

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAELA VAUPOTIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAELA VAUPOTIČ

**ANALIZA FARMAKOKINETIKE CISPLATINA IN KARBOPLATINA PRI
BOLNIKI S PLJUČNIM RAKOM**

PHARMACOKINETIC ANALYSIS OF CISPLATIN AND CARBOPLATIN IN PATIENTS
WITH LUNG CANCER

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja in somentorstvom prof. dr. Tanje Čufer. Meritve smo izvedli na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Na tem mestu bi se rada zahvalila mentorju, izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju, ki me je odlično vodil skozi celoten proces izdelave magistrske naloge. Hvala za ves čas, ki ste mi ga posvetili, ter vse vaše napotke in nasvete.

Najlepše se zahvaljujem tudi prof. dr. Tanji Čufer, izr. prof. dr. Tomažu Vovku, asist. dr. Gregorju Maroltu ter strokovni sodelavki Nevenki Lilik.

Iskrena hvala tudi staršem, Matiji in vsem prijateljem, ki so me podpirali in mi stali ob strani v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja in somentorstvom prof. dr. Tanje Čufer.

Mihaela Vaupotič

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 PLJUČNI RAK	1
1.2 CISPLATIN IN KARBOPLATIN.....	2
1.2.1 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	5
1.2.2 ODMERJANJE CISPLATINA	7
1.2.3 ODMERJANJE KARBOPLATINA	8
1.3 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJE UČINKOVINE	9
1.4 FARMAKOKINETIČNI MODELI.....	11
1.5 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA	12
1.5.1 METODA NELINEARNEGA MODELIRANJA MEŠANIH UČINKOV	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL	17
3.1.2 STANDARDI	17
3.1.3 REAGENTI IN TOPILA.....	17
3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE	17
3.2 POSTOPKI IN METODE	18
3.2.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN	19
3.2.2 VALIDACIJA	22
3.2.2.1 LINEARNOST	22
3.2.2.2 NATANČNOST	22
3.2.2.3 TOČNOST	23
3.2.3 PRIPRAVA BIOLOŠKIH VZORCEV	23
3.2.4 ANALIZA PLAZEMSKIH VZORCEV	24
3.2.5 PRIMERJAVA MASNE SPEKTROMETRIJE Z INDUKTIVNO SKLOPLJENO PLAZMO (ICP-MS) IN ELEKTROTERMIČNE ATOMSKE ABSORPCIJSKE SPEKTROSKOPIJE (ETAAS).....	27

3.2.6	LITERATURNI PREGLED ANALIZ POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE CISPLATINA IN KARBOPLATINA	28
3.2.7	ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE	30
4	REZULTATI	32
4.1	PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE.....	32
4.2	KONCENTRACIJE PLATINE V PLAZMI BOLNIKOV	34
4.3	ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE	34
4.3.1	FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA CISPLATIN.....	36
4.3.2	FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA KARBOPLATIN	42
5	RAZPRAVA.....	49
6	SKLEPI.....	54
7	VIRI.....	55
	PRILOGA 1: Podatki o aplikaciji, vzorčenju in meritvah koncentracije platine	63
	PRILOGA 2: Rezultati analize populacijske farmakokinetike cisplatina	68
	PRILOGA 3: Rezultati analize populacijske farmakokinetike karboplatina.....	70

POVZETEK

Cisplatin in karboplatin sta pogosti antineoplastični zdravilni učinkovini v kemoterapiji različnih vrst raka. Citotoksična zdravila imajo pogosto veliko interindividualno farmakokinetično variabilnost. Zaradi variacij lahko pride do zmanjšane učinka ali toksičnega odziva, kar zahteva prilagoditev odmerka. Pri tem je smiselna uporaba terapevtskega spremljanja koncentracij cisplatina oz. karboplatina za individualizacijo terapije, optimizacijo kliničnega odziva in zmanjšanje pojava neželenih učinkov.

Cilj magistrske naloge je bil določitev izpostavljenosti prostemu cisplatinu in karboplatinu ter raziskava farmakokinetike obeh zdravil pri bolnikih z drobnoceličnim rakom pljuč z metodo nelinearnega modeliranja mešanih učinkov. Vzorce plazme 20 bolnikov smo predhodno pripravili z ultrafiltracijo ter izmerili plazemske koncentracije prostega karboplatina oz. cisplatina z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo. V procesu validacije smo določili linearnost, točnost in ponovljivost metode. Moč podatkov smo povečali z literaturnim pregledom vseh objavljenih raziskav na temo populacijske farmakokinetike prostega cisplatina in karboplatina. Kot predhodno vedenje smo uporabili tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov prostega cisplatina in karboplatina, njihove standardne napake, interindividualne variabilnosti ter vplive sočasnih spremenljivk. Skupaj z našimi podatki smo jih združili v modele s programom NONMEM. Izdelali smo 3 modele za cisplatin in 4 za karboplatin. Z njimi smo ocenili tipične vrednosti osnovnih farmakokinetičnih parametrov, vplive sočasnih spremenljivk, interindividualno variabilnost za očistek in volumen osrednjega prostora ter rezidualno variabilnost. Ustreznost razvitih modelov smo ovrednotili z različnimi grafičnimi prikazi. Primerjali smo izmerjene koncentracije individualne in populacijske napovedi koncentracij učinkovin ter izračunali in primerjali ocene površine pod krivuljo med razvitimi modeli.

Razviti modeli lahko služijo kot podpora v načrtovanju terapije na osnovi individualnih vrednosti farmakokinetičnih parametrov. Pri tem je osnovni cilj postavitve takih režimov odmerjanja, da je terapevtski učinek največji in toksičnost minimalna.

KLJUČNE BESEDE: cisplatin, karboplatin, pljučni rak, populacijska farmakokinetika, površina pod krivuljo

ABSTRACT

Cisplatin and carboplatin are common antineoplastic chemotherapy drugs used to treat different types of cancer. Most chemotherapeutic agents have large interindividual variability. Variations may cause subtherapeutic or toxic adverse effects. For optimal therapeutic effect it is necessary to individualize dosage regimens and maintain blood drug concentration within a targeted range. Therapeutic drug monitoring is a relevant approach in individualizing drug therapy, optimizing clinical outcome and reducing the risk of adverse drug effects.

The main goal of this thesis was to estimate the exposure to unbound cisplatin and carboplatin and investigate their pharmacokinetics in patients with small cell lung cancer, using nonlinear mixed-effects modeling. The plasma samples were first ultrafiltered. Concentrations of free cisplatin and carboplatin were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry. Reference standards were used to determine linearity, accuracy and precision of analytical method. To strengthen our data we included data from previous population pharmacokinetic studies of free cisplatin and carboplatin. Estimates obtained from earlier data included typical pharmacokinetic parameter values, their standard errors, interindividual variabilities and covariates. With combined data, population pharmacokinetic models were developed using NONMEM software. Final models for cisplatin and carboplatin estimates typical pharmacokinetic parameter values, covariate effects, residual variability and interindividual variability in clearance and in central distribution volume. Adequacy of final models was demonstrated by various graphic displays. Finally, we compared predicted and observed unbound platinum plasma concentrations and area under curve values between models.

Developed models can serve as support in design of new dosage regimens based on individual pharmacokinetics parameters. The primary objective is to obtain the maximum therapeutic response with minimal risk of adverse drug reactions.

KEYWORDS: cisplatin, carboplatin, lung cancer, population pharmacokinetics, area under the curve

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC	površina pod krivuljo (<i>ang. area under the curve</i>)
BSA	površina telesa (<i>ang. body surface area</i>)
C	koncentracija učinkovine
CI	interval zaupanja (<i>ang. confidence interval</i>)
CL	očistek
CPS	signali/sekundo (<i>ang. counts per second</i>)
CV	koeficient variacije
D	odmerek
DEL	delovna raztopina
DF	stopinje prostosti
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor
GFAAS	elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (<i>ang. graphite furnace atomic absorption</i>)
GFR	hitrost glomerulne filtracije (<i>ang. glomerular filtration rate</i>)
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (<i>ang. inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ID	zaporedna številka bolnika
IDMS	masna spektrometrija z izotopsko dilucijo
IIV	interindividualna variabilnost
k_a	konstanta hitrosti absorpcije
k_{el}	konstanta hitrosti izločanja
k_{12}	konstanta hitrosti prehajanja iz osrednjega v periferni prostor
k_{21}	konstanta hitrosti prehajanja iz periferne v osrednji prostor
m/z	razmerje masa/naboj
M_{cis}	masa cisplatina
MDRD	enačba za ocenitev hitrosti glomerulne filtracije (<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>)
MDV	manjkajoča odvisna spremenljivka

MS	multistandard
NONMEM	nelinearno modeliranje mešanih učinkov (<i>ang. nonlinear mixed effects modeling</i>)
NSCLC	nedrobnocelični rak pljuč (<i>ang. non-small cell lung cancer</i>)
OFV	vrednost objektivne funkcije
OSN	osnovna raztopina
PD	farmakodinamika
PK	farmakokinetika
PopPK	populacijska farmakokinetika
Q	distribucijski očistek
QC _L	kontrolni vzorec z nizko koncentracijo
QC _M	kontrolni vzorec s srednjo koncentracijo
QC _H	kontrolni vzorec z visoko koncentracijo
RCF	relativna centrifugalna sila
RSD	relativni standardni odklon
RSE	relativna standardna napaka
SCLC	drobnocelični rak pljuč (<i>ang. small cell lung cancer</i>)
Scr	serumski kreatinin
SD	standardni odklon
SE	standardna napaka
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracije učinkovine (<i>ang. therapeutic drug monitoring</i>)
V ₁	volumen osrednjega prostora
V ₂	volumen perifernega prostora
W _a	aditivna napaka
W _p	proporcionalna napaka
ω^2	varianca interindividualne variabilnosti
θ	ocena tipične vrednosti farmakokinetičnega parametra v populaciji

1 UVOD

1.1 PLJUČNI RAK

Med leti 2007 in 2011 je v Sloveniji za pljučnim rakom v povprečju na leto zbolelo 868 moških in 358 žensk, kar obolenje uvršča na 4. mesto po pogostosti med vsemi raki pri obeh spolih (1). Največ obolelih je starih med 65 in 75 let (2). Za večino bolnikov je prognoza neugodna. Vzrok se skriva v že prisotnih oddaljenih metastazah, ki jih ima ob odkritju bolezni skoraj polovica pacientov. Novejši podatki kažejo, da se petletno preživetje bolnikov s pljučnim rakom, četudi sodi med najmanjše, vseeno postopno povečuje (12,3 % pri moških in 18,8 % pri ženskah za obolele v obdobju 2004–2008) (3). Povečano preživetje je v veliki meri posledica razmaha tarčnega zdravljenja pri nedrobnoceličnem raku pljuč. Kot učinkovita so se izkazala tarčna zdravila, ki delujejo na receptor za epidermalni rastni faktor (EGFR). Pri bolnikih s potrjenimi aktivirajočimi mutacijami EGFR je pričakovana velika korist zdravljenja s proti EGFR usmerjenimi zaviralci tirozinskih kinaz (84). Možnost za boljše preživetje je tudi v izboljšani diagnostiki, ki bi odkrila več tumorjev v zgodnjih stadijih. Etiološko je pljučni rak povezan predvsem s kajenjem, kronično obstruktivno pljučno boleznijo in azbestnimi vlakni z latentno dobo tudi do 20 let (4). Ostale škodljive snovi so spojine niklja, kroma, arzena, berilija in nekateri aromatski ogljikovodiki; od fizikalnih vplivov pa ionizirajoči žarki radioaktivnih delcev uranove rude in plina radona, kar ogroža predvsem tiste, ki so jim izpostavljeni poklicno (2). K obolevanju prispeva tudi genetsko nagnjenje (5).

Večina pljučnih rakov je epiteljskega izvora, druge patohistološke vrste so manj pogoste (3). Po patohistološki sliki pljučni rak razdelimo na:

- drobnocelični (SCLC)
- nedrobnocelični (NSCLC)
 - žlezni
 - ploščatocelični
 - drugi, redkejši tipi (velikocelični, adenoskvamozni, sarkomatoidni, nevroendokrini raki) (83).

SCLC je imenovan po velikosti rakastih celic, videnih pod mikroskopom. Znan je po hitri rasti z zelo zgodnjimi zasevki po telesu (2, 6). Ker se SCLC in NSCLC obnašata zelo različno, je različno tudi zdravljenje. Poleg histološkega tipa tumorja je pri odločanju o zdravljenju

pomembna njegova razširjenost in sposobnost bolnika za zdravljenje, kar ugotovimo v samem diagnostičnem postopku (2). Poleg mikroskopske slike nas pri odločanju o zdravljenju zanima tudi molekulska podoba pljučnega raka. Nova tarčna zdravila delujejo namreč le na rakaste celice z ustreznimi receptorji (5). Pristop v standardni klinični praksi zadeva zaenkrat le nedrobnocelični rak pljuč, pri drobnoceličnem trenutno nimamo ne bioloških označevalcev ne tarčnih zdravil (84, 85). Na podlagi zbranih podatkov predlagamo tisti način zdravljenja, ki daje najboljši uspeh ob najmanjšem tveganju za zaplete in najmanj prizadene kakovost bolnikovega življenja. Dolgoročni uspeh zdravljenja se ocenjuje s petletnim preživetjem, kratkoročno preživetje pa z mediano preživetja. Preživetje je odvisno predvsem od stadija bolezni, učinkovitosti zdravljenja in telesne zmogljivosti bolnika pred zdravljenjem (2). Pred, med in po uvedbi kemoterapije je treba oceniti naslednje parametre oziroma funkcije organov: delovanje ledvic, delovanje jeter, hematopoetske funkcije (število rdečih in belih krvnih celic ter trombocitov) in vsebnost elektrolitov v serumu (7). V primeru nepojasnjenih citopenij ali patološke diferencialne krvne slike je za varno vodenje citostatske terapije treba izvesti biopsijo kostnega mozga (8).

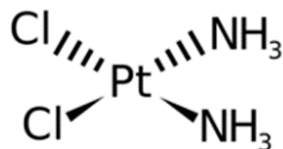
Pri večini bolnikov s pljučnim rakom sočasno ali pa v različnih stadijih bolezni uporabimo več pristopov zdravljenja; prepletajo se zdravljenje z obsevanjem, s kirurgijo, s citostatiki, z novimi tarčnimi zdravili in v zadnjem času tudi z imunoterapijo. Temu moramo dodati še simptomatsko in podporno zdravljenje, ki je usmerjeno k izboljšanju bolnikove splošne kondicije in k lažšanju težav, ki jih povzroča sama bolezen (5). Primarna metoda izbora pri zdravljenju SCLC je kemoterapija, podporno pa obsevanje in/ali operacija. S kombinacijo dveh ali treh citostatikov je delež odgovorov večji kot pri monoterapiji z vsakim izmed njih. Sestava kemoterapije se spreminja v skladu s ponudbo učinkovitejših in manj toksičnih citostatikov (2, 9). V zadnjih letih uporabljamo predvsem kombinacijo zdravil s platino z etopozidom – inhibitorjem encima topoizomeraza II, ki se je v prospektivnih kliničnih raziskavah izkazala za najbolj učinkovito (2, 9, 10).

1.2 CISPLATIN IN KARBOPLATIN

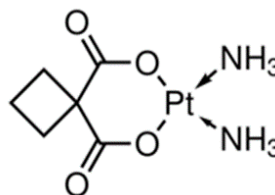
Cisplatin je vse od odkritja njegovih bioloških lastnosti pred 40 leti pogosto uporabljena protitumorska zdravilna učinkovina. Ima širok spekter aktivnosti proti malignim trdnim tumorjem, vključujoč rak glave in vratu, mehurja, jajčnikov, zarodnih celic, endometrija,

materničnega vratu ter pljuč (11). Resni neželeni učinki, še posebej nefrotoksičnost, so vodili v nadaljnje raziskovanje zdravilnih učinkovin s platino ter razvoja karboplatina, ki ima enako učinkovitost kot cisplatin, ampak bolj sprejemljiv profil neželenih učinkov (12).

Spojina 1: Cisplatin



Spojina 2: Karboplatin



Slika 1: Kemični strukturi cisplatina in karboplatina (13, 14).

Cisplatin je anorganska spojina, ki vsebuje težko kovino platino ter dva kloridna in dva amonijeva liganda v cis konfiguraciji (Slika 1) (15). Karboplatin spada v drugo generacijo zdravil s platino. Njegova struktura temelji na cisplatinu, le da so kloridni ligandi zamenjani z bidentatnim ligandom (Slika 1) (16). Primerjava osnovnih lastnosti cisplatina in karboplatina je podana v Preglednici I.

Preglednica I: Primerjava osnovnih lastnosti cisplatina in karboplatina (7, 11, 17, 18, 19, 20, 21).

	Cisplatin	Karboplatin
Kemijsko ime	cis-diamin-dikloro-platina	cis-diamin-(1,1-ciklobutandikarboxilat)-platina (II)
Molekulska formula	PtCl ₂ H ₆ N ₂	PtC ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄
Molekulska masa	300.05104 g/mol	371.25448 g/mol
Metabolizem	inaktivacija s sulfhidrilno skupino	minimalni jetrni metabolizem
Vezava na plazemske proteine (4h)	90 %	24 %
Izločanje	urin : žolč 9 : 1	urin
Toksičnost (vrstni red po resnosti)	ledvična, gastrointestinalna, nevrološka	mielosupresija

Najpomembnejši mehanizem delovanja cisplatina je vezava na jedro DNA in posledično poseg v normalno prepisovanje in/ali podvojevanje DNA. Ima imunosupresivne, radiosenzitivne in protibakterijske lastnosti, v manjši meri zavira tudi sintezo beljakovin in RNA. K protitumorski aktivnosti cisplatina pripomorejo še drugi mehanizmi, kot je npr. povečanje imunogenosti

tumorja (7, 22). Citotoksični način delovanja je posledica kovalentnih interakcij z DNA ter tvorbe DNA aduktov, zlasti prečnih povezav dveh nukleotidnih baz znotraj ene verige (*ang. intrastrand cross-links*), kar sproži kaskado signalizacijskih prenosnih poti ter končno aktivacijo p53-odvisne in p53-neodvisne apoptoze (23, 24). Preden se lahko veže na DNA, se mora nevtralni cisplatin aktivirati s serijo spontanih hidratacij, pri čemer kloridne skupine zamenja voda. Tako nastane zelo reaktivna spojina, ki reagira prednostno s položajem N-7 purinskih baz. Nastanejo različni tipi DNA lezij: prečne povezave ene verige (96 %), prečne povezave znotraj ene vijačnice (1 %), monoadukti (2 %) in prečne povezave DNA – protein (<1 %) (12, 25, 26). Na nastalo mehansko spremenjeno DNA se lahko veže 20 različnih proteinov (*ang. damage recognition protein*). Njihova vloga je pretvorba signala o poškodbi DNA do efektorja. Učinki na celico se kažejo v zaviranju sinteze DNA, supresiji transkripcije RNA, učinkih na celični cikel in prehodom v apoptozo. Treba je upoštevati, da se poleg pro-apoptotskih aktivirajo tudi pro-preživetveni signali; usoda celice je odvisna od relativne intenzitete in trajanja posameznega signala (24). Adukti, ki jih z DNA tvori **karboplatin** so enaki tistim pri cisplatinu. Zaradi manjše reaktivnosti z nukleofilnimi mesti na DNA pa je potrebna višja koncentracija odmerka karboplatina. Hitrost nastajanja aduktov pri karboplatinu je v primerjavi s cisplatinom 10-krat počasnejša (12).

Najpogosteje opisani neželeni učinki cisplatina so hematološki (levkopenija, trombocitopenija in anemija), prebavni (neješčnost, slabost, bruhanje in driska), okvara sluha, prizadetost ledvic in povišana telesna temperatura. Neželeni učinki so odvisni od odmerka in so lahko kumulativni (7). Glavni omejujoč dejavnik pri odmerjanju cisplatina je z odmerkom povezana in kumulativna ledvična insuficienca, vključno z najresnejšim zapletom - akutno odpovedjo ledvic (26). Ledvična toksičnost je posledica transporta cisplatina v ledvične epitelijske celice, poškodbe jedrne in mitohondrijske DNA, aktivacije celične smrti in preživetvenih poti ter sprožitev močnega vnetnega odziva (27). Prvič je stanje opaženo drugi teden po odmerjanju in se izraža z dvigom koncentracije sečnine, kreatinina in serumske sečne kisline in/ali v zmanjšanju očistka kreatinina. Stanje postane bolj resno s ponavljajočimi se cikli zdravljenja, pred ponovnim odmerkom pa se mora funkcija ledvic vrniti na normalno raven (26). Izločanje urina 100 mL/h ali več praviloma zmanjša nefrotoksičnost cisplatina (7). Do ledvične toksičnosti lahko pride navkljub agresivni hidraciji. Kot bolj učinkovita preventivna strategija se vse pogosteje omenja oblikovanje t. i. »micelnega« cisplatina, ki se manj izloča skozi

ledvice, dobro pa prodira v tumorske celice (27). Ototoksičnost se kaže z zvonjenjem v ušesih in/ali poslabšanjem sluha v območju visokih frekvenc. Učinki so lahko izrazitejši pri otrocih (7). Mielosupresija se pojavi pri 25–30 % bolnikov. Levkopenija in trombocitopenija sta bolj izraženi pri večjih odmerkih ($>50 \text{ mg/m}^2$). Sočasno se pojavi tudi anemija. Še bolj dovzetni za nefrotoksičnost in periferno nevropatijo so starejši bolniki. Pri teh so tudi nevtropenije, trombocitopenije, levkopenije ter infekcijski zapleti resnejši. Pri bolnikih, ki so prejeli višje odmerke ali z večjo frekvenco odmerjanja od priporočene, so poročali o resnih nevropatijah, ki so lahko ireverzibilne in se izražajo kot parestezije, arefleksija ter izguba propriocepcije in občutek tresenja. Poročali so tudi o izgubi funkcij motorike. Zdravilne učinkovine, ki vsebujejo platino, so mutagene, teratogene in embriotoksične, zato se med zdravljenjem priporoča zaščita pred nosečnostjo. Cisplatin se izloča z materinim mlekom, zato se dojenje odsvetuje (26). Slabost in bruhanje se pojavita pri skoraj vseh bolnikih in sta lahko zelo huda, zato zahtevata ustrezno antiemetično zdravljenje. Tako kot pri drugih zdravilnih učinkovinah, ki vsebujejo platino, se lahko pojavijo preobčutljivostne reakcije, večinoma med perfuzijo. Drugi neželeni stranski učinki, ki se pojavljajo pogosteje, so: žilni zapleti, Raynaudov sindrom, motnje serumskih elektrolitov, hiperurikemija, okularne okvare, hepatotoksičnost, srčne abnormalnosti ter razne okužbe in izpuščaji (7, 26).

Cisplatin je sicer zelo učinkovito protitumorsko zdravilo, vendar resna nefrotoksičnost in vpliv na gastrointestinalni trakt predstavljata omejitveni dejavnik. Ustanovi Institute of Cancer Research v Londonu je uspel velik preboj z vpeljavo karboplatina v klinično prakso. Njegova manjša toksičnost, brez vpliva na učinkovitost, sloni na domnevi bolj stabilne izstopajoče dikarboksilatne skupine od kloridne. V primerjavi s cisplatinom ima karboplatin znatno manjšo nefrotoksičnost, manjši je toksičen vpliv na gastrointestinalni trakt, tudi nevtrotoksičnost je manjša. Nasprotno pa je mielosupresija, posebno trombocitopenija, glavni omejujoč dejavnik pri odmerjanju karboplatina (12). Med zdravljenjem je treba pogosto nadzirati periferno krvno sliko; cikel se ne sme ponoviti, dokler se število levkocitov, nevtrofilcev in trombocitov ne vrne na normalno vrednost (19).

