

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATRA KEBE

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATRA KEBE

**POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA BISOPROLOOLA  
PRI BOLNIKIH S KRONIČNIM SRČNIM POPUŠČANJEM**

POPULATION PHARMACOKINETICS OF BISOPROLOL IN  
PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

**ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Vovku za sodelovanje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala tudi asist. dr. Juriju Trontlu za meritve na masnem spektrometru, izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za pomoč pri programu NONMEM, doc. dr. Mojci Kerec Kos in Katji Trobec za podatke o bolnikih.

Prav tako se iskreno zahvaljujem svojim staršem, ki so mi omogočili študij in me podpirali v času študija. Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem za podporo in spodbudo pri izdelavi diplomske naloge.

**IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka.

---

Ljubljana, januar 2014

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: doc. dr. Rok Dreu

**VSEBINA**

POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 Kronično srčno popuščanje.....	1
1.2 Smernice za zdravljenje kroničnega srčnega popuščanja .....	2
1.2.1 Zaviralci angiotenzin-konvertaze.....	4
1.2.2 Antagonisti beta adrenergičnih receptorjev.....	4
1.2.3 ACE inhibitorji in/ali BB .....	5
1.2.4 Antagonisti mineralokortikoidnih receptorjev .....	6
1.2.5 Druga zdravila za zdravljenje sistoličnega SP .....	6
1.3 Farmakodinamika bisoprolola .....	7
1.3.1 Beta blokatorji pri zdravljenju kroničnega SP .....	8
1.3.2 Mehanizem delovanja bisoprolola .....	9
1.3.3 Merjenje farmakodinamskih učinkov bisoprolola .....	10
1.4 Farmakokinetika bisoprolola .....	13
1.4.1 Farmakokinetični parametri .....	14
1.4.2. Farmakokinetika bisoprolola pri bolnikih s kroničnim SP.....	15
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE .....	19
3.1 Materiali.....	19
3.1.1 Osebe, vključene v študijo .....	19
3.1.2 Plazma .....	20
3.1.3 Standard in interni standardi .....	21

3.1.4 Reagenti in topila .....	21
3.2 Določanje koncentracije bisoprolola v vzorcih bolnikov .....	22
3.2.1 Priprava vzorcev z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) .....	22
3.2.2 Analiza vzorcev bolnikov s kromatografijo, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS).....	24
3.2.3 Priprava umeritvene krivulje za izračun koncentracije bisoprolola v vzorcih bolnikov .....	26
3.3 Populacijska farmakokinetična analiza podatkov.....	28
3.3.1 Postavitev osnovnega strukturnega modela .....	28
3.3.2 Statistični model.....	29
4 REZULTATI .....	33
4.1 Delna validacija LC-MS/MS metode .....	33
4.2 Bolniki .....	37
4.2.1 Osnovni podatki o bolnikih.....	37
4.2.2 Koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih .....	38
4.3 Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela.....	43
5 RAZPRAVA.....	46
6 SKLEP .....	51
7 VIRI .....	53
8. Priloga: Grafična predstavitev rezultatov končnega modela .....	58

## **POVZETEK**

Bisoprolol je selektivni zaviralec  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev in se zelo pogosto uporablja za zdravljenje bolnikov s kroničnim sistoličnim srčnim popuščanjem. Ključnega pomena pri zmanjševanju simptomov in znakov srčnega popuščanja je, da za vsakega bolnika izberemo primerno zdravilo oziroma kombinacijo zdravil ter določimo ustrezni odmerek.

Namen diplomske naloge je bil razviti populacijski farmakokinetični model za bolnike s kroničnim srčnim popuščanjem, ki bi bil v pomoč pri ustreznom odmerjanju bisoprolola. V študijo smo vključili 46 bolnikov z znanim kroničnim srčnim popuščanjem, katerih zdravljenje so vodili v kardiološki ambulanti v bolnišnici Golnik, na Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in alergijo. Bolnikom smo izmerili plazemske koncentracije bisoprolola v stanju dinamičnega ravnovesja s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemso masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Plazemske vzorce smo predhodno ekstrahirali na trdnem nosilcu mešanega tipa. Rezultate analizne metode smo delno validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. Metoda je bila linearna v območju 0,85–127 ng/ml, točna (97,7–99,5 %) in ponovljiva s koeficientom variacije 1,3–6,3 %.

Podatke, ki smo jih pridobili na obeh obiskih, ter izračunane koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih bolnikov smo analizirali s programom NONMEM z uporabo metode nelinearnih modelov mešanih učinkov. Za osnovni strukturni model smo izbrali enoprostorski model, definiran s konstanto absorpcije, očistkom in volumnom porazdelitve bisoprolola. Srednja vrednost konstante absorpcije (relativna standardna napaka) je v osnovnem modelu  $2,18 \text{ h}^{-1}$  (19,3 %), očistka 10,2 l/h (5,47 %) in volumna porazdelitev bisoprolola 230 l (4,56 %). Ocena vpliva interindividualnih variabilnosti ter variabilnosti med obiski na konstanto absorpcije znaša 69,3 % (75,9 %) in 64,4 % (71,7 %), na očistek 32,9 % (29,1 %) in 24,8 % (34,8 %) ter na volumen porazdelitve 17,3 % (23,0 %) in 13,6 % (46,9 %). Izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola ter pridobljene lastnosti bolnikov, vključenih v študijo, pa so na voljo za nadaljnji razvoj modela s postopnim vključevanjem posameznih sočasnih spremenljivk.

*Ključne besede:* bisoprolol, kronično srčno popuščanje, plazemske koncentracije, populacijska farmakokinetika.



**ABSTRACT**

Bisoprolol is a highly selective antagonist of  $\beta_1$  adrenoceptors that has been widely used in patients with chronic systolic heart failure. In order to relieve symptoms and signs an appropriate drug or their combination and optimal dose for each individual patient have to be chosen.

The aim of this paper was to develop population pharmacokinetic model for the design of dosage regiments of bisoprolol for patients suffering from chronic heart failure. 46 patients diagnosed with heart failure, treated in cardiology clinic in Golnik Hospital, University Clinic of Pulmonary and Allergic Diseases Golnik, were included in the study. The plasma levels of bisoprolol were determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), after preparation of plasma samples by solid phase extraction with a mixed-mode adsorbent. The results of analytical method were partially validated according to the recommendations by the United States Food and Drug Administration. Calibration curve was linear ranged from 0.85 to 127 ng/mL, the method precision did not exceed 6.3 % and accuracy ranged from 97.7 % to 99.5 %.

The population pharmacokinetic model was based on patient data from two visits using non-linear mixed-effect modeling (NONMEM) software. The basic structural model was a one-compartment model, defined by absorption rate constant, clearance and volume of distribution of bisoprolol. The mean value of absorption rate constant (relative standard error) is  $2.18 \text{ h}^{-1}$  (19.3 %), clearance  $10.2 \text{ l/h}$  (5.47 %) and volume of distribution  $230 \text{ l}$  (4.56 %). Interindividual variability and variability between visits for absorption rate constant is 69.3 % (75.9 %) and 64.4 % (71.7 %), clearance 32.9 % (29.1 %) and 24.8 % (34.8 %) and for volume of distribution 17.3 % (23.0 %) and 13.6 % (46.9 %), respectively. The results, plasma concentrations of bisoprolol and patients characteristics are available for further investigation and can be used to identify predictive covariates in a target population.

