

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ŠTEGER

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ŠTEGER

**POPULACIJSKI FARMAKOKINETIČNI MODEL
AKTIVNEGA METABOLITA LEFLUNOMIDA IN
VREDNOTENJE VPLIVA GENSKIH POLIMORFIZMOV V
NJEGOVI PRESNOVI Z RANDOMIZACIJSKIM TESTOM**

**A POPULATION PHARMACOKINETIC MODEL OF THE
ACTIVE METABOLITE OF LEFLUNOMIDE AND
EVALUATION OF THE INFLUENCE OF GENETIC
POLYMORPHISMS IN ITS METABOLISM WITH
RANDOMIZATION TEST**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Iztoka Grabnarja.

Za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju,izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju. Hvala tudiizr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič in doc. dr. Tomažu Bratkoviču za pregled diplomske naloge in predloge popravkov.

Ata, mama, Luka, hvala vam. Za vse.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

Katja Šteger

VSEBINA

POVZETEK.....	2
SEZNAM OKRAJŠAV.....	4
1. UVOD.....	9
1.1 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIČNA ANALIZA IN PRIMERJAVA S TRADICIONALNIMI METODAMI.....	9
1.1.1 <i>Nelinearni model mešanih učinkov</i>	10
1.1.2 <i>Testiranje vpliva sočasnih spremenljivk</i>	12
1.1.3 <i>Sklepna statistika in neparametrični testi</i>	14
1.2 REVMATOIDNI ARTRITIS: PATOGENEZA IN FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE.....	15
1.2.1 <i>Revmatoidni artritis</i>	15
1.2.2 <i>Zdravljenje revmatoidnega artritisa</i>	16
1.2.3 <i>Leflunomid</i>	18
2. NAMEN DELA	24
3. MATERIALI IN METODE.....	25
3.1 KLINIČNA RAZISKAVA	25
3.2 OSNOVNI MODEL	26
3.2.1 <i>Programska oprema</i>	26
3.2.2 <i>Določanje parametrov z NONMEM</i>	27
3.2.3 <i>Razvoj osnovnega modela</i>	29
3.3 TESTIRANJE VPLIVA SOČASNIH SPREMENLJIVK	30
3.4 ANALIZA VARIANCE ENEGA FAKTORJA.....	33
3.5 NEPARAMETRIČNA BOOTSTRAP-METODA	34
3.6 RANDOMIZACIJSKI TEST.....	35
4. REZULTATI.....	37
4.1 PODATKI O BOLNIKI.....	37
4.2 RAZVOJ OSNOVNEGA MODELA	39
4.3 VPLIV SOČASNIH SPREMENLJIVK	43
4.4 RANDOMIZACIJSKI TEST.....	52
5. RAZPRAVA	55
6. SKLEP.....	59
7. LITERATURA IN VIRI	60

POVZETEK

Pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, ki se zdravijo z leflunomidom, prihaja do velikih interindividualnih razlik v plazemskih koncentracijah njegovega aktivnega metabolita, A77 1726. Po podatkih iz rutinske klinične prakse zaradi neučinkovitosti, predvsem pa neželenih učinkov leflunomida, zdravljenje v prvem letu opusti kar 40-70 % bolnikov. V diplomski nalogi smo z namenom potrditve izsledkov nedavnih študij, ki dokazujejo vpliv polimorfizma genov za citokrome P450 CYP 1A2, CYP 2C19 in CYP 2C9 na učinkovitost in toksičnost leflunomida, razvili populacijski farmakokinetični model A77 1726. Pri populacijski farmakokinetični analizi smo upoštevali podatke 69 bolnikov z revmatoidnim artritisom, ki se z leflunomidom v povprečju zdravijo že 3,4 leta. Za razvoj modela smo uporabili programsko orodje NONMEM. Predpostavili smo enoprostorni model in 1. red absorpcije ter izbrali aproksimacijsko metodo FOCE INTER, ki vključuje interakcijo med interindividualno in intraindividualno variabilnostjo. Pred posamičnim testiranjem sočasnih spremenljivk smo z enofaktorsko analizo variance (ANOVA), ki smo jo izvedli s pomočjo programa SPSS, identificirali tiste genske polimorfizme in njihove interakcije, ki imajo značilen vpliv na interindividualno variabilnost navideznega peroralnega očistka. Najustreznejši model smo izbrali na podlagi testa razmerja verjetja, ujemanje napovedanih in izmerjenih vrednosti pa dodatno preverili z grafično analizo. Model smo ovrednotili tudi glede na krčenje variabilnosti in parametrični ter neparametrični 95 % interval zaupanja ocen parametrov. S končnim modelom smo ocenili vrednost geometrične sredine navideznega očistka ter navideznega volumna porazdelitve: Cl/F je znašal 0,0267 L/h, V_d/F pa 22,9 L. Interindividualna variabilnost Cl/F je bila 54,8 %. V končni model smo vključili vpliv spola na navidezni volumen porazdelitve ter vpliva združenih genotipov *CYP 2C19* *1/*2 in *2/*17 in njune interakcije s *CYP 1A2* AA na navidezni očistek. Značilnost vključenih sočasnih spremenljivk smo preverili z randomizacijskim testom. Izvedli smo 1000 in 5000 ponovitev procesa randomizacije, a rezultat se ni bistveno spremenil. Ugotovili smo, da vključitev vpliva spola na navidezni volumen porazdelitve značilno zniža vrednost objektivne funkcije (OFV), interakcija med *CYP 1A2* AA in *CYP 2C19* *1/*2 oz. *2/*17 pa značilno poveča navidezni očistek.

Ključne besede:

- populacijska farmakokinetika,
- leflunomid,
- genski polimorfizem,
- randomizacijski test.

Keywords:

- population pharmacokinetics,
- leflunomide,
- genetic polymorphism,
- randomization test.

SEZNAM OKRAJŠAV

A77 1726	aktivni metabolit leflunomida (teriflunomid)
ADCC	od protiteles odvisna celična citotoksičnost (<i>ang. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AGE	starost
ALT	alanin aminotransferaza (alanin transaminaza)
Ang.	angleško
ANOVA	analiza variance (<i>ang. analysis of variance</i>)
AST	aspartat-aminotransferaza (aspartat-transaminaza)
AWK	programski jezik, namenjen obdelavi besedilnih datotek
BSA	telesna površina (<i>ang. body surface area</i>)
BSS	vsota kvadratov med skupinami (<i>ang. between sum of squares</i>)
CDC	od komplementa odvisna celična citotoksičnost (<i>ang. complement-dependent cytotoxicity</i>)
CDD	orodje v PsN za odkrivanje osamelcev (<i>ang. case deletion diagnostics</i>)
CI	interval zaupanja (<i>ang. confidence interval</i>)
Cl	očistek (<i>ang. clearance</i>)
C _{obs, ij}	izmerjena koncentracija
COV	sočasna spremenljivka (<i>ang. covariate</i>)
COX	ciklooksigenaza (<i>ang. cyclooxygenase</i>)
C _{pred, ij}	napovedana koncentracija

C _{ss}	koncentracija aktivnega metabolita leflunomida v plazmi v stacionarnem stanju
CV	koeficient variacije (<i>ang. coefficient of variation</i>)
CWRESI	uteženi reziduali (<i>ang. conditionally weighted residuals with interaction</i>)
CYP 450	citokrom P450
df	stopnja prostosti (<i>ang. degree of freedom</i>)
DHODH	dihidroorotat-dehidrogenaza
DMARD	imunomodulirajoče protirevmatične učinkovine (<i>ang. disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
DV	izmerjena koncentracija – odvisna spremenljivka (<i>ang. dependent variable</i>)
F	obseg absorpcije
FO	metoda aproksimacije prvega reda (<i>ang. first-order approximation</i>)
FOCE	metoda aproksimacije prvega reda s pogojem (<i>ang. first-order conditional estimation</i>)
FOCEI	metoda aproksimacije prvega reda s pogojem in interakcijo (<i>ang. first-order conditional estimation with interaction</i>)
GFR	hitrost glomerulne filtracije (<i>ang. glomerular filtration rate</i>)
HLA	človeški levkocitni antigen (<i>ang. human leukocyte antigen</i>)
HT	telesna višina (<i>ang. height</i>)
IL	interlevkin
IPRED	napovedana koncentracija pri posameznem bolniku (<i>ang. individual predicted</i>)

ITM	indeks telesne mase
IWRES	individualni utežen rezidual (<i>ang. individual weighted residual</i>)
k_a	hitrostna konstanta absorpcije
k_{el}	hitrostna konstanta eliminacije
LF	leflunomid
LRT	test razmerja verjetja (<i>ang. likelihood ratio test</i>)
MDRD	enačba za pretvorbo koncentracije serumskega kreatinina v kreatininski očistek oz. hitrost glomerulne filtracije (<i>ang. Modification of Diet in Renal Disease</i>)
MED	metilprednizolon (Medrol)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (poglavitni kompleks tkivne skladnosti, <i>ang. major histocompatibility complex</i>)
MS	srednji kvadrat (<i>ang. mean square</i>)
MTX	metotreksat
NM-TRAN	prevajalnik ukazov in podatkovni predprocesor v NONMEM (<i>ang. NONMEM translator</i>)
NONMEM	programsko orodje, namenjeno populacijski farmakokinetični in/ali farmakodinamični analizi (<i>ang. nonlinear mixed effect modeling</i>)
NSAID	nesteroidne protivnetne učinkovine (<i>ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
OFV	vrednost objektivne funkcije (<i>ang. objective function value</i>)
PRED	povprečna napovedana koncentracija v populaciji bolnikov (<i>ang. population predicted</i>)

PREDPP	zmogljiv paket podprogramov, ki jih NONMEM lahko uporabi za izračun ocen populacijskih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih parametrov (<i>ang. prediction for population pharmacokinetics</i>)
PsN	Perl-Speaks NONMEM
RA	revmatoidni artritis
SCR	koncentracija kreatinina v serumu
SE	standardna napaka (<i>ang. standard error</i>)
Sig.	statistična značilnost (<i>ang. statistical significance</i>)
SS	vsota kvadratov (<i>ang. sum of squares</i>)
SX	spol (<i>ang. sex</i>)
$t_{1/2}$	razpolovni čas (biološka razpolovna doba)
TAD	čas po odmerku (<i>ang. time after dose</i>)
TFMA	4-trifluorometilanilin
$t_{\max}$	čas, v katerem se doseže najvišja plazemska koncentracija ($C_{\max}$)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (<i>ang. tumor necrosis factor</i>)
TOB	kajenje (tobak)
TS	tubulna sekrecija
TSS	skupna vsota kvadratov (<i>ang. total sum of squares</i>)
V_d	volumen porazdelitve (<i>ang. volume of distribution</i>)
WFN	Wings for NONMEM
WSS	vsota kvadratov znotraj skupin (<i>ang. within sum of squares</i>)
WT	telesna masa (<i>ang. weight</i>)

ε	rezidualna variabilnost
η	naključna interindividualna variabilnost
θ	povprečna vrednost parametra v populaciji

1. UVOD

1.1 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIČNA ANALIZA IN PRIMERJAVA S TRADICIONALNIMI METODAMI

Populacijska farmakokinetika je preučevanje farmakokinetike v izbrani populaciji, kjer je z uporabo nelinearnih modelov mešanih učinkov omogočena hkratna analiza podatkov vseh posameznikov v populaciji. Primarni cilj populacijske farmakokinetike je poiskati model, ki bi povezoval koncentracijo učinkovine z njenim odmerkom in s sočasnimi spremenljivkami posameznika, sekundarni cilj pa je kvantitativno oceniti povprečne (tipične) vrednosti farmakokinetičnih parametrov in njihovo variabilnost ter poiskati izvor variabilnosti. Populacijski farmakokinetični modeli so uporabni pri načrtovanju terapije in smernic za optimizacijo/individualizacijo odmerjanja (1, 2).

Tradicionalne farmakokinetične študije običajno vključujejo pogosto vzorčenje (včasih tudi 10 vzorcev na posameznika) v majhni in večinoma homogeni populaciji zdravih prostovoljcev ali izbranih pacientov z relativno enostavnim režimom odmerjanja. Podatke analiziramo s standardno dvostopenjsko metodo (*ang. Standard Two-Stage*), pri kateri v prvi stopnji z uporabo nelinearne regresije izračunamo farmakokinetične parametre za vsakega posameznika, ki jih nato v drugi stopnji uporabimo pri računanju srednjih vrednosti, standardnih deviacij, koeficientov variacije, varianc in kovarianc v populaciji. Prevladuje osredotočenost na učinek posameznega dejavnika na farmakokinetiko učinkovine (2, 3).

Prvotni namen populacijskega pristopa k vrednotenju farmakokinetike je bil analizirati rutinsko zbrane klinične podatke iz velike populacije heterogenih posameznikov, sedaj pa ga pogosteje uporabljamo v kliničnih študijah. V populacijski farmakokinetični analizi podatke vseh posameznikov analiziramo sočasno, kljub temu pa razlikujemo med interindividualnimi in intraindividualnimi vplivi. Istočasno določimo srednje vrednosti farmakokinetičnih parametrov in njihovo variabilnost (2).

Načrt populacijske farmakokinetične študije dovoljuje veliko in heterogeno populacijo z različnim številom vzorcev na posameznika, torej skope in/ali bogate podatke. Tak pristop omogoča pridobitev ocen farmakokinetičnih parametrov tudi za posameznike z nezadostnimi podatki, ki bi bili v tradicionalnih študijah izključeni. Poleg tega redkejše vzorčenje omogoča izvedbo farmakokinetičnih raziskav v posebnih populacijah, kjer je

zaradi etičnih in medicinskih načel število vzorcev na posameznika omejeno (novorojenci, starostniki, bolniki z rakom, bolniki na intenzivni negi, pogosto bolni) (3, 4).

Eden glavnih ciljev populacijske farmakokinetike je vključevanje sočasnih spremenljivk v osnovni model. Sočasne spremenljivke so spremenljivke, značilne za posameznika, ki vplivajo na farmakokinetično variabilnost. Z zvezo med farmakokinetičnimi parametri in sočasnimi spremenljivkami razložimo, zakaj se farmakokinetika razlikuje med posamezniki, poleg tega pa lahko identificiramo tudi podskupine v populaciji, pri katerih obstaja tveganje za neučinkovite ali toksične koncentracije, in jim nato prilagodimo odmerek (2).

V nasprotju s tradicionalnim si populacijski farmakokinetični pristop prizadeva pridobiti farmakokinetične podatke pacientov, ki so reprezentativni za izbrano populacijo. Poleg tega omogoča točnejšo oceno variabilnosti, izvor variabilnosti pa prepozna kot pomemben dejavnik za identifikacijo in kvantifikacijo tekom razvoja ali vrednotenja zdravila. Glavna ovira populacijskega pristopa je zahtevnost matematičnih in statističnih metod, ki jih uporabljamo za ocenjevanje farmakokinetičnih parametrov, in posledično pomanjkanje izurjenih strokovnjakov na tem področju (1, 4, 5).

1.1.1 NELINEARNI MODEL MEŠANIH UČINKOV

V populacijski farmakokinetiki uporabljamo nelinearni model mešanih učinkov, tj. kombinacijo stalnih in naključnih učinkov. Osnova nelinearnega modeliranja mešanih učinkov je enostopenjski pristop, kar pomeni, da vse parametre določamo simultano. Namen takšne analize je:

- določiti populacijske in individualne farmakokinetične parametre ter interindividualno in rezidualno variabilnost,
- identificirati in raziskati vire variabilnosti (3).

Populacijski farmakokinetični model lahko razdelimo na tri podmodele: strukturnega, statističnega (stohastičnega) in kovariatnega (2, 6).

Strukturni podmodel je osnovna struktura procesa, ki predstavlja najbolj reprezentativnega (tipičnega) posameznika v populaciji. Vsebuje deskriptorje procesa (npr. farmakokinetične parametre), ki se od posameznika do posameznika razlikujejo. Vzrok takšnega variiranja znotraj populacije so znane, izmerljive lastnosti posameznika, imenovane stalni učinki. Označujemo jih z grško črko θ (1, 7).

Statistični (stohastični) podmodel opisuje naključne učinke, ki jih ne moremo predvideti vnaprej. Kvantificirajo variabilnost v populaciji. V populacijski farmakokinetični analizi navadno ločimo med dvema viroma variabilnosti: prva je variabilnost med posamezniki, imenovana tudi interindividualna variabilnost, druga pa rezidualna variabilnost ali šum.

Povezavo med vrednostjo parametra farmakokinetičnega modela pri posamezniku in tipično vrednostjo parametra v populaciji lahko zapišemo kot:

$$P_i = \theta_P + \eta_i \quad \text{Enačba 1}$$

P_i je vrednost parametra P pri posamezniku i , ki za η_i odstopa od povprečne (tipične) vrednosti parametra v populaciji – stalnega učinka θ_P . η je označena naključna interindividualna variabilnost, za katero predpostavljamo normalno porazdelitev z aritmetično sredino 0 in varianco ω^2 (interindividualna varianca parametra P).

Ker se v bioloških sistemih večina parametrov porazdeljuje logaritemsko normalno, lahko enačbo 1 zapišemo tudi drugače:

$$P_i = \theta_P \times e^{\eta_i} \quad \text{Enačba 2}$$

Parameter P sledi logaritemsko normalni porazdelitvi, θ_P predstavlja geometrično sredino, η_i pa se porazdeljuje normalno s povprečjem 0 in varianco ω^2 (CV^2 interindividualne variabilnosti) (2, 7).

Rezidualna variabilnost predstavlja odklon izmerjene vrednosti od vrednosti, ki jo je za posameznika napovedal model. Sestoji iz variabilnosti znotraj posameznika oz. intraindividualne variabilnosti, neustreznosti modela, napak analizne metode in napak pri izvedbi poskusa. Označujemo jo z grško črko ε . Predpostavljamo da se v populaciji porazdeljuje normalno z aritmetično sredino 0 in varianco σ^2 (3, 7).

Poznamo tri osnovne modele rezidualne variabilnosti:

1. Aditivni model rezidualne napake

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{Enačba 3}$$

$C_{obs, ij}$ predstavlja vrednost izmerjene koncentracije za posameznika i ob določenem času (j -to meritev), $C_{pred, ij}$ z modelom napovedano vrednost koncentracije za istega posameznika ob istem času, ε_{ij} pa rezidualno napako. Tudi če koncentracijo ob istem času izmerimo istemu najbolj reprezentativnemu posamezniku, ki ga predstavlja model, vrednosti izmerjene in napovedane koncentracije zaradi rezidualne napake ne sovpadata.

Aditivni model skoraj vedno zadovoljivo opiše rezidualno napako, le ob velikem razponu podatkov ponavadi zanemari nižje koncentracije, zato v takem primeru uporabimo tudi proporcionalni ali logaritemsko normalni model.

2. Proporcionalni model rezidualne napake

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{Enačba 4}$$

Napake so porazdeljene normalno, toda proporcionalne velikosti napovedane koncentracije.