1.2.1 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Po hitri intravenski aplikaciji **cisplatin** takoj doseže najvišjo plazemsko koncentracijo (28). Hitro se porazdeli po vseh tkivih in tekočinah; slabo pa prodira v osrednje živčevje (7, 28).

Najvišje koncentracije doseže v jetrih, ledvicah, mehurju, mišičnem tkivu, koži, modih, prostati, trebušni slinavki in vranici. Z izjemo možganskih tumorjev so koncentracije v tumorjih običajno nekoliko nižje kot v nemalignem tkivu. Učinkovina se v tkivih akumulira in lahko ostane prisotna do 180 dni po zadnji aplikaciji. Cisplatin se hitro in v veliki meri veže na biološke molekule v tkivu in na plazemske proteine, med njimi so albumin, gama-globulini in transferin (7, 26). Interakcija je časovno odvisna, pri čemer naraste vezana frakcija na 90 % v 2–4 urah in ima lastnosti procesa prvega reda (29). Vezava je ireverzibilna, vezana platina ostaja v plazmi za čas življenjske dobe albumina. Kompleksi med albuminom in platino ne razpadejo v pomembnem obsegu, ampak se počasi izločijo z minimalno razpolovno dobo 5 dni ali več (7, 26). Ko se enkrat cisplatin veže na protein, se pretvori v neaktivno obliko. Aktivni (nevezani) cisplatin lahko ločimo od vezanega z ultrafiltracijo in ima precej drugačno kinetiko z veliko hitrejšim plazemskim očistkom, primarno z izločanjem skozi ledvice (29). V bioloških tekočinah se kloridni ion cisplatina z ireverzibilno reakcijo zamenja s hidroksilno skupino. Nespremenjeni in hidrolizirani cisplatin lahko brez težav reagirata z nukleofili. Biotransformacija poteka z vezavo na nukleofile z nizko molekulsko maso (npr. glutation, metionin, cistein) in na nukleofile z veliko molekulsko maso (večinoma proteini) v plazmi in tkivih; nastanejo t. i. mobilni in fiksni metaboliti (15). Fiksne metabolite predstavljajo vse makromolekularne spojine z vezano platino, ki ostanejo v tkivu do pretvorbe v mobilne metabolite. Mobilni metaboliti pa vključujejo vse spojine platine z nizko molekulsko maso (30). Izločanje intaktnega cisplatina in njegovih metabolitov poteka predvsem skozi ledvice z urinom, pretežno z glomerulno filtracijo. Sprva je ledvični očistek vezane in proste platine enak kreatininskemu očistku in predstavlja izločanje nevezanih molekul platine. Z obsežno vezavo na proteine očistek cisplatina skokovito pade in končna faza izločanja se podaljša. Majhen delež cisplatina se izloči z žolčem in slino (28). Od 27 do 43 % apliciranega odmerka se pojavi v urinu v prvih petih dneh po zdravljenju (7). Ledvični očistek proste platine je nelinearen in spremenljiv ter odvisen od odmerka, stopnje izločanja urina in individualne variabilnosti (7, 26). Koncentracija v ledvicah znatno preseže tisto v krvi, kar nakazuje na aktivno akumulacijo v ledvičnih parenhimskih celicah (27).

Karboplatin se po aplikaciji hitro in popolnoma porazdeli po tkivih in tekočinah z najvišjo koncentracijo v ledvicah, jetrih, koži in tumorskem tkivu (31). Definira ga linearni farmakokinetični profil, farmakokinetiko zadovoljivo opiše dvoprostorski model z izločanjem

iz osrednjega prostora. V krvi sta prisotni dve nevezani obliki: sam karboplatin ter dekarboksilirani platino vsebujoči razpadni produkti (32). Po aktivaciji s hidracijo nastane pozitivno nabit kompleks s platino, ki reagira z nukleofilnimi mesti na DNA. Reakcija je veliko počasnejša v primerjavi s cisplatinom, vsekakor pa se število prečnih povezav z DNA ne spremeni, kar povzroči enak biološki učinek kot pri cisplatinu (33). Karboplatin je v plazmi bolj stabilen kot cisplatin. V štirih urah po intravenski aplikaciji, ostane v plazmi več kot 90 % karboplatina v prosti obliki (34). Ker se karboplatin v večini filtrira in izloči skozi ledvične glomerule, očistek močno korelira s hitrostjo glomerulne filtracije. Pri bolnikih s kreatininskim očistkom približno 60 mL/min ali več, se 70 % odmerka karboplatina izloči s sečem, večinoma že v 12 do 16 urah (19, 34). Razpolovna doba izločanja variira glede na ledvično funkcijo in znaša tipično med 2 in 6 ur pri bolnikih z normalno GFR oz. do 18 ur pri bolnikih s prizadeto funkcijo ledvic (32). Vsa platina se v 24-urnem urinu nahaja v obliki karboplatina. Le 3 do 5 % odmerka se izloči v roku od 24 do 96 ur (19). Delež, ki je vezan na proteine, je neaktiven ter se izloči počasneje v naslednjih petih dneh (35).

1.2.2 ODMERJANJE CISPLATINA

Zaradi močne povezave med odmerkom in odzivom je odmerjanje v kemoterapiji s cisplatinom zelo pomembno (36). Bolniki z rakom imajo zelo variabilno sposobnost presnove in izločanja zdravil. Variabilnost izvira iz kombinacije fizioloških spremenljivk in intrinzičnih karakteristik, kot so genetske komponente in obenem tudi okoljskih dejavnikov, kar skupaj določi bolnikov fenotip. Da bi zmanjšali vpliv farmakokinetične in farmakodinamične variabilnosti med bolniki, se odmerek protitumorskih zdravil navadno določi glede na bolnikovo individualno telesno površino (BSA) (37).

Cisplatin se lahko uporablja za samostojno zdravljenje (monoterapija) ali za kombinirano zdravljenje, in sicer v obliki intravenske infuzije. Odmerjanje je odvisno od primarne bolezni, pričakovanega odgovora in od tega, ali je cisplatin uporabljen pri monoterapiji ali kot sestavina kombinirane terapije. Smernice za odmerjanje veljajo tako za odrasle kot za otroke. Za samostojno zdravljenje sta priporočeni naslednji shemi odmerjanja:

- enkratni odmerek od 50 do 120 mg/m² telesne površine, vsake 3 do 4 tedne;
- od 15 do 20 mg/m²/dan v obdobju 5 dni, vsake 3 do 4 tedne.

Če je cisplatin uporabljen v kombinirani terapiji, je treba odmerek zmanjšati. Običajni odmerek je 75 ali 80 mg/m², enkrat na vsake 3 do 4 tedne. Bolnikom z motenim delovanjem ledvic ali depresijo kostnega mozga je treba odmerek prav tako ustrezno zmanjšati. Od 2 do 12 ur pred uporabo cisplatina in vsaj 6 ur po njegovi uporabi je potrebno vzdrževati ustrezno hidracijo. Hidracija je potrebna za zagotovitev zadostne diureze in zmanjšanje nefrotoksičnosti med zdravljenjem in po njem. Pred in po dajanju cisplatina je treba opraviti preiskave krvi za kontrolo delovanja ledvic in jeter, določiti krvno sliko ter izmeriti elektrolite v serumu. Ponavljajočo se uporabo je treba odložiti, dokler se ne normalizirajo vrednosti kreatinina, sečnine, levkocitov ter trombocitov (7).

1.2.3 ODMERJANJE KARBOPLATINA

Odmerek karboplatina se lahko določi glede na bolnikovo telesno površino. Vendar je to metodo povečini nadomestilo odmerjanje glede na površino pod krivuljo (AUC), ki znaša ponavadi 4-6 mg/mL*min (19). Za izračun odmerka karboplatina se uporablja preprosta formula, ki jo je razvil Calvert.

$$\text{Celokupni odmerek karboplatina (mg)} = (\text{ciljna AUC}) \times (\text{GFR} + 25)$$

Enačba 1: Calvertova formula (38).

V primerjavi z empirično določenim odmerkom, katerega izračun temelji na telesni površini, formula omogoča upoštevanje individualnih razlik med bolniki glede na ledvično funkcijo pred zdravljenjem (19). Očistek karboplatina močno korelira z GFR. Za vsakega bolnika posebej na osnovi njegove GFR ciljamo tarčno površino pod krivuljo koncentracije zdravila v plazmi v odvisnosti od časa (19, 34). V rutinski praksi se odmerek karboplatina določi z uporabo kreatininskega očistka, ki ga izračunamo z uporabo enačb, ki vključujejo bolnikov serumski kreatinin. V preteklosti so se za določitev serumskega kreatinina uporabljale številne metode, posledično je bila znatna med-laboratorijska variabilnost v vrednostih kreatinina. Leta 2006 je National Kidney Disease Education Program z namenom standardizacije merjenja serumskega kreatinina objavil priporočila za sledljivost do referenčne metode izotopne dilucijske masne spektroskopije (IDMS). Pri nekaterih bolnikih z normalno ledvično funkcijo, nova standardizirana metoda IDMS daje v povprečju od 10 do 20 % nižje vrednosti kot ostale metode. Posledično je višji izračunan kreatininski očistek in odmerek karboplatina. Tudi za ocenitev ledvične funkcije se je uporabljalo več enačb, najpogosteje Cockcroft-Gaultova enačba (38).

Trenutno sta najširše uporabljeni enačbi MDRD (The Modification of Diet in Renal Disease) in CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), ki sta obe sledljivi do IDMS. Obe enačbi vključita kot spremenljivke starost, spol in raso. Enačba po Wrightu je edina, ki je bila razvita na populaciji bolnikov z rakom. Kot spremenljivke vključi BSA, starost in spol (87). Če je bolnikova GFR izračunana na podlagi serumskega kreatinina, izmerjenega z metodo IDMS, Ameriška Agencija za hrano in zdravila podaja naslednji priporočili:

- GFR, višje od 125 mL/min, v Calvertovo formulo ne vstavljamo,
- maksimalni odmerek karboplatina določimo glede na tarčno AUC (Preglednica II) (38).

Preglednica II: Maksimalni odmerki karboplatina glede na tarčno AUC (38).

AUC	Maks. odmerek karboplatina
6	900 mg
5	750 mg
4	600 mg

1.3 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJE UČINKOVINE

Cilj terapije z določenim zdravilom je doseči željen terapevtski učinek z minimalnimi neželenimi učinki. Pri protirakavih zdravilih načeloma spremljamo uspeh oz. neuspeh terapije s kliničnim spremljanjem bolnika in radiološko oceno velikosti tumorskih mas. V vseh primerih pa to ni mogoče, takrat uporabimo drug pristop, to je terapevtsko spremljanje koncentracije zdravilne učinkovine (TDM). TDM je pristop, pri katerem merjenje koncentracije učinkovine služi kot orodje za individualizacijo odmerjanja zdravila. Pri tem mora koncentracija korelirati z incidenco in intenziteto želenih in neželenih terapevtskih učinkov. Dejstvo, ki govori v korist TDM je močnejša korelacija med koncentracijo v krvi ter samim učinkom v primerjavi s korelacijo med odmerkom zdravila in učinkom, kar je posledica farmakokinetične variabilnosti med bolniki. Pri pojavu toksičnih učinkov zdravila je navadno treba zmanjšati odmerek zdravila. Zato je ključno koncentracijo vzdrževati znotraj t. i. terapevtskega območja, kjer je verjetnost želenega kliničnega odziva relativno visoka, obenem pa verjetnost nesprejemljive toksičnosti relativno nizka. Uporaba TDM pristopa prinaša več prednosti: hitrejša in lažja je določitev ustreznega novega ter vrednotenje obstoječega režima odmerjanja, omogoča profilakso pred

toksičnostjo in razlikovanje med farmakokinetičnim in farmakodinamičnim vzrokom neuspeha terapije. Pri zdravilih z nizkim terapevtskim indeksom in/ali zelo variabilnimi farmakokinetičnimi parametri ter pri bolnikih z visokim tveganjem za pojav toksičnih neželenih učinkov je TDM nujno potreben (40).

Citotoksična protitumorska zdravila v mnogih pogledih izpolnjujejo predpogoje za TDM. Interindividualna farmakokinetična variabilnost je v večini primerov velika. Koeficienti variacije pri očistku so lahko tudi 50 % in več. Velika interindividualna variabilnost je verjetno povezana z genetskimi razlikami kot tudi z variacijami v funkcionalnem statusu bolnika z rakom. Genskim faktorjem pripisujemo pomemben delež variabilnosti, zato veliko farmakogenetskih študij raziskuje gene, ki kodirajo prenašalce zdravil in encime, ki sodelujejo v metabolizmu zdravil ter same tarče. Poleg genetike imajo velik vpliv na farmakokinetiko in/ali farmakodinamiko ter končen izid zdravljenja tudi patofiziologija, okolje, prehrana, interakcije med zdravili, alergije na zdravila in slaba compliance. Naslednji parameter, ki ga lahko spremljamo s TDM, je razmerje med plazemsko koncentracijo učinkovine in končnimi točkami farmakodinamike, kot je na primer odstotek upada števila nevtrofilcev pred zdravljenjem in na najnižji točki. Razlog, zakaj se TDM rutinsko povečini ne uporablja pri citotoksičnih zdravilih je ta, da AUC za posameznega bolnika izvemo šele po aplikaciji zdravila. V primeru, da je opazovana AUC pomembno drugačna od tarčne se ne more izvesti modifikacija odmerka, saj je zdravilo že bilo aplicirano. Na podlagi farmakokinetičnih parametrov iz prvega cikla pa lahko načrtujemo individualizacijo odmerka za zdravljenje v drugem ciklu. V rutini se zmanjševanje odmerka izvaja običajno samo v primerih nesprejemljive toksičnosti, opazovane med cikli. Pri tem lahko TDM omogoči koristno dodatno informacijo za usmeritev prilagoditve odmerka. Pristop se v praksi povečini ni uveljavil iz več razlogov. Ker je kemoterapija pogosto sestavljena iz kombinacije zdravil, zahteva določitev vrednosti AUC za specifično zdravilo večkratni odvzem vzorca; PK-PD razmerja je težje modelirati pri kombinacijah zdravil in vrednosti tarčne AUC za specifično zdravilo je težje določiti. Drugi dejavniki so cena TDM in dejstvo, da je izvedba prospektivnih validacij TDM pristopov, ki temeljijo na randomiziranih študijah, težavna. Ker večina bolnikov prejme odmerek karboplatina glede na ledvično funkcijo, se TDM priporoča pri subpopulacijah pacientov, pri katerih je izpostavljenost zdravilu težje napovedati. AUC karboplatina tesno korelira s toksičnostjo in odzivom tako pri odraslih kot pri otrocih. Uporaba TDM-a je smiselna pri bolnikih, ki prejemajo visoke odmerke učinkovine, pri

farmakokinetičnih variabilnostih, ki lahko vodijo do nevarne toksičnosti, pri otrocih, pri anefričnih bolnikih ter pri bolnikih z ledvično okvaro, pri katerih prevladuje ne-ledvični očistek učinkovine (41).

Optimalni režim odmerjanja določijo proizvajalci zdravila med samim razvojem s testiranjem na večjem številu bolnikov. Zaradi intra- in interindividualnih variacij pogosto pride do bodisi subterapevtskega bodisi toksičnega odziva, kar zahteva ustrezno prilagoditev odmerka. Klinična farmakokinetika vključuje multidisciplinarni pristop individualizacije optimalnega odmerjanja, ki temelji na bolnikovem stanju in njegovih specifičnih dejavnikih. Tesno je povezana tudi s TDM pri določenih učinkovinah, še posebej tistih z ozkim terapevtskim oknom. Pri teh zdravilih je spremljanje pacientov nujno, bodisi z merjenjem plazemske koncentracije učinkovine bodisi z nadzorovanjem končnih točk farmakodinamike (42).

1.4 FARMAKOKINETIČNI MODELI

Farmakokinetični modeli so poenostavljeni prikaz »sistema«, kar nam olajša razumevanje kompleksnih procesov, ki vključujejo absorpcijo, porazdelitev, metabolizem in izločanje učinkovine iz telesa. Poenostavitev je nujna zaradi nezmožnosti kvantitativne meritve vseh procesov v telesu, vključno s pomanjkanjem bioloških vzorcev iz notranjosti telesa. Farmakokinetični modeli predstavljajo osnovo za opis in razumevanje časovnega poteka izpostavljenosti in odziva na učinkovino po odmerjanju oz. opišejo odnos med koncentracijo učinkovine in časom. Uporabljamo jih za simulacijo plazemskega koncentracijskega profila in izračun režima odmerjanja za posameznike ali skupine. Prostorski modeli so klasični modeli, ki simulirajo kinetične procese absorpcije, porazdelitve in izločanja zdravila. V modelu prostori predstavljajo dele telesa, v katerih je učinkovina dobro premešana in kinetično homogena. Razdelimo jih glede na število potrebnih prostorov za opis vseh procesov. Prostori ne predstavljajo specifičnega tkiva ali tekočine, ampak skupino podobnih tkiv ali tekočin. Organe in tkiva, v katerih je porazdelitev zdravila podobna, združimo v en prostor (42, 44, 53).

Enoprostorni model je najpreprostejši prikaz procesa porazdelitve in izločanja učinkovine iz telesa. Model predstavlja en prostor, ki ga sestavljajo vsa telesna tkiva in tekočine. Model predvideva, da se učinkovina lahko absorbira in izloči iz telesa (»odprti model«), ter da se po aplikaciji takoj enakomerno porazdeli po celem telesu. Pri dvoprostornem modelu krivulja plazemske koncentracije v odvisnosti od časa prikaže biekspontni upad koncentracije

učinkovine kot vsoto dveh procesov prvega reda – porazdelitve in izločanja. Učinkovina se porazdeli v dveh prostorih: centralnem in perifernem. Centralni prostor vključuje kri (plazmo), ekstracelularno tekočino in organe, ki so dobro prekravljeni (srce, možgani, ledvice), periferni pa maščobno in mišično tkivo ter cerebrospinalno tekočino. Učinkovina se po centralnem prostoru porazdeli hitro in enakomerno, po perifernem počasneje. Med prostoroma prehaja s kinetiko prvega reda. (42, 53)

1.5 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Populacijska farmakokinetika (PopPK) je študija variabilnosti v plazemskih koncentracijah učinkovine med populacijami in znotraj določene populacije bolnikov, ki prejemajo terapevtski odmerek izbrane učinkovine. Namen PopPK je ocena populacijskih in individualnih farmakokinetičnih parametrov, ter interindividualne in rezidualne variabilnosti. Običajno se farmakokinetične študije izvedejo na zdravih prostovoljcih ali skrbno izbranih pacientih, pri čemer je v središču zanimanja povprečno vedenje v skupini (npr. časovni profil povprečne plazemske koncentracije učinkovine). PopPK preiskuje merljive demografske, genetske, patofiziološke, okoljske in druge dejavnike (telesna teža, ledvična in jetrna funkcija, prisotnost sočasnih terapij), ki spremenijo razmerje odmerek – plazemska koncentracija ter prispevajo k variabilnosti v varnosti in učinkovitosti preiskovane učinkovine. Če so spremembe take, da pride do klinično pomembnega premika v terapevtskem indeksu, je potrebna ustrezna sprememba odmerka (42, 43). Večina farmakokinetičnih modelov zahteva za ocenitev parametrov dobro načrtovane študije z veliko odvzemi vzorcev. Vendar je v praksi, še posebej pri občutljivih populacijah bolnikov, število vzorčenj omejeno, kar pa ne zadostuje za popolno določitev farmakokinetičnega profila pri posamezniku. PopPK dopušča uporabo podatkov predhodnih bolnikov oz. širše populacije bolnikov namesto omejenih krvnih vzorcev individualnega bolnika (42).

V nasprotju s tradicionalnim pristopom, PopPK pristop zajema naslednje značilnosti:

- zbiranje ustreznih farmakokinetičnih informacij pri bolnikih, ki so reprezentativni za tarčno populacijo, ki bo prejemala učinkovino,
- identifikacijo in merjenje variabilnosti med razvojem in vrednotenjem učinkovine,
- pojasnitev variabilnosti z identifikacijo dejavnikov demografskega, patofiziološkega in okoljskega izvora, ki lahko vplivajo na farmakokinetiko učinkovine,

- kvantitativno ocenitev nepojasnjene variabilnosti v določeni populaciji bolnikov; le-ta je pomembna zaradi učinkovitosti in varnosti zdravila, ki se lahko zmanjšata pri porastu nepojasnjene variabilnosti (43).

Obstaja več načinov ocenjevanja farmakokinetičnih parametrov. Z metodo enostavnega združevanja podatkov (*ang.: naive pooled approach*) združimo podatke vseh posameznikov, brez upoštevanja individualnih razlik. Lahko pa analiziramo podatke vsakega posameznika posebej in nato združimo vse individualne parametre, da dobimo srednje populacijske vrednosti (t. i. dvostopenjski pristop). Pri obeh metodah se srečamo s težavami, ki so lahko posledica npr. neustrezne compliance, manjkajočih vzorcev in drugih napak v podatkih.

Sheiner je s sodelavci (86) upošteval te pomanjkljivosti in razvil modeliranje populacijske farmakokinetike, ki dopušča združevanje pomanjkljivih podatkov več oseb in oceno populacijskih srednjih vrednosti, interindividualne variabilnosti in vpliva sočasnih spremenljivk. Ta pristop omogoča tudi določitev natančnosti parametrov z določitvijo standardne napake (SE). Metoda nelinearnega modeliranja mešanih učinkov oz. NONMEM se danes najpogosteje uporablja in je zelo primerna še posebej takrat, ko imamo na voljo pomanjkljive podatke (majhno št. vzorcev ipd.) (42–44, 86).

1.5.1 METODA NELINEARNEGA MODELIRANJA MEŠANIH UČINKOV

Pri študiji populacijske farmakokinetike z metodo nelinearnega modeliranja mešanih učinkov analiziramo podatke vseh posameznikov iz določene populacije sočasno. Ime metode izhaja iz dejstva, da model uporabi za opis podatkov tako stalne kot tudi naključne učinke. Funkcija koncentracije $f(X, \theta)$ je nelinearna, pri čemer predstavlja grška črka θ (theta) oceno tipične vrednosti farmakokinetičnega parametra v populaciji oz. njegovo povprečje. To pomeni, da je odvisna spremenljivka (koncentracija) nelinearno povezana s parametri modela in neodvisnimi spremenljivkami (42, 45, 46).

Pri razvoju populacijskega farmakokinetičnega modela upoštevamo 5 pomembnih vidikov:

- podatke,
- strukturni model, ki opiše tipični koncentracijski profil v odvisnosti od časa v populaciji,
- statistični model, ki razloži nepojasnjeno (slučajno) variabilnost v populaciji,
- model sočasnih spremenljivk,

- ter programsko opremo, ki združi podatke in modele z metodo, ki poišče ustrezne parametre za strukturni in statistični model ter model sočasnih spremenljivk.

Na voljo je veliko programskih paketov za populacijsko modeliranje. Večina ocenjuje parametre z minimiziranjem vrednosti objektivne funkcije (OFV), največkrat z uporabo ocene največjega verjetja. OFV določi splošen prikaz, kako dobro se napovedan model ujema s podatki (maksimalno verjetje = nizki OFV = najboljše ujemanje). Program izračuna OFV po enačbi št. 2, pri čemer črka L predstavlja verjetje.

$$OFV = -2\log(L)$$

Enačba 2: Izračun OFV.

V populacijskem modeliranju je računanje verjetja bolj zapleteno kot pri modelih s samo stalnimi učinki. Napovedane koncentracije pri vsaki osebi so odvisne od razlike med posameznikovimi in populacijskimi parametri ter od razlike med vsakim parom opazovane in napovedane koncentracije (46).