*Keywords:* bisoprolol, chronic heart failure, plasma concentrations, population pharmacokinetics modelling

**SEZNAM OKRAJŠAV**

- ACE angiotenzin-konvertaza (*angiotensin-converting enzyme*)  
ACE-inhibitor zaviralec encima angiotenzin-konvertaze (*angiotensin-converting enzyme inhibitor*)  
ACN acetonitril  
AF atrijska fibrilacija  
ARB zaviralec angiotenzinskih receptorjev (*angiotensin receptor blocker*)  
ATC anatomsko-terapevtsko-kemična klasifikacija zdravil  
AUC biološka uporabnost  
BB zaviralec adrenergičnih receptorjev beta (*beta-blocker*)  
CIBIS *Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study*  
CIBIS-ELD *Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study in Elderly*  
ClCG očistek kreatinina za oceno glomerulne fitracije (Cockroft- Gault)  
ClMDRD4 očistek kreatinina za oceno glomerulne fitracije (po MDRD enačbi)  
 $C_{\max}$  maksimalna koncentracija v plazmi  
CRT-D zdravljenje z resinhronizacijskim srčnim spodbujevalnikom s funkcijo defibrilatorja  
CRT-P zdravljenje z resinhronizacijskim srčnim spodbujevalnikom  
CV koeficient variacije  
ESC Evropsko združenje za kardiologijo (*European Society of Cardiology*)  
FDA Ameriška agencija za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*)  
FSU frekvenca srčnega utripa  
H-ISDN kombinacija hidralazina in izosorbid dinitrata (*hydralazine and isosorbide dinitrate*)  
HPLC tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*high-performance liquid chromatography*)  
ICD implantirani kardioverter/defibrilator  
IIV interindividualna variabilnost  
IS interni standard  
KAH 2 OD 5 bolniki imajo postavljeno diagnozo kaheksije in izpolnjujejo dva od petih kriterijev za kaheksijo  
KAH 3 OD 5 bolniki imajo postavljeno diagnozo kaheksije in izpolnjujejo tri od petih kriterijev za kaheksijo  
LC-MS/MS tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo  
LLOQ spodnja meja določljivosti (*lower limit of quantification*)

- LVAD mehanska podpora levega prekata
- LVEF iztisni delež levega prekata (*left ventricular ejection fraction*)
- m/z razmerje med maso in nabojem
- MF mobilna faza
- MRA antagonist mineralokortikoidnih receptorjev (*mineralocorticoid receptor antagonist*)
- MRM multirezidualna analiza (*multiple reaction monitoring*)
- MS masni spektrometer
- NYHA *New York Heart Association*
- PopFK populacijska farmakokinetika
- Q kvadrupol ali masni filter
- QC kontrolni vzorec (*quality control*)
- QC<sub>H</sub> kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji
- QC<sub>L</sub> kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
- QC<sub>M</sub> kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
- QTD razpršenost QT intervalov oz. razlika med maksimalnim in minimalnim QT intervalom (*QT dispersion*)
- r<sup>2</sup> determinacijski koeficient
- rpm obrati na minuto (*revolutions per minute*)
- RSE relativna standardna napaka
- S-Cr koncentracija serumskega kreatinina
- SD standardna napaka
- SP srčno popuščanje
- SPE ekstrakcija na trdnem nosilcu (*solid phase extraction*)
- SR sinusni ritem
- TM telesna teža
- t<sub>max</sub> čas, pri katerem je dosežena maksimalna koncentracija v plazmi
- TV telesna višina
- v/v volumski odstotek

## 1 UVOD

Delež bolnikov s srčnim popuščanjem (SP) dramatično narašča z naraščajočo starostjo populacije in je pri moških trikrat večji kot pri ženskah (1). V razvitih državah trpi za SP že približno 1–2 % odrasle populacije, pri starostnikih nad 70 let pa ta delež presega 10 %, kar je povezano tudi z vse višjimi stroški zaradi pogostih hospitalizacij (2). S farmakološkim zdravljenjem želimo bolnikom v čim večji meri zmanjšati simptome SP in pogostost poslabšanja bolezni ter jim tako olajšati in podaljšati življenje. Poleg tega, da za vsakega bolnika izberemo primerno zdravilo oziroma kombinacijo zdravil, pa je ključnega pomena tudi ustrezno odmerjanje. Le tako lahko dosežemo plazemske koncentracije zdravila, ki zagotavljajo ustrezno terapevtsko delovanje ter čim manj neželenih učinkov, ki bi obremenili bolnika in ga lahko odvrnili od nadaljnega jemanja zdravila. V uvodnem delu bomo predstavili smernice za zdravljenje SP ter farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti bisoprolola, za katerega bomo razvili populacijski farmakokinetični model pri bolnikih s kroničnim SP.

### 1.1 KRONIČNO SRČNO POPUŠČANJE

Kronično SP »je bolezensko stanje, pri katerem okvarjeno srce ob normalnih polnilnih tlakih ne zmore črpati dovolj krvi, da bi zadostilo presnovnim potrebam ostalih organov in tkiv« (3). **Vzroki** za SP so lahko koronarna bolezen, hipertenzija, kardiomiopatija, bolezni zaklopk, aritmije in ostali manj pogosti vzroki, ki so posledica slabše oskrbe tkiv s kisikom in zadrževanja vode v telesu. Nekateri **simptomi** SP so dispnea ob naporu, paroksizmalna nočna dispnea, ortopneja, utrujenost, zmanjšana telesna zmogljivost, otekanje gležnjev ter nočno uriniranje (2, 4). Večina teh simptomov je nespecifičnih za SP in zato težko ločimo med SP in drugimi boleznimi. Tipična za SP pa sta ortopneja in paroksizmalna nočna dispnea, ki pa se ne kažeta pri bolnikih z milejšo obliko bolezni (2). Najpomembnejši **znaki** SP so bazalni poki nad pljuči, prekomerno polnjene vratne vene, tretji ton, tahikardija, vtrisljive otekline nog, hladni udi in periferna cianoza, povečana jetra in ascites (2, 3).

V preteklih randomiziranih kliničnih študijah in metaanalizah (8, 11, 14–30) so opredelili stopnje SP obravnnavanih pacientov po lestvici ameriškega združenja *New York Heart*

*Association (NYHA)* (Preglednica I). Stopnje SP klasificiramo v štiri razrede – glede na simptome, ki kažejo na funkcionalno zmogljivost bolnikov (4).

**Preglednica I:** Opredelitev simptomov srčnega popuščanja po lestvici ameriškega združenja *New York Heart Assosiaction (NYHA)* (3)

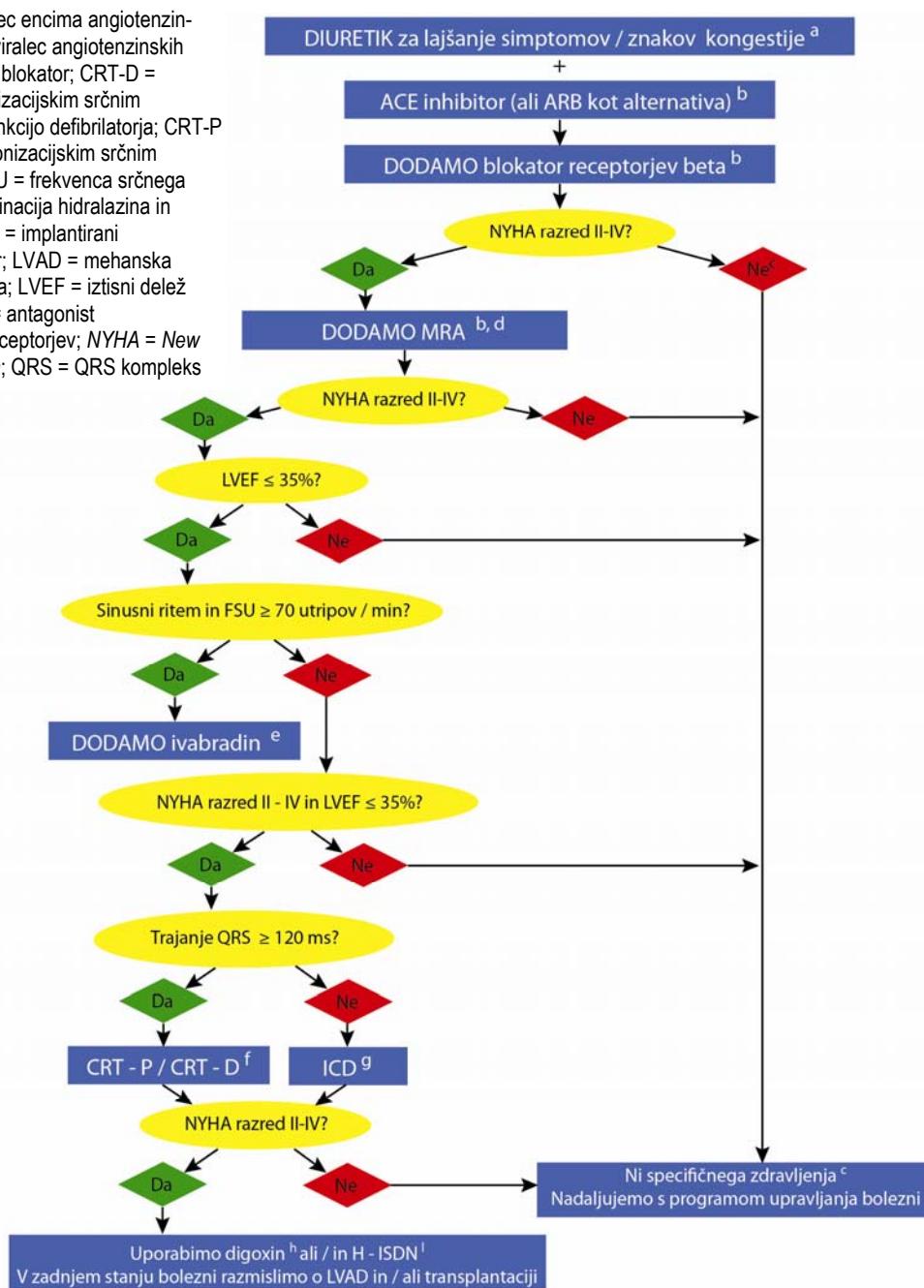
<i>NYHA</i> razred I	Brez omejitev telesne dejavnosti. Normalni telesni napor ne povzročajo prekomerne utrujenosti ali težav z dihanjem. V mirovanju ni težav.
<i>NYHA</i> razred II	Blaga omejitev telesne dejavnosti. Normalni telesni napor povzročajo prekomerno zadihanost in utrujenost. V mirovanju ni težav.
<i>NYHA</i> razred III	Pomembna omejitev telesne dejavnosti. Že najmanjši napor povzročajo hitro utrujenost in prekomerno zadihanost. V mirovanju ni težav.
<i>NYHA</i> razred IV	Težave z dihanjem se pojavljajo že v mirovanju in se okrepijo že pri najmanjših telesnih naporih.