Aditivni in proporcionalni model rezidualne napake sta lahko tudi kombinirana, takrat govorimo o kombiniranem tipu rezidualne napake:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Enačba 5}$$

3. Logaritemsko normalni model rezidualne napake

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} \times e^{\varepsilon_{ij}} \quad \text{Enačba 6}$$

Proporcionalni in logaritemsko normalni model se pri nižjih vrednostih rezidualnih napak (do 20 %) porazdeljujeta zelo podobno, pri višjih vrednostih pa pride do divergence, saj proporcionalni lahko zavzame negativne vrednosti, logaritemsko normalni pa ne.

Če želimo pridobiti natančno oceno stalnih učinkov, moramo naključne učinke pri tem upoštevati ravno v pravnji meri: premalo naključnih učinkov v modelu namreč vodi do pristranskosti, preveč naključnih učinkov pa do prevelikih standardnih napak.

V kovariatnem podmodelu je s stalnimi parametri izraženo razmerje med sočasnimi spremenljivkami in parametri modela (1, 2).

1.1.2 TESTIRANJE VPLIVA SOČASNIH SPREMENLJIVK

Sočasna spremenljivka ali kovariata (*ang. covariate*) je katerakoli spremenljivka, ki je specifična za posameznika in lahko vpliva na farmakokinetiko ali farmakodinamiko učinkovine. Sočasne spremenljivke so lahko znotraj posameznika konstantne (npr. spol) ali pa se s časom spreminjajo (npr. starost). Možne sočasne spremenljivke v farmakokinetičnem ali farmakodinamičnem modelu vključujejo:

- demografske dejavnike (starost, telesna masa, spol),

- označevalce funkcije organov (kreatininski očistek, serumska aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT), serumska koncentracija bilirubina),
- genetske dejavnike (polimorfizem izoencimov citokroma P450),
- kazalce iz okolja (sočasna terapija, kajenje, alkohol, dieta) in
- druge dejavnike (stadij bolezni, ostale laboratorijske meritve) (1, 3, 6).

Ločimo dve vrsti sočasnih spremenljivk:

1. Kategorične sočasne spremenljivke so kvalitativne spremenljivke. Lahko so dihotomne (npr. sočasna terapija: DA ali NE, spol: MOŠKI ali ŽENSKI), lahko pa imajo več kategorij in so ordinalne (npr. kajenje: NE, manj kot 20 cigaret na dan, več kot 20 cigaret na dan) ali nominalne (npr. rasa).
2. Zvezne sočasne spremenljivke imajo definirano skalo in so kvantitativne (npr. telesna masa, starost, kreatininski očistek).

O vključitvi kovariat v farmakokinetični ali farmakodinamični model se navadno odločamo na podlagi znanstvene sprejemljivosti, klinične pomembnosti in statistične značilnosti. Pri ugotavljanju povezave med farmakokinetičnim parametrom in sočasno spremenljivko je pomembna grafična analiza, npr. graf *post hoc* ocen parametrov v odvisnosti od kovariate. Zaradi številnih slabosti, npr. nenatančno in/ali napačno ocenjenih parametrov, spreminjanja parametrov in sočasnih spremenljivk s časom ali obstoječih korelacij med posameznimi sočasnimi spremenljivkami, jo je potrebno dopolniti s statističnim testom. Merilo izbora najustrežnejšega modela je običajno test razmerja verjetja, LRT (*ang. likelihood ratio test*), ki ga izvedemo tako, da primerjamo OFV osnovnega modela brez sočasnih spremenljivk (*ang. base model*) in modela s sočasnimi spremenljivkami. Porazdelitev razlike OFV je podobna teoretični χ^2 distribuciji, število prostostnih stopenj pa ustreza številu dodatnih parametrov modela. Izboljšanje prilaganja modela tako lahko določimo s stopnjo statistične značilnosti. Kot statistično značilno privzamemo znižanje OFV, večje od 3,84 (5 % tveganje) ali 6,63 (1 % tveganje), za eno stopnjo prostosti (1, 2, 8).

1.1.3 SKLEPNA STATISTIKA IN NEPARAMETRIČNI TESTI

Inferenčna (sklepna) statistika na podlagi reprezentativnih vzorcev oblikuje sklepe o populaciji. Ločimo dve glavni metodi:

1. ocenjevanje (vzorec uporabimo za pridobitev ocen parametrov, vsakemu od njih določimo interval zaupanja, ki predstavlja intervalno oceno populacijske vrednosti, iz katere je vzet vzorec) in
2. testiranje hipotez (poznamo populacijske parametre in parametre vzorca, na podlagi tega ocenjujemo, ali je naš vzorec vzet iz te populacije) (9, 10).

Parametrični testi ocenjevanja intervala zaupanja zahtevajo predpostavko o porazdelitvi tega parametra v populaciji in poznavanje načina za izračun parametrov porazdelitve (11). Sklepna statistika skoraj v vseh primerih predpostavlja normalno porazdelitev. Kadar je odklon od normalne porazdelitve prevelik ali pa porazdelitve sploh ne poznamo, predpostavke o normalnosti ne moremo sprejeti. V takšnih primerih imamo dve možnosti: še vedno se lahko poslužimo testov, ki predpostavljajo normalno porazdelitev, a moramo pred tem bodisi preoblikovati podatke (logaritmiranje, korenjenje) bodisi zagotoviti dovolj velik vzorec (vsaj 100 enot), lahko pa uporabimo neparametrične teste (12, 13).

Neparametrični testi se ne zanašajo na ocenjene parametre in ne predpostavljajo porazdelitve, iz katere smo z vzorčenjem pridobili podatke. Kljub temu zagotavljajo osnovo za oblikovanje sklepov o populaciji, kar jih uvršča med inferenčno statistiko. Neparametrični testi omogočajo obdelavo podatkov nižje kakovosti – kadar porazdelitve parametra v populaciji ne poznamo in/ali kadar je velikost vzorca majhna. Najbolj učinkoviti so pri obdelavi podatkov, ki sestojijo iz nominalnih (kategoričnih, imenskih) spremenljivk ali iz ordinalnih spremenljivk z zvezno porazdelitvijo, ki zelo odstopa od normalne.

Neparametrični testi imajo pri vzorcih, vzetih iz zelo nesimetričnih porazdelitev, večjo moč kot parametrični, pri analizi normalno porazdeljenih podatkov pa imajo manjšo moč. Večina neparametričnih testov temelji na principu randomizacije (12, 13, 14).

1.2 REVMATOIDNI ARTRITIS: PATOGENEZA IN FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE

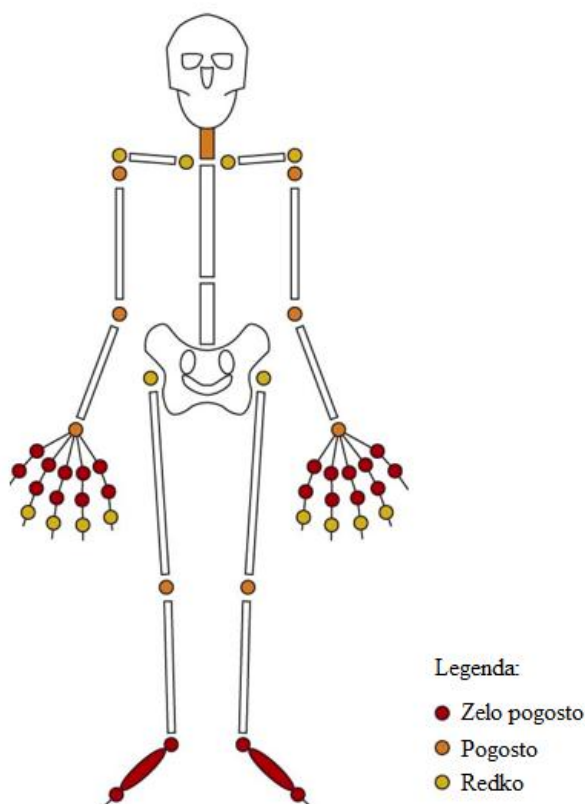
1.2.1 REVMATOIDNI ARTRITIS

Revmatoidni artritis je kronična sistemska bolezen avtoimunske narave, katere glavna značilnost je simetrično razporejeno (obojestransko) vnetje sinovialnih sklepov, prizadene pa lahko tudi druga tkiva in organe (koža, podkožje, krvne žile, pljuča, srce, oči, živčevje). Patofiziološko dogajanje se začne kot vnetje sinovijske membrane (sinovitis), kar povzroči eksudacijo, celično infiltracijo (predvsem celic T pomagalk, limfocitov B, nevtrofilcev in makrofagov) ter hiperplazijo sinoviocitov. Pomnožene celice tvorijo panus, tj. invazivno granulacijsko tkivo, ki z vraščanjem v sklepni hrustanec in kost povzroča njuno razgradnjo. Omenjeni procesi vodijo v ankilozo (otrditev sklepa), uničenje vezivnega tkiva in kostno erozijo v okolici sklepa (15, 17).

Ocenjena prevalenca revmatoidnega artritisa je 1-2 %. Rasa na pogostnost nima vpliva. Bolezen se lahko pojavi pri vseh starostih, največkrat pa se začne med 25. in 55. letom. Ženske pred menopavzo zbolijo trikrat pogosteje kot moški iste starosti, po menopavzi pa je pojavnost bolezni med spoloma enaka. Izvensklepna prizadetost se pojavi pri približno 40 % pacientov kadarkoli med potekom bolezni in je pogostejša pri moških (17, 19).

Vzrok nastanka revmatoidnega artritisa je neznan. Za razvoj bolezni naj bi bili nujni genetska nagnjenost, predvsem prisotnost molekul HLA-DR1 in HLA-DR4 poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) na površini antigen predstavljajočih celic, in sprožilni dejavniki iz okolja (18).

Najpogostejše prizadeti so mali sklepi rok, zapestja in stopal, vnetje pa lahko zajame tudi komolce, ramena, kolke, kolena, gležnje in vratno hrbtenico (slika 1).



Slika 1: Značilen vzorec prizadetosti sklepov pri revmatoidnem artritisu

Vir: AccessPharmacy, 2013.

1.2.2 ZDRAVLJENJE REVMAOIDNEGA ARTRITISA

Revmatoidni artritis je idiopatska bolezen, zato kavezalne terapije ne poznamo. Bistvenega pomena za potek in napredovanje bolezni sta zgodnja diagnoza ter pričetek zdravljenja v začetnih stadijih, saj lahko le na ta način preprečimo hude in nepovratne okvare sklepov. Zdravljenje revmatoidnega artritisa je lahko simptomatsko in/ali usmerjeno v spremembo poteka bolezni. Za odpravljanje simptomov bolezni uporabljamo zdravila z nesteroidnimi protivnetnimi učinkovinami (NSAID, *ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs*), potek bolezni pa spreminjamo z imunomodilirajočimi protirevmatičnimi učinkovinami (DMARD, *ang. disease-modifying antirheumatic drugs*) in kortikosteroidi. Ker so številni bolniki neodzivni na konvencionalne protirevmatične učinkovine ali pa odzivnost nanje s časom slabi, so postale nepogrešljive tudi nove biološke učinkovine s protirevmatičnim delovanjem (16, 20).

Nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID)

Nesteroidni antirevmatiki blažijo vnetje sklepov in z njim povezano bolečino, ker zavirajo ciklooksigenazo (COX), encim za peroksidacijo arahidonske kisline v endoperokside, intermediate v sintezi prostaglandinov, tromboksanov in prostaciklina (21). Zdravljenje z njimi je le simptomatsko, zato ne upočasnijo napredovanja bolezni in nimajo učinka na njene dolgoročne posledice. Delimo jih na neselektivne (acetilsalicilna kislina, diklofenak, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, naproksen, piroksikam), ki inhibirajo tako COX-1 kot tudi COX-2, in selektivne inhibitorje COX-2 (celekoksib, etorikoksib, etodolak, meloksikam, nimesulid) (16, 22).

Glukokortikoidi

Protivnetno delovanje glukokortikoidov temelji na indukciji sinteze in aktivnosti dejavnikov, ki zavirajo vnetje. Najbolj raziskan med njimi je aneksin-1 (lipokortin-1), ki zavira delovanje fosfolipaze A2 in COX-2 ter tako zmanjša nastajanje vnetnih eikozanoidov. Glukokortikoidi preko inhibicije transkripcijskih dejavnikov tudi zavirajo izražanje genov za vse pomembnejše vnetne citokine in njihove receptorje ter tudi za COX-2 (21). Dolgotrajnemu zdravljenju z njimi se zaradi številnih neželenih učinkov skušamo izogibati, zaželeni pa so za kratko ali premostitveno obdobje, saj imajo hiter protivnetni učinek. Uporabljamo jih le pri hudi in hitro napredujoči bolezni, dostikrat v kombinaciji z drugimi zdravili. Običajno bolnika zdravimo z nizkim odmerkom metilprednizolona, zdravili izbora za intraartikularno uporabo ob močno vnetih sklepih pa sta betametazon in triamcinolon (16, 23).

Imunomodulirajoče protirevmatične učinkovine (DMARD)

Imunomodulirajoče protirevmatične učinkovine delujejo počasneje, saj je učinek običajno dosežen šele 1-3 mesece po začetku zdravljenja (pri metotreksatu in zlasti leflunomidu včasih že po 14 dneh) (18). Glede na mehanizem delovanja jih lahko razdelimo v naslednje skupine:

- antimetaboliti, ki z delovanjem na metabolizem folatov zavirajo sintezo nukleinskih baz (metotreksat),
- zaviralci biosinteze pirimidinov (leflunomid),
- zaviralci biosinteze purinov (azatioprin),
- inhibitorji kalcinevrina (ciklosporin),
- zaviralci dejavnika tumorske nekroze α (sulfasalazin, klorokin, hidroklorokin) in

- alkilirajoči citostatiki (ciklofosfamid).

Ostale v terapiji uporabne učinkovine so še D-penicilamin, soli zlata in tetraciklinski antibiotik minociklin (16).

Pomanjkljivost konvencionalnih DMARD je njihova nespecifičnost, saj gre za majhne molekule s številnimi vezavnimi mesti, ki lahko prizadenejo različne celice ter interagirajo z različnimi receptorji in encimskimi sistemi. Zaradi možnosti pojava resnih, včasih celo življenje ogrožajočih neželenih učinkov, je potreben stalen laboratorijski nadzor (24).

Biološke učinkovine

Biološke učinkovine so namenjene zdravljenju bolnikov z zmerno ali s hudo obliko revmatoidnega artritisa, ki se niso ustrezno odzvali na konvencionalno zdravljenje. Delujejo imunosupresivno, kar pomeni, da zavirajo prekomerno aktivnost različnih komponent imunskega sistema. Mehanizmi njihovega delovanja so naslednji:

- blokiranje dejavnika tumorske nekroze (TNF) (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliksimab),
- zaviranje aktivacije limfocitov T (abatacept),
- blokiranje receptorja IL-1 (anakinra),
- blokiranje receptorja IL-6 (tocilizumab) in
- selektivna citotoksičnost do limfocitov B – od protiteles odvisna celična citotoksičnost (ADCC, *ang. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) in od komplementa odvisna celična citotoksičnost (CDC, *ang. complement-dependent cytotoxicity*) (rituksimab).

Same ali v kombinaciji s konvencionalnimi DMARD, zlasti z metotreksatom, uspešno zavirajo napredovanje sklepnih poškodb in izboljšajo fizično funkcijo. Pomanjkljivosti so kljub visoki učinkovitosti številne: parenteralna aplikacija (proteini), povišano tveganje za razvoj okužb, postopno upadanje učinkovitosti (imunski odziv na učinkovino pri dolgotrajni uporabi) in visoka cena (20).

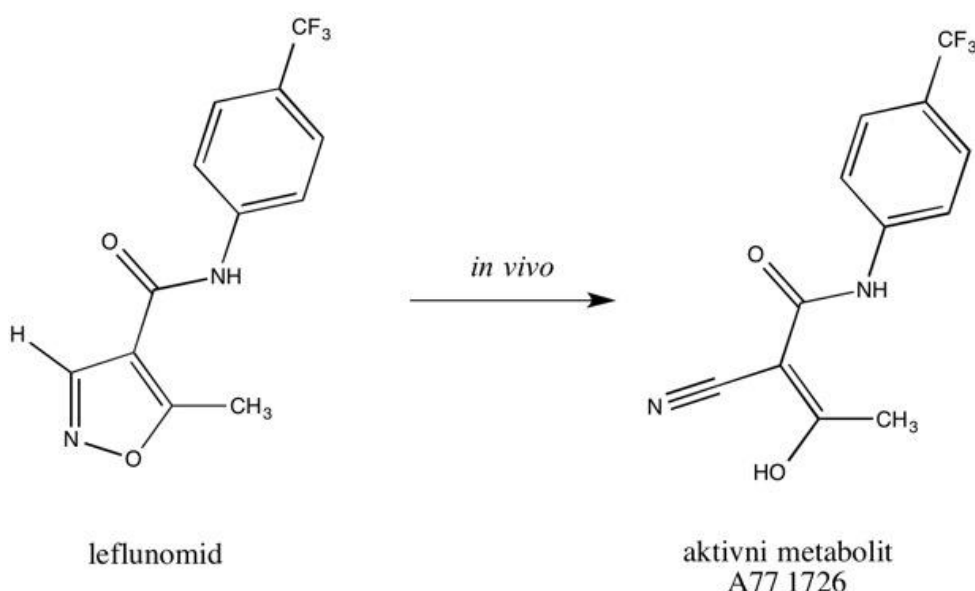
1.2.3 LEFLUNOMID

Terapevtske indikacije

Leflunomid je indiciran za zdravljenje odraslih bolnikov z aktivnim revmatoidnim artritism (kot imunomodilirajoče antirevmatično zdravilo) ali z aktivnim psoriatičnim artritism (25).

Farmakodinamične lastnosti

Leflunomid je imunomodulirajoče antirevmatično predzdravilo, ki se po strukturi in mehanizmu delovanja razlikuje od konvencionalnih imunomodulatorjev. Je sintezni derivat izoksazola, ki se v črevesni steni, jetrih in plazmi s cepitvijo N-O vezi v izoksazolnem obroču hitro presnovi v aktivni metabolit A77 1726 (slika 2). *In vitro* raziskave navajajo, da je A77 1726 reverzibilni selektivni inhibitor dihidroorotat-dehidrogenaze (DHODH), ključnega encima pri *de novo* biosintezi pirimidinskih ribonukleotidov v aktivno delečih se limfocitih. Speči limfociti imajo namreč nizko raven dejavnosti dihidroorotatne dehidrogenaze in lahko pridobijo potrebne pirimidine po drugih poteh, aktivirani pa so odvisni le od *de novo* sinteze. A77 1726 tako prepreči proliferacijo aktiviranih limfocitov, ki igrajo pomembno vlogo v patogenezi revmatoidnega artritisa, in deluje protivnetno. V višjih koncentracijah A77 1726 zavira nekatere tirozinske kinaze in aktivacijo jedrnega dejavnika κB , kar ima lahko dodaten učinek na terapevtski izid (16, 26).