NONMEM (NONlinear Mixed Effects Modeling) je prva razvita programska oprema in trenutno najširše uporabljen program za populacijsko ocenjevanje. Program ponuja možnost vključitve t. i. priorjev oz. predhodnega vedenja iz predhodno objavljenih populacijskih farmakokinetičnih analiz z namenom povečati natančnost ocen parametrov (47). Napisan je v programskem jeziku Fortran.

Metode največjega verjetja uporabljajo številne aproksimacijske pristope za izračun in minimizacijo OFV (48). NONMEM najpogosteje uporablja naslednje:

- LAPLACE – aproksimacija drugega reda,
- FO – aproksimacija prvega reda,
- FOCE – pogojno ocenjevanje prvega reda,
- FOCEI – metoda aproksimacije prvega reda s pogojem in interakcijo (49).

Parametri stalnih učinkov so populacijski parametri, ki definirajo povprečno vrednost parametra v populaciji in/ali povprečno razmerje med merjenimi dejavniki pri bolniku in farmakokinetičnimi parametri. Tipična vrednost parametra je povprečna vrednost parametra pri vrednosti specifične sočasne spremenljivke. Če ni sočasne spremenljivke, je enaka povprečni populacijski vrednosti. Parametri naključnih učinkov so populacijski parametri, ki kvantificirajo naključne (neznane) variacije. Razdelimo jih na interindividualno in rezidualno variabilnost ter

variabilnost med dogodki. Interindividualna variabilnost predstavlja merilo nepojasnjenih naključnih razlik v parametru med posamezniki v populaciji. Označena je s simbolom η in je normalno porazdeljena slučajna spremenljivka s povprečno vrednostjo 0 in varianco ω^2 . Predstavlja razliko med napovedano vrednostjo parametra za populacijo in za posameznika. Individualni kinetični parametri so modelirani kot funkcija populacijske sredine in individualne naključne deviacije. Rezidualna variabilnost pa je merilo preostale nepojasnjene variabilnosti, potem ko upoštevamo vse druge vire. Model vključuje intraindividualne napake, napake pri merjenju, napake v strukturi modela in predstavlja razmerje med napovedano in opazovano plazemsko koncentracijo za posameznika. Označena je s simbolom ε in je normalno porazdeljena naključna spremenljivka s povprečno vrednostjo 0 in varianco σ^2 (50, 51). Poznamo več modelov rezidualne variabilnosti. Enačba št. 3 prikazuje aditivni model, ki predvidi konstantno (homoskedastično) napako.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + \varepsilon_{ij}$$

Enačba 3: Aditivni model rezidualne napake ($C_{obs,ij}$ – izmerjena koncentracija, $C_{pred,ij}$ – z modelom napovedana vrednost, ε_{ij} – rezidualna napaka).

Napaka je lahko proporcionalna napovedani koncentraciji (ali parametru) (Enačba 4). V tem primeru napaka proporcionalno narašča z naraščanjem koncentracije/parametra (s konstantnim koeficientom variacije), zatorej je heteroskedastična.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij})$$

Enačba 4: Proporcionalni model rezidualne napake.

Aditivni in proporcionalni model rezidualne napake lahko tudi kombiniramo (Enačba 5), v nekaterih primerih je potreben bolj izpopolnjen model z uporabo log-transformacije, vključno z avto-korelacijo oz. spreminjanjem magnitude rezidualne napake med subjekti.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij}) + \varepsilon_{ij}$$

Enačba 5: Kombinirani model rezidualne napake.

Variabilnost med dogodki je merilo nepojasnjenih naključnih razlik pri posamezniku med različnimi dogodki; običajno jo združimo z rezidualno variabilnostjo (50, 51, 52).

2 NAMEN DELA

Interindividualna farmakokinetična variabilnost je pri citotoksičnih protitumorskih zdravilih pogosto velika, zato je terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin pomembno pri zagotavljanju optimalnega razmerja med učinkovitostjo in varnostjo zdravljenja bolnikov z rakom. Rezultati TDM-a omogočajo, da z metodami populacijske farmakokinetike ocenimo populacijske in individualne farmakokinetične parametre ter interindividualno in rezidualno variabilnost. PopPK preiskuje merljive demografske, genetske, patofiziološke, okoljske in druge dejavnike, ki spremenijo razmerje med odmerkom in plazemsko koncentracijo ter prispevajo k variabilnosti v varnosti in učinkovitosti preiskovane učinkovine. Če so spremembe take, da pride do klinično pomembnega premika v terapevtskem indeksu, je potrebna ustrezna sprememba odmerka.

20 bolnikov Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik z drobnoceličnim rakom pljuč je bilo prvotno vključenih v raziskavo razvoja orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju bolnikov s to boleznijo. Tej raziskavi so bili tudi prilagojeni odvzemi krvi. Bolniki so bili prejemniki kombinirane terapije etopozida s cisplatinom oz. karboplatinom v 4 do 6 krogih zdravljenja. Cilj magistrske naloge je določitev izpostavljenosti nevezanemu cisplatinu in karboplatinu ter raziskava farmakokinetike obeh zdravil z uporabo populacijskega pristopa. V vzorcih plazme bolnikov bomo z masno spektrometrijo z vzbujanjem v induktivno sklopljeni plazmi določili koncentracije nevezanih učinkovin; to sta prosti cisplatin in karboplatin. Vzorce bomo po odtajanju predhodno pripravili z ultrafiltracijo. V analizo bomo vključili predhodno vedenje oz. priorje – to so predhodno objavljeni literaturni podatki farmakokinetičnih lastnosti obeh spojin. Ta korak je nujen zaradi omejenega števila vzorčenj plazme bolnikov. Z metodami populacijske analize farmakokinetike bomo ocenili populacijske farmakokinetične parametre nevezane učinkovine v posameznem krogu kemoterapije pri vsakem bolniku. Raziskali bomo vpliv demografskih in fizioloških spremenljivk na parameter zanimanja. Pri tem bomo uporabili program NONMEM oz. nelinearno modeliranje mešanih učinkov, s pomočjo katerega bomo razvili farmakokinetične modele ter jih grafično ovrednotili. Na koncu bomo med posameznimi modeli primerjali napovedane in izmerjene vrednosti učinkovine ter ocene površine pod krivuljo koncentracije v plazmi v odvisnosti od časa, ki je bistven farmakokinetični parameter za citotoksična zdravila.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Analizirali bomo 139 vzorcev plazme 20 bolnikov, ki smo jih skupaj s podatki o bolnikih prejeli iz Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Vzorce (6 mL) so odvzeli v epruvete z antikoagulantom kalijeve soli etilendiamintetraoetne kisline (EDTA) in takoj postavili na led. Plazmo in krvne celice so ločili z 10 minutnim centrifugiranjem pri $3000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, plazmo odpipetirali in shranili do analize v plastičnih mikroeprevetah pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za analizo bomo uporabili po en oz. dva vzorca, odvzeta v času od 7 do 465 minut po aplikaciji platine v vsakem ciklu.

Za pripravo standardnih in kontrolnih raztopin bomo uporabili humano slepo plazmo zdravih darovalcev (identifikacijska številka: 2164544, datum odvzema: 19. 09. 2013, datum alikvotiranja: 23. 04. 2014) Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (Ljubljana, Slovenija). Plazma je bila odvzeta v epruvete s CPD antikoagulantom (*ang. citrate phosphate dextrose solution*) in shranjena na -20°C .

3.1.2 STANDARDI

- kristalizirana cis-diamin-dikloro-platina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- multistandard inorganic ventures var-cal-2, konc. $100,00\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr^3 , Cu, Mn, Ni, Pb, Se, Th, TI, U, V, Zn) v 7% dušikovi kislini (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slovenija)

3.1.3 REAGENTI IN TOPILA

- ultračista voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- 65 % dušikova kislina (HNO_3) (Merck, Nemčija), pred uporabo razredčena z ultra čisto vodo do 1 % raztopine HNO_3

3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE

- Amicon® Ultra-0.5 filtri za centrifugiranje (Millipore Corporation, Ireland)
- mikroeprevete volumna $500\text{ }\mu\text{L}$ (Millipore Corporation, Ireland)
- tehtnica (Mettler Toledo, Švica)

- polavtomatske pipete Eppendorf Research volumnov 2–20 μL , 20–200 μL , 200–1000 μL , 1–10 mL (Eppendorf, Nemčija)
- aparat Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, ZDA)
- stresalnik Vortemp 56 EVC (Tehtnica, Slovenija); $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $30\times 10\text{ RMP}$
- stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- centrifuga Eppendorf (Eppendorf, Nemčija); $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 14,0 RCF
- analizator ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, USA)
- hladilnik 3°C (Gorenje, Slovenija)
- zamrzovalnik $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gorenje, Slovenija)
- zamrzovalnik $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sankyo, Slovenija)
- drugo: merilne bučke, merilni valj, nastavki za pipete, stojala, Parafilm® M

3.2 POSTOPKI IN METODE

V raziskavo smo vključili 20 bolnikov, 6 žensk in 14 moških z diagnosticiranim drobnoceličnim rakom pljuč, ki so se zdravili na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Bolniki so bili vključeni v raziskavo razvoja orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju drobnoceličnega raka pljuč. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 127/10/11, 43/02/13). Bolniki so prejeli kombinirano terapijo etopozida bodisi s cisplatinom bodisi s karboplatinom v štirih do šestih ciklih. V vsakem ciklu so prejeli en odmerek cisplatina oz. karboplatina drugi dan kemoterapije v obliki enournih infuzij. Zaradi pomanjkljivih podatkov smo iz nadaljnje farmakokinetične analize izključili bolnika pod zaporedno številko 10. Manjkal je namreč podatek o točnem času aplikacije cisplatina. Podrobni podatki o aplikaciji platine pri vsakem bolniku so podani v prilogi št. 1, osnovne lastnosti bolnikov pa v preglednici III.

Preglednica III: Osnovne lastnosti bolnikov (n=20).

LASTNOSTI	Aritmetična sredina	Mediana	Interval (min-maks)
Starost (leta)	64	63	51–78
Telesna teža (kg)	83	84	45–117
Telesna višina (cm)	171	171	153–184
Telesna površina (m ²)	1,98	2,02	1,42–2,38
Serumski kreatinin (μmol/L)	76,3	75	49–116,9
Očistek kreatinina (mL/min)	86,1	85,1	48,4–131,7
Odmerek cisplatina (mg)	141	150	110–160
Odmerek karboplatina (mg)	443	450	400–500

Koncentracijo platine v plazmi bolnikov smo določili z masno spektrometrijo z vzbujanjem v induktivno sklopljeni plazmi. Za izdelavo standardnih in kontrolnih raztopin smo uporabili dve osnovni raztopini ter šest delovnih raztopin, ki smo jih pripravili sami.

3.2.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Priprava delovne raztopine iz standardnega cisplatina

Za pripravo osnovne raztopine smo najprej natehtali 5,9 mg standardne učinkovine v prahu, dodali 30 mL HNO₃ in dobro premešali. Z redčenjem osnovne raztopine smo pripravili 3 delovne raztopine (Preglednica IV). Raztopine smo v izogib matričnim vplivom pripravili z ultra čisto vodo in s HNO₃ z nizko vsebnostjo kovin.

Preglednica IV: Priprava delovnih raztopin iz standardnega cisplatina.

Osnovna raztopina (OSN)		Delovna raztopina 1 (DEL1)		Delovna raztopina 2 (DEL2)		Delovna raztopina 3 (DEL3)	
masa cisplatina	5,9 mg	V _{OSN}	2 mL	V _{OSN}	0,1 mL	V _{OSN}	0,02 mL
V _{1% HNO3}	30 mL	V _{1% HNO3}	50 mL	V _{1% HNO3}	50 mL	V _{1% HNO3}	100 mL
konc.OSN	196,67 mg/L	konc.DEL1	7,867 mg/L	konc.DEL2	0,393 mg/L	konc.DEL3	0,0393 mg/L

Priprava delovnih raztopin iz multistandarda

Multistandard smo dobili v obliki raztopine s koncentracijo platine 100 mg/L, le-ta nam je služila kot osnovna raztopina, iz katere smo spet pripravili tri delovne raztopine po preglednici št. V.

Preglednica V: Priprava delovnih raztopin iz multistandarda.

Delovna raztopina 1 MS (DEL1 _{MS})		Delovna raztopina 2 MS (DEL2 _{MS})		Delovna raztopina 3 MS (DEL3 _{MS})	
V _{OSN}	4,8 mL	V _{OSN}	0,2 mL	V _{OSN}	0,04 mL
V _{1% HNO₃}	30 mL	V _{1% HNO₃}	50 mL	V _{1% HNO₃}	100 mL
konc.DEL1 _{MS}	16 mg/L	konc.DEL2 _{MS}	0,4 mg/L	konc.DEL3 _{MS}	0,04 mg/L

Priprava kalibracijskih standardov

Kalibracijske standarde za platino smo pripravili tako, da smo delovni raztopini multistandarda dodali delovno raztopino cisplatina ter razredčili s HNO₃ do volumna 8 mL. Po shemi v preglednici VI smo pripravili slepi vzorec ter 12 raztopin standardov z naraščajočo koncentracijo.

Preglednica VI: Priprava kalibracijskih standardov.

konc. stand. (µg/L)	V DEL1 _{MS} (µL)	V DEL2 _{MS} (µL)	V DEL3 _{MS} (µL)	V _{DEL1} (µL)	V _{DEL2} (µL)	V _{DEL3} (µL)	V 1% HNO ₃ (µL)	V stand. (µL)
0							8000	8000
0,1			20			20	7960	8000
0,2			40			40	7920	8000
0,5		10			10		7980	8000
1		20			20		7960	8000
2		40			40		7920	8000
5		100			100		7800	8000
10		200		10			7790	8000
20	10			20			7970	8000
50	25			50			7925	8000
100	50			100			7850	8000
200	100			200			7700	8000
500	250			500			7250	8000

Priprava kontrolnih raztopin

Slepo plazmo smo najprej pustili na sobni temperaturi, da se je odtalila. Nato smo jo ultrafiltrirali ($14000 \times g$) ter 200 μL filtrata obogatili z delovno raztopino cisplatina in redčili z 1 % HNO_3 do volumna 8 mL. Poleg slepega vzorca smo pripravili 13 kontrolnih raztopin koncentracij od 0,1 $\mu\text{g/L}$ do 100 $\mu\text{g/L}$ (Preglednica VII).

Preglednica VII: Priprava kontrolnih raztopin.

konc. ($\mu\text{g/L}$)	V filtr. plazme (μL)	V_{DEL1} (μL)	V_{DEL2} (μL)	V_{DEL3} (μL)	V 1% HNO_3 (μL)	V (μL)
0	200				7800	8000
0,1	200			20	7780	8000
0,2	200			40	7760	8000
0,5	200		10		7790	8000
1	200		20		7780	8000
2	200		40		7760	8000
5	200		100		7700	8000
10	200	10			7790	8000
10	200	10			7790	8000
10	200	10			7790	8000
10	200	10			7790	8000
20	200	20			7780	8000
50	200	50			7750	8000
100	200	100			7700	8000

Za ustrezno kontrolo metode moramo analizirati minimalno tri različne koncentracije: nizko, srednjo in visoko (Q_{CL} , Q_{CM} , Q_{CH}), ter meritev vsaj enkrat ponoviti. Rezultati meritev kontrolnih vzorcev predstavljajo osnovo za sprejem ali zavrnitev analize (43).

3.2.2 VALIDACIJA

3.2.2.1 LINEARNOST

Linearnost analitičnega postopka je zmožnost (znotraj določenega območja) pridobiti rezultate, ki so neposredno proporcionalni koncentraciji analita v vzorcu. Linearnost detektorja določimo z uporabo minimalno 5 koncentracij čistih standardov. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) kot osnovni kriterij za linearnost metode navaja vrednost koeficienta determinacije (R^2) $\geq 0,995$ (54, 55).

3.2.2.2 NATANČNOST

Sipanje rezultatov pri posameznih meritvah poda natančnost določene metode. Nanaša se na velikost razlik med kvantitativnimi rezultati, ki jih dobimo s ponavljanjem poskusa na istem vzorcu. Manjša kot je razlika, bolj natančna je metoda. Če meritve potekajo ena za drugo ali če je med meritvami določena časovna odvisnost, govorimo o ponovljivosti. Kadar je časovni interval med meritvami kratek, uporabljamo izraz repetabilnost, če je daljši pa reproducibilnost. V uporabi sta tudi izraza ponovljivost na daljši oz. na kratek rok. Pri ponovljivosti testa na daljši rok merimo koliko se rezultati sipajo, če isti vzorec testiramo v različnih dnevih. Sipanje rezultatov izračunamo statistično. Primerni metodi za izračun sta standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV).

Tri standardne raztopine (QC_L , QC_M , QC_H) smo izmerili dvakrat z vmesno razliko več tednov ter izračunali standardni in relativni standardni odklon po enačbah 6 in 7. Relativni standardni koeficient (RSD) oz. koeficient variacije ne sme preseči 15%.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Enačba 6: Enačba za izračun standardnega odklona.

$$CV[\%] = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Enačba 7: Enačba za izračun koeficienta variacije.

Ponovljivost v seriji je določil analizator s šestkratno ponovitvijo meritve vsakega vzorca. Rezultat je podal kot RSD.

3.2.2.3 TOČNOST

Točnost meritve se nanaša na velikost razlike med rezultati kvantitativnega testa in resnično vsebnostjo merjenega parametra. Večja kot je razlika med izmerjeno in resnično (nominalno) vrednostjo, tem manj točna je metoda in seveda obratno. Točnost torej pomeni, v kolikšni meri smo se z meritvijo analita uspeli približati njegovi pravi vrednosti. Izrazimo jo z relativno napako, podano v odstotkih (Enačba 8). Pri tem uporabimo vsaj tri kontrolne vzorce različnih koncentracij znotraj umeritvene krivulje, za katere je dovoljena relativna napaka 15 % (56).

$$\text{točnost [\%]} = \frac{\bar{c}_{\text{izmerjena}}}{c_{\text{nominalna}}} \times 100$$

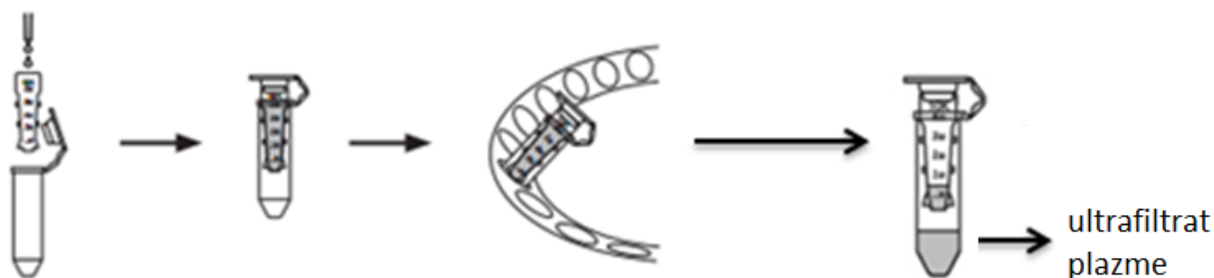
Enačba 8: Enačba za izračun točnosti.

3.2.3 PRIPRAVA BIOLOŠKIH VZORCEV

Plazmo bolnikov, ki je bila shranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo najprej odtajali na sobni temperaturi ter premešali na stresalniku, da smo zagotovili homogenost vzorca. Ker nas je zanimala koncentracija nevezanih učinkovin v plazmi, je bila potrebna predhodna ultrafiltracija z mikrofiltri, s katero smo iz vzorca odstranili proteine.

Ultrafiltracija

Za ultrafiltracijo smo uporabili filtre Amicon® Ultra-0.5 (Preglednica VIII), ki smo jih pred uporabo pripravili z dvakratnim centrifugiranjem 500 μL Milli-Q® vode (5 minut, $14000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nato smo na filtre nanegli 500 μL plazme bolnikov in centrifugirali 10 minut ($14000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Za analizo smo uporabili ultrafiltrat plazme (Slika 2).



Slika 2: Ultrafiltracija plazme (57, 58).

Preglednica VIII: Lastnosti filtra Amicon® Ultra-0.5 (59).

VOLUMNI	
Maksimalni začetni volumen	500 µL
Priporočena RCF	14.000×g (za koncentracijsko centrifugiranje); maks. 15.000×g
Aktivna površina membrane	1 cm ²
MATERIALI	
Filter	kopolimer stiren/butadien
Membrana	Millipore Ultracell – regenerirana celuloza

200 µL filtrata plazme smo odpipetirali v epruvete volumna 10 mL ter dopolnili z 1 % HNO₃ do volumna 8 mL. Do analize so bili pripravljene vzorci shranjeni v hladilniku na 3 °C.

3.2.4 ANALIZA PLAZEMSKIH VZORCEV

Za analizo vzorcev smo uporabili masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Metoda se uporablja za določanje elementne sestave različnih tipov vzorcev in je zaradi zelo nizke meje detekcije ter širokega linearnega območja odlična izbira za analizo elementov v sledovih. Instrument sestavlja izvor ionov (ICP), ki deluje pri atmosferskem tlaku in zelo visoki temperaturi ter masni spektrometer (MS) (60, 61).

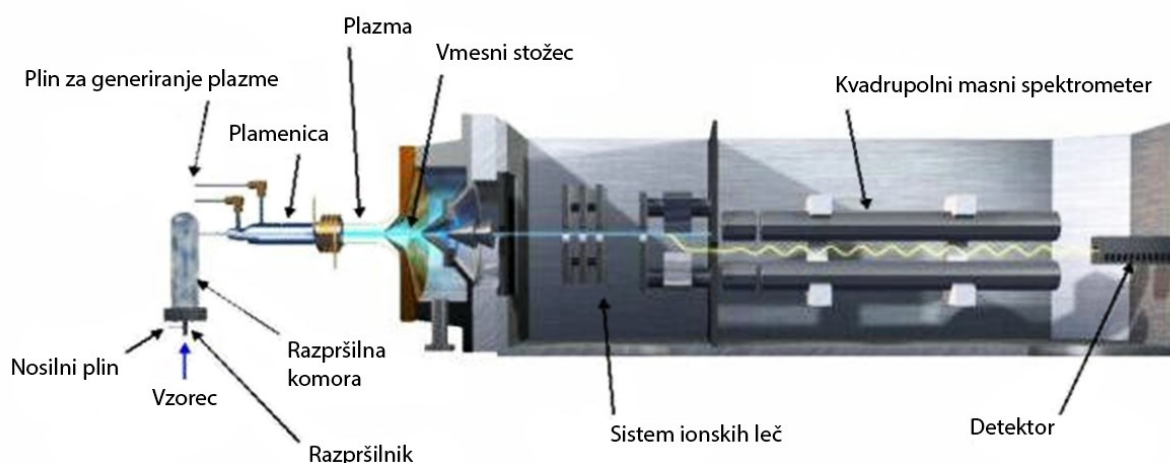
Vnos vzorca

Prvi korak analize je uvajanje samega vzorca. Obstaja več načinov uvajanja, metoda je odvisna od fizikalnih lastnosti vzorca. Vzorci za ICP-MS analizo so običajno v tekoči obliki, v gorilnik pa morajo priti bodisi v plinasti obliki bodisi kot aerosol. S pomočjo peristaltične črpalke vodimo vzorec od vzorčevalnika skozi sistem do razpršilca, kjer se razprši skupaj z argonom. Nastane aerosol, ki prehaja v razpršilno komoro, kjer se večji delci odstranijo, manjši se razpršijo naprej.