## **1.2 SMERNICE ZA ZDRAVLJENJE KRONIČNEGA SRČNEGA POPUŠČANJA**

Cilji zdravljenja SP so usmerjeni v omejevanje simptomov in znakov, zmanjševanje pogostosti bolnišnične oskrbe ter število prezgodnjih smrti bolnikov s SP. Pomembno za uspešno zdravljenje je, da hkrati zdravimo simptome in vzroke SP, zaviramo prekomeren nevrohormonski odgovor ter tako preprečimo sprožilne dejavnike, ki bi utegnili povzročiti epizode akutnega poslabšanja. SP lahko zdravimo z nefarmakološkimi ukrepi (npr. omejevanje vnosa soli, zmanjšanje telesne teže, vzdrževanje telesne kondicije), farmakološko (z zdravili), pri napredovanih oblikah bolezni pa uporabljamo tudi invazivne in kirurške metode zdravljenja (2, 3).

Farmakoterapija SP sledi smernicam evropskega združenja za kardiologijo (*European Society of Cardiology, ESC*), ki za zdravljenje SP predlaga uporabo zaviralcev angiotenzin-konvertaze (ACE-inhibitor), antagonistov angiotenzina II (ARB), antagonistov beta adrenergičnih receptorjev (blokatorje beta ali BB) in antagonistov mineralokortikoidnih receptorjev (MRA), ki pomembno vplivajo na potek bolezni ter zmanjšajo umrljivost bolnikov s SP. Za lajšanje simptomov SP pa v smernicah navajajo še diuretike, organske nitrile in digitalis. V več kot polovici primerov SP gre za kronično sistolično SP. V nadaljevanju se bomo osredotočili na zdravljenje le-tega (Slika 1) (2, 3, 4).

ACE-inhibitor = zaviralec encima angiotenzin-konvertaze; ARB = zaviralec angiotenzinskih receptorjev; BB = beta blokator; CRT-D = zdravljenje z resinhronizacijskim srčnim spodbujevalnikom s funkcijo defibrilatorja; CRT-P = zdravljenje z resinhronizacijskim srčnim spodbujevalnikom; FSU = frekvenca srčnega utripa; H-ISDN = kombinacija hidralazina in izosorbid dinitrata; ICD = implantirani kardioverter/defibrilator; LVAD = mehanska podpora levega prekata; LVEF = iztisni delež levega prekata; MRA = antagonist mineralokortikoidnih receptorjev; NYHA = New York Heart Association; QRS = QRS kompleks



**Slika 1:** Možnosti zdravljenja bolnikov s kroničnim simptomatskim sistoličnim srčnim popuščanjem (NYHA razred II–IV) (2)

### **1.2.1 ZAVIRALCI ANGIOTENZIN-KONVERTAZE**

Smernice kot prvo izbiro za zdravljenje sistoličnega SP z LVEF  $\leq 40\%$  priporočajo zdravila iz skupine zaviralcev angiotenzin-konvertaze skupaj z antagonistom beta adrenergičnih receptorjev. Pomembno je, da zdravljenje z najnižjim odmerkom ACE-inhibitorja začnemo takoj po diagnozi SP ter da odmerke postopoma povečujemo do najvišjega, končnega odmerka za zdravljenje (2, 5). S svojim vazodilatornim delovanjem zmanjšajo obremenjenost levega prekata, hkrati pa zavirajo njegovo preoblikovanje ter tako podaljšajo preživetje bolnikov s SP. Primerni so tako za zdravljenje asimptomatskih bolnikov s sistolično disfunkcijo levega ventrikla (*NYHA* razred I), saj podaljšajo preživetje in zmanjšajo število hospitalizacij, kot za bolnike s simptomi sistoličnega SP (*NYHA* razredi II–IV), pri katerih izboljšajo tudi funkcijo prekatov in počutje bolnikov (2, 6).

Zaviralci ACE so kontraindicirani pri obojestranski zožitvi ledvičnih arterij, znani preobčutljivosti na zaviralce ACE (angioedem) ter v nosečnosti. Posebna previdnost pri jemanju je potrebna pri hiperkaliemiji ( $K^+ > 5.0 \text{ mmol/l}$ ), ledvični insuficienci (kreatinin  $> 221 \mu\text{mol/l}$ ) in hipotenziji (sistolični krvni pritisk  $< 90 \text{ mmHg}$ ) (2, 6). Ob uvedbi zaviralcev ACE pogosto pride do stranskih učinkov, kot so kašelj, hipotenzija, hiperkaliemija in poslabšanje ledvične funkcije, ki pa z nadaljevanjem jemanja pogosto izzvenijo. V primeru, da z zmanjšanjem odmerka stranskih učinkov ne odpravimo, moramo terapijo nadomestiti z zavircem angiotenzinskih receptorjev (2).

### **1.2.2 ANTAGONISTI BETA ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV**

Zaviralec beta adrenergičnih receptorjev se priporoča kot dodatek ACE inhibitorjem (ali ARB) za vse bolnike s stabilnim zmernim do srednje močnim SP (*NYHA* razred II in III) z LVEF  $\leq 40\%$ . Pri klinično stabilnih bolnikih je priporočljivo, da začetni odmerek BB dodamo takoj po diagnozi SP, pri hudi obliki SP (*NYHA* razred IV) pa jih lahko uporabljamo le pod strogim nadzorom specialista. Pri uvajanju BB je nujno postopna titracija, s podvajanjem odmerka na vsaka dva tedna do maksimalnega odmerka, ki ga bolnik še prenaša. Tako kot velja za ACE inhibitorje, tudi BB zmanjšajo število hospitalizacij in tveganje za prezgodnjo smrt, izboljšajo funkcijo prekatov ter počutje bolnikov (2, 6).

BB so kontraindicirani pri astmi in atrioventrikularnem bloku II. ali III. stopnje. Posebno pozorni moramo biti pri hudih oblikah SP (*NYHA* razred IV), trenutnem ali nedavnem poslabšanju SP, srčnem bloku ali pri bolnikih z utripom, manjšim od 60 utripov na minuto. V primeru, da so prisotni znaki poslabšanja, kot so bradikardija, povišan jugularni venski tlak, periferni edemi in ascites ali drugi neželeni učinki (utrjenost, omotica, vrtoglavica, glavobol, hladne okončine), je potrebno počakati z začetkom uvajanja BB oziroma moramo zdravljenje začasno prekiniti (2, 6).

Smernice sicer odsvetujejo uvedbo BB pri astmatikih, vendar izjemoma  $\beta_1$ -selektivni adrenergični antagonist (npr. bisoprolol, nebivolol) lahko uvedemo tudi pri urejenih astmatikih (2, 7).