Slika 2: Pretvorba leflunomida v aktivni metabolit

Farmakokinetične lastnosti

Absorpcija

Po peroralni aplikaciji radioaktivno označenega ^{14}C -leflunomida se absorbira najmanj 82 do 95 % odmerka. Čas, v katerem se doseže najvišja plazemska koncentracija metabolita A77 1726, variira od 1 do 24 ur. S hrano se zmanjša hitrost absorpcije leflunomida, obseg absorpcije na poln in prazen želodec pa je primerljiv, zato leflunomid lahko jemljemo s hrano. Zaradi dolgega razpolovnega časa metabolita A77 1726 (14 dni) in priporočenega

odmernega intervala (24 ur) je za hitrejše doseganje stacionarnega stanja potreben višji začetni odmerek (100 mg/dan, 3 dni). Ocenjujejo, da bi bilo brez udarnega odmerka stacionarno stanje doseženo šele po skoraj dvomesečnem jemanju. Zdravljenje se nadaljuje z vzdrževalnim odmerkom 10 ali 20 mg/dan. V stacionarnem stanju so plazemske koncentracije 33- do 35-krat višje kot po enkratnem odmerku (25, 27, 28).

Porazdelitev

A77 1726 ima visoko stopnjo vezave na plazemske beljakovine (albumine). Delež nevezane frakcije A77 1726 pri zdravih prostovoljcih je približno 0,62 %, pri bolnikih z revmatoidnim artritisom približno 0,80 %, pri bolnikih s kronično ledvično insuficienco pa še nekoliko višji. Vezava je v območju terapevtskih koncentracij linearna. Navidezni volumen porazdelitve je majhen (po intravenski aplikaciji zdravim prostovoljcem je znašal približno 12,7 L), kar je v skladu z izrazito vezavo na plazemske beljakovine. Privzem v eritrocite je majhen.

Zaradi izrazite vezave na plazemske beljakovine lahko A77 1726 izpodrine druge v veliki meri vezane učinkovine (npr. varfarin), vendar se tak mehanizem interakcije *in vitro* ni izkazal kot klinično pomemben. Podobne študije so pokazale, da A77 1726 poveča delež nevezane frakcije diklofenaka, ibuprofena in tolbutamida, vendar le za 10-50 %. Nevezana frakcija A77 1726 se v prisotnosti tolbutamida zveča za 2- do 3-krat, diklofenak in ibuprofen pa A77 1726 ne izpodrineta. Ni znano, da bi bili omenjeni učinki klinično pomembni (25, 27, 28).

Presnova

Metabolizem prvega prehoda poteka v črevesni steni, jetrih in najverjetneje tudi v plazmi. Glavni presnovek leflunomida je A77 1726, med večimi stranskimi metaboliti pa je možno kvantificirati le TFMA (4-trifluorometilanilin), ki se v nizkih koncentracijah pojavi v plazmi nekaterih pacientov. Plazemska koncentracija nespremenjenega leflunomida je najpogostejše pod mejo kvantifikacije. Za biotransformacijo leflunomida v A77 1726 in nadaljnjo presnovo A77 1726 ni odgovoren le en encim. *In vitro* študije na človeških jetrnih mikrosomih in rekombinantnih izoencimih CYP so pokazale vpletenost citokromov P450 (CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 3A4) v aktivacijo leflunomida. Dokazano je, da metabolizem poteka v mikrosomski in citosolni celični frakciji. Glede na *in vitro* študije A77 1726 zavira aktivnost citokroma P450 2C9 (CYP 2C9), ki je odgovoren za presnovo fenitoina, tolbutamida, varfarina in mnogih nesteroidnih antirevmatikov, zato je ob sočasni

uporabi teh učinkovin (izvzemši nesteroidne antirevmatike) z leflunomidom potrebna previdnost (25, 26, 27, 28).

Izločanje

Aktivni metabolit A77 1726 se izloča tako z metabolizmom kot tudi z ekskrecijo; v prvih 96 urah je pomembnejša renalna, nato pa začne prevladovati biliarna ekskrecija. Izločanje je počasno, z navideznim očistkom približno 31 mL/h. Študija z radioaktivno označenim ¹⁴C-leflunomidom je pokazala, da se učinkovina v enaki meri izloča v urin (približno 43 %) in blato (približno 48 %, najverjetneje z žolčem). A77 1726 je bil v urinu in blatu prisoten še 36 dni po enkratnem odmerku. Najpomembnejši presnovki, najdeni v urinu, so bili TFMA-oksanilat, glukuronidni derivati leflunomida (predvsem v vzorcih prvega dne) in metilhidroksi-A77 1726, glavna sestavina blata pa je bila A77 1726. Peroralna aplikacija uprašenega aktivnega oglja, pripravljenega v suspenziji, ali holestiramina vodi do hitrega in pomembnega povečanja hitrosti izločanja A77 1726 (zmanjšanje razpolovnega časa na 1 do 2 dneva), domnevno zaradi gastrointestinalne dialize in/ali prekinitve enterohepatične recirkulacije. Plazemska koncentracija A77 1726 se je pri uporabi holestiramina (8 g trikrat na dan, 24 ur) znižala za 40 % v 24 urah in za 49 do 65 % v 48 urah, pri uporabi aktivnega oglja (50 g na 6 ur, 24 ur) pa za 37 % v 24 in za 48 % v 48 urah (25, 27, 28).

Tveganja, povezana z leflunomidom

Najpogostejši neželeni učinki so driska, navzea, bolečine v trebuhu, bruhanje, zvečano izpadanje las in pojav izpuščajev. Pogosto je tudi blago zvišanje krvnega tlaka, zato je le-tega potrebno preveriti pred uvedbo zdravljenja, njegovo spremljanje pa se priporoča tudi med zdravljenjem. Najpomembnejši neželeni učinki so hepatični. Največ jetrnih okvar se pojavi v prvih 6 mesecih zdravljenja pri bolnikih z večjim tveganjem za hepatotoksične učinke (bolezni jeter, sočasna uporaba drugih hepatotoksičnih zdravil, npr. metotreksata). Uporabe leflunomida ne priporočamo bolnikom, okuženim z virusom hepatitisa, uživalcem prekomernih količin alkohola, bolnikom s hipoproteinemijo in tistim, ki imajo oslABLJENO jetrno funkcijo zaradi ciroze jeter. V kliničnih raziskavah so povišano aktivnost ALT in AST opazili pri 5-15 % bolnikov. Zvišanje je bilo reverzibilno in manjše od dvakratne zgornje meje normalne vrednosti. Leflunomid je kontraindiciran pri bolnikih s hudo imunsko pomanjkljivostjo ter pri bolnikih z resnimi okužbami, saj lahko zaradi svojega imunosupresivnega delovanja zveča dovzetnost bolnikov za okužbe, vključno z oportunističnimi. Aktivni presnovek leflunomida, A77 1726, domnevno povzroča resne

okvare ploda, zato je zdravilo kontraindicirano pri nosečnicah in ženskah v rodni dobi, ki ne uporabljajo zanesljive kontracepcije. Doječe matere leflunomida ne smejo jemati. Ker se A77 1726 izloča tudi z renalno ekskrecijo, se terapija z leflunomidom odsvetuje bolnikom z zmerno do hudo ledvično insuficienco. Večjemu tveganju za pojav hematoloških neželenih učinkov so izpostavljeni bolniki z obstoječo anemijo, levkopenijo in/ali trombocitopenijo ter bolniki z okvarjenim delovanjem kostnega mozga (25, 27, 29, 30).

Dejavniki, ki vplivajo na farmakodinamiko in farmakokinetiko leflunomida

In vitro študije na človeških jetrnih mikrosomih in rekombinantnih izoencimih CYP so pokazale vpletenost citokromov P450 v aktivacijo leflunomida. Odprtje izoksazolnega obroča in s tem pretvorbo leflunomida v aktivni metabolit A77 1726 naj bi kataliziral predvsem CYP 1A2, v manjši meri pa tudi CYP 2C19 in CYP 3A4 (26). Vpliv genskih polimorfizmov omenjenih encimov na farmakodinamiko in farmakokinetiko leflunomida so v preteklosti že preučevali.

Bohanec Grabar in sodelavci so v svoji raziskavi ugotavljali, ali so neželeni učinki leflunomida pri bolnikih z revmatoidnim artritisom povezani z genskimi polimorfizmi CYP 1A2, CYP 2C19 in CYP 2C9. Za analizo slednjega so se odločili zato, ker A77 1726 glede na študije *in vitro* zavira aktivnost citokroma CYP 2C9, znana pa je tudi povezava genotipa CYP 2C9 *3/*3 s toksičnostjo leflunomida. Izkazalo se je, da naj bi bili bolniki z genotipom CYP 1A2 *1F CC izpostavljeni 9,7-krat večjemu tveganju za neželene učinke leflunomida kot bolniki z alelom CYP 1A2 *1F A, medtem ko povezave med toksičnostjo in genskimi polimorfizmi CYP 2C19 ter CYP 2C9 niso odkrili (27, 31).

V naslednji raziskavi so Bohanec Grabar in sodelavci vrednotili vpliv genskih polimorfizmov encimov, ki sodelujejo v presnovi leflunomida, na farmakokinetiko A77 1726. Interindividualna variabilnost farmakokinetike leflunomida je namreč zelo velika (povprečna koncentracija aktivnega metabolita leflunomida v plazmi v stacionarnem stanju (C_{ss}) se giblje od 3 do 176 mg/L), s pomočjo demografskih dejavnikov (starost, spol, telesna površina), fizioloških dejavnikov (funkcija jeter) in dejavnikov okolja (kajenje) pa lahko pojasnimo le del te variabilnosti. Pri bolnikih z genotipom CYP 1A2 *1F CC so opazili tendenco po nižjem navideznem očistku v primerjavi z genotipom AA. Pri bolnikih z alelom CYP 2C19 *2, ki ima izraženo manjšo encimsko aktivnost, je bil navidezni očistek značilno večji (zmanjšana presnova leflunomida v A77 1726 in posledično zmanjšan obseg absorpcije), večje vrednosti navideznega očistka pa so zaznali tudi pri

bolnikov z večjo hitrostjo glomerulne filtracije (približno 50 % A77 1726 se izloča z urinom). Od vplivov na navidezni volumen porazdelitve sta se kot značilna izkazala vpliv spola in telesne površine (BSA). Prisotnost alela *CYP 2C19 *17* z izraženo večjo encimsko aktivnostjo ni imela vpliva na navidezni očistek. Genske variabilnosti *CYP 3A4* niso preučevali, ker pri belcih nobeden od funkcionalnih alelov ni prevladujoč (>0,1 %) in ker so med genotipom in fenotipom opazili le omejeno povezavo (32).

Namen študije, ki jo je izvedel Wiese s sodelavci, je bil raziskati, kakšen je vpliv farmakogenomskih dejavnikov na opustitev zdravljenja z leflunomidom pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, ki leflunomid uporabljajo v kombinaciji z drugimi DMARD. Analizirali so genske polimorfizme, ki:

- vplivajo na presnovo leflunomida (*CYP 2C19 *2, *17*),
- vplivajo na biliarno ekskrecijo aktivnega metabolita leflunomida (*ABCG2*),
- so povezani s toksičnostjo leflunomida (*CYP 1A2 *1F, DHODH*).

Ugotovili so, da obstaja značilna povezava med *CYP 2C19* in opustitvijo zdravljenja z leflunomidom zaradi toksičnosti. Prekinitev terapije je bila pri hitrih (genotip *CYP 2C19 *1/*1*, divji tip) in srednjih (genotip *CYP 2C19 *1/*2*) ali počasnih presnavljalcih (genotip *CYP 2C19 *2/*2*) pogostejša kot pri izjemno hitrih presnavljalcih (prisotnost enega ali obeh alelov *CYP 2C19 *17*, odsotnost alela *CYP 2C19 *2*); pri srednjih in počasnih presnavljalcih obstaja torej večje tveganje za pojav neželenih učinkov. Med genotipi *CYP 1A2*, *ABCG2* in *DHODH* ter opustitvijo zdravljenja z leflunomidom značilne povezave ni (33).

2. NAMEN DELA

Leflunomid je imunomodulirajoče antirevmatično predzdravilo, ki se po strukturi in mehanizmu razlikuje od ostalih DMARD. Pri njegovi presnovi v aktivni metabolit (A77 1726) sodelujejo trije citokromi P450: CYP 1A2, CYP 3A4 in CYP 2C19. Nedavne študije dokazujejo vpliv polimorfizma genov *CYP 1A2* in *CYP 2C19* na učinkovitost in toksičnost leflunomida; slednjo povezujejo tudi s *CYP 2C9*.

Po podatkih iz rutinske klinične prakse zdravljenje z leflunomidom v prvem letu opusti približno 40-70 % bolnikov, bodisi zaradi neželenih učinkov bodisi zaradi neučinkovitosti. Cilj diplomske naloge je potrditi, da so pri bolnikih z revmatoidnim artritismom interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah A77 1726 posledica polimorfizma genov za omenjene citokrome, in ugotoviti, ali med genskimi polimorfizmi obstajajo klinično pomembne interakcije z značilnim vplivom na farmakokinetiko A77 1726. S pomočjo programskega orodja NONMEM bomo razvili populacijski farmakokinetični model in s testom razmerja verjetja preskusili vplive različnih sočasnih spremenljivk. Statistično značilnost v končni model vključenih sočasnih spremenljivk bomo dodatno ovrednotili z randomizacijskim testom.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 KLINIČNA RAZISKAVA

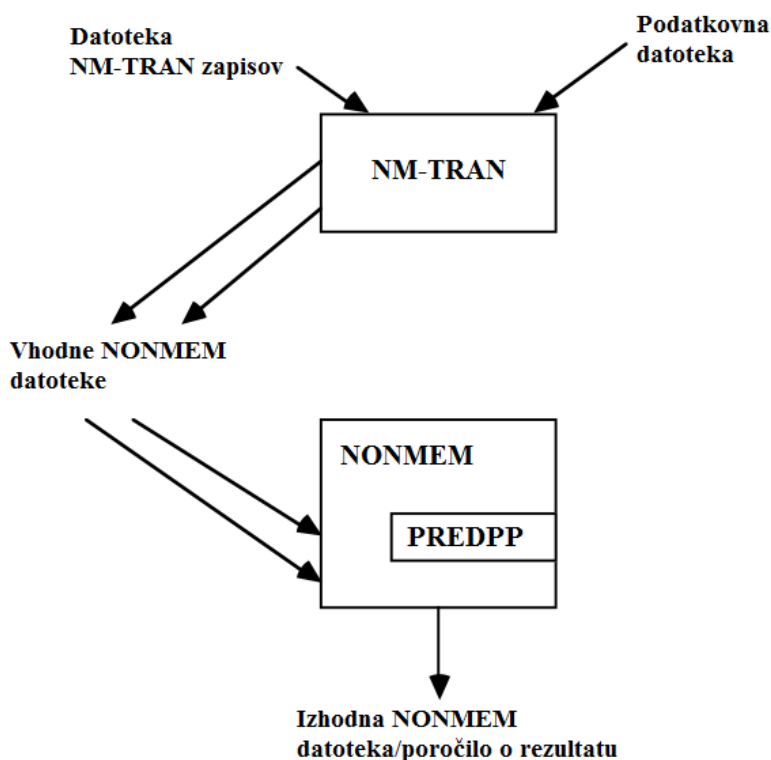
Klinični del raziskave so opravili v Bolnišnici dr. Petra Držaja v Ljubljani. Študija je trajala eno leto (od septembra 2006 do septembra 2007), vključevala pa je 71 odraslih bolnikov, od tega 67 z diagnosticiranim revmatoidnim artritisom in 4 s poliartritisom, ki spominja na revmatoidni artritis. Bolniki so se pred pričetkom študije z leflunomidom zdravili že povprečno 3,4 leta (od 6 mesecev do 8 let). Začetni odmerek leflunomida je pri večini bolnikov znašal 60 ali 100 mg učinkovine/dan, po 3 dneh pa so zdravljenje nadaljevali z vzdrževalnim odmerkom 10 mg ali 20 mg učinkovine/dan. Vsakemu bolniku so na dan rednega pregleda trikrat odvzeli kri: tik pred odmerkom leflunomida, 3 ure po odmerku in 6 ur po odmerku. Podatke o demografskih značilnostih (starost, spol, telesna višina, telesna masa, ITM, kajenje, alkohol) ter informacije o zdravljenju (trajanje zdravljenja z leflunomidom, začetni odmerek, vzdrževalni odmerek, sočasna uporaba drugih zdravil, prekinitev zdravljenja in vzrok zanjo, neželeni učinki, neučinkovitost ali neprenašanje zdravila) so pridobili iz razpoložljive medicinske dokumentacije. Lečeči revmatologi so na podlagi pogovora z bolniki ocenili, ali je bilo jemanje zdravil v skladu z navodili. Na slabo vodljivost so posumili pri 6 bolnikih. V farmakokinetičnem delu raziskave, natančneje med razvojem osnovnega modela, so t. i. osamelce (*ang. outliers*) odkrivali s pomočjo orodja, imenovanega CDD (*ang. case deletion diagnostics*). Za vsakega izmed 71 bolnikov so izračunali Cookovo število (*ang. Cook's score*; pove, za koliko se pri posamezniku spremenijo vrednosti parametrov, če iz nabora odstranimo določen podatek) in razmerje kovarianc (meri zmanjšanje natančnosti parametrov). Osamelci imajo visoko Cookovo število in nizko razmerje kovarianc. Pri 2 od 6 prej omenjenih slabo vodljivih bolnikov je bilo razmerje kovarianc nižje od 0,4, Cookovo število pa višje od 1. Genotipizacijo so izvedli na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani (32, 34).

3.2 OSNOVNI MODEL

3.2.1 PROGRAMSKA OPREMA

Najpogosteje uporabljano programsko orodje, namenjeno populacijski farmakokinetični in/ali farmakodinamični analizi, je NONMEM (NONlinear Mixed Effect Modeling). Razvila sta ga Lewis Sheiner in Stuart Beal skupaj z NONMEM projektno skupino na Kalifornijski univerzi v San Franciscu (UCSF) kot prvi poskus ocenjevanja interindividualne farmakokinetične variabilnosti z uporabo nelinearnega modela mešanih učinkov. Prva različica programa je izšla leta 1980, trenutno pa je v uporabi NONMEM 7.2.0. Napisan je v programskem jeziku ANSI FORTRAN 90/95.

Programska oprema sestoji iz 3 delov: NONMEM, PREDPP in NM-TRAN (slika 3).



Slika 3: NONMEM, PREDPP in NM-TRAN

Vir: Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL: NONMEM Users Guide - Part V, Introductory Guide, 2011, str. 2.

NONMEM je osnovno, splošno orodje za nelinearno regresijo, uporabno tako za simulacijo kot tudi za prileganje različnih vrst parametrov modela.

PREDPP (Prediction for Population Pharmacokinetics) je zmogljiv paket podprogramov, ki jih NONMEM lahko uporabi za izračun ocen populacijskih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih parametrov. Ker gre za knjižnico različnih farmakokinetičnih modelov, uporabniku modela ni potrebno opisovati z zahtevnimi diferencialnimi enačbami, temveč samo izbire med že ponujenimi. Paket omogoča obdelavo tako splošnih linearnih in nelinearnih modelov kot tudi zahtevnejših podatkov, pridobljenih iz populacije bolnikov.