Plazemski izvor

Plazma je električno prevodna plinasta mešanica, ki nastane z ionizacijo argona. Le-ta je prvi izbor zaradi naslednjih lastnosti: je inerten, relativno poceni in ima visoko stopnjo čistosti, ki jo je zlahka vzdrževati. ICP izvor sestavljajo tri koncentrične kvarčne cevi, skozi katere teče argon. Poleg tvorbe plazme in vloge nosilnega plina, služi argon namreč tudi kot hladilni plin, ki varuje pred pregrevanjem izvora. Aerosol vzorca vstopi v plamen skupaj s tokom argona skozi

injekcijsko cev plamenice. Okrog vrhnjega dela zunanje cevi izvora je ovita bakrena indukcijska tuljava, ki je povezana z radio-frekvenčnim generatorjem. Iskra, ki jo povzroči Teslova tuljava preleti tok argona in ionizira atome, kar privede do nastanka kationov in elektronov ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + e^-$). Na nastale ione in elektrone vpliva električno in magnetno polje, ki izhaja iz bakrene indukcijske tuljave. Visoko-energijski elektroni povzročijo nadaljnjo ionizacijo s trki v preostale atome argona. Verižna reakcija se nadaljuje vse do razpada plina v argonsko plazmo, ki je sestavljena iz atomov, elektronov in ionov argona. Zaradi upora ionov in elektronov gibanju nastane t. i. ohmsko gretje, posledica česar je visoka temperatura (6000–10000 K) izvora, ki omogoča vzdrževanje plazme. Aerosol vzorca se v plazmi atomizira in ionizira. Na ionizacijo vplivajo gostota elektronov, temperatura in ionizacijska energija (60, 61, 62, 63).



Slika 3: Masna spektrometrija z vzbujanjem v induktivno sklopljeni plazmi (88).

Detekcija

Tehnika ICP, ki jo odlikuje visoka učinkovitost atomizacije in tvorbe ionov, je dopolnjena s specifično in občutljivo več-elementno detekcijo z atomsko masno spektrometrijo, pri čemer masni spektrometer loči in izmeri ione glede na njihovo razmerje masa/naboj (m/z). Ioni so iz plazme z atmosferskim tlakom izločeni preko vmesnika v vakuumski predel masnega analizatorja. Nato prehajajo mimo masnega filtra (ponavadi kvadrupol) in tisti z izbranim razmerjem masa/naboj so usmerjeni k detektorju, ki določi število ionov (61, 62).

Prednosti uporabe plazme v primerjavi z drugimi ionizacijskimi metodami, kot je plamenska ionizacija, so v tem, da do ionizacije pride v kemijsko inertnem okolju, kar varuje pred tvorbo oksidov in hidroksidov. Plazma ima dvakrat višjo temperaturo kot gorilni plamen in je bolj

stabilna. Čas zadrževanja analita v plazmi je dvakrat daljši, zato je atomizacija bolj popolna in signal višji. Temperaturni profil plazme je enoten, posledica je linearnost kalibracijske krivulje v območju 6-8 velikostnih redov. Prednost metode ICP-MS je tudi v tem, da je možna direktna sklopitev z različnimi kromatografskimi in elektroforetskimi separacijskimi metodami. Slabost metode je višja cena vpeljave ter nekatere interference, ki so lahko spektroskopske (nezmožnost ločiti enake mase ali razmerja m/z) in nespektroskopske (vpliv matriksa). Omejitve predstavlja tudi potreba po visokem vakuumu za delovanje masnega spektrometra, za kar je potreben vmesni stožec, ki je postavljen med izvorom in masnim spektrometrom (61, 62, 63, 64, 65). V Preglednici IX so navedeni pogoji merjenja z analizatorjem ICP-MS Agilent 7500ce pri naši analizi.

Preglednica IX: Pogoji merjenja z analizatorjem ICP-MS Agilent 7500ce.

Delovna moč radiofrekvenčnega generatorja	1550 W
Merjeni izotopi	^{195}Pt
Čas zajemanja rezultatov	0.24 s
Število točk na enoto mase	3
Pretok argona (L min^{-1})	15.03 (hladilni), 0.90 (plazemski), 1.07 (nosilni), 0.00 (pomožni)
Oktopolni reakcijski sistem	pretok helija: 5.0 mL min^{-1}
Število ponovitev meritve	6

Uporaba internega standarda

Vloga internih standardov je korekcija variacij v odzivu, ki so posledica bodisi učinka matriksa bodisi zaradi samega instrumenta. Enaka koncentracija internega standarda se doda vsakemu vzorcu, standardu in slepi raztopini. Sistem tako pričakuje enake odzive internega standarda v vsaki raztopini. Za korekcijo se uporabi razmerje med izmerjenim in pričakovanim odzivom internega standarda oz. normalizacija na odziv internega standarda. Pri izbiri internega standarda je pomembno, da izberemo elemente, ki se primarno ne nahajajo v preiskovani raztopini. Poleg tega mora masno število internega standarda biti blizu masnemu številu analita in imeti podoben ionizacijski potencial. V našem primeru smo uporabili naslednje interne standarde: ^{45}Sc , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{159}Tb , ^{209}Bi (63).

3.2.5 PRIMERJAVA MASNE SPEKTROMETRIJE Z INDUKTIVNO SKLOPLJENO PLAZMO (ICP-MS) IN ELEKTROTERMIČNE ATOMSKE ABSORPCIJSKE SPEKTROSKOPIJE (ETAAS)

Elektrotermična AAS je tehnika atomske spektroskopije, pri kateri namesto plamena oz. plazme uporabimo razpršilnik skupaj z majhno, električno segreto grafitno cevko ali kiveto. V prvi stopnji se vzorec posuši, nato razkroji in na koncu atomizira, pri čemer je cevka segreta na temperaturo do 3000 °C. Ko svetloba iz izvora (izbran na podlagi merjenega analita), potuje skozi sredino cevke, jo željeni atomi absorbirajo, kar na koncu zazna detektor (65). Primerjava obeh metod je predstavljena v preglednici X. Primerjavi elektrotermične AAS in ICP-MS je namenjena posebna pozornost zaradi upoštevanja predhodnega vedenja pri analizi farmakokinetike proste učinkovine. Pri vseh najdenih objavah je bila namreč prosta učinkovina v plazmi izmerjena z metodo ETAAS.

Preglednica X: Primerjava dveh metod: ETAAS in ICP-MS (65, 66).

		ETAAS	ICP-MS
Meja detekcije (ng/g)		0,01–1	0,00001–0,0001
Območje linearnosti		10 ²	10 ⁸
Natančnost	kratkoročna (5-10 min)	0,5–5 %	0,5–2 %
	dolgoročna (več ur)	1–10 %	<5 %
Interference	spektralne	zelo malo	malo
	kemične	veliko	nekaj
	fizikalne	zelo malo	nekaj
Analiza izotopov		ne	da
Št. primernih elementov		>50	82
Semikvantitativna analiza		ne	da
Zmogljivost		3–4 min/element	vsi elementi v 1–5 min
Volumen vzorca		zelo majhen	srednji
Stroški obratovanja		srednji	visoki
Začetni kapital		srednji/visok	zelo visok

3.2.6 LITERATURNI PREGLED ANALIZ POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE CISPLATINA IN KARBOPLATINA

Pri vseh bolnikih smo imeli v vsakem ciklu kemoterapije na voljo samo eden oz. dva vzorca plazme po aplikaciji platine, ker so bili časi vzorčenja prilagojeni študiji farmakokinetike etopozida. Ker sta dve izmerjeni koncentraciji učinkovine premalo za analizo farmakokinetičnih parametrov, smo se odločili za vključitev t. i. priorjev oziroma predhodnega vedenja. Pri tem smo uporabili že objavljene podatke predhodnih raziskav oz. naredili literaturni pregled. V biomedicinski podatkovni bazi MEDLINE smo poiskali vse objavljene klinične študije analize populacijske farmakokinetike prostega cisplatina in karboplatina. Za iskanje smo uporabili naslednje ključne besede ter relacijske in logične operatorje: cisplatin AND pharmacokinetics AND (population OR nonmem). V člankih smo poiskali tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov (Cl , Q , V_1 , V_2 , k_{12} , k_{21}) nevezanega cisplatina in karboplatina, njihove standardne napake ter vplive sočasnih spremenljivk. Podatke iz vsakega članka posebej smo združili skupaj z našimi ocenami parametrov v končni farmakokinetični model.

Preglednica XI: Pregled izbranih predhodno objavljenih študij farmakokinetike prostega cisplatina/karboplatina.

Referenca/ opomba*	Model	Število bolnikov	Indikacija	Odmerjanje	Merjenje proste platine
CISPLATIN					
Urien et al 36/ Preglednica 4	1	43	različne vrste metastatskih rakov	30-min intravenska infuzija, 5 zaporednih dni ali 2 × na mesec; odmerek variira med 15 in 80 mg/infuzijo	ultrafiltracija, elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (ETAAS)
Chen et al 67/ Preglednica 2	2	41	nedrobnocelični pljučni rak	30-min intravenska infuzija 1. ,2. ,3. in 4. dan; na 21 dni; odmerek 20 mg/m ² /dan	ekstrakcija z etanolom, ETAAS
Urien et al 68/ Preglednica 2	3	32	različne vrste malignih novotvorb	30-min intravenska infuzija ali oralno, odmerek 10-30 mg/m ² 5 zaporednih dni	ultrafiltracija, ETAAS
KARBOPLATIN					
de Jonge et al 74/ Preglednica 1	1	46	rak dojk, rak jajčnikov in rak zarodnih celic	60-min infuzija, eden ali dva cikla na vsake 4 tedne, tarčna AUC=5 mg × min/mL/d	ultrafiltracija, ETAAS
Ekhart et al 71/ Preglednica 2	2	178	različni tipi raka	30 ali 60 min infuzija, odmerek 300-600 mg/m ² ali tarčna AUC 13,3 ali 20 mg/mL* min	ultrafiltracija, ETAAS
Zandvliet et al 72/ Preglednica 2	3	16	bolniki s trdnimi tumorji, ki se niso odzvali na standardno terapijo	30-min infuzija, tarčna AUC 6 mg/min mL	ultrafiltracija, ETAAS
Joerger et al 75/ Preglednica 2	4	139	rak jajčnikov	30-min infuzija, tarčna AUC 5 mg/mL*min	ultrafiltracija, ETAAS

* – številka preglednice v članku, iz katere so vzeti podatki

3.2.7 ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE

Za analizo populacijske farmakokinetike prostega cisplatina in karboplatina smo uporabili statistični program NONMEM. Poiskali in uporabili smo 7 predhodno objavljenih analiz farmakokinetike preučevanih učinkovin; 3 za cisplatin in 4 za karboplatin. V objavah smo poiskali ocene vrednosti parametrov populacijske farmakokinetike ter potencialne sočasne spremenljivke, ki predstavljajo vpliv demografskih in fizioloških spremenljivk na parameter zanimanja. Z upoštevanjem izmerjenih in literaturnih podatkov smo razvili 3 končne modele za cisplatin in 4 za karboplatin, ki smo jih med seboj primerjali.

Pri cisplatinu smo v predhodnih objavah preučili objavljene sistematične teste vpliva sočasnih spremenljivk na farmakokinetične parametre. Učinek sočasne spremenljivke se smatra kot izboljšanje prileganja, če se OFV v primerjavi z osnovnim modelom (brez sočasne spremenljivke) signifikantno zmanjša sočasno z zmanjšanjem interindividualne variabilnosti. Končni modeli s sočasnimi spremenljivkami, ki smo jih uporabili v analizi, so podani v preglednici št. XII.

Preglednica XII: Modeliranje učinkov sočasnih spremenljivk cisplatina v predhodnih objavah.

MODEL	Parameter	Sočasna spremenljivka	Končni model iz literature
1 _{(36)**}	Cl	BSA	$Cl=35,5 \times (BSA/1,7)^{0,83} \times (ClCr/81)^{0,36}$
		ClCr	
	V ₁	BSA	$V_1=23,4 \times (BSA/1,7)^{2,3}$
2 ₍₆₇₎	Cl	BSA	$Cl=25,4 \times (BSA/1,63)^{0,53} \times 1,22^{GROUP}$
		GROUP*	
3 ₍₆₈₎	Cl	BSA	$Cl=37 \times (BSA/1,74)^{+1,85}$
	V ₁	BSA	$V_1=22,7 \times (BSA/1,74)^{+1,38}$

*bolniki so bili razdeljeni v dve skupini: skupina A (aplikacija cisplatina ob 6:00), skupina B (aplikacija cisplatina ob 18:00) (36, 67, 68), **referenca

Program NONMEM poda oceno variance kot ω^2 , ki jo pretvorimo v koeficient variacije z enačbo št. 9. Slednje naredimo zaradi predpostavke o logaritmski normalni porazdelitvi osnovnih parametrov v populaciji.

$$CV[\%] = \sqrt{e^{\omega^2} - 1} \times 100$$

Enačba 9: Enačba za izračun koeficienta variacije v %.

Za opis rezidualne variabilnosti smo podali kombinirani – aditivni in proporcionalni model napake, ki predstavlja merilo preostale nepojasnjene variabilnosti, potem ko smo upoštevali vse druge vire.

Izdelane modele smo ocenili grafično z diagrami. Primerjali smo izmerjene vrednosti z individualnimi ter s populacijskimi napovedanimi vrednostmi. Analiza tega diagrama nam pove, kako dobro se izmerjene koncentracije ujemajo s pričakovanimi. Pri tem želimo, da se točke čimbolj prilegajo premici $x=y$, oziroma da so čimbolj enakomerno razporejene. Rezidual variabilnosti predstavlja razliko med napovedano in izmerjeno koncentracijo. Naredili smo grafe odvisnosti uteženih rezidualov od populacijske napovedne vrednosti ter od časa od odmerjanja, kjer vidimo ujemanje takrat, ko ni opaznega trenda in se rezultati enakomerno sipajo okrog abscisne osi.

AUC je površina pod krivuljo, ki prikazuje odvisnost koncentracije učinkovine v plazmi od časa. Ob poznanem odmerku in očistku smo jo izračunali z enačbo št. 10.

$$AUC \left[mg * \frac{min}{mL} \right] = \frac{odmerek [mg]}{očistek [mL/min]}$$

Enačba 10: Enačba za izračun AUC.

$$BSA(m^2) = \sqrt{\frac{HT(cm) \times WT(kg)}{3600}}$$

Enačba 11: Mostellerieva enačba (70)

Z Bland-Altmanovi diagrami smo primerjali in ocenili medsebojno razliko ustreznega ujemanja AUC med razvitimi modeli. Na abscisno os nanese povprečno vrednost obeh primerjanih vrednosti, na ordinatno pa njuno razliko; na diagramu mora biti dovolj velik delež razlik blizu vrednosti 0 in obenem meje ujemanja, ki zajamejo 95% vrednosti, dovolj ozke. Je pa potrebno graf oceniti s kliničnega vidika. (69)

V ciklih, kjer nismo imeli na razpolago vzorcev krvi, smo AUC izračunali samo na podlagi predhodnega vedenja. Uporabili smo enačbe končnih modelov cisplatina, ki so podane v preglednici št. XII. Telesno površino (BSA) smo izračunali z enačbo po Mostellerju (enačba št. 11).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE

Prvi korak pri določitvi koncentracije cisplatina in karboplatina v plazmi bolnikov je bila priprava ustrezne umeritvene krivulje. Pripravili smo slepo raztopino ter 12 standardnih raztopin s koncentracijskim intervalom od 0,1 do 500 µg/L. Odvisnost med odzivom analizatorja in koncentracijo platine opisuje naslednja enačba:

$$y = Ax + B ;$$

kjer je:

y – odziv analizatorja

A – naklon krivulje

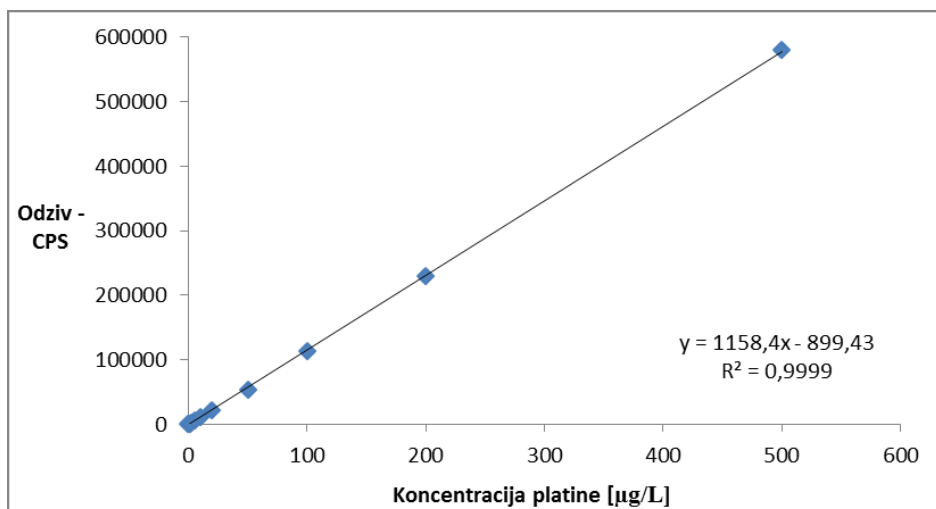
x – koncentracija analita

B – presečišče premice z x-osjo.

Preglednica XIII: Rezultati meritev raztopin multistandarda.

Konc. standarda (µg/L)	CPS	CPS RSD (%)
0	7,22	13,27
0,1	111,11	11,26
0,2	218,34	7,97
0,5	547,24	9,21
1	1085,60	0,79
2	2082,95	4,08
5	5272,74	2,19
10	10612,63	0,45
20	21987,10	1,45
50	54186,18	0,15
100	112557,20	0,38
200	229728,43	1,44
500	579459,37	1,79

Analizator je podal odziv kot CPS oz. število signalov na sekundo (*ang. counts per second*). Na podlagi rezultatov meritve raztopin kalibracijskih standardov, ki so podani v preglednici št. XIII smo izdelali linearno kalibracijsko premico za platino. Premica z enačbo $y = 1158,4x - 899,43$ in determinacijskim koeficientom 0,9999 je predstavljena na sliki št. 4.



Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje platine v plazmi.

Determinacijski koeficient (R^2) je merilo, kako dobro enačba premice določi vrednost y in zavzame vrednosti med 0 in 1. Višji kot je, boljši je model. (73)

Preglednica XIV: Rezultati meritev kontrolnih vzorcev.

Konc. standarda (µg/L)	Izmerjena koncentracija platine (µg/L)	RSD (%)	Točnost (%)
0,1	0,1421	13,85	142,1
0,2	0,2471	8,88	123,55
0,5	0,5014	3,53	100,28
1	0,9574	7,00	95,74
2	2,1429	0,19	107,145
5	5,2605	2,25	105,21
10	9,5942	2,23	95,942
10	9,9988	0,94	99,988
10	9,7645	1,94	97,645
10	9,6119	1,77	96,119
20	19,2560	0,91	96,28
50	53,4083	4,36	106,8166
100	97,4860	0,95	97,486

V preglednici št. XIV so podani rezultati meritve koncentracije platine v 13 standardih, RSD meritev in izračunana točnost.

Medtedensko ponovljivost smo določili z analizo treh kontrolnih vzorcev (QC_L, QC_M, QC_H) Meritve smo izvedli pod enakimi pogoji z vmesno razliko nekaj tednov. Rezultati so predstavljeni v Preglednici XV.

Preglednica XV: Rezultati meritve kontrolnih vzorcev ter medtedenska točnost in ponovljivost določanja platine.

Konc. kontrolne raztopine (µg/L)	Prva meritev (µg/L)	Druga meritev (µg/L)	SD	RSD (%)	Točnost (%)
1	0,9574	0,9271	0,0214	2,27	94,2
10	9,5942	10,3880	0,5613	5,62	99,9
100	97,4860	99,9619	1,7507	1,77	98,7

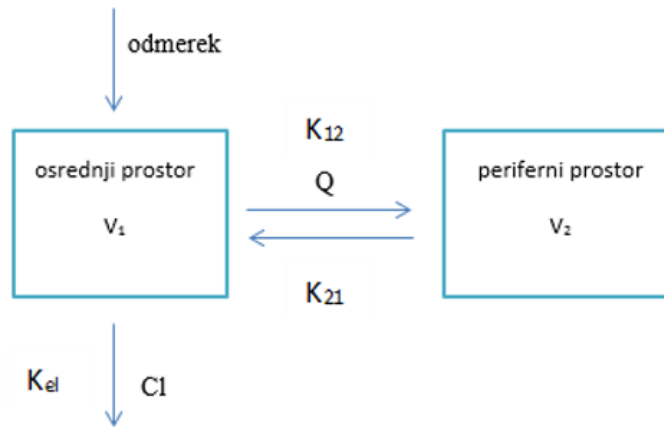
4.2 KONCENTRACIJE PLATINE V PLAZMI BOLNIKOV

Rezultati meritev platine v vzorcih plazme bolnikov so zbrani v preglednici v prilogi št. 1. Zraven koncentracije platine so podani še identifikacijska številka bolnika, cikel ter podatki o aplikaciji in vzorčenju (datum, čas, vrsta zdravila (cisplatin oz. karboplatin), odmerek in hitrost infuzije).

4.3 ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE

Za osnovni strukturni model smo izbrali dvoprostorni model (Slika 5) z izločanjem prvega reda, ker le-ta najboljše opiše časovni potek koncentracije proste platine v plazmi po infuziji cisplatina oz. karboplatina. Nevezana platina prehaja med osrednjim in perifernim prostorom ter se lahko ireverzibilno veže na proteine v prostoru št. 1.

Da smo povečali moč podatkov, smo podatke meritev združili s sedmimi predhodno objavljenimi študijami farmakokinetike prostega cisplatina in karboplatina. Poiskali smo tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, njihove interindividualne variabilnosti ter vplive sočasnih spremenljivk. Rezultati pregleda študij so povzeti v preglednici št. XI. Ostali parametri so podani v preglednicah za vsak model posebej.



Slika 5: Shema farmakokinetičnega strukturnega modela nevezane platine po infuziji cisplatina oz. karboplatina (V_1 – volumen osrednjega prostora, V_2 – volumen perifernega prostora, k_{el} – konstanta hitrosti izločanja, Cl – očistek, Q – distribucijski očistek, k_{12} – konstanta hitrosti prehajanja iz centralnega v periferni prostor, k_{21} – konstanta hitrosti prehajanja iz perifernega v centralni prostor).

4.3.1 FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA CISPLATIN

Z upoštevanjem izmerjenih vrednosti prostega in poiskanih predhodnih študij farmakokinetike ultrafiltrabilnega cisplatina smo s programom NONMEM izdelali tri modele. V preglednicah XVI, XVII in XVIII so prikazane tipične vrednosti parametrov predhodnih objav (PRIOR) s standardnimi napakami in ocena farmakokinetičnega parametra združenih podatkov skupaj s standardno napako in 95% intervalom zaupanja. Podobno preglednico smo naredili za vsak model posebej. Interindividualna variabilnost za očistek in volumen osrednjega prostora je podana kot koeficient variacije v %, rezidualna variabilnost pa kot kombinirani – aditivni in proporcionalni model napake.

Preglednica XVI: Model št. 1 za cisplatin.

	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	35,6	1,40	1,96	/	36,8	0,57	35,7–38,0
V ₁ (L)	23,0	1	1	/	23,3	0,28	22,8–23,9
V ₂ (L)	12,6	5,33	28,4	/	25,3	3,15	19,2–31,5
Q (L/h)	8,89	1,44	2,07	/	10,6	0,79	9,07–12,2
Cl, θ _{BSA}	+0,83	0,31	0,10	/	+1,04	0,13	0,79–1,29
Cl, θ _{ClCr}	+0,36	0,18	0,03	/	+0,29	0,08	0,13–0,45
V ₁ , θ _{BSA}	+1,53	0,34	0,11	/	+1,73	0,10	1,54–1,93
W _a (µg/L)	/	/	/	/	0,0001	/	/
W _p	/	/	/	/	0,498	0,036	0,43–0,57
ω²							
Cl (% CV)	14,5	0,01	/	8	12,7	1,47	11,2–14,1
V ₁ (% CV)	22,3	0,02	/	19	21,5	1,13	20,4–22,6

θ - ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, V₂ – volumen perifernega prostora, Q – distribucijski očistek, BSA – telesna površina, ClCr – očistek kreatinina, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω² – varianca interindividualne variabilnosti, CV – koeficient variacije, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

Preglednica XVII: Model št. 2 za cisplatin.