### **1.2.3 ACE INHIBITORJI IN/ALI BB**

Smernice navajajo, da je najbolj optimalno zdravljenje kombinacija ACE inhibitorja (začetek zdravljenja) ter BB (dodamo, ko so bolniki stabilni), saj imajo ACE inhibitorji zmeren učinek na preoblikovanje levega prekata, BB pa vodijo v izboljšanje iztisnega deleža levega prekata. Pomembno je, da zdravljenje pri obeh skupinah zdravil začnemo z najnižjim odmerkom, ki ga nato postopoma titriramo do optimalnega končnega odmerka (2). V študiji CIBIS III (8) so pokazali, da je enako varno in učinkovito začeti zdravljenje z bisoprololom (BB) kot z enalaprolohom (ACE inhibitor). Pri obeh strategijah uvedbe zdravljenja bolnikov s kroničnim SP (*NYHA* razred II in III) sta bili stopnji skupne pogostnosti smrti in hospitalizacije podobni. V skupini, kjer so bolnike začeli zdraviti z bisoprololom, so zaznali celo trend daljšega preživetja, predvsem zaradi zmanjšane pogostnosti nenasljive smrti (8).

V primeru, da bolnik ne tolerira hkratnega zdravljenja z zdravili iz obeh zgoraj navedenih skupin, ima BB celo nekaj prednosti pred ACE inhibitorjem:

- BB ima večji vpliv na zmanjšanje pogostosti nenasljive smrti,
- adrenergični sistem se aktivira pred renin-angiotenzinskim sistemom in
- BB deluje inhibitorno na oba sistema (8).

### **1.2.4 ANTAGONISTI MINERALOKORTIKOIDNIH RECEPTORJEV**

Zaviralci aldosterona (spironolakton, eplerenon), kot tretja skupina za zdravljenje kroničnega sistoličnega SP, blokirajo receptorje, ki vežejo aldosteron in druge kortikosteroide. Priporočajo jih za zdravljenje vseh skupin bolnikov s sistoličnim SP (NYHA razred II–IV) z LVEF  $\leq 35\%$ , v primeru da simptomi SP vztrajajo kljub zdravljenju z ACE inhibitorji (ali ABR) in BB. Pri odmerjanju je pomembna faza titracije ter uporaba najnižjega še učinkovitega odmerka. Imajo blag diuretičen učinek ter zavirajo aktiviranje nevrohormonskega sistema in preoblikovanje srčne mišice. Njihov glavni namen uporabe ni lajšanje simptomov (diuretik), ampak zmanjšanje števila hospitalizacij in tveganja za prezgodnjo smrt (2, 5).

MRA so kontraindicirani pri hiperkaliemiji, motenem delovanju ledvic (kreatininski očistek pod 30 ml/min), v kombinaciji z drugimi zdravili, ki višajo nivo kalija v krvi ter pri hkratni uporabi ACE inhibitorja in ARB. Možni neželeni učinek spirolaktona je lahko tudi antiandrogeno delovanje, kar lahko povzroči ginekomastijo, amenorejo in impotenco, zato ga ob pojavu teh učinkov nadomestimo z novejšim epleneronom (2, 5).

### **1.2.5 DRUGA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE SISTOLIČNEGA SP**

Za zdravljenje sistoličnega SP se uporablja tudi v nadaljevanju omenjena zdravila, ki pa se od zgoraj opisanih razlikujejo po tem, da nimajo dokazanega vpliva na celokupno umrljivost pacientov. Uporablja se kot alternativa ali dodatek zgornjim, saj pomembno vplivajo na izboljšanje simptomov in počutje bolnikov ter zmanjšajo število hospitalizacij bolnikov s SP (2).

#### **1.2.5.1 ZAVIRALCI ANGIOTENZINSKIH RECEPTORJEV**

Zaviralci angiotenzinskih receptorjev se uporablja kot alternativa ACE inhibitorjev ali MRA, pri bolnikih z LVEF  $\leq 40\%$ , ki slabo prenašajo katero od teh zdravil. ARB se uporablja (v kombinaciji z BB in MRA) kot alternativa za ACE inhibitor pri bolnikih, pri katerih se kot neželeni učinek ACE inhibitorja pojavi kašelj. Za zmanjšanje števila hospitalizacij pa se uporablja tudi pri bolnikih, ki prejemajo ACE inhibitor in BB ter ne tolerirajo MRA. V nobenem primeru ne smemo hkrati uporabljati ACE inhibitorja, ARB in MRA, saj lahko ta kombinacija povzroči hiperkaliemijo in poslabšanje ledvične funkcije (2, 4).

### **1.2.5.2 IVABRADIN**

Smernice priporočajo uporabo ivabradina za zniževanje srčne frekvence pri bolnikih v sinusnem ritmu z LVEF  $\leq 35\%$  in frekvenco nad 70 udarcev/minuto. Lahko se uporabi kot alternativa BB, če pacient ne tolerira BB. V primeru, da so kljub maksimalno toleriranemu odmerku BB simptomi popuščanja še vedno prisotni, pa ga uporabimo kot dodatek terapiji z BB, ACE inhibitorji (ARB) in MRA (2, 4).

### **1.2.5.3 DIGOKSIN**

Smernice priporočajo uporabo digoksina za zniževanje srčne frekvence pri bolnikih v sinusnem ritmu z LVEF  $\leq 45\%$  – lahko kot alternativa za paciente, ki ne tolerirajo BB (skupaj z ACE inhibitorjem in MRA) ali dodatek BB, ACE inhibitorjem in MRA, ob prisotnosti simptomov SP. Poleg tega se digoksin lahko uporablja tudi pri bolnikih s simptomatskim SP in atrijsko fibrilacijo za zniževanje srčne frekvence (2, 4).

### **1.2.5.4 KOMBINACIJA HIDRALAZINA IN IZOSORBID DINITRATA**

Kombinacijo dveh vazodilatatorjev, hidralazina in izosorbid dinitrata (H-ISDN), smernice priporočajo za bolnike z LVEF  $\leq 45\%$  in dilatiranim levim ventrikлом ali bolnike z LVEF  $\leq 35\%$ , z namenom zmanjšanja števila hospitalizacij in tveganja za prezgodnjo smrt. Uporablja se lahko kot alternativa za ACE inhibitor oziroma ABR (bolnik ne tolerira nobenega izmed teh dveh zdravil) ob jemanju BB in MRA, ali kot dodatek BB, ACE inhibitorjem in MRA, ob prisotnosti simptomov SP (2).

### **1.2.5.5 DIURETIKI**

Diuretike pri bolnikih s SP uporabljamo le simptomatsko, za odpravljanje simptomov in znakov pljučne ali periferne kongestije in vedno v kombinaciji z ACE inhibitorji (ali ABR), BB in MRA. V večini primerov uporabljamo diuretike zanke ali tiazidne diuretike, saj oboji pospešijo izločanje kalija, kar je v kombinaciji z ACE inhibitorji/ARB in MRA koristno. Pomembno pri njihovi uporabi je, da redno spremljamo serumske koncentracije elektrolitov ter kreatinina. Bolnik si lahko z vsakodnevnim spremeljanjem telesne teže in ob ustrezni podučenosti sam prilagaja odmerke diureтика (2).

## **1.3 FARMAKODINAMIKA BISOPROLOLA**

Bisoprolol je selektivni zaviralec  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev (ATC oznaka C07AB07), ki so značilni za gladke mišice srca in ledvic. Nima izrazitega negativnega ionotropnega učinka in membrane stabilizirajoče aktivnosti ter kaže le nizko afiniteto do  $\beta_2$ -receptorjev

gladkih mišic bronhijev in žil ter  $\beta_2$ -receptorjev v gastrointestinalnem traktu. Na  $\beta_2$ -receptorje deluje antagonistično šele pri odmerkih, višjih od 20 mg – njegova  $\beta_1$ -selektivnost torej sega preko meja terapevtskega odmerka (9, 10, 11).

Adrenergični receptor »je receptor, sklopljen s proteinom G, na katerega se fiziološko vežejo kateholamini, zlasti adrenalin in noradrenalin« (12). Vezava antagonista na  $\beta_1$ -adrenergični receptor sproži zaviralni odziv zaradi deaktivacije adenilat ciklaze in posledično znižanja znotrajcelične koncentracije cikličnega adenozinmonofosfata (12). Posledice blokade adrenergičnih receptorjev  $\beta_1$  so zmanjšana frekvenca in moč krčenja srčne mišice ter zaviranje sproščanja renina, kot posledica zaviranja adrenergičnih receptorjev  $\beta_1$  v ledvicah (9).