NM-TRAN (NONMEM Translator) je ločeni, samostojni prevajalnik ukazov in podatkovni predprocesor. S pretvorbo datoteke NM-TRAN zapisov (z znakom \$ na začetku) v več NONMEM vhodnih datotek omogoča vpis ukazov na enostaven, uporabniku prijazen način, namenjen pa je tudi hitremu prepoznavanju napak (35, 36).

Bolj priročno uporabo programskega orodja NONMEM omogoča zbirka DOS paketnih ukaznih datotek in AWK skriptov (AWK je programski jezik, namenjen obdelavi besedilnih datotek), imenovana Wings for NONMEM (WFN). Prva verzija WFN (Wheels for NONMEM) je bila napisana leta 1989 na Kalifornijski univerzi v San Franciscu, trenutno uporabljane različice pa so 411 (NONMEM V), 616 (NONMEM VI), 703 (NONMEM 7.1) in 720 (NONMEM 7.2) (37).

Programska knjižnica Perl-Speaks NONMEM (PsN) je namenjena uporabnikom, ki želijo rezultate računsko zmogljivejšega programa NONMEM uporabiti v zunanjih aplikacijah. Knjižnica je objektno orientirana in napisana v programskem jeziku Perl. Njena funkcionalnost sega od rešitev preprostejših nalog, kot je npr. razširitev ocen parametrov iz izhodne NONMEM datoteke, do naprednejših računalniško intenzivnih statističnih metod. Trenutno je v uporabi verzija 3.6.2 (38, 39).

3.2.2 DOLOČANJE PARAMETROV Z NONMEM

NONMEM parametre določa po principu največjega verjetja (*ang. maximum likelihood approach*). Verjetje za podatke, pridobljene iz opazovanj, je zapisano kot funkcija parametrov modela. Cilj metode največjega verjetja je poiskati take vrednosti parametrov, da se za te podatke doseže največje verjetje. To hkrati pomeni največjo verjetnost, da se določene vrednosti parametrov modela pojavijo v podatkih, pridobljenih iz opazovanj (40). Verjetje je v programskem orodju NONMEM izraženo kot vrednost objektivne funkcije, OFV (*ang. objective function value*), ki je proporcionalna dvakratniku negativnega

logaritma verjetja ($-2\log L$). NONMEM vrednosti parametrov modela izračuna tako, da se doseže najmanjša vrednost objektivne funkcije. Največje verjetje torej sovpada z najnižjo vrednostjo objektivne funkcije. Večje kot je verjetje oz. nižja kot je vrednost objektivne funkcije, boljše je ujemanje modela s podatki, pridobljenimi iz opazovanj (3, 7).

Zaradi nelinearnega vstopa naključnih učinkov v model je funkcijo verjetja težko oceniti. NONMEM v ta namen uvede aproksimacijo, ki vključuje linearizacijo naključnih učinkov. Najenostavnejša metoda je aproksimacija prvega reda, FO (*ang. first-order approximation*), ki temelji na razširitvi v Taylorjevo vrsto okoli vrednosti $\eta=0$. Metoda oceni le populacijske parametre, naključne interindividualne učinke in s tem individualne parametre pa je kot *post hoc* ocene mogoče pridobiti z empirično Bayesovo metodo največjega verjetja posteriorne porazdelitve verjetnosti (1, 2, 41). Bolj izpopolnjena od FO je metoda FOCE (*ang. first-order conditional estimation*), ki simultano ocenjuje tako populacijske kot tudi individualne parametre. Linearizacija naključnih učinkov v tem primeru temelji na razširitvi v Taylorjevo vrsto prvega reda okoli posteriorno pridobljenih empiričnih Bayesovih ocen za naključne interindividualne učinke (η) (1, 40, 41). Obstaja še bolj prefinjena različica metode FOCE, ki vključuje interakcijo med interindividualnimi in intraindividualnimi naključnimi učinki. Imenuje se FOCE INTER oz. FOCEI (*ang. first-order conditional estimation with interaction*), od metode FOCE pa se razlikuje v načinu obravnave rezidualne napake. Z upoštevanjem interakcije se tekom računanja OFV ohrani odvisnost modela intraindividualne napake od η vrednosti. Metoda je primerna za obdelavo bogatih profilov, ki vključujejo interakcijo med η in ε (2).

Kadar so podatki za posameznika v populaciji skopi, pričakujemo manjši odklon empiričnih Bayesovih ocen od populacijske aritmetične sredine. V skrajnem primeru, ko za posameznika nimamo nobenega podatka, empirična Bayesova ocena sovpada s populacijsko vrednostjo. Varianca porazdelitve empiričnih Bayesovih ocen se torej z zmanjševanjem količine informacij na ravni posameznika krči proti vrednosti 0, kar imenujemo η -krčenje (*ang. η -shrinkage*). Pri individualnih uteženih rezidualih (IWRES) oz. rezidualni napaki gre za identično krčenje, le da ga v tem primeru imenujemo ε -krčenje (*ang. ε -shrinkage*). Kadar je krčenje večje od 20-30 %, diagnostika, ki temelji na empiričnih Bayesovih *post hoc* ocenah, izgubi na svoji moči in informativnosti ter lahko postane celo zavajajoča (42).

3.2.3 RAZVOJ OSNOVNEGA MODELA

Identifikacija osnovnega oz. strukturnega modela je prvi korak v razvoju populacijskega farmakokinetičnega modela. Predpostavili smo enoprostorni model ter absorpcijo 1. reda, kinetiko pa smo se odločili opisati z očistkom, volumnom porazdelitve in s hitrostno konstanto absorpcije, zato smo iz knjižnice PREDPP izbrali podprogram ADVAN2/TRANS2 (`$SUBROUTINE ADVAN2 TRANS2`). Za oceno parametrov modela smo uporabili aproksimacijsko metodo FOCE INTER (`METHOD=1 INTERACTION`). Največje dovoljeno število določitev objektivne funkcije smo omejili z 9999 (`MAXEVALS=9999`). Pri številu zahtevanih signifikantnih mest končne ocene farmakokinetičnega parametra smo ohranili privzete nastavitve, po katerih mora biti to število večje od 3 (`SIGDIGITS=3`). Najustreznejši model smo izbrali na podlagi minimuma vrednosti objektivne funkcije, ujemanje napovedanih in izmerjenih vrednosti pa dodatno preverili še z grafično analizo. Model smo ovrednotili tudi glede na krčenje variabilnosti in 95 % interval zaupanja ocen parametrov, o natančnosti določitve vrednosti farmakokinetičnih parametrov pa smo se – ker gre za nelinearni model – dodatno prepričali z uporabo neparametrične bootstrap-metode, kjer nas je zanimal neparametrični 95 % interval zaupanja.

3.3 TESTIRANJE VPLIVA SOČASNIH SPREMENLJIVK

Kategorične sočasne spremenljivke

Kovariate z dvema kategorijama obravnavamo tako, da jim pripišemo številčni vrednosti 0 ali 1 (npr. če bolnik ne prejema sočasne terapije, ga označimo z 0, če sočasno terapijo prejema, pa z 1).

Učinek sočasne spremenljivke (sočasne terapije) na izbran farmakokinetični parameter ponazorimo z naslednjo enačbo:

$$P = \theta_1 + \theta_2 \times \text{sočasna terapija} \quad \text{Enačba 7}$$

θ_1 je tipična vrednost parametra (P) pri pacientu, ki sočasne terapije ne prejema, θ_2 pa predstavlja zvečanje/zmanjšanje vrednosti parametra zaradi sočasne terapije. Model lahko s transformacijo prevedemo v obliko, kjer θ_2 predstavlja relativno spremembo P:

$$P = \theta_1 \times [1 + \theta_2 \times \text{sočasna terapija}] \quad \text{Enačba 8}$$

Če ima kovariata več kategorij, vsaki kategoriji dodelimo številčno vrednost (COV = 1, 2, 3, ...). Model lahko oblikujemo tako, da ima vsaka kategorija svojo oceno parametra:

$$P = \begin{cases} \theta_1 & \text{če COV} = 1 \\ \theta_2 & \text{če COV} = 2 \\ \theta_3 & \text{če COV} = 3 \end{cases} \quad \text{Enačba 9}$$

Pri ordinalnih kovariatah raje uporabimo model, ki zagotavlja učinek urejenosti:

$$P = \begin{cases} \theta_1 & \text{če COV} = 1 \\ \theta_1 + \theta_2 & \text{če COV} = 2 \\ \theta_1 + \theta_2 + \theta_3 & \text{če COV} = 3 \end{cases} \quad \text{Enačba 10}$$

Zvezne sočasne spremenljivke

V najenostavnejšem modelu je parameter linearna funkcija sočasne spremenljivke, v našem primeru telesne mase (WT):

$$P = \theta_1 + \theta_2 \times WT \quad \text{Enačba 11}$$

θ_1 je tipična vrednost parametra pri posamezniku s telesno maso 0, θ_2 pa predstavlja zvečanje/zmanjšanje parametra za vsako enoto spremembe telesne mase.

θ_1 dobi bolj smiselno vrednost, če v model vključimo mediano vrednosti sočasne spremenljivke:

$$P = \theta_1 \times [1 + \theta_2 \times (WT - \text{mediana } WT)] \quad \text{Enačba 12}$$

V tem primeru θ_1 predstavlja oceno parametra pri posamezniku s telesno maso, ki je enaka mediani, θ_2 pa relativno spremembo parametra za vsak kilogram razlike med telesno maso in mediano. S preoblikovanjem modela preprečimo, da bi parameter zavzel negativne vrednosti.

V mnogih primerih, še posebej, če je razpon vrednosti sočasne spremenljivke velik, linearni modeli ne zadostujejo za zadovoljiv opis podatkov. Najenostavnejši nelinearni model dobimo s kombinacijo linearnih:

$$P = \begin{cases} \theta_1 \times [1 + \theta_2 \times (WT - \text{mediana } WT)], & \text{če je } WT \leq \text{mediana } WT \\ \theta_1 \times [1 + \theta_3 \times (WT - \text{mediana } WT)], & \text{če je } WT > \text{mediana } WT \end{cases} \quad \text{Enačba 13}$$

Ostala nelinearna razmerja razložimo z uporabo potenčnega (enačba 14), sigmoidnega (enačba 15) ali eksponentnega modela (enačba 16):

$$P = \theta_1 \times \left[\frac{WT}{\text{mediana } WT} \right]^{\theta_2} \quad \text{Enačba 14}$$

$$P = \theta_1 \times \frac{WT^{\theta_3}}{(\theta_2^{\theta_3} + WT^{\theta_3})} \quad \text{Enačba 15}$$

$$P = \theta_1 \times e^{[\theta_2 \times (WT - \text{mediana } WT)]} \quad \text{Enačba 16}$$

Preden sočasno spremenljivko uporabimo v modelu, jo lahko preoblikujemo, npr. z logaritemsko transformacijo:

$$P = \theta_1 \times \left[1 + \theta_2 \times \log \left(\frac{WT}{\text{mediana } WT} \right) \right] \quad \text{Enačba 17}$$

V programskem orodju NONMEM za določitev končnega modela (*ang. final model*) uporabimo metodo postopnega dograjevanja (*ang. stepwise covariate building method*). V prvem koraku osnovnemu modelu postopoma dodajamo sočasne spremenljivke in za vsako dodano kovariato dobljeni OFV primerjamo z OFV osnovnega modela. V modelu obdržimo sočasne spremenljivke, pri katerih je znižanje OFV statistično značilno (npr. 3,84 pri 5 % tveganju). Ko glede na postavljen kriterij ne moremo vključiti nobene

kovariate več, definiramo polni model (*ang. full model*). V naslednjem koraku iz polnega modela postopoma odvezemo sočasne spremenljivke in ponovno opazujemo značilnost njihovega vpliva, a si pri tem navadno zadamo strožji kriterij (npr. 1 % tveganje). Končni model dobimo, ko iz polnega modela izločimo vse neznačilne vplive sočasnih spremenljivk (2).

Testirali smo vpliv naslednjih sočasnih spremenljivk:

- | | |
|--|--|
| - starost, | - spol, |
| - telesna masa, | - kajenje, |
| - telesna višina, | - sočasna terapija z NSAID, |
| - trajanje revmatoidnega artritisa, | - sočasna terapija z metotreksatom, |
| - koncentracija alanin aminotransferaze (ALT), | - sočasna terapija z metilprednizolonom, |
| - koncentracija kreatinina v serumu (SCR), | - sočasna terapija z DMARD. |
| - trajanje zdravljenja z leflunomidom, | |
| - hitrost glomerulne filtracije (GFR), | |
| - telesna površina, | |

Telesno površino (BSA, *ang. body surface area*) smo izračunali po Mostellerjevi formuli:

$$BSA = \sqrt{\left(\frac{HT \times WT}{3600}\right)} \quad \text{Enačba 18}$$

HT je telesna višina [cm], WT pa telesna masa [kg]. BSA podajamo v m².

Nastajanje kreatinina v telesu je funkcija starosti, telesne mase in spola. Čeprav se v glavnem filtrira, se ga manjši del aktivno izloča tudi s tubulno sekrecijo (TS). Koncentracijo kreatinina v serumu smo zato s pomočjo enačbe MDRD pretvorili v hitrost glomerulne filtracije, ki neposredno odraža funkcijo ledvic.

$$GFR = 175 \times \left(\frac{SCR}{88,4}\right)^{-1,154} \times AGE^{-0,203} \times 0,742^{SX} \times \frac{BSA}{1,73} \quad \text{Enačba 19}$$

SCR je koncentracija serumskega kreatinina [μmol/L], AGE starost [leta], SX pa spol (34, 43).

3.4 ANALIZA VARIANCE ENEGA FAKTORJA

Analiza variance (ANOVA) enega faktorja (*ang. one-way analysis of variance*) skupno variabilnost razdeli na pojasnjeno (med skupinami) in nepojasnjeno variabilnost (znotraj skupin), kar lahko ponazorimo s statističnim modelom:

$$Y_{ij} = \eta + G_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Enačba 20}$$

Y_{ij} predstavlja j-ti odziv v skupini i, G_i odklon aritmetične sredine skupine i od aritmetične sredine celotne populacije (η), ε_{ij} pa naključno napako (napaka pri merjenju, biološka variabilnost itd.), ki se porazdeljuje normalno, z aritmetično sredino 0 in varianco σ^2 .

Statistična analiza in interpretacija ANOVA enega faktorja temelji na naslednjih predpostavkah:

- napake (ali meritve) so neodvisne,
- napake so porazdeljene normalno in imajo konstantno varianco.

Odklone vsake posamezne vrednosti od aritmetične sredine celotne populacije lahko ponazorimo s skupno vsoto kvadratov (TSS, *ang. total sum of squares*):

$$\sum (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad \text{Enačba 21}$$

ki je ekvivalentna

$$\sum (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 + \sum N_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad \text{Enačba 22}$$

Prvi člen predstavlja vsoto kvadratov znotraj skupin (WSS, *ang. within sum of squares*), drugi člen pa vsoto kvadratov med skupinami (BSS, *ang. between sum of squares*). $\bar{Y}$ predstavlja aritmetično sredino celotne populacije, $\bar{Y}_i$ pa aritmetično sredino skupine i.

Tabela z rezultati ANOVA poleg vrednosti TSS, WSS in BSS vsebuje tudi podatke o številu stopenj prostosti (df , *ang. degrees of freedom*), varianci oz. srednjem kvadratu (MS, *ang. mean square*), testni statistiki F in statistični značilnosti (Sig., *ang. statistical significance*).

Skupno število stopenj prostosti izračunamo kot:

$$df = N_i - 1 \quad \text{Enačba 23}$$

N_i je število vseh vrednosti v populaciji.

Število stopenj prostosti med skupinami (df_b) je število skupin, zmanjšano za 1, število stopenj prostosti znotraj skupin (df_w) pa dobimo tako, da od skupnega odštejemo število prostostnih stopenj med skupinami.

Varianco med skupinami (BMS) izračunamo kot:

$$BMS = \frac{BSS}{df_b} \quad \text{Enačba 24}$$

varianco znotraj skupin (WMS) pa kot:

$$WMS = \frac{WSS}{df_w} \quad \text{Enačba 25}$$

Testna statistika F je razmerje med BMS in WMS, porazdeljuje se po F distribuciji z df_b in df_w stopnjami prostosti. Eksperimentalno določen F primerjamo z vrednostjo v tabeli F porazdelitve pri določeni stopnji tveganja (običajno zgornjih 5 %, saj BMS ne more biti manjši od WMS) ter df_b in df_w stopnjah prostosti. Če se BMS izkaže za dovolj veliko v primerjavi z WMS, to dokazuje vpliv sočasnih spremenljivk, ki ponazarjajo variabilnost med skupinami, na obravnavano odvisno spremenljivko (44, 45).

3.5 NEPARAMETRIČNA BOOTSTRAP-METODA

Pri nelinearnih modelih, kjer je porazdelitev negotovosti parametra pogosto asimetrična in predpostavke o normalnosti ne moremo sprejeti, za izračun intervala zaupanja ne moremo uporabiti standardne napake. Lahko pa se poslužimo metod ponovnega vzorčenja (jackknife, bootstrap), ki temeljijo na predpostavki, da se meritve v nizu podatkov med sabo razlikujejo naključno in da ravno ta naključna razlika povzroča negotovost parametra (46).

Z bootstrap-metodo lahko ocenimo natančnost neke statistike, kadar njene teoretične porazdelitve v populaciji ne poznamo. Iz originalnih podatkov reprezentativnega vzorca z naključnim ponovnim vzorčenjem z zamenjavo ustvarimo nize podatkov, ki so po velikosti enaki originalnemu. Ista meritev je lahko v nizu zastopana večkrat, lahko pa je izključena. Rezultat procesa je empirična porazdelitev neke statistike, na podlagi katere lahko sklepamo o porazdelitvi v osnovni populaciji.

Obstaja več različic bootstrap-metode, ki se med sabo razlikujejo v načinu izračuna intervala zaupanja. Najenostavnejša in najpogosteje uporabljana je neparametrična (centilna) metoda, pri kateri postopamo tako, da ocenjene vrednosti statistike najprej razporedimo od najmanjše do največje, nato pa poiščemo meritvi pod zaporedno številko $B\left(\frac{\alpha}{2}\right)$ in $B\left(1 - \frac{\alpha}{2}\right)$, ki predstavljata spodnjo in zgornjo mejo intervala zaupanja. α je napaka prve vrste oz. tveganje, B pa število ponovitev bootstrap-procesa (za določitev ocene intervala zaupanja naj bi jih bilo vsaj 1000). Spodnjo in zgornjo mejo 95 % intervala zaupanja pri 1000 ponovitvah predstavljata torej 25. in 975. meritev oz. 2,5. in 97,5. centil (11, 12, 46).