	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	24,8	1,22	1,50	/	28,9	0,71	27,5–30,3
V ₁ (L)	21,1	1,22	1,50	/	20,5	0,43	19,6–21,3
V ₂ (L)	6,99	1,01	1,01	/	8,95	0,53	7,93–9,98
Q (L/h)	9,63	1,12	1,25	/	8,58	0,26	8,07–9,10
Cl _{BSA}	0,55	0,05	0,002	/	0,58	0,01	0,56–0,60
Cl _{GROUP}	1,23	0,11	0,013	/	1,23	0	/
W _a (µg/L)	/	/	/	/	41,8	17,9	6,70–76,9
W _p	/	/	/	/	0,52	0,03	0,47–0,58
ω²							
Cl (% CV)	14,9	0	/	59	15,5	0,40	15,1–15,9
V ₁ (% CV)	27,3	0,02	/	30	26,3	0,84	25,4–27,1

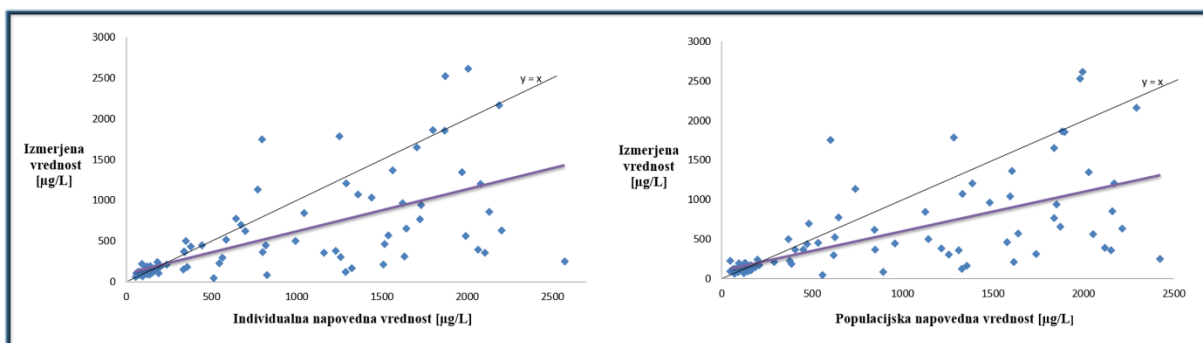
θ - ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, V₂ – volumen perifernega prostora, Q – distribucijski očistek, BSA – telesna površina, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω² – varianca interindividualne variabilnosti, CV – koeficient variacije, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

Preglednica XVIII: Model št. 3 za cisplatin.

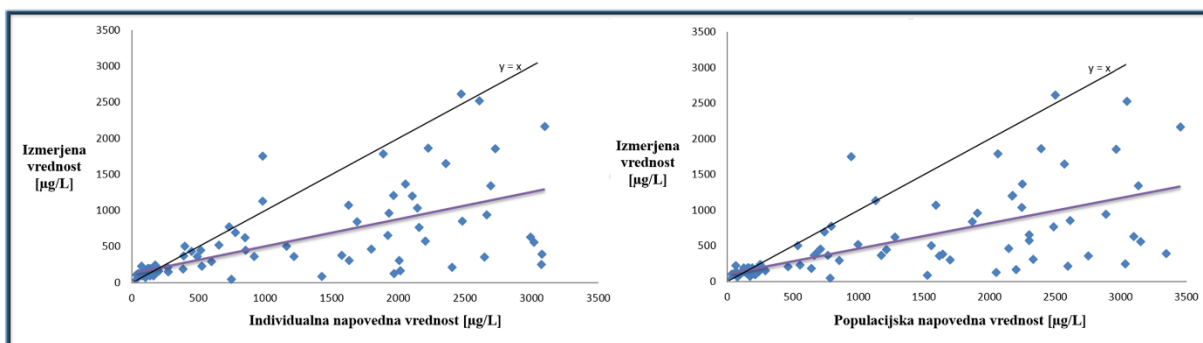
	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	34,7	8,10	65,6	/	45,1	3,12	39,0–51,3
V ₁ (L)	22,8	1,90	3,61	/	25,8	1,08	23,6–27,89
V ₂ (L)	22,5	12,0	144	/	47,1	8,75	30,0–64,2
Q (L/h)	14	10,0	100	/	16,7	4,41	8,09–25,4
Cl _{BSA}	1,95	0,61	0,37	/	1,36	0,38	0,61–2,10
V _{1BSA}	1,49	0,46	0,21	/	1,97	0,23	1,50–2,42
W _a (µg/L)	/	/	/	/	34,2	9,66	15,3–53,2
W _p	/	/	/	/	0,44	0,03	0,37–0,51
ω²							
Cl (% CV)	16	0,01	/	15	16,0	4,64	10,5–20,1
V ₁ (% CV)	14	0,01	/	17	14,9	1,22	13,7–16,1

θ - ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, V₂ – volumen perifernega prostora, Q – distribucijski očistek, BSA – telesna površina, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω² – varianca interindividualne variabilnosti, CV – koeficient variacije, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

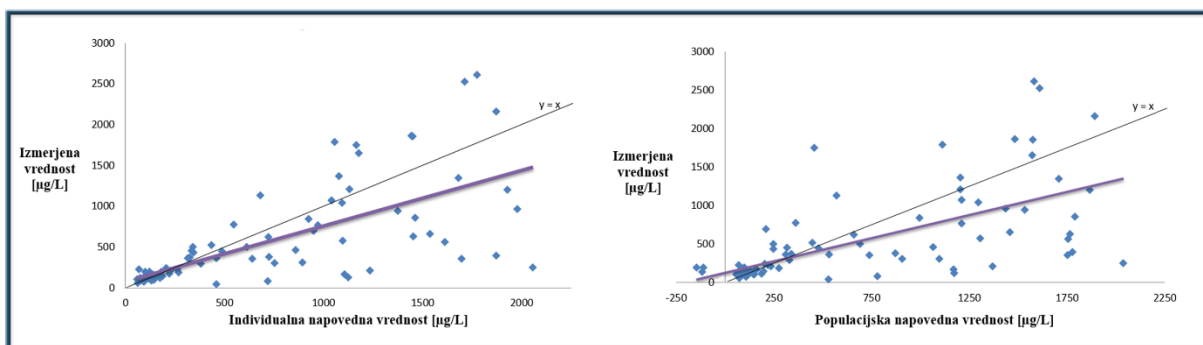
Rezultate smo ovrednotili grafično z diagrami. Slike št. 6, 7 in 8 prikažejo odvisnost med izmerjenimi vrednostmi in populacijskimi ter individualnimi napovedanimi vrednostmi. Tako lahko primerjamo, kako dobro se izmerjene vrednosti ujemajo z napovedanimi. Črna črta predstavlja premico $x=y$; napovedane vrednosti so na tej premici enake izmerjenim. Modre pike, ki predstavljajo naše rezultate, se morajo čim bolj prilegati črni premici.



Slika 6: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije cisplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 1.

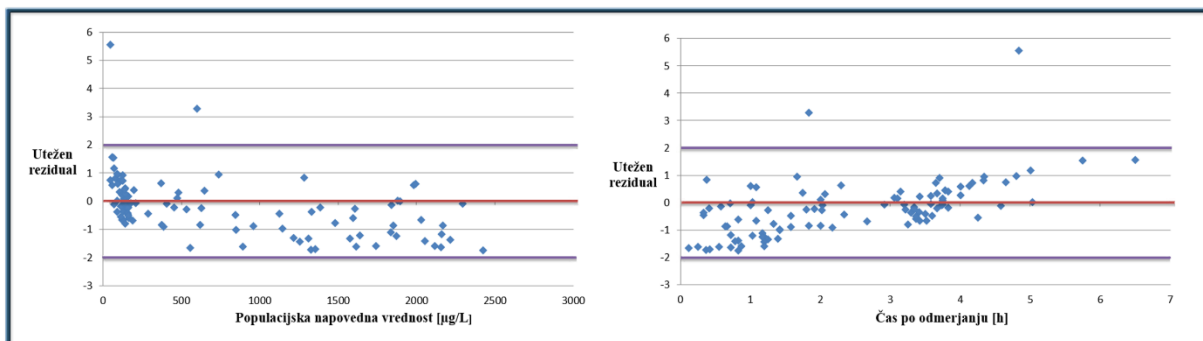


Slika 7: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije cisplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 2.

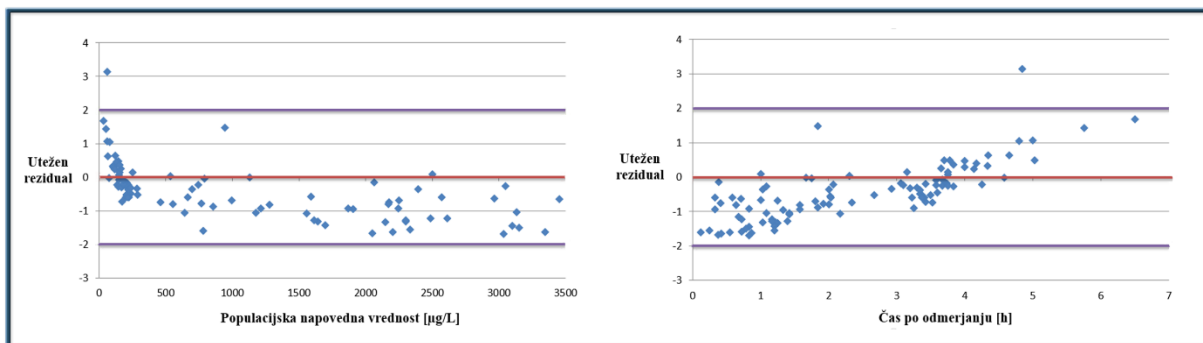


Slika 8: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije cisplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 3.

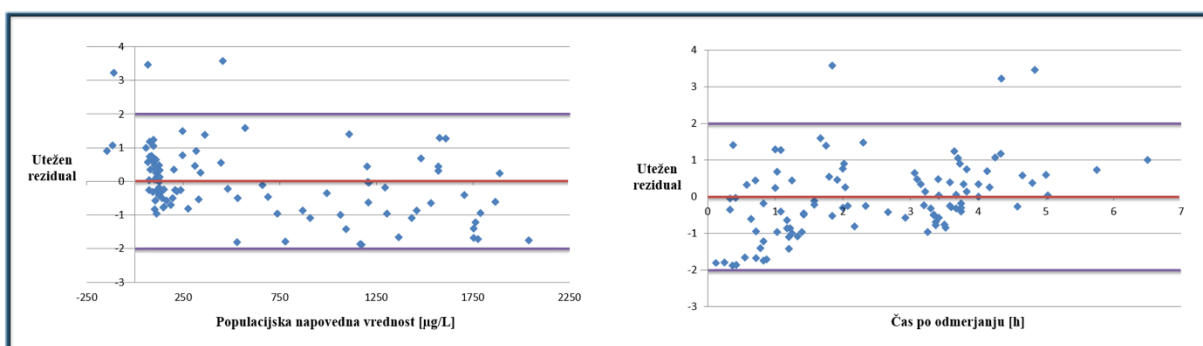
Slike 9, 10 in 11 prikazujejo grafe odvisnosti uteženih rezidualov od populacijske napovedne vrednosti ter od časa po odmerjanju. Vijolični črti predstavljata spodnjo in zgornjo mejo 95 % intervala zaupanja.



Slika 9: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedne vrednosti ter od časa po odmerjanju pri modelu št. 1.

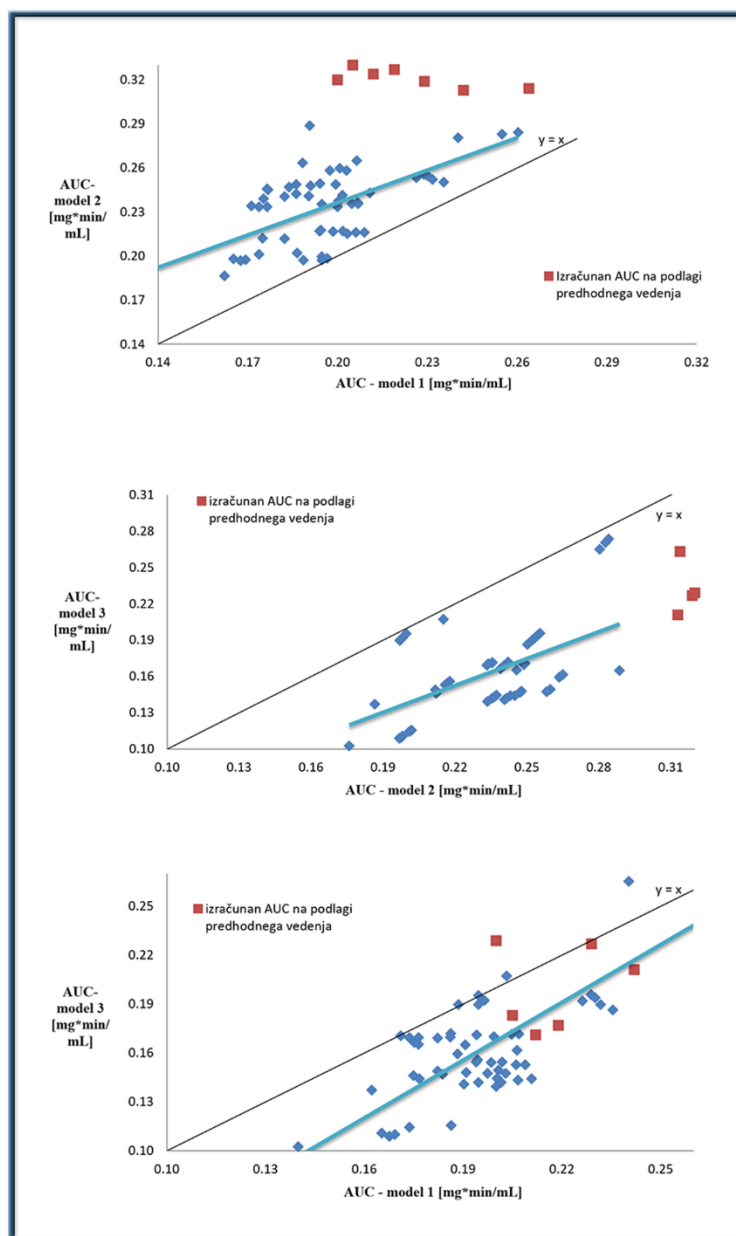


Slika 10: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedne vrednosti ter od časa po odmerjanju pri modelu št. 2.

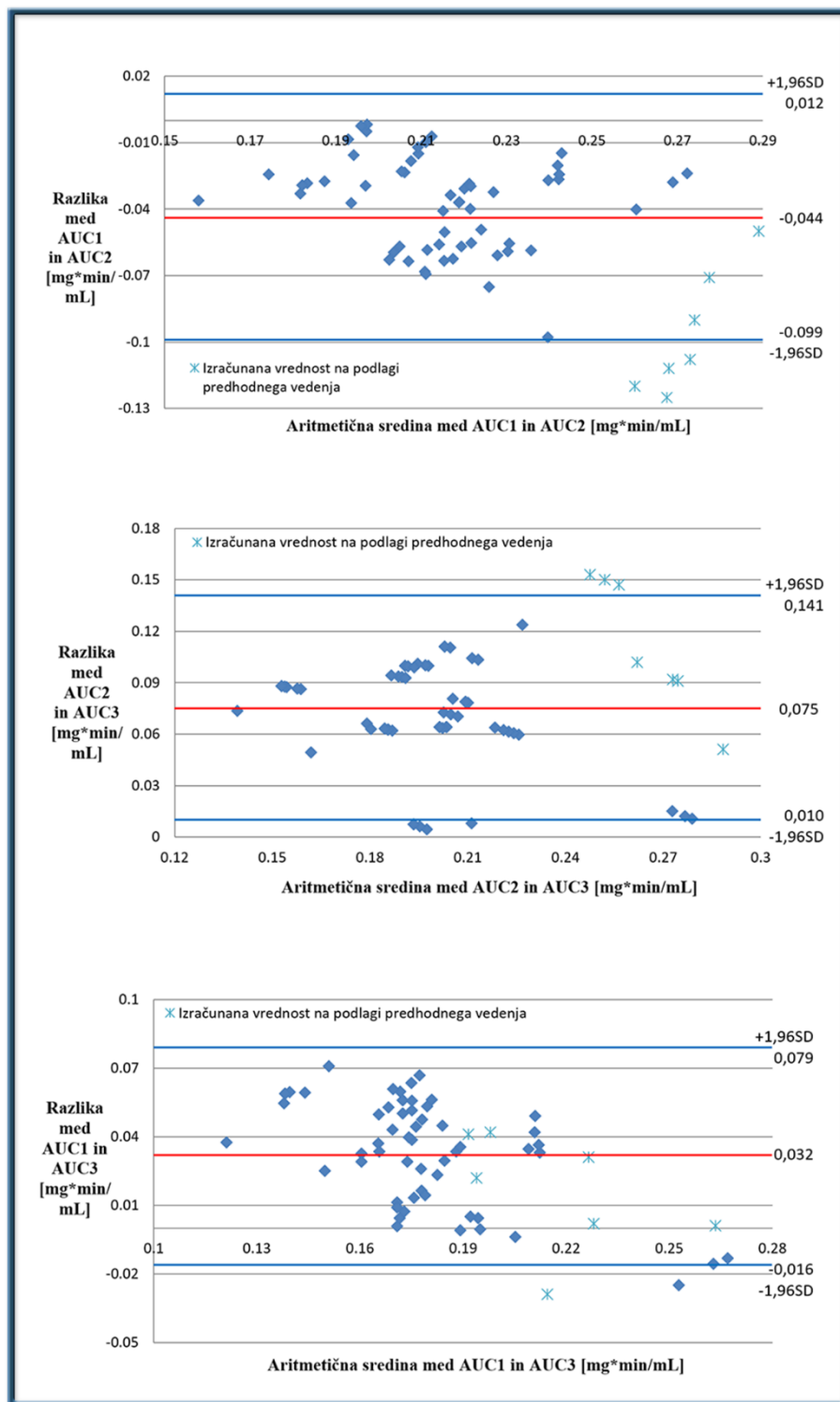


Slika 11: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedne vrednosti ter od časa po odmerjanju pri modelu št. 3.

S poznanim odmerkom ter določenim očistkom smo z enačbo št. 10 izračunali AUC za vsakega bolnika v vsakem krogu zdravljenja. Rezultati so prikazani v preglednici v prilogi št. 2. Zraven preglednice, smo ujemanje AUC med tremi modeli podali še v obliki diagramov (Slika 12). Za dodatno ocenitev ujemanja smo izbrali še Bland-Altmanove diagrame (Slika 13), ki prikažejo razlike med modeli. Na abscisni osi so nanešene povprečne vrednosti AUC obeh modelov, na ordinatni osi pa razlike med vrednosti AUC. Meje ujemanja smo izračunali iz povprečne razlike in standardnega odklona ($\pm 1,96$ SD).



Slika 12: Primerjava vrednosti AUC med tremi modeli za cisplatin.



Slika 13: Bland - Altmanovi diagrami primerjave razlik med AUC treh modelov za cisplatin.

4.3.2 FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA KARBOPLATIN

Karboplatin je v sklopu zdravljenja drobnoceličnega raka pljuč prejelo 5 bolnikov. Postopek analize farmakokinetike je bil enak kot pri cisplatinu, le da smo tukaj uporabili 4 predhodno objavljene študije in tako izdelali 4 modele, ki so prikazani v preglednicah XIX, XX, XXI in XXII.

Preglednica XIX: Ocene vrednosti farmakokinetičnih parametrov karboplatina pri modelu številka 1.

	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	7,44	0,40	0,16	/	7,17	0,15	6,88–7,47
V ₁ (L)	10,4	0,70	0,49	/	11,5	0,30	10,9–12,1
k ₁₂	0,67	0,09	0,01	/	0,68	0,02	0,65–0,71
k ₂₁	0,49	0,05	0,002	/	0,54	0,01	0,52–0,57
W _a (µg/L)	/	/	/	/	170	37,3	97,2–243
W _p	/	/	/	/	/	/	/
ω²							
Cl (% RSE)	20	0,00	/	59	19,8	0,61	19,2–20,4
V ₁ (% RSE)	13	0,02	/	30	13,1	0,26	12,8–13,3

θ – ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, k₁₂ – konstanta hitrosti prehajanja iz osrednjega v periferni prostor, k₂₁ – konstanta hitrosti prehajanja iz perifernega v osrednji prostor, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω² – varianca interindividualne variabilnosti, RSE – relativna standardna napaka, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

Preglednica XX: Ocene vrednosti farmakokinetičnih parametrov karboplatina pri modelu številka 2.

	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	8,33	0,14	0,02	/	8,26	0,04	8,18–8,34
V ₁ (L)	16,3	0,36	0,13	/	16,6	0,20	16,2–17,0
k ₂₁ (h ⁻¹)	0,171	0,01	0	/	0,177	0,004	0,17–0,19
k ₁₂ (h ⁻¹)	0,104	0,01	0	/	0,105	0,001	0,102–0,107
W _a (µg/L)	/	/	/	/	898	378	157–1640
W _p	/	/	/	/	0	/	/
ω²							
Cl (% RSE)	19,1	3,69	/	55	19,0	0,590	18,4–19,5
V ₁ (% RSE)	17,0	2,89	/	70	17,2	1,08	16,1–18,3

θ – ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, k₁₂ – konstanta hitrosti prehajanja iz osrednjega v periferni prostor, k₂₁ – konstanta hitrosti prehajanja iz perifernega v

osrednji prostor, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω^2 – varianca interindividualne variabilnosti, RSE – relativna standardna napaka, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

Preglednica XXI: Ocene vrednosti farmakokinetičnih parametrov karboplatina pri modelu številka 3.