Terapevtske indikacije pri nas registriranih zdravil z bisoprololom so za zdravljenje:

- hipertenzije,
- koronarne srčne bolezni (angine pektoris) in
- stabilnega kroničnega popuščanja z zmanjšano sistolično funkcijo ventriklov (10, 13).

### **1.3.1 BETA BLOKATORJI PRI ZDRAVLJENJU KRONIČNEGA SP**

Antagonisti  $\beta$  adrenergičnih receptorjev imajo že desetletja pomembno vlogo pri zdravljenju bolezni srca in ožilja. V začetku so jih uporabljali za zdravljenje ishemije, aritmije in povišanega krvnega pritiska, pri SP pa so bili kontraindicirani zaradi njihovega negativnega inotropnega delovanja (zmanjšajo krčljivost srčne mišice) ter povečanega tveganja za hipotenzijo, vrtoglavico in bradikardijo. V kasnejših raziskavah so pokazali, da terapija z BB (bisoprolol, karvedilol in metoprolol sukinat) v primerjavi s standardno terapijo brez BB, zmanjša umrljivost zaradi vseh vzrokov za več kot 34 %, število nenadnih smrtnosti za več kot 40 % ter pogostost hospitalizacij zaradi poslabšanja SP za več kot 30 % pri bolnikih s SP. Z namenom, da bi preučili razmerje med koristjo in tveganjem pri dolgotrajni uporabi bisoprolola pri bolnikih s kroničnim SP, so Leizorovich in sodelavci naredili metaanalizno študijo (14). Izsledki študije so pokazali, da se je pri bolnikih, zdravljenih z bisoprololom, skupna smrtnost znižala za 29,3 %, število dogodkov SP, ki so zahtevali bolnišnično oskrbo, pa za 25,1 % glede na placebo. Po daljšem zdravljenju se je pokazalo tudi pomembno izboljšanje funkcijskega statusa po klasifikaciji NYHA (14–17).

### **1.3.2 MEHANIZEM DELOVANJA BISOPROLOLA**

Mehanizem delovanja bisoprolola in ostalih BB težko natančno opredelimo – obstajajo namreč pomembne razlike med posameznimi zdravili iz te skupine. Vsekakor pa je njihov glavni namen uporabe preprečevanje kardiotoksičnih učinkov kateholaminov (17). Ostali pomembni mehanizmi pa so še:

#### Izboljšanje strukture in funkcije levega prekata

Povečana simpatična stimulacija, ki postopno narašča z razvojem SP, oslabi funkcijo levega ventrikla ter pospeši subendokardialno ishemijo. BB zavrejo prekomerno simpatično stimulacijo ter tako ugodno zmanjšajo adrenergično toksičnost za srčno mišico in izboljšajo delovanje srca:

- o preko znižanja srčne frekvence in s podaljšanjem časa diastoličnega polnjenja ter časa perfuzije,
- o z zmanjšanjem miokardne porabe kisika,
- o z izboljšanjem energetske preskrbe miokarda preko zavore s kateholamini inducirano sproščanje prostih maščobnih kislin iz maščobnega tkiva,
- o preko obnove receptorjev (ni povsem jasno ali je ugoden učinek ali ne) in
- o z znižanjem miokardnega oksidativnega stresa (karvedilol) (16–18).

#### Antihipertenzivno delovanje

Bisoprolol preko zmanjšane frekvence ter utripnega volumna ugodno vpliva na zmanjšanje minutnega volumna srca ter tako zniža povišan krvni pritisk. Kot možen mehanizem antihipertenzivnega delovanja pa navajajo tudi zaviranje sproščanja renina in proizvodnje angiotenzina II preko zaviranja  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev v ledvicah. Pri kroničnem zdravljenju se v začetku nekoliko povečan periferni žilni upor zmanjša. Polni antihipertenzivni učinek bisoprolola se običajno razvije šele po dveh tednih (10, 17).

#### Antiishemično delovanje

Bisoprolol zniža srčno frekvenco, moč kontrakcije ter sistolični krvni pritisk ter tako podaljša čas diastole in oskrbo srca s kisikom, kar je zaželeni učinek pri angini pektoris z osnovno koronarno srčno bolezni (10, 13, 17).

***Antiaritmični učinek***

BB neposredno zavirajo elektrofiziološke učinke adrenergične stimulacije in srčno frekvenco, zmanjšano spontano proženje ektopičnih impulzov srčnega spodbujevalnika ter upočasnijo prevajanje in podaljšajo refraktorno dobo atrioventrikularnega vozla (17).

**1.3.3 MERJENJE FARMAKODINAMSKIH UČINKOV BISOPROLOLA**

Farmakodinamske učinke bisoprolola so v do sedaj objavljenih raziskavah različno kvantitativno opredelili, saj nimamo enotnega farmakodinamskega označevalca. Leta 1986 so Leopold in njegovi sodelavci v študiji, v kateri je bilo vključenih 36 zdravih prostovoljcev, določali farmakodinamske učinke bisoprolola s spremeljanjem srčne frekvence ter krvnega pritiska (21). Z inzulinom spodbujeno hipoglikemijo so pokazali selektivnost bisoprolola za  $\beta_1$  receptorje, s telesnim naporom spodbujeno tahikardijo pa njegovo učinkovitost. Tudi v večini kasnejših raziskav so merili vpliv bisoprolola in drugih BB na srčno frekvenco (8, 11, 15, 16, 19, 21, 24–27) ter sistolični in diastolični krvni pritisk (8, 11, 15, 21, 23–27). V nekaterih analizah so spremljali tudi izboljšanje funkcije levega prekata (11, 19, 24, 26, 27), v randomizirani študiji, kjer so preučevali antiaritmični učinek bisoprolola in karvedilola ter neposreden vpliv na nenadno smrt, pa so poleg srčne frekvence in LVEF merili še spremembo QT intervala ter razliko med maksimalnim in minimalnim QT intervalom (QTD) (19).

**1.3.3.1 VPLIV NA SRČNO FREKVENCO IN KRVNI PRITISK**

Rezultati študij kažejo, da je terapija z bisoprololom povezana s signifikantnim zmanjšanjem srčne frekvence pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem v primerjavi s placebom (8, 26) oziroma izmerjeno srčno frekvenco pred začetkom zdravljenja (16, 19, 24, 27) z bisoprololom (Preglednica II). Kasnejše analize študij CIBIS II (29) in CIBIS (26) kažejo, da sta začetna vrednost in sprememba od izhodiščne vrednosti srčne frekvence signifikantno ( $p < 0,005$ ) povezani s preživetjem (29). Razmerje med spremembami srčnega utripa v območju za 10 do 40 utripov na minuto in logaritmom možnosti za smrt je skoraj linearно (26, 28).

Pri pacientih s kroničnim SP, ki so bili vključeni v študiji CIBIS in CIBIS-ELD, je bisoprolol signifikantno znižal diastolični krvni pritisk (26) – tako pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo kot sinusno tahikardijo (24), medtem ko v ostalih študijah to znižanje ni signifikantno (Preglednica II). Rezultati študije CIBIS-ELD (24) kažejo tudi signifikantno

znižanje sistoličnega krvnega pritiska, medtem ko je v eni izmed študij (27) bisoprolol signifikantno znižal sistolični krvni pritisk le pri bolnikovem telesnem naporu, v mirovanju pa ni signifikantnih sprememb (Preglednica II).