3.6 RANDOMIZACIJSKI TEST

Osnovni princip

Recimo, da imamo na začetku dve originalni skupini podatkov. Število podatkov v prvi skupini je n_1 , število podatkov v drugi skupini pa n_2 . Izračunano imamo tudi vrednost neke funkcije, ki skupini povezuje, npr. razliko njunih aritmetičnih sredin. V nadaljevanju podatke na novo razporedimo v dve skupini z n_1 podatki v prvem in n_2 podatki v drugem stolpcu. Nato ponovno izračunamo razliko aritmetičnih sredin. Če se skupini med sabo ne razlikujeta, naj bi bila ponovno izračunana vrednost enaka originalni. Rezultat ponavljajočega se naključnega razporejanja v dve skupini in vnovičnega računanja razlike aritmetičnih sredin je neka porazdelitev, na podlagi katere lahko izračunamo verjetnost določitve originalne vrednosti (p-vrednost). To storimo tako, da število kombinacij, pri katerih je razlika aritmetičnih sredin večja ali enaka kot pri originalnem naboru podatkov, delimo s številom vseh kombinacij. Napisano velja le za enostransko tveganje; pri dvostranskem postopamo tako, da števec podvojimo. Število vseh kombinacij izračunamo na sledeč način (11, 14):

$$W = \frac{(n_1! + n_2!)}{(n_1! n_2!)} \quad \text{Enačba 26}$$

Randomizacija sočasnih spremenljivk

S postopkom randomizacije sočasnih spremenljivk pridobimo dodatno oceno stopnje značilnosti, kar nam pomaga pri vključitvi sočasnih spremenljivk v farmakokinetični ali farmakodinamični model. Ideja metode je naslednja: če med sočasno spremenljivko in farmakokinetičnim parametrom ni statistično značilne povezave (ničelna hipoteza), ni pomembno, katero od vrednosti sočasne spremenljivke pripišemo določenemu posamezniku. Za randomizacijo individualnih vrednosti sočasne spremenljivke iz originalnega niza podatkov, s čimer prekinemo razmerje med farmakokinetičnim parametrom in sočasno spremenljivko, lahko uporabimo (vsaj) tri metode:

1. vzorčenje iz parametrične porazdelitve sočasne spremenljivke,
2. ponovno vzorčenje iz empirične porazdelitve sočasne spremenljivke,
3. vzorčenje s permutacijo empirične porazdelitve sočasne spremenljivke (brez ponovnega vzorčenja).

Prva metoda je podobna parametrični, druga pa neparametrični bootstrap randomizaciji. Medtem ko parametrična zahteva predpostavko o porazdelitvi kovariat v populaciji, pri neparametrični porazdelitve ne poznamo, v obeh primerih pa obstaja možnost, da se bo distribucija randomiziranih kovariat razlikovala od originalne. S permutacijsko metodo zagotovimo identično porazdelitev sočasnih spremenljivk pred randomizacijo in po njej. To dosežemo tako, da po naključnem vzorčenju iz originalne porazdelitve izbrano vrednost izbrišemo in nadalje vzorčimo iz preostalih vrednosti. S permutacijo dobimo nov, randomiziran niz podatkov, ki ustreza modelu z vključeno sočasno spremenljivko. Rezultat ponavljajočega se procesa randomizacije je empirična porazdelitev opazovanih vrednosti, bodisi OFV bodisi stalnih učinkov za sočasno spremenljivko, ki jih nato razporedimo po velikosti. Mejna vrednost OFV pri 5 % tveganju je vrednost 5. centila (razlika je možna le v eni smeri, saj se OFV lahko le manjša). Vpliv sočasne spremenljivke je značilen, če je OFV končnega modela nižji. Pri stalnih učinkih sta mejni vrednosti dve (razlika je možna v obe smeri): spodnjo mejo predstavlja vrednost 2,5., zgornjo pa 97,5. centila. Za dosego statistične značilnosti mora biti s končnim modelom ocenjena vrednost θ nižja od spodnje oz. višja od zgornje meje (8, 47, 48).

4. REZULTATI

4.1 PODATKI O BOLNIKIH

Podatke o bolnikih, prikazane v tabeli I, in rezultate genotipizacije, ki so podani v tabeli II, smo pridobili iz diplomske naloge Tine Trdan (34). Pri populacijski farmakokinetični analizi smo upoštevali le podatke 69 bolnikov, saj smo izločili slabo vodljiva bolnika z razmerjem kovarianc, nižjim od 0,4, in Cookovim številom, višjim od 1. Bivše kadilce smo združili z nekadilci.

Tabela I: Podatki o bolnikih, vključenih v raziskavo

	N	Povprečje $\pm$ SD	Mediana
Demografski podatki			
Spol [moški:ženske]	14:57		
Starost [leta]		58,5 $\pm$ 13,2	59
Telesna masa [kg]		68,9 $\pm$ 11,9	70
Telesna višina [cm]		164,9 $\pm$ 7,4	166
Kreatininski očistek (mL/min)		73,6 $\pm$ 16,4	74,7
Trajanje RA [leta]		12,5 $\pm$ 9,9	10
Trajanje terapije z LEF [leta]		3,37 $\pm$ 2,50	2
Koncentracija ALT [μ kat/L]		0,43 $\pm$ 0,33	0,35
Sočasna zdravila			
NSAID	24		
MTX	11		
Ostali DMARD	14		
Metilprednizolon (Medrol)	22		
Farmakokinetični podatki			
Vzorci	213		
Plazemska koncentracija ob 8.00 [mg/L]		34,5 $\pm$ 30,2	26,0
Plazemska koncentracija ob 11.00 [mg/L]		34,7 $\pm$ 28,7	26,0
Plazemska koncentracija ob 14.00 [mg/L]		32,9 $\pm$ 28,9	24,5
Dnevni odmerek LEF [mg]		19,1 $\pm$ 2,80	20
10 mg	6		
20 mg	65		
Kajenje			
Ne	54		
Da	17		

Tabela II: Podatki o številu
bolnikov z določenim
genotipom

Genotipi	N
CYP 1A2	
CC	4
CA	40
AA	27
CYP 2C9	
*1/*1	53
*1/*2	10
*1/*3	6
*2/*2	0
*2/*3	1
*3/*3	1
CYP 2C19	
*1/*1	22
*1/*2	10
*1/*3	0
*1/*17	28
*2/*2	0
*3/*3	0
*17/*17	9
*2/*17	2
*3/*17	0

4.2 RAZVOJ OSNOVNEGA MODELA

Najprej smo preizkusili model, s katerim bi hkrati pridobili ocene vseh stalnih učinkov: očistka (Cl/F), volumna porazdelitve (V_d/F) in hitrostne konstante absorpcije (k_a). Interindividualne variabilnosti nismo ocenjevali (η smo pripisali vrednosti 0). Z drugim modelom smo želeli ocenjevati tako stalne učinke kot tudi naključno interindividualno variabilnost ($\eta_{Cl/F}$, $\eta_{V/F}$, $\eta_{ka/F}$), a se je zaradi previsokih vrednosti η -krčenja za hitrostno konstanto absorpcije in volumen porazdelitve izkazal za neustreznega. V naslednjem poizkusu smo naključni interindividualni variabilnosti hitrostne konstante absorpcije ($\eta_{ka/F}$) pripisali vrednost 0 in ocenjevali preostali dve ($\eta_{Cl/F}$, $\eta_{V/F}$), toda η -krčenje za volumen porazdelitve je ostalo skoraj nespremenjeno. Nadalje smo vrednost 0 pripisali tudi naključni interindividualni variabilnosti volumna porazdelitve in ocenjevali le $\eta_{Cl/F}$. Model ni bil ustrezen, tokrat zavrlo previsoke vrednosti ocenjene hitrostne konstante absorpcije. Odločili smo se, da hitrostno konstanto absorpcije nastavimo glede na literaturno vrednost razpolovnega časa učinkovine, ki znaša 336 ur (14 dni), in časa, v katerem se doseže maksimalna koncentracija učinkovine (6-12 ur). S pomočjo enačb 27 in 28 smo izračunali, da je hitrostna konstanta absorpcije približno 1 h^{-1} (32).

$$k_{el} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{Enačba 27}$$

$$t_{max} = \frac{\ln(k_a) - \ln(k_{el})}{k_a - k_{el}} \quad \text{Enačba 28}$$

V nadaljevanju smo torej od treh stalnih učinkov ocenjevali dva: očistek in volumen porazdelitve. Zaradi te spremembe smo ponovno poizkusili z ocenjevanjem dveh naključnih interindividualnih variabilnosti, $\eta_{Cl/F}$ in $\eta_{V/F}$, toda η -krčenje za volumen porazdelitve je bilo še zmeraj neprimerno visoko (99,7 %). Kot ustrezen se je izkazal model, ki poleg očistka in volumna porazdelitve ocenjuje le naključno interindividualno variabilnost očistka.

Rezidualno variabilnost smo opisali z aditivnim in s proporcionalnim modelom, za opis interindividualne variabilnosti pa smo uporabili eksponentni model.

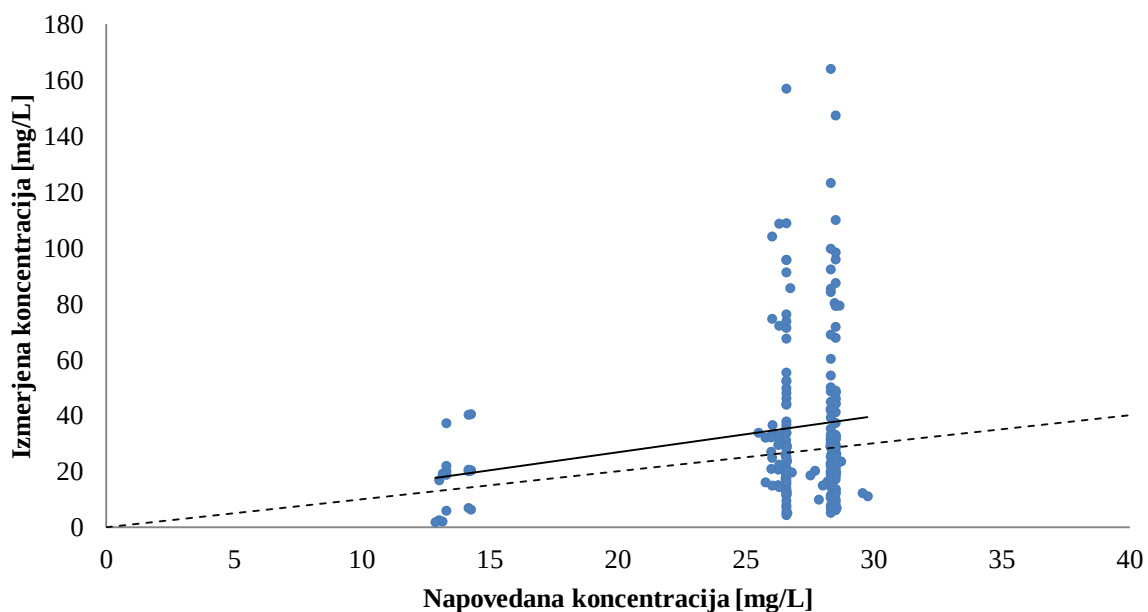
Osnovni model je ovrednoten v tabeli III.

Tabela III: Vrednotenje osnovnega modela

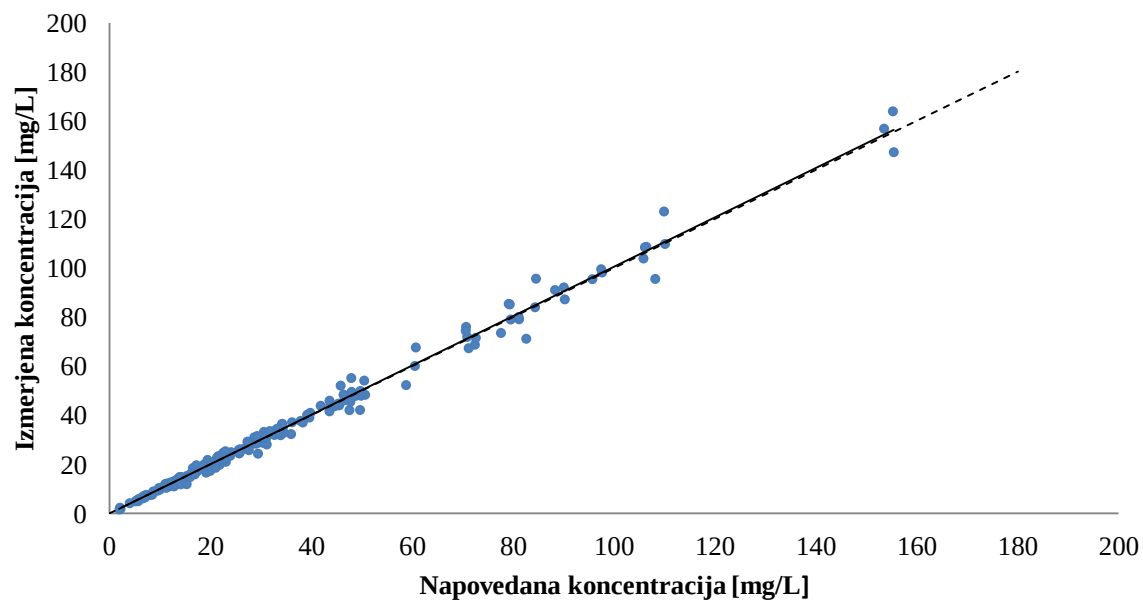
	Osnovni model				Bootstrap		
	OFV=883,9239				OFV=877,28298		
	Število signifikantnih mest=3,5						
Parameter	Ocena	RSE [%]	95 % CI	Mediana	RSE [%]	Neparametrični 95 % CI	
<i>Stalni učinki</i>							
k_a [h ⁻¹]	1*			1*			
Cl [L/h]	0,0302	9,37	0,0246 – 0,0357	0,0304	9,34	0,0247 – 0,0366	
V [L]	8,55	9,08	7,03 – 10,1	8,52586	9,35	7,02 – 10,9	
<i>Interindividualna variabilnost</i> (krčenje -0,5 %)							
η_{Cl} [CV %]	91,1	16,0	71,7 – 110	90,5	15,9	72,6 – 109	
<i>Rezidualna variabilnost</i> (krčenje 18,0 %)							
W_p [CV %]	7,48	7,43	6,39 – 8,57	7,36	7,63	5,90 – 8,59	
W_a [mg/L]	0,250	20,7	0,148 – 0,351	0,264	20,1	0,153 – 0,898	

* Hitrostne konstante nismo ocenjevali, ampak smo ji pripisali vrednost 1.

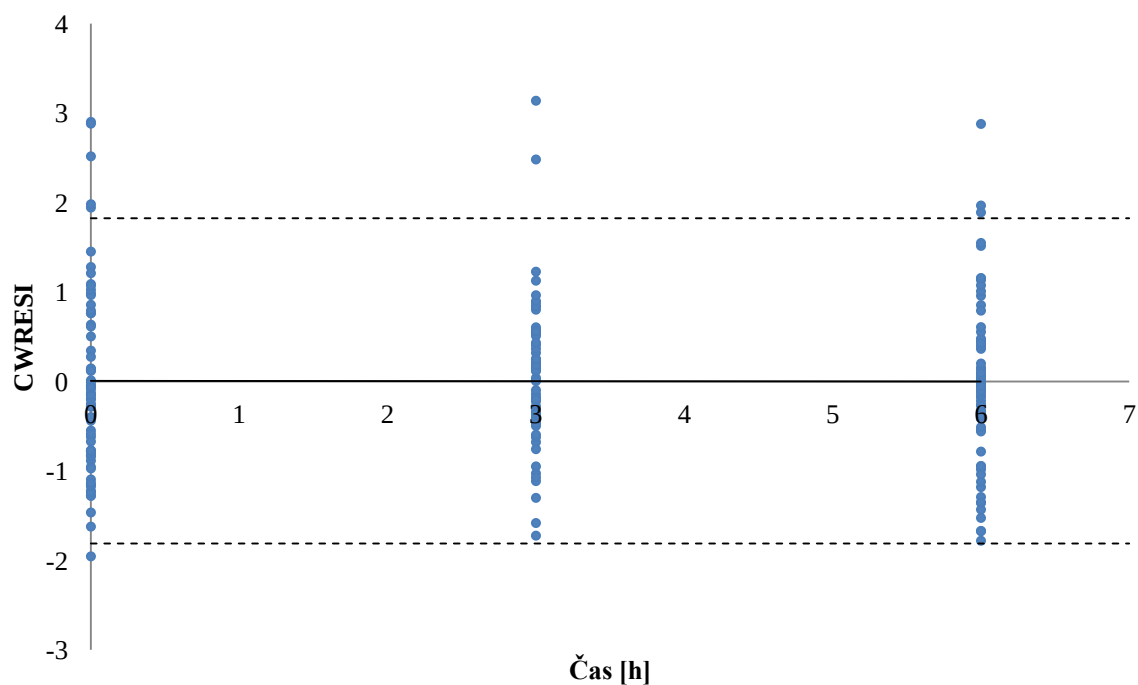
S pomočjo grafične analize smo preverili, kako se z modelom napovedane koncentracije prilegajo izmerjenim koncentracijam (*ang. goodness of fit*). Slika 4 prikazuje odvisnost izmerjenih koncentracij od povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov, slika 5 pa odvisnost izmerjenih koncentracij od napovedanih koncentracij pri posameznem bolniku. Prekinjena črta v obeh primerih predstavlja premico $y=x$, polna črta pa regresijsko premico. Želimo, da se regresijska premica čim bolj prilega premici $y=x$. Naslednja diagrama prikazujeta odvisnost razlike med napovedano in izmerjeno koncentracijo (uteženi reziduali) od časa (slika 6) oz. od povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov (slika 7). Prekinjeni črti v obeh primerih predstavljata spodnjo in zgornjo mejo 95 % intervala zaupanja. Želimo, da se znotraj meja nahaja vsaj 95 % vseh točk.