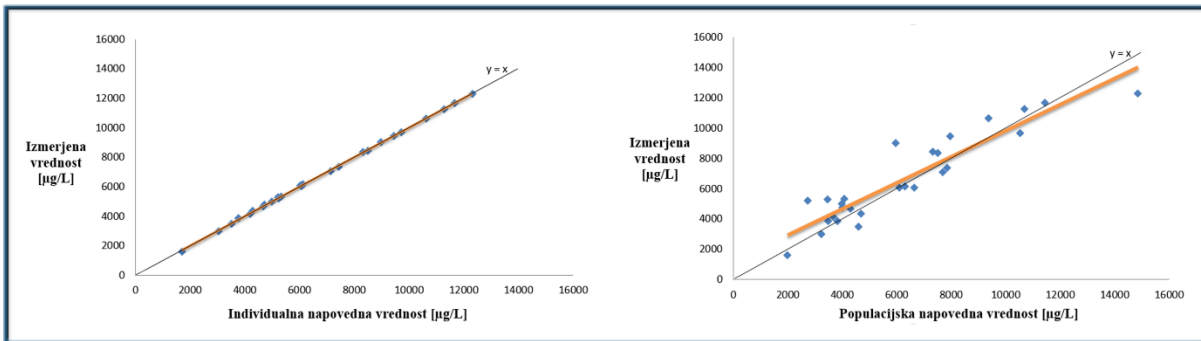
	PRIOR	SE	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled				Končni model		
θ							
Cl (L/h)	Cl _{Cr} *0,76+1,5	0,04	0,001	/	Cl _{Cr} *0,81+1,5	0,02	0,78–0,84
V ₁ (L)	15,5	2,95	8,67	/	18,4	1,17	16,1–20,7
V ₂ (L)	9,86	1,08	1,18	/	10,9	0,36	10,2–11,6
Q (L/h)	3,46	0,62	0,39	/	3,79	0,10	3,61–3,98
W _a (µg/L)	/	/	/	/	607	59,0	492–723
W _p	/	/	/	/	0	/	/
ω²							
Cl (% CV)	13	0	/	119	14,1	0,74	13,4–14,8
V ₁ (% CV)	54	0,14	/	8	38,1	10,5	25,4–48,1

θ – ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, V₂ – volumen perifernega prostora, Q – distribucijski očistek, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω^2 – varianca interindividualne variabilnosti, CV – koeficient variacije, Cl_{Cr} – očistek kreatinina, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja

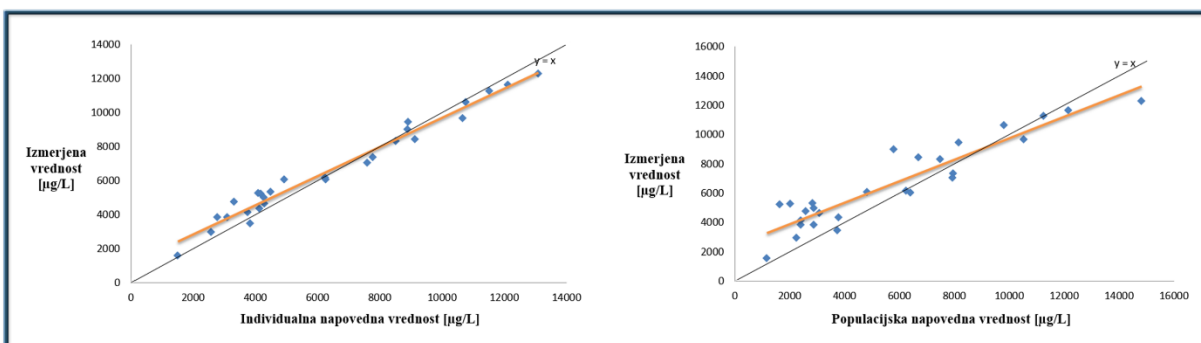
Preglednica XXII: Ocene vrednosti farmakokinetičnih parametrov karboplatina pri modelu številka 4.

	PRIOR	SE ²	DF	θocena	SE	95 % CI
	Literaturni pregled			Končni model		
θ						
Cl (L/h)	7,38	0,06	/	7,34	0,03	7,29–7,40
V ₁ (L)	11,9	0,46	/	12,2	0,15	12,0–12,5
V ₂ (L)	8,23	0,86	/	8,43	0,09	8,27–8,60
Q (L/h)	5,43	0,35	/	5,70	0,11	5,49–5,91
W _a (µg/L)	/	/	/	406	21,9	363–449
W _p	/	/	/	0,05	0,01	0,03–0,07
ω²						
Cl (% CV)	35,2	/	31	33,5	1,60	31,8–35,1
V ₁ (% CV)	37,4	/	32	37,6	0,87	36,7–38,5

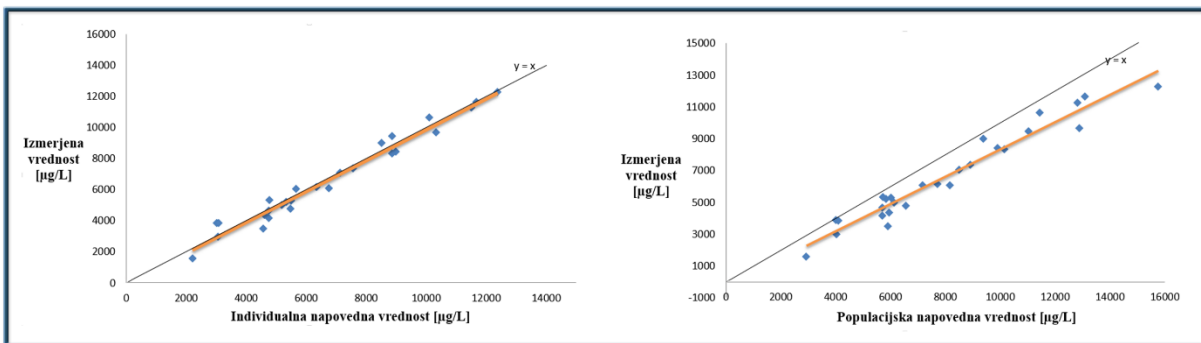
θ – ocena tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov, Cl – očistek, V₁ – volumen osrednjega prostora, V₂ – volumen perifernega prostora, Q – distribucijski očistek, W_a – aditivna napaka, W_p – proporcionalna napaka, ω^2 – varianca interindividualne variabilnosti, CV – koeficient variacije, SE – standardna napaka, DF – stopinje prostosti, CI – interval zaupanja



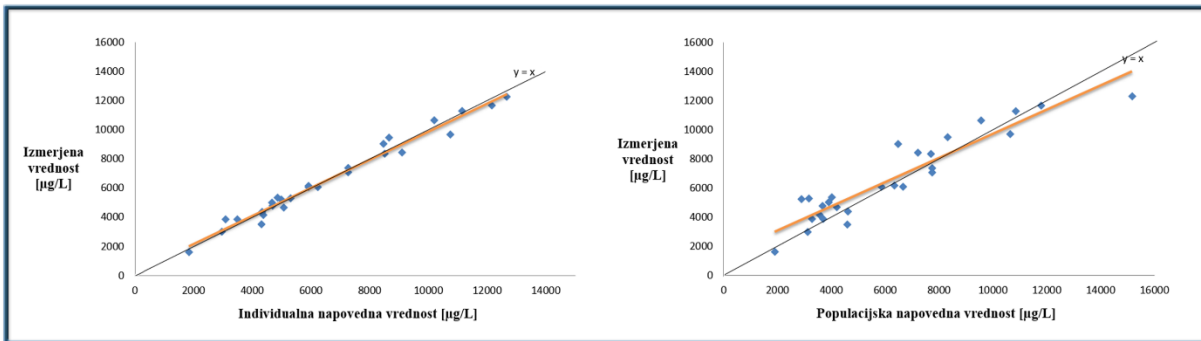
Slika 14: Individualne in populacijske napovedne vrednosti koncentracije karboplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 1.



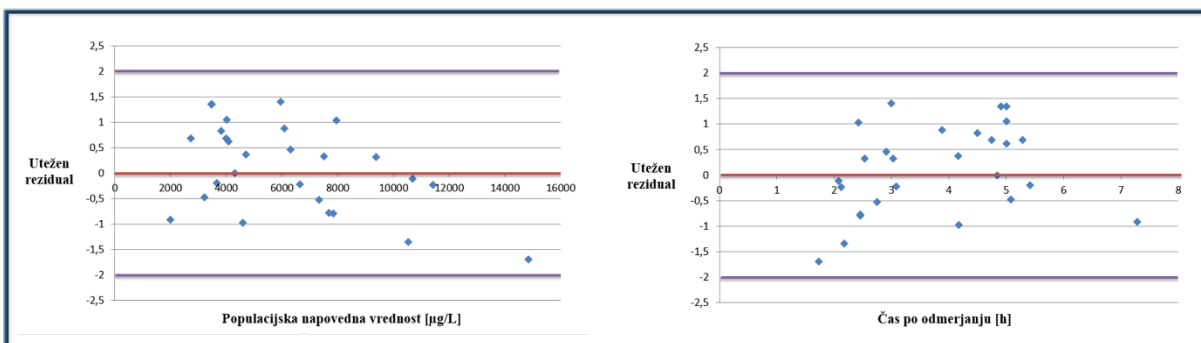
Slika 15: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije karboplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 2.



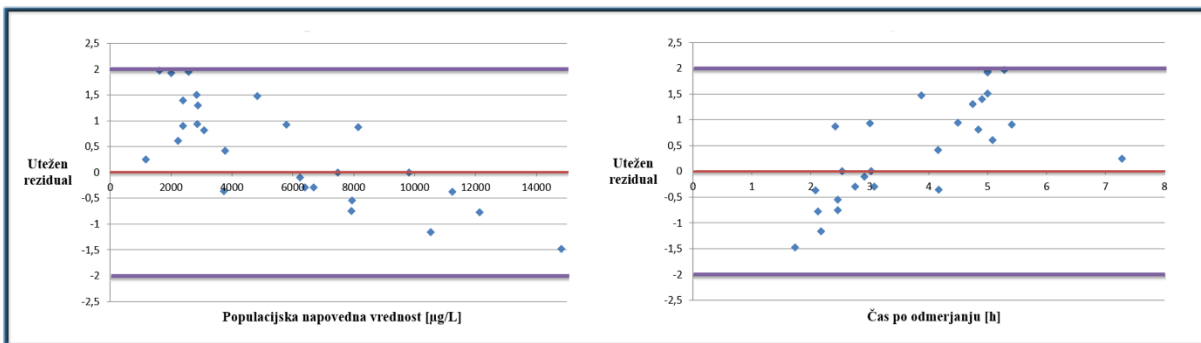
Slika 16: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije karboplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 3.



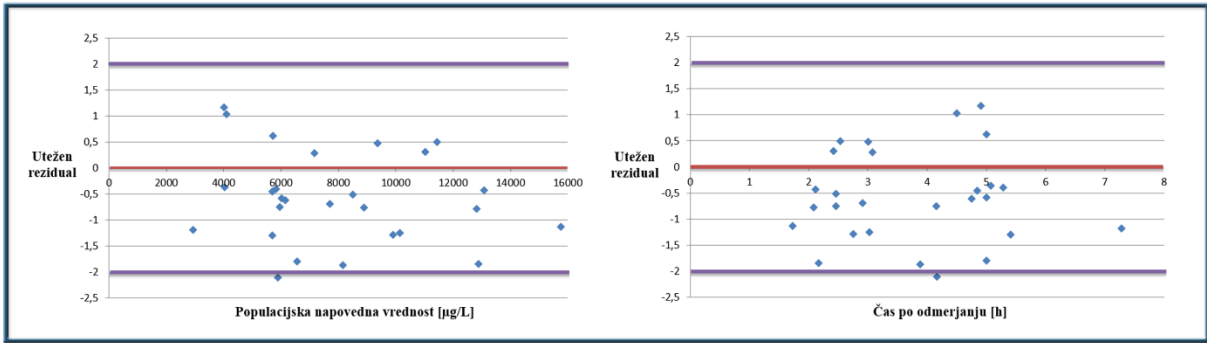
Slika 17: Individualne in populacijske napovedane vrednosti koncentracije karboplatina v odvisnosti od izmerjene vrednosti pri modelu št. 4.



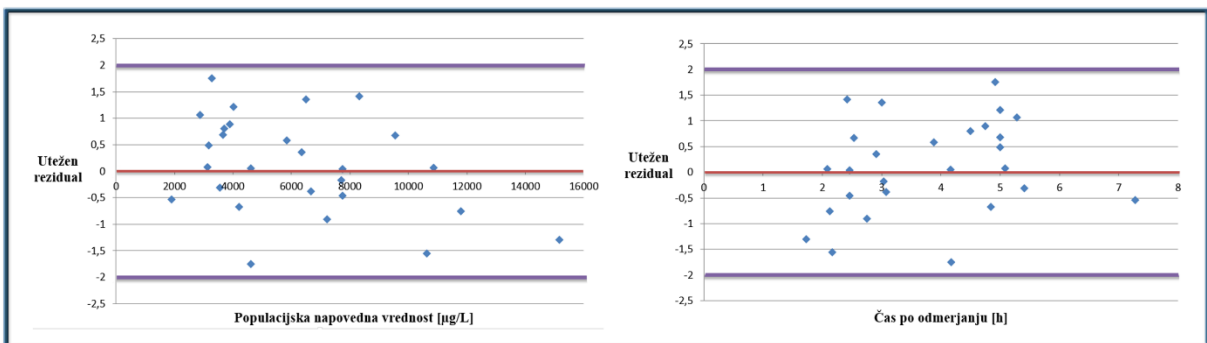
Slika 18: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedane vrednosti ter od časa odmerjanja pri modelu št. 1.



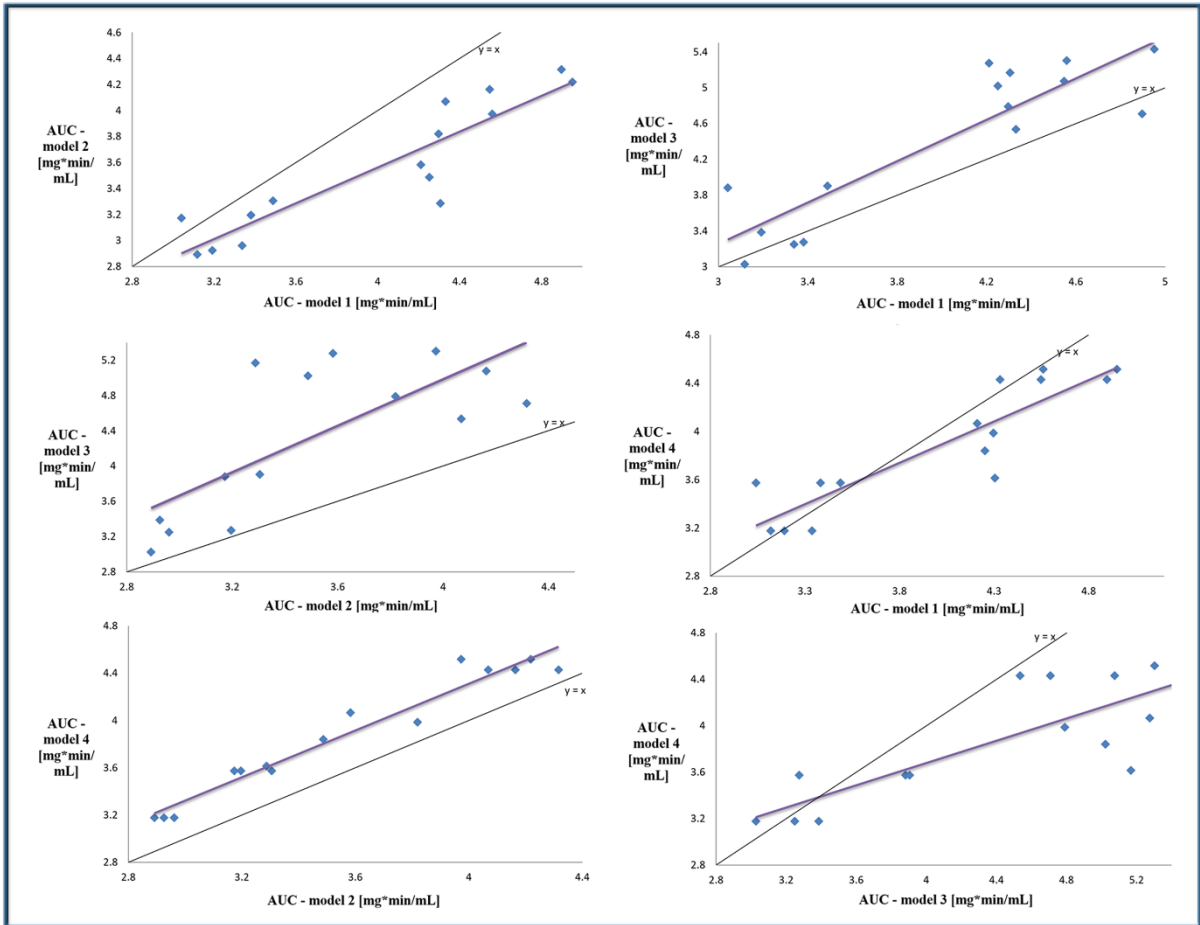
Slika 19: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedane vrednosti ter od časa odmerjanja pri modelu št. 2.



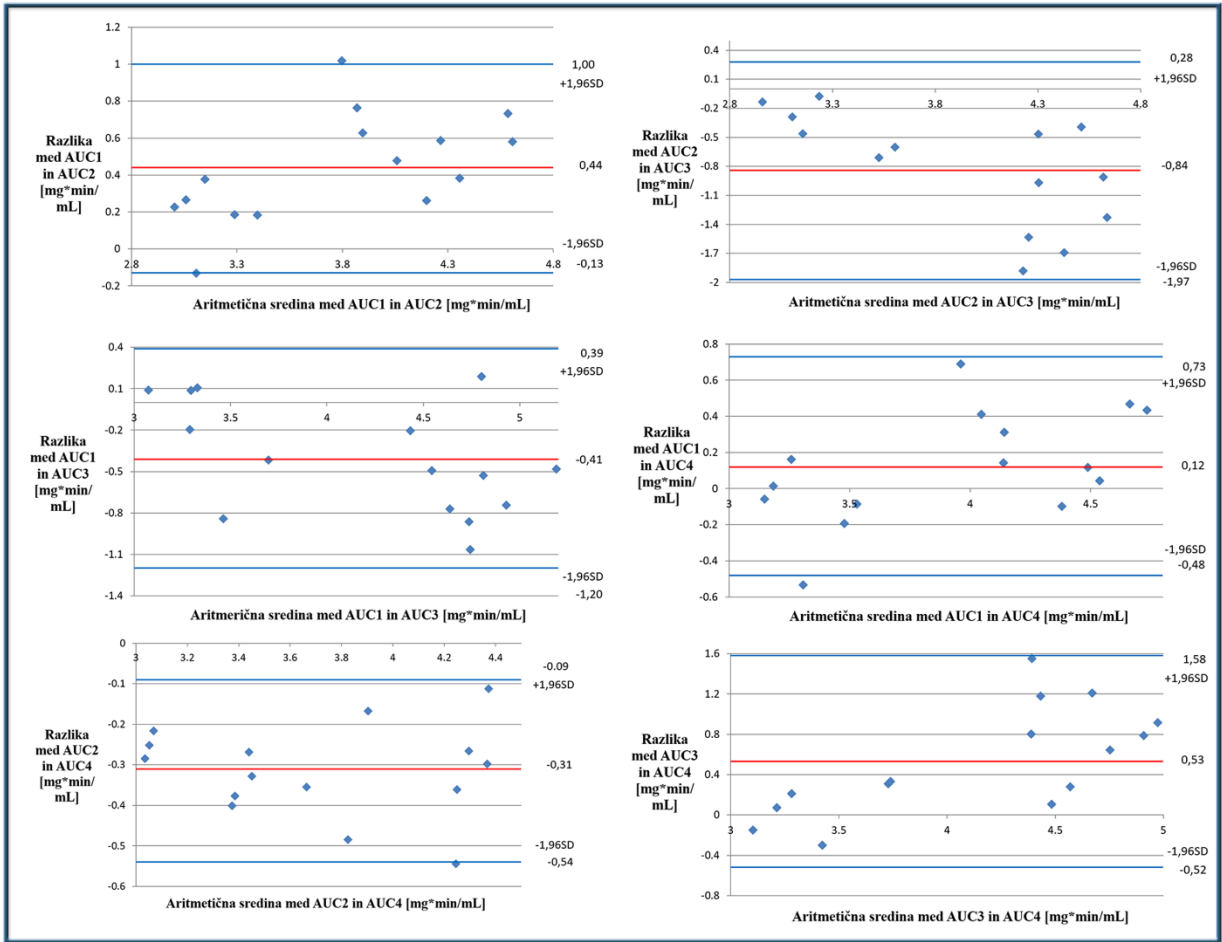
Slika 20: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedane vrednosti ter od časa odmerjanja pri modelu št. 3.



Slika 21: Odvisnost uteženih rezidualov od populacijske napovedane vrednosti ter od časa odmerjanja pri modelu št. 4.



Slika 22: Primerjava vrednosti AUC med štirimi modeli za karboplatin.



Slika 23: Bland - Altmanovi diagrami primerjave razlik med AUC štirih modelov za karboplatin.

5 RAZPRAVA

Cisplatin in karboplatin spadata v skupino alkilirajočih citostatikov s širokim spektrom aktivnosti proti malignim tumorjem (11). Citotoksični način delovanja je posledica kovalentnih interakcij z DNA ter tvorbe DNA aduktov, kar sproži kaskado signalizacijskih prenosnih poti ter aktivacijo apoptoze (23, 24). Čeprav je cisplatin zelo učinkovito protitumorsko zdravilo, resni neželeni učinki, še posebej nefrotoksičnost, vpliv na gastrointestinalni trakt, ototoksičnost in nevrotoksičnost predstavljajo omejitvene dejavnike pri odmerjanju. Karboplatin ima zaradi bolj stabilne izstopajoče skupine v primerjavi s cisplatinom nekoliko manjši toksičen vpliv; pri tretjini bolnikov se pojavi mielosupresija (12). Interindividualna farmakokinetična variabilnost pri citotoksičnih protitumorskih zdravilih je pogosto velika (41). Farmakokinetične variacije med posamezniki in znotraj osebe lahko privedejo do nepredvidljive toksičnosti in spremenljivih protitumorskih učinkov. Če so spremembe take, da pride do klinično pomembnega premika v terapevtskem indeksu, je potrebna ustrezna sprememba odmerka (42, 43). Terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin (TDM) se je izkazalo kot učinkovito orodje za zmanjšanje neželenih učinkov in optimizacijo učinka zdravljenja. TDM je pristop, kjer merjenje koncentracije učinkovine služi kot orodje za individualizacijo odmerjanja zdravila, pri katerem je korelacija med koncentracijo v krvi ter samim učinkom močnejša v primerjavi s korelacijo med odmerkom in učinkom. Prinaša hitro in lažjo določitev ustreznega novega ter vrednotenje obstoječega režima odmerjanja (40). TDM je pomembno orodje za optimizacijo terapije, vendar se v vsakdanji praksi uporablja le redko zaradi težavnosti, časa in cene analize. Cilj idealnega terapevtskega spremljanja zdravila je dosežen z izbiro ustrezne tehnike, ki je stroškovno učinkovita in zanesljiva ter dosego rezultatov, ki doprinesejo korist pacientu. Izbira cisplatina in karboplatina je upravičena zaradi določenih značilnosti zdravilne učinkovine in uporabe pri občutljivi populaciji bolnikov z rakom.

Cilj našega dela je bila določitev izpostavljenosti bolnikov cisplatinu in karboplatinu. Izmerjene koncentracije učinkovine so služile kot izhodišče za analizo farmakokinetike obeh citostatikov, določitev njunih očistkov in površine pod krivuljo, ki je bistven farmakokinetični parameter. V raziskavo smo vključili 20 bolnikov z diagnosticiranim drobnoceličnim rakom pljuč, ki so prejeli kombinirano terapijo etopozida bodisi s karboplatinom bodisi s cisplatinom v štirih do šestih ciklih. Kombinacija etopozida s karboplatinom ali cisplatinom je pogosta v veliko

kemoterapevtskih režimih. Študija, ki je raziskovala potencialne interakcije med zdravili s platino ter oksidativnim metabolizmom etopozida je odkrila, da so le-te majhne in klinični pomen verjetno nepomemben (76). Odvzemi krvi pri izbranih bolnikih so bili prilagojeni optimizaciji peroralnega odmerka etopozida pri bolnikih z drobnoceličnim rakom pljuč v doktorski disertaciji Renate Režonja Kukec (82). Posledično smo pri vseh bolnikih imeli na voljo omejeno število vzorcev, ki niso zadoščali za analizo. Zato smo naredili literaturni pregled vseh objavljenih raziskav populacijske farmakokinetike prostega cisplatina in karboplatina ter obogatili naše meritve s podatki iz sedmih objavljenih študij. Analizirali smo 139 vzorcev plazme, ki smo jih skupaj s podatki o bolnikih prejeli iz Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Plazme bolnikov so bile do analize shranjene na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V člankih, katere podatke smo uporabili za izdelavo modelov, so vzorce plazme takoj ultrafiltrirali in shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le v enem primeru so bili vzorci shranjeni na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Shranjevanje nedeproteinizirane polne krvi ali plazme pri temperaturah nad ničlo ne vpliva signifikantno na frakcijo proste učinkovine prvi dve uri. Po tem času je možno zaznati postopen padec. Johnsson in sodelavci (77) so v svoji raziskavi zaznali postopen padec proste frakcije v času 14 dni pri shrambi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, medtem ko je pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ostala koncentracija proste platine nespremenjena vsaj tri mesece. Študija je tako dokazala, da so na daljši rok nedeproteinizirani vzorci lahko shranjeni na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ več mesecev, medtem ko je temperatura $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ previsoka (77). V vseh objavljenih študijah farmakokinetike cisplatina in karboplatina so učinkovino v plazmi izmerili z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektroskopijo (ETAAS). V primerjavi z ICP-MS ima ETAAS višjo mejo detekcije, manjše območje linearnosti in podobno natančnost. Zahteva zelo majhen volumen vzorca, ne omogoča pa analize izotopov ter semikvantitativne analize. V študiji št. 2 (Chen et al) so proteine iz vzorca odstranili z metodo precipitacije s hladnim etanolom, ostali so vzorce pripravili z ultrafiltracijo. Kot ustrezni sta se skozi preverjanja izkazali obe metodi (78).