**Preglednica II:** Vpliv bisoprolola na frekvenco srčnega utripa (FSU), sistolični (SBP) in diastolični krvni pritisk (DBP) pri bolnikih s kroničnim SP

			FSU (utripov/min)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)
Dobre el. al. (8) (bolniki nad 65 let, NYHA razred II/III) N = 505	Pred terapijo 6 mes. (10 mg)	79	135	80	
		68 (- 14) *	129	76	
Cao et. al. (11) (bolniki povprečno 72 let, NYHA razred II/III) N = 66	Pred terapijo 12 mes. (10 mg)	77	130	73	
		71 (- 8)	121 (- 7)	69	
Stoschitzky et. al. (25) (zdravi prostovoljci povprečno 28 let) N = 16	V mirovanju	Pred terapijo	65	118	67
		3 h (10 mg)	52 (- 21)##	106 (- 9)##	61
		24 h (10 mg)	51 (- 22)##	108 (- 8)##	62
		7 dni (5 mg)	55 (- 15)##	114 (- 3)##	61
	Po 10 min. telesnem naporu	Pred terapijo	158	176	67
		3 h (10 mg)	123 (- 24)##	158 (- 11)##	65
		24 h (10 mg)	132 (- 16)##	168 (- 5)##	66
		7 dni (5 mg)	139 (- 12)##	170 (- 3)##	63
Dubach et. al. (27) (bolniki $57 \pm 11$ let, NYHA razred II/III) N = 13	V mirovanju	Pred terapijo	81	125	82
		12 mes. (10 mg)	61 (- 25) #	138	85
	Po 10 min. telesnem naporu	Pred terapijo	144	166	97
		12 mes. (10 mg)	127 (- 12) #	199 (17) #	104
Lechat et. al (26) (bolniki $59 \pm 10$ let NYHA razred III/IV) N = 557	Pred terapijo Po 2 mes. (2,5 mg)	82	127	79	
		66 (- 20)**	124	76 (- 4)**	
Stankovic et. al (24) (bolniki $72 \pm 6$ let, NYHA razred I–IV) N = 876	AF n = 164	Pred terapijo 12 ted. (10mg)	86 77 (- 11)###	133 125 (- 6)###	82 78 (- 5) ###
	SR n = 712	Pred terapijo 12 ted. (10 mg)	71 65 (- 9) ###	138 128 (- 7)###	80 76 (- 6) ###
Aygul et. al. (19) (bolniki med 47 in 69 let, NYHA razred I–IV) N = 41	Pred terapijo 6 mes. (10 mg)	78			
		65 (- 17)###			
CIBIS (16) (bolniki $60,1 \pm 1,2$ let, NYHA razred I–IV) N = 320	Pred terapijo 1 mes. max. odmerka (5 mg)	83			
		67 (- 19)###			

Predstavljene so povprečne vrednosti (relativna sprememba glede na začetno vrednost v %).

AF = bolniki z atrijsko fibrilacijo; SR = bolniki v sinusnem ritmu

\* p < 0,001 glede na enalapril; \*\* p < 0,0001 glede na placebo

# p < 0,01 glede na začetek; ## p < 0,05 glede na začetek; ### p < 0,001 glede na začetek

### 1.3.3.2 VPLIV NA FUNKCIJO LEVEGA PREKATA

Dolgotrajna aktivacija simpatičnega živčnega sistema pri pacientih s kroničnim SP vodi k poslabšanju delovanja prekata (30). Študije (11, 19, 24, 26, 27), kjer so opazovali izboljšanje funkcije levega prekata, kažejo, da bisoprolol značilno poveča LVEF za 6 do 45 % (19, 24, 27). V nekaterih študijah so merili vpliv bisoprolola na končni diastolični in sistolični volumen (27) ter premer (11, 24, 26) levega prekata. Zmanjšanje končnega sistoličnega premera levega prekata je značilno le v eni študiji (26), v ostalih pa niso opazili signifikantnih sprememb (Preglednica III).

Bisoprolol ne kaže klinično pomembnih izboljšav v diastolični funkciji pri bolnikih s kroničnim SP (11, 26, 30). V eni izmed študij bisoprolol sicer kaže trend zmanjšanja končnega sistoličnega in diastoličnega volumna levega prekata za 32 % in 22 %, vendar spremembe niso statistično signifikantne (Preglednica III) (27).

**Preglednica III:** Vpliv bisoprolola na funkcijo levega prekata pri bolnikih s kroničnim SP

		LVEF (%)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEDV (ml)	LVESV (ml)
Cao et. al. (11) (bolniki povprečno 72 let, NYHA razred II/III) N = 66	Pred terapijo	46	5,9	4,5		
	12 mes. (10 mg)	49	5,8	4,3		
Aygul et. al. (19) (bolniki med 47 in 69 let, NYHA razred I-IV) N = 41	Pred terapijo	32				
	6 mes.(10 mg)	41 (31)*				
Dubach et. al. (27) (bolniki $57 \pm 11$ let, NYHA razred II/III) N = 13	Pred terapijo	25			252	191
	12 mes. (7,19 mg)	36 (45)**			198	129
Stankovic et. al (24) (bolniki $72 \pm 6$ let, NYHA razred I-IV) N = 876	AF N = 164	Pred terapijo 12 ted. (10mg)	37 42 (12)*	NP -0,23		
	SR N = 712	Pred terapijo 12 ted. (10mg)	43 45 (6)*	NP -0,31		
Lechat et. al (26) (bolniki $59 \pm 10$ let NYHA razred III/IV) N = 160	Pred terapijo		6,9	5,8		
	Po 5 mes.		6,7	5,4		

Predstavljeni so povprečne vrednosti (relativna sprememba glede na začetno vrednost v %).

AF = atrijska fibrilacija; SR = sinusni ritem; LVEF = delež izstisne fracie levega prekata; LVEDD/SD = končni diastolični /sistolični premer levega prekata; LVEDV/SV = končni diastolični/sistolični volumen levega prekata; NP = ni podatka

\* p < 0,001 glede na začetek; \*\*p < 0,05 glede na začetek

### 1.3.3.3 VPLIV NA QT INTERVAL TER QTD

Več kot polovico smrti pri bolnikih s kroničnim SP predstavljajo nenadne srčne smrti, ki so zelo pogosto posledica usodne aritmije, predvsem prekatne tahikardije in fibrilacije. V randomizirani prospektivni študiji so pokazali, da dolgotrajna terapija (vsaj 6 mesecev) z

bisoprololom značilno ( $p < 0,001$ ) zmanjša razpršenost korigiranih QT intervalov (QTcD) in QTD (Preglednica IV), kar je eden od mehanizmov antiaritmičnega učinka BB (19).

**Preglednica IV:** Vpliv bisoprolola na QT interval in QTD pri bolnikih s kroničnim SP

		QTmax (ms)	QTmin (ms)	QTD (ms)	QTcmax (ms)	QTcmin (ms)	QTcD (ms)
Aygul et. al. (19) (bolniki med 47 in 69 let, NYHA I–IV) N = 41	Pred terapijo  Po 6 mes. (10 mg)	424  451 (6,8)*	354  393 (11)*	70  59 (-14)*	482  467 (-2,7)	399  406 (2,2)	83  61 (-24)*

V preglednici so povprečne vrednosti (relativna sprememba glede na začetno vrednost v %). QTmax = maksimalen QT interval; QTmin = minimalen QT interval; QTD = razlika med QTmax in QTmin.

\*  $p < 0,001$  glede na začetek

## 1.4 FARMAKOKINETIKA BISOPROLOOLA

V svojih fizikalno-kemijskih lastnostih je bisoprolol sorazmerno lipofilna učinkovina in združuje prednosti lipofilnih BB, kot je visoka stopnja absorpcije, in hidrofilnih BB, kot je majhen učinek prvega prehoda preko jeter. Farmakokinetične lastnosti bisoprolola, ki so navedene v preglednici V, zagotavljajo enkrat dnevno aplikacijo zdravila ter nizke inter in intraindividualne variabilnosti v plazemskih koncentracijah (31).

**Preglednica V:** FK lastnosti bisoprolola (31)

<i>BIORAZPOLOŽLJIVOST</i>		88%
Absorbcija	> 90 %	
Predsistemski metabolizem	< 10 %	
<i>PORAZDELITEV</i>		
Vezava na plazemske proteine	30%	
Volumen porazdelitve	3,5 l/kg	
Prehod čez placento	da	
Prehod v mleko	da	
<i>METABOLIZEM</i>		50 % v jetrih do neaktivnih metabolitov 50 % v nespremenjeni obliki
<i>IZLOČANJE</i>		95 % preko ledvic 2 % z blatom
Razpolovna doba v plazmi	10–12 h	

### 1.4.1 FARMAKOKINETIČNI PARAMETRI

Farmakokinetične parametre bisoprolola so določali že v več študijah na zdravih prostovoljcih (Preglednica VI) (32–35). Maksimalne plazemske koncentracije enkratnega odmerka 1,25 do 10 mg bisoprolola so približno 14 do 87 ng/ml, dosežene v intervalu od 1,5 do 4 ur (32). Farmakokinetika bisoprolola je linearna in neodvisna od starosti, spola ter aplikacije pred oziroma po hranjenju (31).