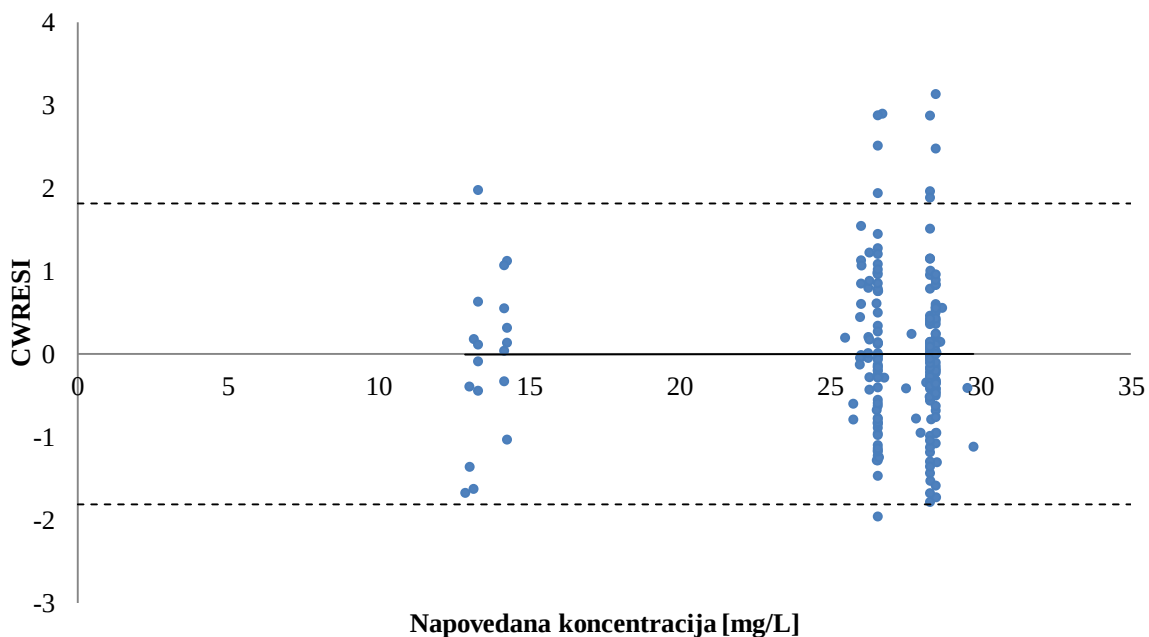
Slika 4: Odvisnost izmerjenih koncentracij (DV) od povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov (PRED)



Slika 5: Odvisnost izmerjenih koncentracij (DV) od napovedanih koncentracij pri posameznem bolniku (IPRED)



Slika 6: Odvisnost uteženih rezidualov (CWRESI) od časa (TAD)



Slika 7: Odvisnost uteženih rezidualov (CWRESI) od povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov (PRED)

4.3 VPLIV SOČASNIH SPREMENLJIVK

Sočasne spremenljivke za vključitev v osnovni model smo izbrali s programskim orodjem NONMEM. Vpliv posamezne kovariate na očistek in navidezni volumen porazdelitve smo ovrednotili na podlagi znižanja OFV v primerjavi z osnovnim modelom. Kot statistično značilno smo privzeli znižanje OFV, večje od 3,84, pri 5 % tveganju. S posamičnim testiranjem sočasnih spremenljivk, katerega povzetek je predstavljen v tabeli IV, smo ugotovili, da največje znižanje OFV, tj. najboljše ujemanje modela, dosežemo z vključitvijo vpliva spola na navidezni volumen porazdelitve. Dobljeni model smo kot nov osnovni model uporabili za vnovično posamično testiranje sočasnih spremenljivk, ki je povzeto v tabeli V. Ugotovili smo, da se ujemanje modela še dodatno izboljša z vključitvijo vpliva hitrosti glomerulne filtracije na navidezni plazemski očistek. Z nadaljnjim posamičnim testiranjem značilnih vplivov nismo več zaznali. Model z vključenima sočasnim spremenljivkama smo kot osnovni model uporabili za testiranje značilnosti genotipov in njihovih interakcij.

Tabela IV: Posamično testiranje vpliva sočasnih spremenljivk (1. stopnja)

Zvezne	Vpliv na očistek			Vpliv na volumen porazdelitve		
	TVCl	Δ OFV	p	TVV	Δ OFV	p
AGE [leta]	$\theta_{Cl} \times (AGE/50)^{\theta}$	0,744	0,379	$\theta_V \times (AGE/50)^{\theta}$	1,075	0,300
WT [kg]	$\theta_{Cl} \times (WT/70)^{\theta}$	0,848	0,357	$\theta_V \times (WT/70)^{\theta}$	6,606	0,010
HT [cm]	$\theta_{Cl} \times (HT/166)^{\theta}$	0,695	0,405	$\theta_V \times (HT/166)^{\theta}$	0,419	0,519
RA [meseci]	$\theta_{Cl} \times (RA/120)^{\theta}$	0,471	0,493	$\theta_V \times (RA/120)^{\theta}$	0,000	0,994
ALT	$\theta_{Cl} \times (ALT/0,35)^{\theta}$	0,032	0,859	$\theta_V \times (ALT/0,35)^{\theta}$	1,706	0,191
SCR [μ mol/L]	$\theta_{Cl} \times (SCR/78)^{\theta}$	3,318	0,069	$\theta_V \times (SCR/78)^{\theta}$	6,154	0,013
LF [leta]	$\theta_{Cl} \times (LF/3)^{\theta}$	0,000	0,991	$\theta_V \times (LF/3)^{\theta}$	0,997	0,318
GFR	$\theta_{Cl} \times (GFR/120)^{\theta}$	5,115	0,024	$\theta_V \times (GFR/120)^{\theta}$	0,377	0,539
BSA	$\theta_{Cl} \times (BSA/1,8)^{\theta}$	0,956	0,328	$\theta_V \times (BSA/1,8)^{\theta}$	5,728	0,017
Kategorične	TVCl	ΔOFV	p	TVV	ΔOFV	p
SX [0=m, 1=ž]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{SX})^{SX}$	0,150	0,699	$\theta_V \times (\theta_{SX})^{SX}$	8,596	0,003
TOB [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{TOB})^{TOB}$	0,304	0,582	$\theta_V \times (\theta_{TOB})^{TOB}$	6,451	0,111
NSAID [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{NSAID})^{NSAID}$	0,061	0,805	$\theta_V \times (\theta_{NSAID})^{NSAID}$	0,991	0,319
MTX [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{MTX})^{MTX}$	0,306	0,580	$\theta_V \times (\theta_{MTX})^{MTX}$	0,772	0,380
MED [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{MED})^{MED}$	1,097	0,295	$\theta_V \times (\theta_{MED})^{MED}$	0,009	0,923
DMARD [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{DMARD})^{DMARD}$	1,292	0,256	$\theta_V \times (\theta_{DMARD})^{DMARD}$	3,063	0,080

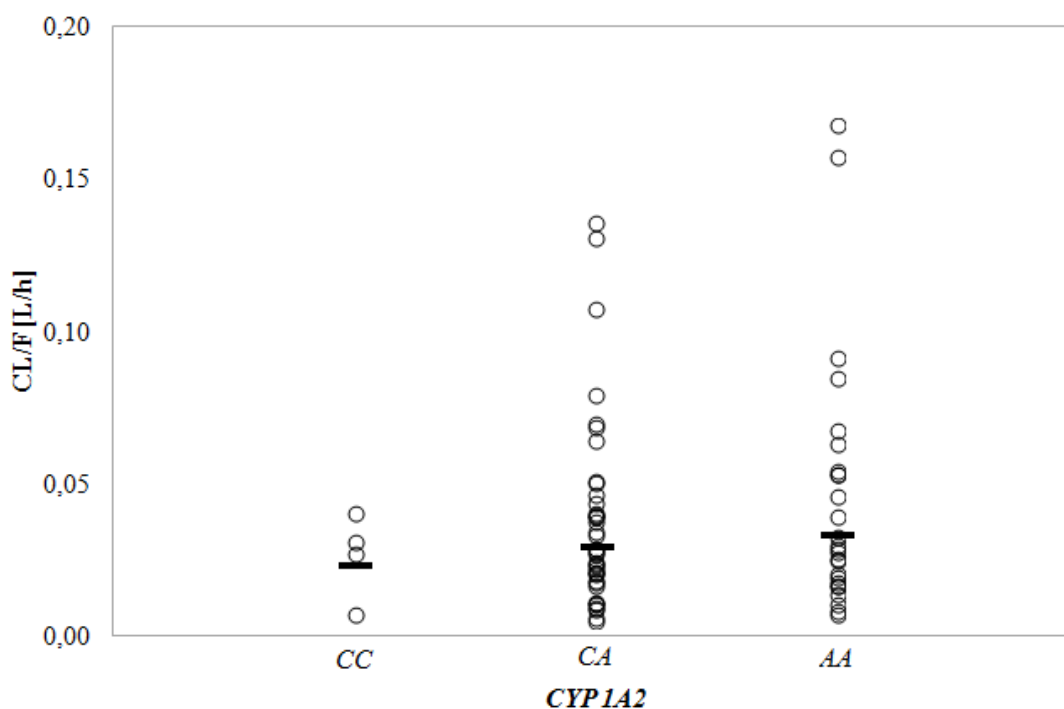
Tabela V: Posamično testiranje vpliva sočasnih spremenljivk (2. stopnja)

Zvezne	Vpliv na očistek			Vpliv na volumen porazdelitve		
	TVCI	Δ OFV	p	TVV	Δ OFV	p
AGE [leta]	$\theta_{Cl} \times (AGE/50)^{\theta}$	0,760	0,383	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (AGE/50)^{\theta}$	0,351	0,553
WT [kg]	$\theta_{Cl} \times (WT/70)^{\theta}$	0,471	0,492	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (WT/70)^{\theta}$	2,567	0,109
HT [cm]	$\theta_{Cl} \times (HT/166)^{\theta}$	0,469	0,493	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (HT/166)^{\theta}$	0,077	0,781
RA [meseci]	$\theta_{Cl} \times (RA/120)^{\theta}$	0,938	0,333	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (RA/120)^{\theta}$	0,102	0,749
ALT	$\theta_{Cl} \times (ALT/0,35)^{\theta}$	0,004	0,951	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (ALT/0,35)^{\theta}$	2,327	0,127
SCR [μmol/L]	$\theta_{Cl} \times (SCR/78)^{\theta}$	3,814	0,051	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (SCR/78)^{\theta}$	1,638	0,201
LF [leta]	$\theta_{Cl} \times (LF/3)^{\theta}$	0,218	0,641	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (LF/3)^{\theta}$	0,022	0,884
GFR	$\theta_{Cl} \times (GFR/120)^{\theta}$	4,069	0,044	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (GFR/120)^{\theta}$	0,283	0,595
BSA	$\theta_{Cl} \times (BSA/1,8)^{\theta}$	0,553	0,457	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (BSA/1,8)^{\theta}$	1,902	0,168
Kategorične	TVCI	ΔOFV	p	TVV	ΔOFV	p
SX [0=m, 1=ž]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{sx})^{sx}$	0,011	0,915	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx}$	/	/
TOB [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{TOB})^{TOB}$	0,282	0,596	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (\theta_{TOB})^{TOB}$	3,381	0,066
NSAID [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{NSAID})^{NSAID}$	0,241	0,623	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (\theta_{NSAID})^{NSAID}$	0,448	0,503
MTX [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{MTX})^{MTX}$	0,432	0,511	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (\theta_{MTX})^{MTX}$	0,527	0,468
MED [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{MED})^{MED}$	1,238	0,266	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (\theta_{MED})^{MED}$	0,002	0,966
DMARD [0=ne, 1=da]	$\theta_{Cl} \times (\theta_{DMARD})^{DMARD}$	1,314	0,252	$\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx} \times (\theta_{DMARD})^{DMARD}$	1,258	0,262

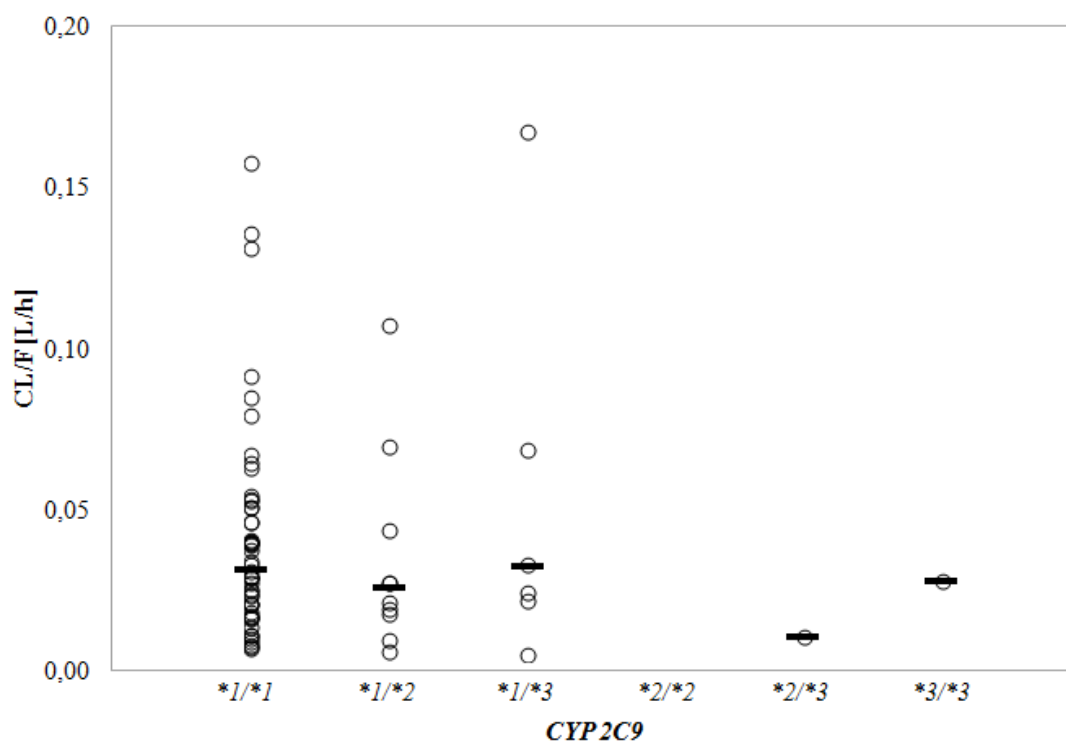
Genotipe smo združevali na podlagi grafičnega prikaza odvisnosti *post hoc* ocen navideznega očistka (Cl/F) A77 1726 od genotipov *CYP 1A2*, *CYP 2C9* in *CYP 2C19* (slike 8, 9 in 10) ter glede na literaturne podatke. V prvem primeru *CYP 1A2* smo združili genotipa CA in AA, saj naj bi bili bolniki z genotipom CC izpostavljeni 9,7-krat večjemu tveganju za toksične učinke leflunomida, v drugem primeru pa smo genotip CC zaradi nizke pogostnosti v populaciji bolnikov (5,8 %) združili z genotipom CA (31, 33). Pri *CYP 2C9* smo divji tip (*1/*1) najprej primerjali z vsemi ostalimi genotipi, nato pa smo genotipa *1/*2 in *1/*3 združili v eno, genotipa *2/*3 in *3/*3 pa v drugo skupino, saj sta

alela *2 in *3 manj aktivna od alela *1 z normalno aktivnostjo (49). Pri *CYP 2C19* smo v prvem primeru genotipa *1/*17 in *17/*17 združili v eno, genotipa *1/*2 in *2/*17 pa v drugo skupino, tretjo skupino je predstavljal divji tip (*1/*1). Alel *2 ima v primerjavi z alelom *1 namreč manjšo aktivnost, medtem ko je alel *17 bolj aktiven. V drugem primeru smo divji tip (*1/*1) združili z genotipoma *1/*2 in *2/*17.

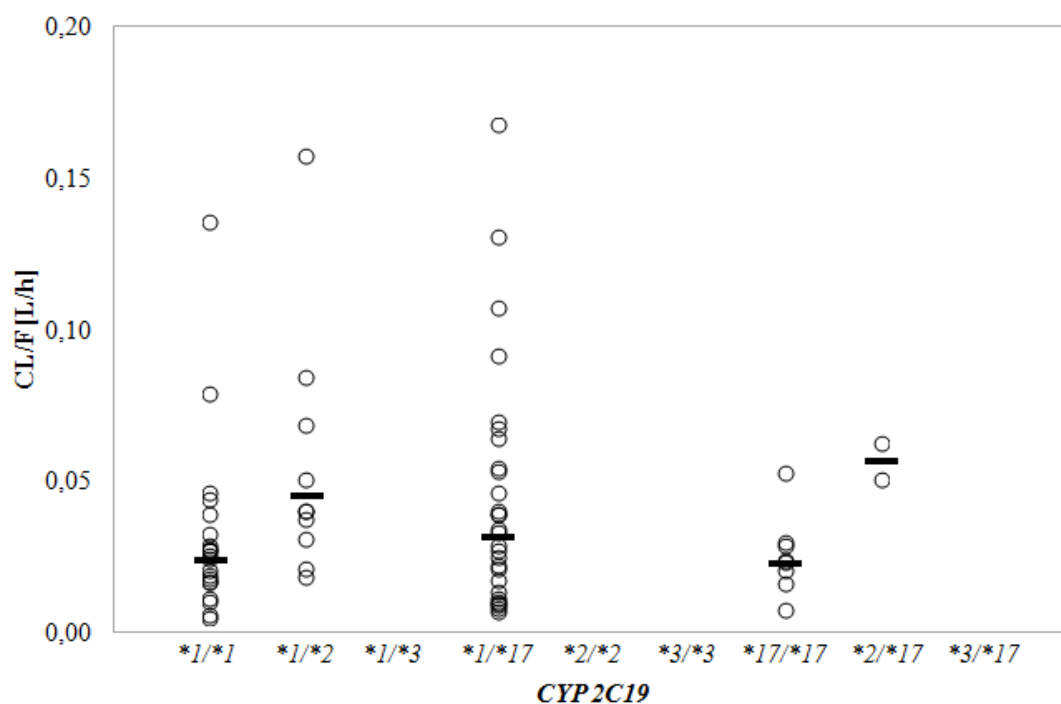
Z enofaktorsko ANOVA, ki smo jo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS, smo nato ugotavljali, katere od dobljenih kombinacij združevanj posameznih genotipov *CYP 1A2*, *CYP 2C9* in *CYP 2C19* najbolje opišejo interindividualno variabilnost navideznega očistka. Na enak način smo preverili tudi možne interakcije med omenjenimi geni. V nadaljevanju smo – prav tako s SPSS – identificirali vse obstoječe interakcije med posameznimi genotipi in hkrati dobili tudi informacijo o številu bolnikov, pri katerih so le-te prisotne. Ugotovitve so prikazane v tabelah VI, VII in VIII.



Slika 8: *Post hoc* ocene navideznega očistka (CL/F) A77 1726 posameznih bolnikov v odvisnosti od njihovih genotipov *CYP 1A2*; vodoravne črte predstavljajo mediano CL/F vsake skupine genotipov



Slika 9: *Post hoc* ocene CL/F A77 1726 posameznih bolnikov v odvisnosti od njihovih genotipov CYP 2C9



Slika 10: *Post hoc* ocene CL/F A77 1726 posameznih bolnikov v odvisnosti od njihovih genotipov CYP 2C19

Tabela VI: Združeni genotipi in število bolnikov s temi genotipi

Dejavnik	Genotip	N
A2	CC+CA	43
	AA	26
C19	*1/*1	21
	*1/*2 + *2/*17	12
	*1/*17 + *17/*17	36
C9	*1/*1	51
	*1/*2 + *1/*3	16
	*2/*3 + *3/*3	2

Tabela VII: Obstoječe interakcije med genotipi in število bolnikov, pri katerih so prisotne.