Vzorci bolnikov smo po odtajanju predhodno pripravili z ultrafiltracijo s filtri Amicon® Ultra-0.5 in tako izločili iz nadaljnjega postopka na proteine vezano učinkovino. Koncentracijo prostega cisplatina oz. karboplatina v plazmi smo določili z masno spektrometrijo z vzbujanjem v induktivno sklopljeni plazmi (ICP-MS). ICP-MS je odlična izbira za analizo elementov v sledovih zaradi zelo nizke meje detekcije (območje ppt), širokega linearnega območja, možnosti kvantifikacije v območju ppm, sposobnosti določanja izotopov in možnostjo določanja

elementne sestave različnih tipov vzorcev. Naštete lastnosti jo naredijo veliko bolj privlačno v primerjavi z drugimi metodami za določitev elementov v sledovih, kot so elektrotermalna atomizacija, plamenska atomska absorpcijska spektroskopija in optična emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo. Eden glavnih razlogov, da metoda ni bolj razširjena je njena relativno visoka cena. Kot posledica nekoliko širše uporabe v zadnjih letih, je sicer cena padla. Še zmeraj pa slovi kot zapletena tehnika, ki zahteva za izvedbo visoko usposobljeno osebo. Strošek vpeljave ostaja relativno visok. Idealno je priprava vzorca preprosta, hitra in izvedljiva na rutinski ravni. Bolj kot je priprava kompleksna, večja je možnost kontaminacije, napak in vpliva na točnost. Analiza bioloških vzorcev ni enostavna zaradi kompleksnosti sestave krvi, urina, seruma, tkiv ... Matriks vzorca lahko predstavlja problem pri pripravi vzorca, korekciji interferenc, kalibraciji in dolgoročni stabilnosti. V primerjavi z okoljskimi vzorci, ki običajno zahtevajo samo preprost dodatek kisline, je priprava biomedicinskih vzorcev bolj kompleksna. V našem primeru je zahtevala centrifugiranje, ločitev plazme od celic, ultrafiltracijo in dodatek HNO_3 . Komponente matriksa se pri ICP-MS lahko odlagajo na dele plazemskega izvora ali optičnega sistema, kar lahko sčasoma vodi do nestabilnega signala. Če analizator uporabljamo vsakodnevno, je zelo pomembno redno čiščenje in vzdrževanje. Pri vpeljavi metode mora biti posebna pozornost namenjena matriksu in spektralnim interferencam, kar lahko uspešno obvladamo z uporabo ustreznih internih standardov. Metodo odlikuje tudi hitrost, kar je posebej važno pri rutinski uporabi za namen TDM (80). Pred analizo vzorcev smo določili točnost in natančnost, kar nam je potrdilo zanesljivost same metode. Z meritvijo 12 standardnih raztopin smo izdelali umeritveno krivuljo z enačbo $y = 1158,4x - 899,43$ in determinacijskim koeficientom 0,9999, ki nakazuje na zelo močno linearno povezanost med spremenljivkama. Spodnja meja kvantifikacije je bila celo nižja od najnižje koncentracije standarda. Za korekcijo variacij v odzivu, ki so lahko posledica učinka matriksa ali samega delovanja instrumenta, smo uporabili interne standarde. Vseh 13 relativnih standardnih odklonov je znotraj dovoljenega območja. Z enačbo št. 8 smo izračunali točnost. Nekoliko večje odstopanje lahko opazimo pri meritvi prvih dveh kontrolnih vzorcev, kar lahko pripišemo nizki koncentraciji analita, ostalih 11 je v dovoljenem območju 15 %. Določili smo tudi medtedensko točnost in ponovljivost ter rezultate podali kot RSD in točnost v % (preglednica št. XV). Vsi rezultati so znotraj dovoljenih odstopanj po smernicah FDA. Za analizo farmakokinetike smo uporabili podatke iz sedmih objavljenih študij, v katerih smo

poiskali tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov (Cl , Q , V_1 , V_2 , k_{12} , k_{21}) nevezanega cisplatina in karboplatina, njihove standardne napake, interindividualne variabilnosti ter vplive sočasnih spremenljivk in jih skupaj z našimi rezultati meritev združili v modele. Vseh sedem študij je ocenjevalo tipične vrednosti Cl in V_1 , pet jih je zraven ocenilo še V_2 in Q , dve študiji pa k_{12} in k_{21} . Vse tri študije za cisplatin so ocenjevale tudi vplive sočasnih spremenljivk. Za statistično značilnega se je izkazal vpliv očistka kreatinina, BSA in ure aplikacije na očistek nevezanega cisplatina ter vpliv BSA na volumen osrednjega prostora. Za analizo populacijske farmakokinetike smo uporabili statistični program NONMEM in z metodo nelinearnega modeliranja mešanih učinkov izračunali tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov treh modelov za cisplatin ter štirih za karboplatin. Ocenili smo še interindividualno variabilnost za očistek in volumen osrednjega prostora ter rezidualno variabilnost. Vrednosti se po združitvi, razen pri očistku in volumnu perifernega prostora v modelu št. 3 za cisplatin, niso bistveno spremenile. Za cisplatin je znašal očistek po enournih infuzijah v vrstnem redu po številki modela od 1 do 3: 36,8 L/h, 28,9 L/h in 45 L/h. Za karboplatin je očistek za modele od 1 do 4 znašal: 7,17 L/h, 8,26 L/h, $Cl_{KR} * 0,81 + 1,5$ L/h in 7,34 L/h. Ustreznost razvitih modelov smo ovrednotili z grafičnimi prikazi. Z več različnimi diagrami smo primerjali individualne in populacijske napovedne vrednosti. Opazno je izrazito neujemanje med napovedanimi in izmerjenimi koncentracijami pri vseh treh modelih za cisplatin, izmerjene vrednosti so nižje v primerjavi z napovedanimi. V nasprotju s cisplatinom se premice, ki prikazujejo odvisnost napovedanih in izmerjenih vrednosti pri karboplatinu, zelo dobro prilegajo premici $x=y$. Z enačbo št. 10 smo izračunali še površino pod krivuljo pri vseh bolnikih v vsakem ciklu. Na diagramih na sliki št. 12 je opazna razlika med AUC za različne modele pri cisplatinu, medtem ko je pri karboplatinu ujemanje veliko boljše (Slika 22). Neujemanje pri cisplatinu je verjetno posledica vključenih literaturnih modelov, ki se, kljub temu da smo poskušali poiskati čim bolj podobne objavljene raziskave, med seboj razlikujejo. Ujemanje med modeli pri karboplatinu je bistveno boljše, posledično so rezultati tudi bolj zanesljivi. Trenutno ne poznamo enotnega statističnega pristopa za validacijo populacijskega farmakokinetičnega modela. Ustreznost modela bi lahko potrdili le tako, da bi po aplikaciji zdravilne učinkovine bolniku v kratkih časovnih intervalih jemali kri, izdelali plazemsko koncentracijsko krivuljo in s trapezoidno metodo izračunali AUC. Bistvena razlika med obema preiskovanima učinkovinama je v načrtovanju odmerka. Medtem ko odmerjanje cisplatina temelji samo na bolnikovi BSA, se

odmerek karboplatina izračuna po Calvertovi formuli, ki upošteva tudi bolnikovo ledvično funkcijo. Pri določitvi ustreznega odmerka karboplatina sta ključni postavljena tarčna vrednost AUC ter natančna določitev GFR, z upoštevanjem učinka kemoterapevtika in zmanjšanja mielosupresije. Ciljna vrednost pri karboplatinu je znašala 4–6 mg/mL*min. V ciljano območje pade 48 % vrednosti AUC (priloga št. 3). Pri bolniku št. 13 so vrednosti AUC nekoliko nižje. Sklepamo lahko, da je za doseg tarčnega AUC območja potrebna morebitna prilagoditev odmerka. Zraven postavitve ustreznega tarčnega območja AUC je zelo pomembna določitev hitrosti glomerulne filtracije. Zlati standard za oceno GFR je očistek od zunaj vnesenih substanc. Težavo pri tem predstavljajo aplikacija, zbiranje urina in potencialna radiotoksičnost. Najnovejše smernice priporočajo uporabo serumskega kreatinina in enačb za ocenjevanje GFR za začetno oceno. V objavljenih raziskavah prostega cisplatina in karboplatina so bile hitrosti glomerulne filtracije izračunane s Cockcroft-Gaultovo enačbo. V Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo bolnišnice Golnik izračunajo GFR z enačbo CKD-EPI in z oceno po Wrightu. Pri rakavih bolnikih se naslanjajo predvsem na slednjo, ki je bila edina razvita na populaciji bolnikov z rakom (81, 87). Pri cisplatinu je spremljanje učinkovine in interpretacija rezultatov bolj težavna, saj glavno omejitev predstavlja dejstvo, da ni postavljenega ustreznega terapevtskega območja oz. referenčnih vrednosti. Tako lahko le določimo izpostavljenost in pri tistih bolnikih z višjo izpostavljenostjo bolj pozorno spremljamo znake toksičnosti. Nefrotoksičnost je najresnejši neželeni učinek cisplatina, ki zahteva posebno prilagoditev odmerka. Tako med našimi bolniki kot tudi pri bolnikih iz objavljenih raziskav je ledvična funkcija variirala, od normalne do zmerno zmanjšane hitrosti glomerulne filtracije. V razred z zmerno zmanjšano hitrostjo glomerulne filtracije so padli trije bolniki iz naše raziskave. V njihovem primeru je že potrebna prilagoditev prvotnega odmerka, ki je znašal 80 mg/m². Izbira pravega odmerka pri takih bolnikih je težavna zaradi določanja, ki temelji samo na bolnikovi BSA. To potrjuje smiselnost terapevtskega spremljanja koncentracije cisplatina. Določitev razmerja odmerek-odziv je za onkologe včasih velik izziv. V zadnjih letih je populacijsko modeliranje farmakokinetike/farmakodinamike postalo ključno orodje za razumevanje, identifikacijo in kvantifikacijo različnih razmerij odmerek-odziv. Omogočilo je sistematično pot razvoja in uporabe modelov kot »vodnikov« v načrtovanju terapije na osnovi individualne terapevtske koncentracije.

6 SKLEPI

- Cisplatin in karboplatin sta zaradi pogostih hudih neželenih učinkov, velike interindividualne farmakokinetične variabilnosti in določanja odmerka na podlagi telesne površine pri cisplatinu ustrezna kandidata za terapevtsko spremljanje zdravilne učinkovine.
- Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo je primerna metoda za terapevtsko spremljanje cisplatina in karboplatina.
- Med napovedanimi in izmerjenimi individualnimi ter populacijskimi vrednostmi so pri cisplatinu opazne očitne razlike. Kljub zelo podobnim raziskavam, ki smo jih vključili v analizo farmakokinetike kot predhodno vedenje, so med modeli razlike. Pri karboplatinu so ujemanja med napovedanimi in izmerjenimi vrednostmi zelo dobra in posledično rezultati bolj zanesljivi.
- TDM se je izkazal za učinkovito orodje za spremljanje terapije obeh citostatikov, vrednotenje obstoječega režima odmerjanja in podporo določitvi ustreznega novega režima.

7 VIRI

1. Zadnik V, Primic Žakelj M. SLORA: Slovenija in rak. Epidemiologija in register raka. Onkološki inštitut Ljubljana. www.slora.si; dostopano: 03. 11. 2015.
2. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D et al: Interna medicina, 4. izdaja, Založba Littera Picta d. o. o. in Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 412–420.
3. Žakelj Primic M, Žagar T: Razširjenost, preprečevanje in zgodnje odkrivanje pljučnega raka. 39. strokovni seminar Pacienti in pljučni rak – trendi in novosti, Zreče, 2012.
4. Terčelj M: Zgodnje odkrivanje pljučnega raka. *Radiol Oncol* 2006; 40: 59–66.
5. Novaković S, Hočevar M, Strojani P et al: Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1 izdaja, Mladinska knjiga, 2009: 284–297.
6. American Cancer Society – What is small cell lung cancer? <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/detailedguide/small-cell-lung-cancer-what-is-small-cell-lung-cancer>; dostopano: 24. 08. 2015.
7. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/ED01BEF2A94BBAD6C1257CF8008318BE/\\$File/s-015687.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/ED01BEF2A94BBAD6C1257CF8008318BE/$File/s-015687.pdf); dostopano: 04. 08. 2015.
8. Zwitter M: Smernice za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč. Onkološki inštitut, 2006.
9. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA et al: Carboplatin Dosage: Prospective Evaluation of a Simple Formula Based on Renal Function. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7(11): 1748–1756.
10. Kukec RR, Grabnar I, Vovk T et al: Febrile neutropenia in chemotherapy treated small-cell lung cancer patients: *Radiol Oncol* 2015; 49(2): 173–180.
11. de Jongh FE, Gallo JM, Shen M et al: Population pharmacokinetics of cisplatin in adult cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54(2): 105–112.
12. Kelland L: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature* 2007; 7: 573–584.
13. Ofichem – Cisplatin. <http://www.ofichem.com/en/cytostatics-cisplatin/>; dostopano 02. 08. 2015.

14. MP – Carboplatin. <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02198873&country=190>; dostopano 02. 08. 2015.
15. Hanada K, Nishijima K, Ogata H et al: Population Pharmacokinetic Analysis of Cisplatin and Its Metabolites in Cancer Patients: Possible Misinterpretation of Covariates for Pharmacokinetic Parameters Calculated from the Concentration of Unchained Cisplatin; Ultrafiltered Platinum and Total Platinum: *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(5): 179–184.
16. Strohfeldt K: *Essentials of Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, 2015: 141.
17. Tonetti M, Giovine M, Gasparini A et al: Enhanced formation of reactive species from cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) (carboplatin) in the presence of oxygen free radicals. *Biochem Pharmacol* 1993; 46(8): 1377–1383.
18. Pubchem – Cisplatinum. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441203#section=Top>; dostopano 02. 08. 2015.
19. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7CF33CD741C445F0C12579C2003F5C2E/\\$File/s-007831.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7CF33CD741C445F0C12579C2003F5C2E/$File/s-007831.pdf); dostopano 04. 08. 2015.
20. Lokich J, Anderson N: Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature. *Annals of Oncology* 1998; 9: 13–21.
21. Schellens JHM, Mcleod HL, Newell DR: *Cancer Clinical Pharmacology*, Oxford University Press, 2005: 192.
22. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM: Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 2003; 10(3): 257–266.
23. Kim ES, Lee JJ, He G et al: Tissue platinum concentration and tumor response in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(27): 3345–3352.
24. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265–7279.
25. Antonio Conconi Lab – Cisplatin. <http://www.conconilab.ca/projects/>; dostopano 02. 08. 2015.
26. RxList – Platinol. <http://www.rxlist.com/platinol-drug.htm>; dostopano 03. 08. 2015.

27. Miller PR, Tadagavadi RK, Ramesh G et al: Mechanism of Cisplatin Nephrotoxicity: *Toxins* 2010; 2(11): 2490–2518.
28. IPCS–Inchem – Cisplatin.
[http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/cisplat.htm#PartTitle:6. KINETICS](http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/cisplat.htm#PartTitle:6.KINETICS);
dostopano: 14. 11. 2015.
29. Poplack DG, Massimo L, Cornaglia-Ferraris P: *The Role of Pharmacology in Pediatric Oncology*, Martinus Nijhoff Publishers, 1987: 20.
30. Reddy M, Yang RS, Andersen ME et al: *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Science and Application*, John Wiley & Sons, 2005: 304.
31. Rodriguez-Galindo C, Wilson MW: *Retinoblastoma*, Springer, 2010: 81.
32. Duffull SB, Robinson BA: Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin. *Clin Pharmacokinet* 1997, 33(3): 161–183.
33. RxList – Paraplatin. <http://www.rxlist.com/paraplatin-drug/clinical-pharmacology.htm>,
dostopano: 22. 03. 2016
34. Ando Y, Shimokata T, Yasuda Y, Hasegawa Y: Carboplatin dosing for adult japanese patients. *Med Sci* 2014; 76: 1–9.
35. Alberts DS, Dorr RT: New Perspectives on an Old Friend: Optimizing Carboplatin for the Treatment of Solid Tumors. *The Oncologist* 1998, 3(1): 15–34.
36. Urien S, Lokiec F: Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2004; 57(6): 756–763.
37. Loos WJ, de Jongh FE, Sparreboom A et al: Evaluation of an Alternate Dosing Strategy for Cisplatin in Patients With Extreme Body Surface Area. *American Society of Clinical Oncology* 2006; 24(10): 1499–1506.
38. O’Cearbhaill R., Sabbatini P.: *New Guidelines for Carboplatin Dosing*.
<https://www.mskcc.org/clinical-updates/new-guidelines-carboplatin-dosing>; dostopano
03. 08. 2015
39. NKDEP: Estimating Glomerular Filtration Rate. <http://nkdep.nih.gov/lab-evaluation/gfr/estimating.shtml>; dostopano 19. 08. 2015.
40. Hedaya M: *Basic Pharmacokinetics*, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2007: 263–272.

41. Paci A, Veal G, Bardin C et al: Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1-cytotoxics. *Eur J Cancer* 2014; 50(12): 2010–2019.
42. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A: *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*, 6. izdaja, The McGraw-Hill Companies, Singapore, 2012: 4–5,597–598, 753.
43. FDA – Guidance for Industry.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM072137.pdf>; dostopano: 16. 09. 2015.
44. Mould DR, Upton RN: Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2012; 1(6): 1–14.
45. Bonate PL: *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*, 2. izdaja, Springer Science-Business Media, New York, 2011: 233–236.
46. Mould DR, Upton RN: Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development –Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods 2013; 2(38): 1–14.
47. Balakrishnan N: *Methods and Applications of Statistics in Clinical Trials: Planning, Analysis and Inferential Methods*. John Wiley, Hoboken New Jersey, 2014.
48. Gibiansky L, Gibiansky E, Bauer R: Comparison of Nonmem 7.2 estimation methods and parallel processing efficiency on a target-mediated drug disposition model: *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2012; 39: 17–35.
49. Kim MG, Yim DS, Bae KS: R-based reproduction of the estimation process hidden behind NONMEM[®]. *Transl Clin Pharmacol* 2015, 23(1): 01–07.
50. ACCP – Pharmacometrics Theory. <http://accp1.org/pharmacometrics/theory.htm>;
dostopano: 06. 10. 2015.
51. Bonate PL: *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling & Simulation*, 2. izdaja, Springer 2011: 233–295.
52. Wählby U: *Methodological Studies on Covariate Model Building in Population Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Analysis*. Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 280. 2002.

53. DiPiro JT: Concepts in clinical pharmacokinetics. 5. izdaja, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, 2010: 6–9.
54. Mandle R. – Assay Validation Methods. <http://www.fws.gov/aah/PDF/QI-Terms%20and%20Defs.pdf>, dostopano: 22. 03. 2016.
55. FDA – Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods. <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/LaboratoryManual/UCM292774.pdf>, dostopano: 22. 03. 2016.
56. EMA – Guideline on bioanalytical method validation. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf; dostopano: 22. 03. 2016.
57. Protein Purification and Concentration. <https://techniquetogo.wordpress.com/>; dostopano 06. 08. 2015.
58. Merck Millipore – Amicon. <http://www.merckmillipore.com/INTL/en/life-science-research/protein-sample-preparation/protein-concentration/amicon-ultra-centrifugal-filters/0-5-ml/ytSb.qB.gZIAAFBQHplvyxn,nav>; dostopano 06. 08. 2015.
59. Merck Millipore – Amicon. http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Amicon-Ultra-0.5%C2%A0mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?bd=1#specifications; dostopano: 10. 10. 2015.
60. Cazes J: Ewing's analytical instrumentation handbook, Marcel Dekker, 3. izdaja, New York, 2005: 61–63, 440–441.
61. National Kidney Disease Education Program. <http://nkdep.nih.gov/lab-evaluation/gfr/estimating.shtml>; dostopano 19. 08. 2015.
62. Skoog D, Holler FJ, Nieman TA: Principles of Instrumental Analysis, 5. Izdaja, Brooks/Cole Thomson Learning, London, 1998: 255–262.
63. Agilent Technologies – Agilent 7500 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. http://homepage.ntu.edu.tw/~yhhwang/file/0905_4.pdf; dostopano: 31. 08. 2015.
64. Bazilio A, Weinrich J: The Easy Guide to: Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS), 2012

65. AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS – Which technique should i use?
<http://www.scribd.com/doc/152042812/AAS-GFAAS-ICP-ICP-MS-Which-Technique-Should-i-Use#scribd>; dostopano 31. 08. 2015.
66. Tyler G: ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared.
http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/OpticalSchool_CN/TN/ICP/ICP-OES__ICP-MS_and_AAS_Techniques_Compared.pdf; dostopano 31. 08. 2015.
67. Chen R, Li J, Hu WW et al: Circadian variability of pharmacokinetics of cisplatin in patients with non-small-cell lung carcinoma: analysis with the NONMEM program. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72: 1111–1123.
68. Urien S, Brain E, Bugat R et al: Pharmacokinetics of platinum after oral or intravenous cisplatin: a phase 1 study in 32 adult patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 55–60.
69. Myles PS, Cui J: Using the Bland – Altman method to measure agreement with repeated measures. *British Journal of Anaesthesia* 2007, 99(3): 309–311.
70. BSA Mosteller Formula Calculator. <https://www.easycalculation.com/medical/bsa-Mostellers.php>, dostopano: 02. 04. 2016.
71. Ekhart C, de Jonge ME, Huitema AD et al: Flat Dosing of Carboplatin Is Justified in Adult Patients with Normal Renal Function. *Clin Cancer Res* 2006; 12(21): 6502–6508.
72. Zandvliet AS, Schellens JHM, Dittrich C et al: Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to support treatment optimization of combination chemotherapy with indisulam and carboplatin. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 66(4): 485–497.
73. <http://www.public.iastate.edu/~alicia/stat328/Regression%20inference-part3.pdf>, dostopano: 22. 03. 2016
74. de Jonge ME, Huitema AD, Tukker AC et al: Accuracy, Feasibility, and Clinical Impact of Prospective Bayesian Pharmacokinetically Guided Dosing of Cyclophosphamide, Thiotepa, and Carboplatin in High-Dose Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 273–283.

