long intervals after the ingestion, when the results may be dependent on the extensive metabolism of the parent compound to active metabolites.

Another innovative aspect of the thesis is the emphasis of an interaction at a pharmacokinetic level between flunitrazepam and methadone, reported for the first time in the literature. This paper is the first study on the changes in dopaminergic system, which may explain the activation of reward system and a faster installation of

addiction. The existence of an interaction at this pharmacodynamic level is reported for the first time in the literature in this research field.

SELECTED REFERENCES

- ¹ Compton WM, Volkow ND. Abuse of prescription drugs and the risk of addiction. *Drug and Alcohol Dependence*. 2006; 83(1):S4-S7.
- ⁴ Laqueillea X, Launayb C, Dervauxa A, Kanita M. Abuse of alcohol and benzodiazepine during substitution therapy in heroin addicts: A review of the literature. *Encephale*. 2009; 35(3): 220-225.
- ¹⁶ Borron SW, Monier C, RiseÁde P, Baud FJ. Flunitrazepam variably alters morphine, buprenorphine, and methadone lethality in the rat. *Human & Experimental Toxicology*. 2002; 21: 599 – 605.
- ²⁴ Farré M, Terán MT, Roset PN, Mas M, Torrens M, Camí J. Abuse liability of flunitrazepam among methadone-maintained patients. *Psychopharmacology*. 1998; 140:486-495.
- ³⁴ Ferrari A, Coccia CPR, Bertolini A, Sternieri E. Methadone—metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacological Research*. 2004; 6:551–559.
- ⁶⁵ Gunn J, Kriger S, Terrell AR. Simultaneous Determination and Quantification of 12 Benzodiazepines in Serum or Whole Blood Using UPLC/MS/MS, Clinical Applications of Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2010; 603:107-119.
- ⁸¹ Sauve EN, Langødegård M, Ekeberg D, Øiestad AM. Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Feb 1; 883-884:177-188.
- ¹²⁷ Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1:3-8.
- ¹³⁰ Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13; 108(37):15037-15042.
- ¹⁵⁵ Tan KR, Rudolph U, Lüscher C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci*. 2011 Apr; 34(4):188-197.
- ¹⁵⁷ Tan KR, Brown M, Labouèbe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, et al. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*. 2010 Feb 11; 463(7282):769-774.
- ¹⁷³ Kan CC, Van der Ven AHGS, Breteler MHM, Zitman FG. Latent Trait Standardization of the Benzodiazepine Dependence Self-Report Questionnaire using the Rasch Scaling Model. *Compr Psychiatry*. 2001; 42(5):424-432.
- ²¹⁵ Lawford BR, Young RMD, Noble EP, Sargent J, Rowell J, Shadforth S. The D2 Dopamine Receptor A1 Allele and Opioid Dependence: Association With Heroin Use and Response to Methadone Treatment. *Am J Med Genet*. 2000; 96:592–598.