CYP 1A2	CYP 2C19	CYP 2C9	N
CC	*1/*1	*1/*2	1
CC	*1/*2	*1/*1	2
CC	*17/*17	*1/*1	1
CA	*1/*1	*1/*1	8
CA	*1/*1	*1/*2	2
CA	*1/*1	*1/*3	2
CA	*1/*2	*1/*1	5
CA	*1/*2	*1/*3	1
CA	*1/*17	*1/*1	10
CA	*1/*17	*1/*2	5
CA	*1/*17	*1/*3	1
CA	*17/*17	*1/*1	4
CA	*2/*17	*1/*1	1
AA	*1/*1	*1/*1	4
AA	*1/*1	*1/*2	2
AA	*1/*1	*1/*3	1
AA	*1/*1	*3/*3	1
AA	*1/*2	*1/*1	2
AA	*1/*17	*1/*1	10
AA	*1/*17	*1/*3	1
AA	*1/*17	*2/*3	1
AA	*17/*17	*1/*1	3
AA	*2/*17	*1/*1	1

Tabela VIII: Rezultat ANOVA: značilni genotipi in interakcije

Odvisna spremenljivka: $\eta_{CI/F}$

Dejavnik	Vsota kvadratov	df	Varianca	F	p
A2	3,155	1	3,155	6,137	0,016
C19	3,379	2	1,689	3,286	0,045
C9	0,902	2	0,451	0,878	0,421
A2*C19	3,518	2	1,759	3,421	0,040
A2*C9	2,996	1	2,996	5,827	0,019
C19*C9	4,229	3	1,410	2,741	0,052
A2*C19*C9	0,483	1	0,483	0,940	0,337
Napaka	28,793	56	0,514		
Skupaj	39,555	69			

$R^2 = 0,272$

$R^2_{Adj} = 0,116$

Poleg genov *CYP 1A2* in *CYP 2C19* se je kot značilna izkazala tudi njuna interakcija ter interakcija med *CYP 1A2* in *CYP 2C9*. Za njihovo testiranje smo uporabili model z že vključenima sočasnima spremenljivkama, pri katerih je bila sprememba značilna. Vplive genotipov in interakcij na navidezni plazemski očistek smo ovrednotili na podlagi 95 % intervala zaupanja, ki smo ga izračunali iz ocene parametra v populaciji (θ) in njene standardne napake (SE):

$$95 \% CI = \theta \pm 1,96 \times SE$$

Enačba 29

Statistično značilen je vpliv, katerega 95 % interval zaupanja ne vsebuje vrednosti 0.

S prvim modelom smo preizkusili vplive:

- združenih genotipov *CYP 2C19* *1/*2 in *2/*17, *CYP 2C19* *1/*17 in *17/*17 ter genotipa *CYP 1A2* AA,
- interakcij med *CYP 1A2* AA in združenimi genotipi *CYP 2C9* *1/*2 in *1/*3, *CYP 2C9* *2/*3 in *3/*3, *CYP 2C19* *1/*2 in *2/*17, *CYP 2C19* *1/*17 in *17/*17.

Ker se nobeden od vplivov ni izkazal kot statistično značilen, smo stalnemu učinku genotipa *CYP 2C19* (*1/*17+*17/*17) pripisali vrednost 0 (z modelom ocenjena vrednost je bila zanemarljivo majhna). Rezultati se niso bistveno spremenili. V nadaljevanju smo združili vpliva interakcij *CYP 1A2* AA s *CYP 2C9* (*1/*2+*1/*3) in

CYP 2C9 (*2/*3+*3/*3), saj je bila prva od interakcij prisotna le pri treh, druga pa le pri enem bolniku. Značilnih vplivov nismo zaznali, zato smo stalnemu učinku interakcije CYP 1A2 AA s CYP 2C19 (*1/*17+*17/*17) nato pripisali vrednost 0. Nobeden od vplivov ni postal značilen. Ker je bila ocenjena θ genotipa CYP 1A2 AA zanemarljivo majhna, smo zanj predpostavili vrednost 0. Po tej poenostavitvi se je kot statistično značilen izkazal vpliv interakcije CYP 1A2 AA s CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17), saj njegov 95 % CI (0,056-2,463) ni vključeval vrednosti 0. V nadaljevanju smo vrednost 0 pripisali še stalnemu učinku združenih interakcij CYP 1A2 AA s CYP 2C9, a so rezultati ostali nespremenjeni.

V polni model smo vključili vpliv spola na volumen porazdelitve ter GFR, CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17) in interakcije CYP 1A2 AA s CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17) na očistek. Za vključitev CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17) smo se odločili na podlagi pretekle raziskave vpliva genskih polimorfizmov na farmakokinetiko A77 1726, v kateri Bohanec Grabar in sodelavci poročajo o značilnem zvišanju navideznega očistka pri bolnikih z alelom CYP 2C19 *2 (32). V naslednjem koraku smo iz polnega modela postopoma odvezemali sočasne spremenljivke ter opazovali značilnost njihovega vpliva, pri čemer smo ohranili enak kriterij kot pri posamičnem testiranju. Če je bilo zvišanje OFV po odstranitvi določene kovariate značilno, smo jo vključili v končni model. Značilno spremembo OFV smo opazili le pri odvzemu spola, vseeno pa smo poleg te kovariate v modelu ohranili CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17) in interakcijo CYP 1A2 AA s CYP 2C19 (*1/*2+*2/*17), saj smo želeli vpliv genskega polimorfizma encimov ovrednotiti še z randomizacijskim testom.

S končnim modelom smo pridobili oceni srednjih vrednosti $Cl/F = 0,0267 \text{ L/h}$ in $V/F = 22,9 \text{ L}$. Model smo opisali z enačbama:

$$Cl/F[L/H] = 0,0267 \times 1,40^{GEN2} \times 2,51^{GEN5} \quad \text{Enačba 30}$$

$$V_d[L] = 22,9 \times 0,35^{SX} \quad \text{Enačba 31}$$

GEN2 = 1, če ima bolnik genotip CYP 2C19 *1/*2 ali CYP 2C19 *2/*17, GEN5 = 1, če ima tak bolnik hkrati tudi genotip CYP 1A2 AA in SX = 1 pri bolnicah ženskega spola.

Končni model je ovrednoten v tabeli IX.

Tabela IX: Vrednotenje končnega modela

	Končni model				Bootstrap		
	OFV=866,6282 Število signifikantnih mest=3,3				Mediana	RSE [%]	Neparametrični 95 % CI
Parameter	Ocena	RSE [%]	95 % CI				
<i>Stalni učinki</i>							
k_a [h ⁻¹]	1*			1*			
Cl [L/h]	0,0267	10,6	0,0211 – 0,0323	0,0264	10,6	0,0213 – 0,0331	
V [L]	22,3	10,6	17,7 – 26,9	22,6	9,20	16,0 – 45,7	
<i>Sočasne spremenljivke</i>							
SX_V	-0,653	-7,47	-0,749 – (-0,557)	-0,676	-6,08	-0,834 – (-0,470)	
GEN2_CI	0,401	60,0	-0,0712 – 0,873	0,404	56,9	0,00565 – 1,047	
GEN5_CI	1,51	42,8	0,242 – 2,78	1,55	35,5	0,551 – 3,70	
<i>Interindividualna variabilnost</i> (krčenje -0,351 %)							
η_{Cl} [CV %]	54,8	17,1	36,4 – 73,2	54,0	17,2	36,2 – 72,1	
<i>Rezidualna variabilnost</i> (krčenje 17,9 %)							
W_p [CV %]	7,33	7,39	7,32 – 7,34	7,21	7,61	5,92 – 8,41	
W_a [mg/L]	0,267	21,0	0,157 – 0,377	0,273	21,0	0,114 – 0,	

* Hitrostne konstante nismo ocenjevali, ampak smo ji pripisali vrednost 1.

4.4 RANDOMIZACIJSKI TEST

Randomizacijski test končnega modela smo izvedli z Wings for NONMEM. Za zagon procesa randomizacije smo uporabili ukazno datoteko nmrt, ki deluje enako kot nmgo, le da ima dva dodatna argumenta: covname (ime sočasne spremenljivke v NM-TRAN zapisu \$INPUT) in NBOOT (število ponovitev randomizacije). Ukaz za randomizacijo sočasne spremenljivke SX (spol), vključene v končni model Base_vsi.mod, smo zapisali kot:

```
nmrt sx Base_vsi 1000
```

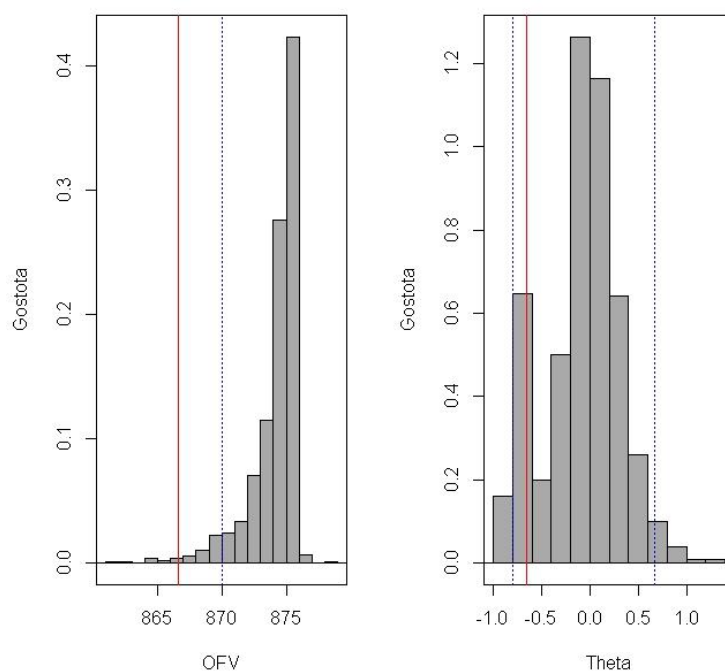
1000 pomeni število ponovitev procesa randomizacije.

Na enak način smo zapisali ukaza za randomizacijo preostalih dveh sočasnih spremenljivk, vključenih v končni model, GEN2 (združena genotipa *CYP 2C19* *1/*2 in *2/*17) ter GEN5 (interakcija med združenima genotipoma *CYP 2C19* *1/*2 in *2/*17 ter genotipom *CYP 1A2 AA*):

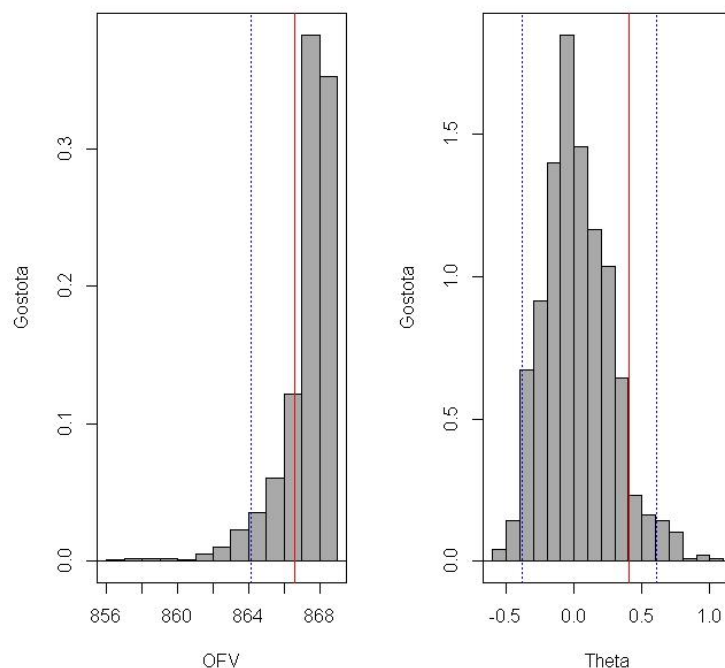
```
nmrt gen2 Base_vsi 1000
```

```
nmrt gen5 Base_vsi 1000
```

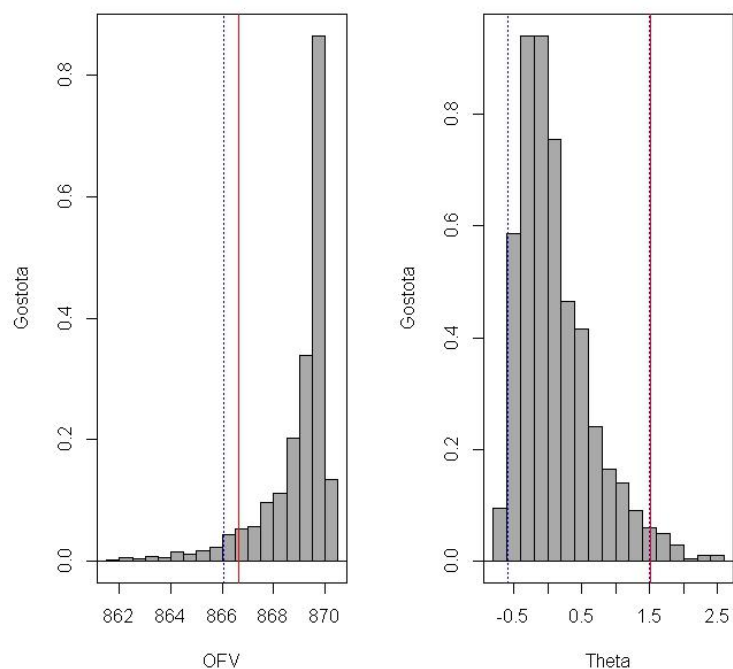
Kot rezultat randomizacijskega testa smo dobili številčne vrednosti, razširjene v besedilno datoteko (Base_vsi.txt), ki so povzetek procesa randomizacije. Za njihovo obdelavo smo uporabili računalniški program Excel. Najprej smo izločili neuspešne ponovitve, uspešne pa razvrstili na dva načina: enkrat po OFV, drugič po θ (θ_{SX} , θ_{GEN2} ali θ_{GEN5}). Nato smo zaporedno številko vsake ponovitve delili s številom vseh uspešnih ponovitev in tako dobili vrednosti pripadajočih centilov. V naslednjem koraku smo vrednost OFV končnega modela, primerjali z vrednostjo 5. centila, tj. mejno vrednostjo OFV pri 5 % tveganju. Enako smo postopali pri stalnih učinkih, kjer mejno vrednost določata 2,5. in 97,5. centil. Kot značilen se je glede na porazdelitev OFV izkazal vpliv spola na volumen (nižji OFV končnega modela v primerjavi z mejno vrednostjo, določeno z randomizacijskim testom), glede na porazdelitev θ pa vpliv interakcije *CYP 1A2 AA* s *CYP 2C19* (*1/*2+*2/*17) na plazemski očistek (s končnim modelom ocenjena θ je višja od zgornje mejne vrednosti, določene z randomizacijskim testom). Slike 11, 12 in 13 prikazujejo porazdelitve randomiziranih vrednosti OFV in stalnih učinkov. Modra prekinjena črta označuje mejne vrednosti, polna rdeča črta pa vrednosti, določene s končnim modelom.



Slika 11: Porazdelitev vrednosti OFV in θ_{SX} po 1000 ponovitvah postopka randomizacije sočasne spremenljivke SX (spol); modra prekinjena črta v prvem primeru (OFV) predstavlja vrednost 5. centila, v drugem (θ) pa vrednosti 2,5. in 97,5. centila



Slika 12: Porazdelitev vrednosti OFV in θ_{GEN2} po 1000 ponovitvah postopka randomizacije sočasne spremenljivke GEN2



Slika 13: Porazdelitev vrednosti OFV in θ_{GEN5} po 1000 ponovitvah postopka randomizacije sočasne spremenljivke GEN5

Randomizacijski test smo izvedli še s 5000 ponovitvami, a se rezultat ni bistveno spremenil.

5. RAZPRAVA

Pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, ki se zdravijo z leflunomidom, prihaja do velikih razlik v plazemskih koncentracijah njegovega aktivnega metabolita, A77 1726. Omenjena interindividualna variabilnost je posledica polimorfizma genov za citokrome P450, ki sodelujejo v presnovi leflunomida (predzdravilo) v A77 1726, vzrok zanjo pa je zagotovo tudi z navodili neskladno jemanje zdravila. Izmed 71 bolnikov, ki so bili od septembra 2006 do septembra 2007 vključeni v raziskavo Bolnišnice dr. Petra Držaja in katerih podatke smo za razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela uporabili tudi mi, so na slabo vodljivost posumili pri 6. Pri populacijski farmakokinetični analizi smo kljub temu upoštevali podatke 69 bolnikov; izločili smo le 2 izmed 6 slabo vodljivih bolnikov, ki sta imela glede na CDD (*ang. case deletion diagnostics*) najvišje Cookovo število in najnižje razmerje kovarianc (32). Model bi lahko izboljšali z izključitvijo vseh 6 slabo sodelujočih bolnikov, sploh ob upoštevanju dejstva, da je bila plazemska koncentracija A77 1726 pri vseh nižja od 5 mg/L. Zgolj na podlagi razgovora z bolnikom zdravnik ne more z gotovostjo sklepati, ali je bilo jemanje zdravila v skladu z navodili. V raziskavo bi bilo potrebno vključiti več bolnikov, ki bi bili pripravljeni tudi sami voditi dnevnik jemanja zdravila in kliniko obiskati večkrat, ne le na dan rednega pregleda, saj bi bilo smiselno pridobiti več plazemskih vzorcev.

Populacijsko farmakokinetično modeliranje smo začeli z razvojem osnovnega (strukturnega) modela. Predpostavili smo enoprostorni model in 1. red absorpcije, kinetiko pa smo se odločili opisati z očistkom in volumnom porazdelitve. Zaradi kratkega odmernega intervala in dolgega razpolovnega časa učinkovine je plazemski koncentracijski profil leflunomida podoben profilu dolgotrajne infuzije, kar onemogoča ocenjevanje hitrostne konstante absorpcije (34). Njeno približno vrednost, 1 h^{-1} , smo izračunali iz literaturnih podatkov o razpolovnem času leflunomida (336 h oz. 14 dni) in času za doseg maksimalne koncentracije učinkovine (6-12 ur) (32). Dobljeni vrednosti η - in ε -krčenja (manjši kot 20 %) potrjujeta, da z modelom ocenjeni parametri dobro ponazarjajo dejanske; pojav zelo majhne negativne vrednosti η -krčenja je najverjetneje posledica premajhnega števila v analizo vključenih bolnikov (42).

Iz standardnih napak ocenjenih parametrov smo izračunali parametrični 95 % interval zaupanja, z uporabo neparametrične bootstrap-metode pa smo določili tudi neparametrični 95 % interval zaupanja, saj porazdelitve parametrov v populaciji ne poznamo, neparametrični testi pa imajo pri vzorčenju iz nesimetričnih porazdelitev, ki odstopajo od

normalne, večjo moč kot parametrični. Med vrednostmi obeh ni večjih razlik, iz česar lahko sklepamo, da porazdelitev parametrov oz. njihove variabilnosti skoraj ne odstopa od normalne.