75. Joerger M, Huitema AD, Richel DJ et al: Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Paclitaxel and Carboplatin in Ovarian Cancer Patients: A Study by the European Organization for Research and Treatment of Cancer- Pharmacology and Molecular Mechanisms Group and New Drug Development Group. *Clin Cancer Res* 2007; 13(21): 6410–6418.
76. Thomas HD, Porter DJ, Bartelink I et al: Randomized cross-over clinical trial to study potential pharmacokinetic interactions between cisplatin or carboplatin and etoposide. *Br J Clin Pharmacol* 2002, 53: 83–91.
77. Johnsson A, Björk H, Schütz A, Skärby T: Sample handling for determination of free platinum in blood after cisplatin exposure. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, 41(3): 248–251.
78. Ma J, Stoter G, Verweij J, Schellens JH: Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations. *Cancer Chemother. Pharmacol* 1996, 38(4): 391–394.
79. Oya R, Nakamura S, Ikemura K, Takagi S, Mugino H: AUC of Calvert's formula in targeted intra-arterial carboplatin chemotherapy for cancer of the oral cavity. *Br J Cancer* 2004, 90(11): 2062–2066.
80. Thomas R: *Practical Guide to ICP-MS*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2004: 1–5, 207–215.
81. Zoccali C, Santoro A, Plebani M: Age, stage and biomarkers for the definition of CKD: a construction in progress. *Clin Chem Lab Med* 2013, 51(10): 1919–1923.
82. Kukec Režonja R. Doktorska disertacija: Razvoj orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom. FFA. 2015.
83. Čufer T, Stanič K: Rak pljuč, plevre in timusa, Katedra za onkologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Ljubljana, 2014: 4–5.
84. Čufer T, Ovčariček T, Kern I: Pomen mutacije gena receptorja za epidermalni rastni dejavnik za zdravljenje nedrobnoceličnega raka pljuč. *Onkologija/ pregledi* 2011, 15(2): 83–87.

85. Arcaro A: Targeted therapies for small cell lung cancer: Where do we stand? *Crit Rev Oncol Hematol* 2015, 95(2): 154–164.
86. Beal SL, Sheiner LB: *NONMEM Users Guides*. Hanover (Maryland), Globomax, University of California at San Francisco, 1994: 1.
87. Trobec L, Knez L, Brguljan Meško P et al: Estimation of renal function in lung cancer patients. *Lung Cancer* 2012, 76: 397–402.
88. Jens Molecular and Nanoscale Analysis Laboratory: ICP–MS.
<http://eecelabs.seas.wustl.edu/ICP-MS.aspx>, dostopano: 31. 03. 2017.

PRILOGA 1: Podatki o aplikaciji, vzorčenju in meritvah koncentracije platine

ID	Cikel	Dogodek*	MDV**	Datum	Čas	Odmerek [mg]	Hitrost infuzije [mg/h]	Tip***	Konc. platine [µg/L]
1	2	1	1	21/11/2012	11:20	160	160	0	.
1	2	0	0	21/11/2012	12:00	0	0	0	940,06
1	2	0	0	21/11/2012	15:02	0	0	0	193,44
1	3	1	1	12/12/2012	11:35	160	160	0	.
1	3	0	0	12/12/2012	12:08	0	0	0	213,05
1	3	0	0	12/12/2012	15:06	0	0	0	91,41
1	4	1	1	03/01/2013	12:30	160	160	0	.
1	4	0	0	03/01/2013	12:45	0	0	0	83,47
1	4	0	0	03/01/2013	15:45	0	0	0	94,31
2	2	1	1	19/12/2012	11:15	140	140	0	.
2	2	0	0	19/12/2012	13:16	0	0	0	451,34
2	2	0	0	19/12/2012	16:17	0	0	0	86,52
2	3	1	1	09/01/2013	12:05	140	140	0	.
2	3	0	0	09/01/2013	12:48	0	0	0	356,79
2	3	0	0	09/01/2013	15:41	0	0	0	112,38
2	4	1	1	30/01/2013	11:40	110	110	0	.
2	4	0	0	30/01/2013	12:42	0	0	0	1863,83
2	4	0	0	30/01/2013	14:44	0	0	0	169,59
3	2	1	1	19/12/2012	11:40	160	160	0	.
3	2	0	0	19/12/2012	13:15	0	0	0	620,44
3	2	0	0	19/12/2012	16:15	0	0	0	59,71
3	3	1	1	10/01/2013	11:45	160	160	0	.
3	3	0	0	10/01/2013	12:37	0	0	0	393,98
3	3	0	0	10/01/2013	15:10	0	0	0	71,84
3	4	1	1	30/01/2013	11:40	160	160	0	.
3	4	0	0	30/01/2013	12:45	0	0	0	2524,36
3	4	0	0	30/01/2013	14:46	0	0	0	157,47
4	1	1	1	08/01/2013	12:50	160	160	0	.
4	1	0	0	08/01/2013	13:12	0	0	0	126,02
5	2	1	1	06/02/2013	11:15	140	140	0	.
5	2	0	0	06/02/2013	13:19	0	0	0	696,98
5	2	0	0	06/02/2013	15:30	0	0	0	134,76
5	3	1	1	27/02/2013	11:40	140	140	0	.
5	3	0	0	27/02/2013	13:00	0	0	0	961,98
5	3	0	0	27/02/2013	15:24	0	0	0	193,57
5	4	1	1	20/03/2013	11:35	140	140	0	.
5	4	0	0	20/03/2013	13:25	0	0	0	1750,44
5	4	0	0	20/03/2013	15:55	0	0	0	193,12
6	1	1	1	14/02/2013	12:50	120	120	0	.
6	1	0	0	14/02/2013	14:35	0	0	0	773,29
6	2	1	1	06/03/2013	12:55	400	400	1	.
6	2	0	0	06/03/2013	15:20	0	0	1	9456,64
6	3	1	1	27/03/2013	10:10	450	450	1	.
6	3	0	0	27/03/2013	12:20	0	0	1	9674,03
6	3	0	0	27/03/2013	15:10	0	0	1	4769,32
8	1	1	1	28/03/2013	13:00	160	160	0	.
8	1	0	0	28/03/2013	13:20	0	0	0	842,70
8	2	1	1	17/04/2013	11:10	160	160	0	.

8	2	0	0	17/04/2013	12:10	0	0	0	2162,28
8	2	0	0	17/04/2013	15:00	0	0	0	117,83
8	3	1	1	08/05/2013	11:25	160	160	0	.
8	3	0	0	08/05/2013	11:50	0	0	0	1206,03
8	3	0	0	08/05/2013	14:50	0	0	0	126,55
8	4	1	1	29/05/2013	11:00	160	160	0	.
8	4	0	0	29/05/2013	12:40	0	0	0	1132,26
8	4	0	0	29/05/2013	15:20	0	0	0	122,02
9	1	1	1	23/05/2013	13:05	110	110	0	.
9	1	0	0	23/05/2013	14:05	0	0	0	2612,87
10	1	1	1	06/06/2013	/****	160	160	0	.
10	1	0	0	06/06/2013	13:35	0	0	0	617,91
10	2	1	1	27/06/2013	/****	160	160	0	.
10	2	0	0	27/06/2013	13:35	0	0	0	544,60
10	2	0	0	27/06/2013	16:35	0	0	0	127,02
10	3	1	1	24/07/2013	/****	160	160	0	.
10	3	0	0	24/07/2013	13:15	0	0	0	631,58
10	3	0	0	24/07/2013	16:20	0	0	0	104,27
10	4	1	1	13/08/2013	/****	160	160	0	.
10	4	0	0	13/08/2013	12:35	0	0	0	184,79
10	4	0	0	13/08/2013	15:05	0	0	0	106,54
10	5	1	1	04/09/2013	/****	160	160	0	.
10	5	0	0	04/09/2013	11:55	0	0	0	467,74
10	5	0	0	04/09/2013	15:00	0	0	0	128,29
10	6	1	1	25/09/2013	/****	160	160	0	.
10	6	0	0	25/09/2013	12:48	0	0	0	131,13
10	6	0	0	25/09/2013	14:45	0	0	0	137,64
11	2	1	1	10/07/2013	11:10	140	140	0	.
11	2	0	0	10/07/2013	14:50	0	0	0	125,10
11	2	0	0	10/07/2013	17:40	0	0	0	105,59
11	3	1	1	31/07/2013	11:00	140	140	0	.
11	3	0	0	31/07/2013	14:20	0	0	0	134,50
11	3	0	0	31/07/2013	16:45	0	0	0	120,99
11	4	1	1	21/08/2013	11:10	140	140	0	.
11	4	0	0	21/08/2013	13:20	0	0	0	184,31
11	4	0	0	21/08/2013	14:55	0	0	0	123,03
11	5	1	1	11/09/2013	10:40	140	140	0	.
11	5	0	0	11/09/2013	12:28	0	0	0	520,60
11	5	0	0	11/09/2013	14:50	0	0	0	148,83
11	6	1	1	02/10/2013	11:25	140	140	0	.
11	6	0	0	02/10/2013	12:15	0	0	0	248,00
11	6	0	0	02/10/2013	15:00	0	0	0	136,68
12	1	1	1	04/07/2013	12:45	110	110	0	.
12	1	0	0	04/07/2013	14:10	0	0	0	364,39
12	2	1	1	24/07/2013	11:20	150	150	0	.
12	2	0	0	24/07/2013	13:10	0	0	0	294,64
12	2	0	0	24/07/2013	16:20	0	0	0	106,88
12	3	1	1	13/08/2013	11:15	150	150	0	.
12	3	0	0	13/08/2013	12:30	0	0	0	462,81
12	3	0	0	13/08/2013	15:00	0	0	0	121,09
12	4	1	1	04/09/2013	11:10	150	150	0	.
12	4	0	0	04/09/2013	12:00	0	0	0	631,67

12	4	0	0	04/09/2013	14:57	0	0	0	156,52
12	5	1	1	25/09/2013	09:35	400	400	1	.
12	5	0	0	25/09/2013	12:20	0	0	1	8427,58
12	5	0	0	25/09/2013	14:35	0	0	1	5280,68
12	6	1	1	16/10/2013	09:35	400	400	1	.
12	6	0	0	16/10/2013	12:35	0	0	1	9010,24
12	6	0	0	16/10/2013	14:52	0	0	1	5220,22
13	1	1	1	05/07/2013	10:40	450	450	1	.
13	1	0	0	05/07/2013	14:50	0	0	1	3485,50
13	2	1	1	31/07/2013	10:20	450	450	1	.
13	2	0	0	31/07/2013	14:30	0	0	1	4358,13
13	2	0	0	31/07/2013	17:37	0	0	1	1587,71
13	3	1	1	21/08/2013	10:20	450	450	1	.
13	3	0	0	21/08/2013	13:25	0	0	1	6059,81
13	4	1	1	25/09/2013	09:35	400	400	1	.
13	4	0	0	25/09/2013	12:30	0	0	1	6159,78
13	4	0	0	25/09/2013	14:40	0	0	1	2975,78
13	5	1	1	16/10/2013	09:50	400	400	1	.
13	5	0	0	16/10/2013	12:18	0	0	1	7361,12
13	5	0	0	16/10/2013	14:45	0	0	1	3866,27
13	6	1	1	06/11/2013	09:50	400	400	1	.
13	6	0	0	06/11/2013	12:18	0	0	1	7065,53
13	6	0	0	06/11/2013	14:20	0	0	1	3843,62
14	1	1	1	10/07/2013	12:30	110	110	0	.
14	1	0	0	10/07/2013	15:10	0	0	0	151,62
14	2	1	1	07/08/2013	11:35	110	110	0	.
14	2	0	0	07/08/2013	13:35	0	0	0	228,95
14	2	0	0	07/08/2013	16:25	0	0	0	224,59
14	3	1	1	28/08/2013	11:45	110	110	0	.
14	3	0	0	28/08/2013	12:47	0	0	0	573,59
14	3	0	0	28/08/2013	15:45	0	0	0	109,74
14	4	1	1	18/09/2013	11:30	110	110	0	.
14	4	0	0	18/09/2013	12:20	0	0	0	1037,16
14	4	0	0	18/09/2013	16:09	0	0	0	93,96
14	5	1	1	09/10/2013	11:50	110	110	0	.
14	5	0	0	09/10/2013	13:03	0	0	0	379,67
14	6	1	1	06/11/2013	11:20	110	110	0	.
14	6	0	0	06/11/2013	12:32	0	0	0	303,76
14	6	0	0	06/11/2013	14:38	0	0	0	107,52
15	1	1	1	11/07/2013	12:40	130	130	0	.
15	1	0	0	11/07/2013	14:05	0	0	0	502,67
15	2	1	1	07/08/2013	11:40	130	130	0	.
15	2	0	0	07/08/2013	13:40	0	0	0	434,29
15	2	0	0	07/08/2013	16:28	0	0	0	122,26
15	3	1	1	28/08/2013	11:55	130	130	0	.
15	3	0	0	28/08/2013	12:38	0	0	0	855,04
15	3	0	0	28/08/2013	15:40	0	0	0	133,57
15	4	1	1	19/09/2013	11:40	130	130	0	.
15	4	0	0	19/09/2013	12:00	0	0	0	1074,08
15	4	0	0	19/09/2013	14:35	0	0	0	168,92
15	5	1	1	09/10/2013	11:25	130	130	0	.
15	5	0	0	09/10/2013	13:00	0	0	0	445,42

15	6	1	1	06/11/2013	11:15	130	130	0	.
15	6	0	0	06/11/2013	12:38	0	0	0	358,15
15	6	0	0	06/11/2013	15:15	0	0	0	138,61
16	1	1	1	26/07/2013	12:05	160	160	0	.
16	1	0	0	26/07/2013	14:07	0	0	0	370,09
16	2	1	1	21/08/2013	11:10	160	160	0	.
16	2	0	0	21/08/2013	13:30	0	0	0	210,57
16	2	0	0	21/08/2013	14:50	0	0	0	118,00
16	3	1	1	11/09/2013	11:20	160	160	0	.
16	3	0	0	11/09/2013	12:25	0	0	0	1343,55
16	3	0	0	11/09/2013	14:45	0	0	0	130,99
17	1	1	1	22/08/2013	12:50	160	160	0	.
17	1	0	0	22/08/2013	13:37	0	0	0	562,09
17	2	1	1	11/09/2013	11:20	160	160	0	.
17	2	0	0	11/09/2013	12:35	0	0	0	1364,95
17	2	0	0	11/09/2013	14:55	0	0	0	161,33
17	3	1	1	02/10/2013	10:05	450	450	1	.
17	3	0	0	02/10/2013	12:10	0	0	1	11259,18
17	3	0	0	02/10/2013	14:50	0	0	1	4997,50
17	4	1	1	23/10/2013	09:00	500	500	1	.
17	4	0	0	23/10/2013	12:02	0	0	1	8332,48
17	4	0	0	23/10/2013	14:25	0	0	1	4158,28
17	5	1	1	13/11/2013	09:40	500	500	1	.
17	5	0	0	13/11/2013	11:47	0	0	1	11649,95
17	5	0	0	13/11/2013	14:30	0	0	1	4664,08
17	6	1	1	04/12/2013	09:20	500	500	1	.
17	6	0	0	04/12/2013	11:52	0	0	1	10621,94
17	6	0	0	04/12/2013	14:20	0	0	1	5334,88
18	1	1	1	29/08/2013	13:00	150	150	0	.
18	1	0	0	29/08/2013	13:35	0	0	0	1649,16
18	2	1	1	25/09/2013	11:15	150	150	0	.
18	2	0	0	25/09/2013	12:27	0	0	0	308,99
18	2	0	0	25/09/2013	14:37	0	0	0	116,64
18	3	1	1	16/10/2013	12:00	150	150	0	.
18	3	0	0	16/10/2013	12:07	0	0	0	43,91
18	3	0	0	16/10/2013	15:09	0	0	0	241,65
18	4	1	1	06/11/2013	11:05	150	150	0	.
18	4	0	0	06/11/2013	12:15	0	0	0	764,64
18	4	0	0	06/11/2013	14:25	0	0	0	144,27
18	5	1	1	27/11/2013	11:50	150	150	0	.
18	5	0	0	27/11/2013	14:08	0	0	0	501,92
19	2	1	1	13/11/2013	11:30	160	160	0	.
19	2	0	0	13/11/2013	11:53	0	0	0	1787,75
19	2	0	0	13/11/2013	15:38	0	0	0	139,63
19	3	1	1	04/12/2013	11:05	160	160	0	.
19	3	0	0	04/12/2013	11:30	0	0	0	167,58
19	3	0	0	04/12/2013	14:18	0	0	0	153,83
19	4	1	1	03/01/2014	11:25	160	160	0	.
19	4	0	0	03/01/2014	12:08	0	0	0	1855,02
19	4	0	0	03/01/2014	15:04	0	0	0	193,41
19	5	1	1	29/01/2014	10:45	500	500	1	.
19	5	0	0	29/01/2014	12:29	0	0	1	12273,47

19	5	0	0	29/01/2014	14:38	0	0	1	6073,93
20	1	1	1	28/11/2013	12:45	120	120	0	.
20	1	0	0	28/11/2013	13:43	0	0	0	16174,02
20	2	1	1	18/12/2013	11:05	120	120	0	.
20	2	0	0	18/12/2013	12:15	0	0	0	657,26
20	2	0	0	18/12/2013	14:35	0	0	0	109,39
20	3	1	1	08/01/2014	11:20	110	110	0	.
20	3	0	0	08/01/2014	11:58	0	0	0	1202,36
20	3	0	0	08/01/2014	14:42	0	0	0	105,43
20	4	1	1	29/01/2014	11:25	110	110	0	.
20	4	0	0	29/01/2014	14:37	0	0	0	155,35
20	5	1	1	19/02/2014	11:00	110	110	0	.
20	5	0	0	19/02/2014	12:55	0	0	0	364,62
20	6	1	1	19/03/2014	10:55	110	110	0	.
20	6	0	0	19/03/2014	14.45	0	0	0	155,82

*dogodek: 1=aplikacija platine, 0=vzorčenje; ** MDV: 1=ni meritve koncentracije, 0=meritev koncentracije; ***tip: 0=cisplatin, 1=karboplatin; ****pri bolniku št. 10 manjkajo podatki o času aplikacije platine

PRILOGA 2: Rezultati analize populacijske farmakokinetike cisplatina

ID	CIKEL	Očistek [L/h]			AUC [mg*min/mL]		
		Model 1	Model 2	Model 3	Model 1	Model 2	Model 3
1	1	45,3	29,6	56,1	0,212	0,324	0,171
1	2	50,2	38,7	64,9	0,191	0,248	0,148
1	3	52,2	38,9	65,4	0,184	0,247	0,147
1	4	54,3	39,2	66,6	0,177	0,245	0,144
2	1	34,7	26,8	39,8	0,242	0,313	0,211
2	2	41,0	35,7	49,0	0,205	0,235	0,171
2	3	40,6	35,7	49,0	0,207	0,236	0,172
2	4	40,7	35,4	48,1	0,162	0,187	0,137
3	1	46,8	29,1	52,4	0,205	0,330	0,183
3	2	56,1	41,0	56,3	0,171	0,234	0,170
3	3	55,2	41,1	56,7	0,174	0,233	0,169
3	4	54,4	41,1	56,7	0,177	0,233	0,169
4	1	50,3	33,3	58,2	0,191	0,289	0,165
5	1	36,7	26,3	37,0	0,229	0,319	0,227
5	2	32,3	29,6	30,7	0,260	0,284	0,274
5	3	32,9	29,7	31,0	0,255	0,283	0,271
5	4	35,0	30,0	31,7	0,240	0,280	0,265
6	1	41,1	33,9	49,3	0,175	0,212	0,146
8	1	54,4	39,1	58,1	0,176	0,246	0,165
8	2	48,1	38,6	56,5	0,199	0,249	0,170
8	3	49,5	38,5	56,2	0,194	0,249	0,171
8	4	51,6	38,6	56,5	0,186	0,249	0,170
9	1	36,2	31,2	44,3	0,182	0,212	0,149
11	1	41,9	26,2	36,6	0,200	0,320	0,229
11	2	35,7	33,6	45,0	0,235	0,250	0,186
11	3	36,7	32,9	42,9	0,229	0,256	0,196
11	4	36,5	33,0	43,3	0,230	0,254	0,194
11	5	37,1	33,2	43,8	0,226	0,253	0,192
11	6	36,2	33,3	44,3	0,232	0,252	0,190
12	1	47,2	37,5	64,4	0,140	0,176	0,102
12	2	47,3	37,4	63,9	0,190	0,241	0,141
12	3	44,6	37,3	63,4	0,202	0,242	0,142
12	4	42,7	37,0	62,5	0,211	0,243	0,144
14	1	35,4	32,7	57,1	0,186	0,202	0,116
14	2	38,0	32,8	57,7	0,174	0,201	0,114
14	3	39,9	33,3	59,7	0,165	0,198	0,111
14	4	39,0	33,4	60,1	0,169	0,198	0,110
14	5	39,4	33,5	60,6	0,168	0,197	0,109
14	6	39,4	33,5	60,6	0,168	0,197	0,109

15	1	40,1	35,8	50,0	0,194	0,218	0,156
15	2	40,2	36,0	50,5	0,194	0,217	0,154
15	3	38,6	36,0	50,5	0,202	0,217	0,154
15	4	39,3	36,0	50,6	0,198	0,217	0,154
15	5	37,8	36,1	51,0	0,206	0,216	0,153
15	6	37,3	36,1	51,0	0,209	0,216	0,153
16	1	54,8	40,2	57,7	0,175	0,239	0,166
16	2	52,7	39,9	56,8	0,182	0,241	0,169
16	3	51,6	39,6	55,9	0,186	0,242	0,172
17	1	51,0	36,4	60,3	0,188	0,263	0,159
17	2	46,6	36,2	59,4	0,206	0,265	0,162
18	1	46,2	38,2	63,5	0,195	0,235	0,142
18	2	45,0	38,5	64,6	0,200	0,234	0,139
18	3	43,5	38,1	62,9	0,207	0,236	0,143
18	4	44,9	37,9	62,3	0,201	0,237	0,144
18	5	44,9	37,9	62,3	0,200	0,237	0,144
19	1	43,7	29,3	54,3	0,219	0,327	0,177
19	2	47,8	36,9	64,3	0,201	0,260	0,149
19	3	48,6	37,2	65,2	0,197	0,258	0,147
19	4	47,3	37,2	65,2	0,203	0,258	0,147
20	1	27,3	22,9	27,4	0,264	0,314	0,263
20	2	35,4	33,5	34,8	0,203	0,215	0,207
20	3	33,9	33,1	33,8	0,195	0,200	0,195
20	4	33,6	33,3	34,3	0,196	0,198	0,192
20	5	35,0	33,5	34,8	0,189	0,197	0,190
20	6	33,9	33,5	34,8	0,195	0,197	0,190

PRILOGA 3: Rezultati analize populacijske farmakokinetike karboplatina

ID	CIKEL	Očistek [L/h]				AUC [mg*min/mL]			
		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
6	2	5,57	7,30	4,64	6,64	4,31	3,29	5,17	3,62
6	3	6,41	7,54	5,12	6,64	4,21	3,58	5,28	4,07
12	5	5,26	6,04	4,53	5,31	4,56	3,97	5,30	4,52
12	6	4,85	5,69	4,42	5,31	4,95	4,22	5,43	4,52
13	1	8,88	8,51	6,96	7,55	3,04	3,17	3,88	3,57
13	2	7,74	8,17	6,91	7,55	3,49	3,31	3,91	3,57
13	3	7,99	8,45	8,25	7,55	3,38	3,20	3,27	3,57
13	4	7,52	8,20	7,09	7,55	3,19	2,93	3,39	3,18
13	5	7,19	8,11	7,39	7,55	3,34	2,96	3,25	3,18
13	6	7,70	8,30	7,93	7,55	3,12	2,89	3,03	3,18
17	3	6,28	7,07	5,64	6,77	4,30	3,82	4,79	3,99
17	4	6,60	7,21	5,91	6,77	4,55	4,16	5,08	4,43
17	5	6,93	7,37	6,61	6,77	4,33	4,07	4,54	4,43
17	6	6,13	6,95	6,37	6,77	4,90	4,32	4,71	4,43
19	5	7,06	8,60	5,97	7,81	4,25	3,49	5,02	3,84