Iz grafičnega prikaza odvisnosti navideznega očistka (Cl/F) A77 1726 od genotipov *CYP 2C19* (slika 10) vidimo značilen trend večjega Cl/F pri bolnikih z alelom *2, ki ima izraženo manjšo encimsko aktivnost od alela *1 z normalno aktivnostjo. Encim *CYP 2C19* se v glavnem nahaja v jetrih, znatno količino pa najdemo tudi v črevesni steni, iz česar sledi, da hkrati potekata tako absorpcija kot tudi presnova leflunomida v aktivni metabolit. Sklepamo, da je večji Cl/F pri bolnikih z manj aktivnim alelom posledica manjšega obsega absorpcije (F), očistek pa najverjetneje ostane nespremenjen.

Z analizo variance (ANOVA) enega faktorja smo ugotovili, da vpliv genskih polimorfizmov in njihovih interakcij na interindividualno variabilnost navideznega očistka najbolje opišemo v primeru združitve genotipov s podobno aktivnostjo. Pri *CYP 1A2* smo združili genotipa CC in CA ter ju obravnavali kot divji tip, kar je v nasprotju z raziskavo Bohanec Grabar in sodelavcev, po kateri naj bi bili bolniki z genotipom CC izpostavljeni 9,7-krat večjemu tveganju za toksične učinke leflunomida, sklada pa se z novejšo raziskavo polimorfizmov citokromov P450, ki so jo izvedli Wiese in sodelavci (31, 33). V primeru *CYP 2C9* smo zaradi manjše aktivnosti alelov *2 in *3 ločeno obravnavali združena genotipa *1/*2 in *1/*3 ter *2/*3 in *3/*3. Pri *CYP 2C19* smo z divjim tipom primerjali združena genotipa s prisotnim manj aktivnim alelom *2 ter združena genotipa *1/*17 in *17/*17 (alel *17 ima izraženo večjo encimsko aktivnost). Poleg vpliva genov *CYP 1A2* in *CYP 2C19* sta se kot značilna izkazala tudi vpliv njune interakcije ter vpliv interakcije med *CYP 1A2* in *CYP 2C9*. Prva od ugotovitev je v skladu z izsledki *in vitro* študij na človeških jetrnih mikrosomih in rekombinantnih izoencimih CYP, po katerih naj bi pretvorbo leflunomida v A77 1726 kataliziral predvsem *CYP 1A2*, v manjši meri pa tudi *CYP 2C19* in *CYP 3A4* (26). Ovrednotenja vpliva interakcij na farmakokinetiko A77 1726 v dosedanjih študijah nismo zasledili.

Nadaljnje testiranje polimorfizmov značilnih genov ter značilnih interakcij z modelom ni dalo povsem pričakovanih rezultatov, saj vpliv genotipov *CYP 2C19* z manj aktivnim alelom *2 ni bil večji od mejne vrednosti značilnosti. Uspelo pa nam je identificirati interakcijo z značilnim vplivom na interindividualno variabilnost očistka: ugotovili smo, da se navidezni očistek značilno poveča pri bolnikih z genotipom *CYP 2C19* *1/*2 ali *2/*17, ki imajo hkrati prisoten tudi genotip *CYP 1A2* AA. Glede na rezultate testa razmerja verjetja bi morali po postopnem odvzemanju sočasnih spremenljivk iz polnega

modela v končnem modelu ohraniti zgolj vpliv spola na navidezni volumen porazdelitve, saj vpliva genotipov *CYP 2C19* z alelom *2 in njune interakcije s *CYP 1A2* AA na interindividualno variabilnost navideznega očistka nista bila večja od mejne vrednosti značilnosti, česar nismo pričakovali. Kljub temu smo se oba vpliva odločili ohraniti v končnem modelu. Podatki raziskave vpliva polimorfizma gena *CYP 2C19* na farmakokinetiko A77 1726 pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, ki so jo izvedli Bohanec Grabar in sodelavci, namreč kažejo na 71 % večji navidezni očistek pri nosilcih alela *2 (32). Poleg tega pred farmakokinetično analizo nismo izločili vseh bolnikov s plazemsko koncentracijo A77 1726, manjšo od 5 mg/L, pri katerih je obstajal sum, da zdravila ne jemljejo v skladu z navodili. Upoštevati je potrebno tudi podatek, da so bili bolnikom odvzeti le 3 vzorci krvi, število vzorcev na posameznika pa ima na stopnjo statistične značilnosti pomemben vpliv (8).

Interindividualna variabilnost (IIV) navideznega očistka, ocenjena z osnovnim modelom, je bila 91,9 %. Po vključitvi vpliva genotipov *CYP 2C19* z alelom *2 in njune interakcije s *CYP 1A2* AA v model se je IIV zmanjšala na 54,8 %. Vzroki velike IIV tega farmakokinetičnega parametra so najverjetneje razlike v obsegu absorpcije (manjši obseg absorpcije pri bolnikih z manj aktivnim alelom *CYP 2C19* *2), visoka stopnje vezave A77 1726 na plazemske beljakovine (albumine) in enterohepatična cirkulacija. Vrednost geometrične sredine navideznega očistka, ocenjena s končnim modelom, je znašala 0,0267 L/h, kar je v skladu z dolgim razpolovnim časom (14 dni) in se ujema z ugotovitvami že objavljenih farmakokinetičnih analiz (32, 50). Navidezni volumen porazdelitve pri bolnikih moškega spola je bil 22,9 L, pri bolnicah ženskega spola pa 2,86-krat manjši. O primerljivem rezultatu poročajo tudi Bohanec Grabar in sodelavci (32). Pri razvoju populacijskega farmakokinetičnega modela se je tvegano zanašati zgolj na rezultate testa razmerja verjetja, zato smo značilnost sočasnih spremenljivk preverili tudi z randomizacijskim testom, ki zagotavlja alternativno oceno stopnje značilnosti. Ker je časovno zelo zamuden, kar je tudi njegova bistvena slabost, smo se osredotočili le na kovariate, ki smo jih vključili v končni model. Uporabili smo t. i. permutacijsko metodo, saj zagotavlja identično porazdelitev sočasnih spremenljivk pred randomizacijo in po njej. Glede na porazdelitev vrednosti objektivne funkcije (OFV) je pri stopnji tveganja 0,05 značilen vpliv spola na volumen, glede na porazdelitev θ pa vpliv interakcije med *CYP 1A2* AA in *CYP 2C19* *1/*2 ali *2/*17 na plazemski očistek. Vpliv genotipov *CYP 2C19* z alelom *2 na plazemski očistek se ni izkazal kot značilen, kar smo glede na

predhodne rezultate postopnega vključevanja in izključevanja sočasnih spremenljivk tudi pričakovali.

Med 69 bolniki, ki so bili vključeni v populacijsko farmakokinetično analizo, je 4,4 % takšnih, ki imajo poleg genotipa *CYP 2C19* *1/*2 ali *CYP 2C19* *2/*17 hkrati prisoten tudi genotip *CYP 1A2* AA. Odstotek ni zanemarljiv. Smiselno bi bilo raziskati, ali se vpliv posameznih genotipov *CYP 2C19* s prisotnim manj aktivnim alelom *2 bistveno razlikuje od vpliva njunih interakcij z genotipom *CYP 1A2* AA ter zagotoviti individualizacijo režima odmerjanja leflunomida.

6. SKLEP

V diplomski nalogi smo z uporabo populacijskega pristopa farmakokinetične analize na osnovi nelinearnega modeliranja mešanih učinkov s programskim orodjem NONMEM ugotavljali, ali pri bolnikih z revmatoidnim artritisom obstaja značilna povezava med interindividualnimi razlikami v plazemskih koncentracijah aktivnega metabolita leflunomida (A77 1726) in polimorfizmi genov za citokrome, ki so udeleženi v presnovi učinkovine.

Za opis časovnega poteka plazemskih koncentracij A77 1726 smo uporabili enoprostorni model s 1. redom absorpcije, parametre pa smo ocenjevali z aproksimacijsko metodo FOCE INTER.

S posamičnim testiranjem sočasnim spremenljivk nam značilnosti vpliva genotipov *CYP 2C19* z (manj aktivnim) alelom *2 na navidezni očistek ni uspelo potrditi, identificirali pa smo njuno interakcijo s *CYP 1A2 AA*, ki bi lahko bila klinično pomembna. Z randomizacijskim testom smo dokazali, da ima omenjena interakcija glede na porazdelitev θ značilen vpliv na navidezni očistek.

Potrdili smo vpliv spola na navidezni volumen porazdelitve. Ženske so imele 2,86-krat manjši navidezni volumen porazdelitve kot moški.

Populacijska farmakokinetična analiza bi bila uspešnejša, če bi na voljo imeli več plazemskih vzorcev posameznega bolnika in če bi izločili podatke vseh slabo vodljivih bolnikov, pri katerih je bila plazemska koncentracija leflunomida nižja od 5 mg/L. Zmogljivejša računalniška oprema bi nam omogočila hitrejšo izvedbo sicer zamudnih računalniško intenzivnih metod (bootstrap, randomizacijski test).

Smiselno bi bilo raziskati, ali se vpliv posameznih genotipov *CYP 2C19* s prisotnim manj aktivnim alelom *2 bistveno razlikuje od vpliva njunih interakcij z genotipom *CYP 1A2 AA* ter zagotoviti individualizacijo režima odmerjanja leflunomida.

7. LITERATURA IN VIRI

1. Bonate PL: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation, Springer, New York, 2006: 205-65.
2. Wählby U: Methodological Studies on Covariate Model Building in Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis. Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 280. 2002.
3. Vučićević K, Miljković B, Vezmar Kovačević S, Todorović Z, Prostran M, Grabnar I: Population Pharmacokinetic Analysis of Therapeutic Drug Monitoring Data in Optimizing Pharmacotherapy of Antiepileptic Drugs. Novel Treatment of Epilepsy 2011; Chapter 6: 96-106. Najdeno 9. novembra 2012 na spletni strani <http://www.intechopen.com/books/novel-treatment-of-epilepsy/population-pharmacokinetic-analysis-of-therapeutic-drug-monitoring-data-in-optimizing-pharmacotherap>.
4. Ette EI, Williams PJ: Population Pharmacokinetics I: Background, Concepts, and Models. The Annals of Pharmacotherapy 2004; 38: 1702-6.
5. Ette EI, Williams PJ, Lane JR: Population Pharmacokinetics III: Design, Analysis, and Application of Population Pharmacokinetic Studies. The Annals of Pharmacotherapy 2004; 38: 2136-42.
6. Ribbing J: Covariate Model Building in Nonlinear Mixed Effects Models. Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 59. 2007.
7. Fisher D, Shafer S: Fisher/Shafer NONMEM Workshop, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis with NONMEM, Basic Concepts, 2007: 6-38.
8. Wählby U, Jonsson NE, Karlsson MO: Assessment of Actual Significance Levels for Covariate Effects in NONMEM. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 2001; 28(3): 231-51.
9. Lane MD: HyperStat Online Statistics Textboox. Introduction to Statistics. About inferential statistics. Najdeno 12. decembra 2012 na spletni strani <http://davidmlane.com/hyperstat/intro.html>.
10. Locatelli I: Sklepna statistika. Gradivo za 4. vajo iz Farmacevske informatike. Najdeno 12. decembra 2012 na spletni strani http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevska_informatika/4.vaja_-_predstavitev_2009-2010.pdf.

11. Bonate PL: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation, Springer, New York, 2006: 353-64.
12. Bolton S, Bon C: Pharmaceutical Statistics, 4th Ed., Marcel Dekker, New York, 2004: 451-67.
13. StatSoft, Inc.: Electronic Statistics Textbook. Nonparametric Statistics. StatSoft, Tulsa, 2013. Najdeno 12. decembra na spletni strani <http://www.statsoft.com/textbook/nonparametric-statistics/?button=2>.
14. Lane MD: HyperStat Online Statistics Textbook. Distribution-Free Tests. Overview. Randomization tests. Najdeno 14. decembra na spletni strani http://davidmlane.com/hyperstat/dist_free.html.
15. Golja M, Brecelj M, Hočevan A, Huzjan B, Kastelic-Klasinc C, Kraut A, Lestan B, Logar D, Pfeifer M, Plešivčnik-Novljan M, Praprotnik S, Resman D, Rotar Ž, Rozman B, Šipek-Dolničar A, Tomšič M, Žlebič J: Kako živeti z revmatizmom: bolečina, samopomoč, zdravljenje, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2005: 21.
16. Anderluh M: Revmatoidni artritis. Revmatoidni artritis: zbornik predavanj, Zdravstveni tim 2011, 2011: 30-1.
17. DiPiro JT, Talbert RL, Matzke GR, Yee GC, Wells BG, Posey ML: Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 7th Ed., McGraw-Hill, New York, 2008: 1505-08.
18. Roche, d.o.o.: O revmatoidnem artritisu. Etiopatogeneza. Patohistološke spremembe sinovijske ovojnice. Zdravila. DMARD. Ljubljana, 2013. Najdeno 7. januarja 2013 na spletni strani <http://www.revmatoidni-artritis.si>.
19. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Doina Vrabie C, Tanasescu R: Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. Maedica 2010; 5(4): 286-91.
20. Bratkovič T: Biološke učinkovine za zdravljenje revmatoidnega artritisa. Revmatoidni artritis: zbornik predavanj, Zdravstveni tim 2011, 2011: 19-23.
21. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 48-55.
22. O'Dell JR: Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. The New England Journal of Medicine 2004; 350: 2591-602.
23. Revma.net, d.o.o.: Revmatološki priročnik za družinskega zdravnika. Najdeno 4. februarja 2013 na spletni strani <http://www.revma.net>.
24. Bondeson J: The Mechanisms of Action of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: A review with Emphasis on Macrophage Signal Transduction and the Induction of

- Proinflammatory Cytokines. General Pharmacology: The Vascular System 1997; 29(2): 127-50.
25. Sanofi-Aventis, d.o.o.: Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Arava. Najdeno 17. septembra 2012 na spletni strani http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000235/WC500026289.pdf.
26. Kalgutkar AS, Nguyen HT, Vaz ADN, Doan A, Dalvie DK, McLeod DG, Murray JC: In vitro metabolism studies on the isoxazole ring scission in the anti-inflammatory agent leflunomide to its active ALPHA-cyanoenol metabolite A771726: mechanistic similarities with the cytochrome P450-catalyzed dehydration of aldoximes. Drug Metabolism and Disposition 2003; 31(10): 1240-50.
27. Sanofi U.S.: Prescribing Information. Arava. Najdeno 17. septembra 2013 na spletni strani <http://products.sanofi.us/arava/arava.pdf>.
28. Rozman B: Clinical Pharmacokinetics of Leflunomide. Clinical Pharmacokinetics 2002; 41(6): 421-30.
29. Hoi A, Littlejohn G: Leflunomide. Antirheumatic Therapy: Actions and Outcomes 2005: 199-219. Najdeno 21. januarja 2013 na spletni strani http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-7643-7726-7_10.pdf.
30. Li EK, Tam LS, Tomlison B: Leflunomide in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Clinical Therapeutics 2004; 26(4): 447-56.
31. Bohanec Grabar P, Rozman B, Tomšič M, Šuput D, Logar D, Dolžan V: Genetic polymorphism of CYP1A2 and the toxicity of leflunomide treatment in rheumatoid arthritis patients. European Journal of Clinical Pharmacology 2008; 64: 871-6.
32. Bohanec Grabar P, Grabnar I, Rozman B, Logar D, Tomšič M, Šuput D, Trdan T, Peterlin Mašič L, Mrhar A, Dolžan V: Investigation of the Influence of CYP1A2 and CYP2C19 Genetic Polymorphism on 2-Cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2-butenamide (A77 1726) Pharmacokinetics in Leflunomide-Treated Patients with Rheumatoid Arthritis. Drug Metabolism and Disposition 2009; 37(10): 2061-68.
33. Wiese MD, Schnabl M, O'Doherty C, Spargo LD, Sorich MJ, Cleland LG, Proudman SM: Polymorphisms in cytochrome P450 2C19 enzyme and cessation of leflunomide in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 2012; 14(4): R163.

34. Trdan T: Populacijska analiza farmakokinetike aktivnega metabolita leflunomida pri bolnikih z revmatoidnim artritisom. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
35. Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL: NONMEM Users Guide - Part V, Introductory Guide, University of California, San Francisco, 2011: 1-2.
36. ICON plc – CRO for Drug Development: Tehnology. ICON Products. NONMEM. Najdeno 19. novembra 2012 na spletni strani <http://www.iconplc.com/technology/products/nonmem/NOMNEM-7-3-March-2012.pdf>.
37. Wings for NONMEM. Najdeno 19. novembra 2012 na spletni strani <http://wfn.sourceforge.net>.
38. Perl-speaks-NONMEM. Najdeno 19. novembra 2012 na spletni strani <http://psn.sourceforge.net/index.php>.
39. Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN: Perl-speaks-NONMEM (PsN) - a Perl module for NONMEM related programming. Computer methods and programs in biomedicine 2004; 75(2): 85-94.
40. Ette EI, Williams PJ: Population Pharmacokinetics II: Estimation Methods. The Annals of Pharmacotherapy 2004; 38: 1907-13.
41. Beal SL, Sheiner LB: NONMEM Users Guide - Part VII, Conditional Estimation Methods, University of California, San Francisco, 1998: 1-15.
42. Savic RM, Karlsson MO: Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. The AAPS Journal 2009; 2(3): 558-568.
43. Vovk T: Izločanje zdravilnih učinkovin iz telesa preko ledvic: fiziološki vidik. Predavanje. Najdeno 7. junija 2013 na spletni strani [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko/Predavanja/Izlocanje_ucinkovin_iz_tesesa - Fizioloski_vidik.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko/Predavanja/Izlocanje_ucinkovin_iz_tesesa_-_Fizioloski_vidik.pdf).
44. Bolton S, Bon C: Pharmaceutical Statistics, 4th Ed., Marcel Dekker, New York, 2004: 215-21.
45. Žiberna A: Analiza variance in linearna regresija. Najdeno 12. julija 2013 na spletni strani <http://www.adp.fdv.uni-lj.si/media/gradiva/delavnice2011/Analiza%20variance%20in%20linearna%20regresija.pdf>.
46. Holford N: Bootstrap and Confidence Intervals. Najdeno 21. novembra 2012 na spletni strani <http://holford.fmhs.auckland.ac.nz/docs/bootstrap-and-confidence-intervals.pdf>.

47. Holford N: Randomization Test Methods: A NONMEM User's Perspective. Najdeno 21. novembra 2012 na spletni strani <http://wfn.sourceforge.net/rtmethod.htm>.
48. Holford N: Randomization and Mixture Approaches to Model Building. Najdeno 21. novembra 2012 na spletni strani <http://holford.fmhs.auckland.ac.nz/docs/randomization-mixtures-model-building.pdf>.
49. Sim SC: The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. Najdeno 18. julija 2013 na spletni strani <http://www.cypalleles.ki.se>.
50. Shi J, Kovacs SJ, Wang Y, Ludden TM, Bhargava VO: Population Pharmacokinetics of the Active Metabolite of Leflunomide in Pediatric Subjects with Polyarticular Course Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2005; 32(3-4): 419-438.
51. Schuna AA: Rheumatoid Arthritis. Education Guide. Najdeno 7. januarja 2013 na spletni strani <http://accesspharmacy.com/resourceToc.aspx?resourceID=669>.