**Preglednica VI:** FK parametri po enkratni aplikaciji enkratnega odmerka 5 do 20 mg bisoprolola pri zdravih odraslih osebah, pri bolnikih s hipertenzijo in **bolnikih s SP (krepko)** v stacionarnem stanju

	Odmerek (mg)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (ng h/ml)	ke (1/h)	Cl <sub>tot</sub> (l/h/kg)	Cl <sub>r</sub> (l/h/kg)
Tjandrawinata (33) N = 18 #	5 mg	21 ± 4,1	1,5–4	9,1 ± 2,2	287 ± 52			
		21 ± 4,0	1,5–3	9,1 ± 1,7	285 ± 62			
Liu (34) n = 20	5 mg	33 ± 11	3,3 ± 1,8	8,7 ± 1,1	421 ± 139			
Jovanović (35) N = 24 #	10 mg	49 ± 22	3,4 ± 0,8	13 ± 3,5	568 ± 150	0,06 ± 0,02		
		42 ± 14	3,1 ± 0,9	15 ± 4	562 ± 127	0,05 ± 0,02		
Horikiri (36) N = 4	20 mg	56 ± 9,2	2,9 ± 1,0	9,2 ± 1,2	884 ± 147		10,3 ± 1,5	6,7 ± 1,5
Concor COR (13)*	10 mg/dan*	64 ± 21		17 ± 5				
Lewis (38) N = 7 ##	10 mg +	42	3,9	10,5	633		15,8	
	10 mg ++	60	2	11,2	787		12,7	

\* Vrednosti v stacionarnem stanju pri bolnikih s SP NYHA razreda III.

# Podatki iz bioekvivalentnih študij na zdravih odraslih osebah po enkratnem odmerku.

## Podatki iz študije bolnikov s hipertezijo; + enkraten odmerek; ++ v stacionarnem stanju

#### 1.4.1.1 BOLNIKI Z MOTENIM DELOVANJEM LEDVIC ALI JETER

V študiji so preučevali farmakokinetiko ponavlajočega odmerka bisoprolola 10 mg/dan pri zdravih prostovoljcih ter bolnikih z ledvično ali jetrno insuficienco. Pri zdravih prostovoljcih so bile maksimalne plazemske koncentracije in koncentracije pred odmerkom 52 ng/ml in 11 ng/ml, razpolovni čas v plazmi 10 ur, skupni očistek pa 14,2 l/h. Pri bolnikih z zmanjšano funkcijo ledvic je bil razpolovni čas v plazmi podaljšan (18,5 h in 24,2 h pri bolnikih z uremičnim sindromom), plazemske koncentracije višje (74 in 32 ng/ml) in vrednosti skupnega očistka zmanjšane (7,8 l/h in 5 l/h pri bolnikih z uremičnim sindromom). Bolniki s cirozo jeter so imeli razpolovni čas 13,5 h, skupni očistek 10,8 l/h ter koncentracije v plazmi 62 in 22 ng/ml (37).

Ker poteka eliminacija v enaki meri preko ledvic in jeter, bolnikom z blagimi do zmernimi funkcijskimi motnjami jeter ali ledvic odmerka običajno ni potrebno prilagajati. Pri bolnikih s hudo ledvično insuficienco (očistek kreatinina < 0,33 ml/s (20 ml/min)) in pri bolnikih s hudimi funkcijskimi motnjami jeter pa dnevni odmerek ne bi smel preseči 10 mg bisoprolola (10).

#### **1.4.1.2 BOLNIKI S HIPERTENZIJO**

Raziskava, narejena na bolnikih s hipertenzijo, kaže na značilne razlike med enkratnim odmerkom ter po daljšem jemanju bisoprolola (v stacionarnem stanju) v sledečih parametrih: maksimalni plazemski koncentraciji, AUC in očistkom bisoprolola (38). Pri bolnikih s hipertenzijo so maksimalne plazemske koncentracije bisoprolola po večkratnem odmerku 10 in 20 mg/dan za 43–54 % višje kot po enkratnem odmerku (30).

#### **1.4.2. FARMAKOKINETIKA BISOPROLOLA PRI BOLNIKIH S KRONIČNIM SP**

O farmakokinetiki bisoprolola pri bolnikih s stabilnim kroničnim SP ni bilo narejenih veliko raziskav in imamo le omejene podatke o razlikah z zdravimi prostovoljci. Maksimalne plazemske koncentracije v stacionarnem stanju pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (*NYHA* razred III) so približno 78 % višje kot po enkratnem odmerku 10 mg bisoprolola pri zdravih prostovoljcih (Preglednica VI) (30) .

V letu 2013 je bila narejena raziskava, kjer so razvili populacijski farmakokinetični model za očistek bisoprolola pri bolnikih s kongestivnim SP (*NYHA* razred II in III). Povprečna vrednost očistka na raziskovani populaciji znaša 11,4 l/h, kar je nižje kot pri zdravih prostovoljcih, kjer znaša med 14,2 in 15,6 l/h. Končni model očistka bisoprolola (*Enačba I*) pri bolnikih s kongestivnim SP pa kaže, da na vrednost očistka bisoprolola najbolj vpliva dnevni odmerek (DD) (39).

$$\text{Oč} (\text{V}_h = 4,68 + 0,859 \times \text{DD}) \quad (1)$$

Iz *Enačbe I* lahko vidimo, da očistek bisoprolola narašča s povečevanjem dnevnega odmerka. Model je uporaben le za bolnike z neokrnjeno oziroma le zmerno zmanjšano funkcijo ledvic ali jeter, pri bolnikih s srednje hudo do zelo hudo ledvično ali jetrno insuficienco pa lahko vrednosti močno odstopajo (39).



## 2 NAMEN DELA

Bisoprolol je selektiven zaviralec  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev, ki so značilni za gladke mišice srca in ledvic. Terapevtske indikacije pri nas registriranih zdravil z bisoprololom so zdravljenje hipertenzije, koronarne srčne bolezni (angine pektoris) in stabilnega kroničnega srčnega popuščanja. Bisoprolol se iz prebavil skoraj popolnoma absorbira (90 %) in doseže maksimalne plazemske koncentracije čez približno dve uri in pol. Eliminacija poteka po dveh poteh. Polovica se ga presnovi v jetrih do neaktivnih presnovkov, ki se nato skupaj z nespremenjeno obliko izločajo preko ledvic. Razpolovna doba bisoprolola znaša 10 do 12 ur, zato je predvidena aplikacija enkrat dnevno. Pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem pa je pri enakem odmerku razpolovni čas daljši, zato so maksimalne plazemske koncentracije višje. Z ustreznim odmerjanjem izboljšamo bolnikove možnosti za preživetje in zmanjšamo možnost pojava neželenih učinkov.

V analizo bomo vključili 46 bolnikov z znanim kroničnim srčnim popuščanjem, katerih zdravljenje vodijo v kardiološki ambulanti v bolnišnici Golnik, na Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in alergijo (KOPA). Vsi bolniki so prejemali vsaj 3 dni konstanten odmerek bisoprolola (1,25–10 mg enkrat ali dvakrat na dan) ter izpolnjujejo vključitvene in izključitvene kriterije za sodelovanje v analizi.

Plazemske vzorce bolnikov bomo pridobili na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Vzorce bomo pridobili na dveh rednih pregledih bolnikov, ki bosta časovno oddaljena vsaj 6 mesecev. Na obeh obiskih bodo vzorce odvzeli v epruvete z antikoagulantom litijevim heparinom v štirih časovnih točkah; tik pred peroralno aplikacijo zdravila ter 2, 3 in 4 ure po aplikaciji zdravila z bisoprololijevim fumaratom.

Koncentracijo bisoprolola bomo določili z LC-MS/MS metodo, z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (izolacija in čiščenje) na mešanem reverzno faznem ionsko-izmenjevalnem adsorbentu Strata X-C®.

Za farmakokinetično analizo bomo uporabili program NONMEM z metodo nelinearnega modela mešanih učinkov. Na osnovi določenih koncentracij bisoprolola in lastnosti bolnikov bomo postavili osnoven populacijski farmakokinetični model za bolnike s kroničnim SP. Farmakokinetični model lahko služi za določevanje očistka bisoprolola pri posamezniku, preko katerega lahko izračunamo potreben dnevni odmerek zdravila za dosego terapevtskega učinka.



### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 OSEBE, VKLJUČENE V ŠTUDIJO**

V študijo smo vključili 46 bolnikov z znanim kroničnim SP, ki so vsaj 3 dni prejemali konstanten odmerek bisoprolola (1,25–10 mg enkrat ali dvakrat na dan). Podatke bolnikov ter plazemske vzorce smo pridobili v bolnišnici Golnik, kjer je potekala prospektivna observacijska študija z naslovom »Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetične parametere bisoprolola in ramiprila ter na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem«. V času vključevanja v študijo so bolnikovo zdravljenje vodili v kardiološki ambulanti v bolnišnici Golnik, na Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in alergijo (KOPA). Lastnosti bolnikov na prvem in drugem obisku so predstavljene v Preglednici VII.

**Preglednica VII:** Lastnosti bolnikov, vključenih v raziskavo na 1. in 2. obisku

	1. obisk (N = 46)	2. obisk (N = 39)
STAROST #	73,1 ± 9,2	73,5 ± 9,5
SPOLO M/Ž #	26/20	23/16
LVEF (%) #	48,5 ± 13,5 *(44)	51,6 ± 12,8 *(33)
TM (kg) #	81,5 ± 18,6	83,1 ± 19,3
TV (cm) #	165,3 ± 9,6	166,3 ± 10
S-Cr (umol/l) #	102 ± 33	106,9 ± 37
CICG (ml/min) #	60,9 ± 24 *(41)	50,9 ± 24 *(30)
CIMDRD4 (ml/min) #	64,3 ± 25	60,9 ± 26
AMIODARON ##	4	3
KAHEKSIJA 3 OD 5 ##	4	3
KAHEKSIJA 2 OD 5 ##	5	10

# podane so povprečne vrednosti ± SD

## št. bolnikov, ki jemljejo amiodaron oz. imajo postavljeno diagnozo kaheksije

\* nimamo podatkov za vse bolnike (št. bolnikov)

SD = standardni odklon; TM = telesna teža; TV = telesna višina; S-Cr = koncentracija serumskega kreatinina;

CICG = očistek kreatinina za oceno glomerulne filtracije (Cockroft- Gault); CIMDRD4 = očistek kreatinina za oceno glomerulne filtracije (po MDRD enačbi); KAH 2/3 OD 5 = bolniki imajo postavljeno diagnozo kaheksije in izpolnjujejo 2/3 od 5-ih kriterijev za kaheksijo

Bolniki so morali izpolnjevati naslednje kriterije za vključitev ali izključitev iz študije (povzeto po protokolu za raziskavo Katje Trobec (40)):

➤ Vključitveni kriteriji

- ✓ Bolnik ima postavljeno diagnozo kroničnega SP *NYHA* razreda II ali III.
- ✓ Bolnik v redni terapiji prejema bisoprolol.
- ✓ Bolnik je sposoben razumeti in prosto podati privolitev za sodelovanje v študiji.

➤ Izklučitveni kriteriji

- ≠ Bolnik ima znano kronično ledvično bolezen z oceno glomerulne filtracije po MDRD enačbi  $< 40 \text{ ml}/(\text{min} \times 1,73 \text{ m}^2)$  na Obisku 1 ali Obisku 2.
- ≠ Bolnik ima znano bolezen jeter oz. je to razvidno iz laboratorijskih izvidov, pridobljenih na Obisku 1 ali Obisku 2.
- ≠ Pri bolniku plazemske koncentracije bisoprolola na Obisku 1 ali Obisku 2 iz kateregakoli razloga ne bodo dosegle stacionarnega stanja oz. bolnik na Obisku 1 in Obisku 2 ne bo več prejemal bisoprolola.
- ≠ Bolnik je v manj kot 4 tednih pred Obiskom 1 ali Obiskom 2 doživel akutno dekompenzacijo SP.
- ≠ Bolnik ima vstavljen srčni spodbujevalnik.
- ≠ Bolniku bodo v času med Obiskom 1 in Obiskom 2 v terapijo dodane ali izvzete učinkovine (oz. spremenjeno odmerjanje), ki pomembno interagirajo z bisoprololom na farmakokinetičnem ali farmakodinamičnem nivoju.
- ≠ Bolnik ima poznano preobčutljivost na rentgenska kontrastna sredstva.
- ≠ Bolnik je že doživel epileptični napad.
- ≠ Poznana nesposobnost slediti študijskim postopkom protokola.

### **3.1.2 PLAZMA**

#### **3.1.2.1 PLAZMA BOLNIKOV**

Plazemske vzorce bolnikov smo pridobili na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Sodelovalo je 46 bolnikov s kardiovaskularnim obolenjem, ki so prejemali 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg ali 10 mg bisoprololijevega fumarata enkrat ali dvakrat na dan in so bili v stacionarnem stanju. Vzorci krvi so bili odvzeti dvakrat, in sicer na Obisku

1 ter na Obisku 2, ki sta bila časovno oddaljena vsaj 6 mesecev. Na obeh obiskih so vzorce odvzeli v epruvete z antikoagulantom litijevim heparinom v štirih časovnih točkah – tik pred aplikacijo zdravila (ob času 0 h) ter 2, 3 in 4 h po jemanju zdravila z bisoprololijevim fumaratom. Vzorce bolnikov smo shranjevali v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.2.2 PLAZMA ZA STANDARDE IN KONTROLNE VZORCE**

Kot biološka matrica za izdelavo standardov in kontrolnih vzorcev (QC-jev) nam je služila človeška plazma dveh različnih darovalcev (antikoagulant EDTA), ki nam jo je priskrbel Zavod za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Datumi odvzema so bili sledeči:

- plazma 10. 5. 2011 / alkvet 2. 3. 2012 / št.:1866003,
- plazma 16. 7. 2012 / alikvet 19. 9. 2012 / št.: 2103144.

### **3.1.3 STANDARD IN INTERNI STANDARDI**

Kot standard za pripravo plazemskih vzorcev smo uporabili *bisoprololijev fumarat*,  $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4 \cdot \frac{1}{2}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4)$ ,  $M = 383,48$  g/mol, proizvajalca *Sequoia Research Products* (Pangbourne, Velika Britanija). Za interni standard (IS) pa smo uporabili *metoprololijev tartrat*,  $(\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_3)_2 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ,  $M = 684,81$  g/mol, podjetja *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Nemčija).

### **3.1.4 REAGENTI IN TOPILA**

Pri delu smo uporabljali naslednje reagente in topila: *ultračista voda*, pridobljena z aparatom *Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System* (*Millipore Corporation*, Bedford, MA, ZDA); *metanol* LC-MS čistoče: *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Nemčija); *puferske raztopine s pH 6*: *Merck* (Darmstadt, Nemčija); *Titrisol<sup>®</sup>* za pripravo raztopine NaOH s koncentracijo 1 mol/l, *kalijev dihidrogenfosfat*, *mrvavljična kislina 98–100 % Suprapur<sup>®</sup>*, *25 % amoniak v vodi*: *Merck* (Darmstadt, Nemčija); *acetonitril* ultra gradient HPLC čistoče, *metanol* HPLC čistoče: *J. T. Baker* (Phillipsburg, NJ, ZDA).

Iz zgoraj navedenih reagentov in topil smo pripravili še naslednje zmesi (povzeto po diplomsko nalogi Anke Peganc):

○*Fosfatni puferski raztopini* (50 mM, pH 6 – za izvedbo SPE): 0,5 l 50 mM fosfatnega pufra smo pripravili tako, da smo na precizni tehtnici *Exacta 300 EB* (Tehtnica, Železniki, Slovenija) natehtali 3,40 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sol prenesli v 500-mililitrsko bučko in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo nato prelili v čašo in na

kalibriranem pH metru MA5750 (Iskra, Kranj, Slovenija) umerili na želeno pH vrednost z 1 M NaOH. Pufer smo s pomočjo vodne črpalke filtrirali skozi celuloznoacetatni filter z velikostjo por 0,45 µm.

- *20 % metanol v vodi* (topilo za standardne raztopine): V 100-mililitrsko bučko smo odpipetirali 20 ml 100 % metanola iz z vodo dopolnili do oznake.
- *0,1 % mravljična kislina v vodi* (pH ~ 3) (mobilna faza): v stekleno posodo smo natočili 0,5 l vode in vanjo odpipetirali 500 µl mravljične kisline.
- *5 % amoniak v metanolu* (elucijsko topilo): v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 2 ml 25-odstotnega amoniaka v vodi in dopolnili do oznake z metanolom.

### **3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE BISOPROLOLA V VZORCIH BOLNIKOV**

Koncentracijo bisoprolola v plazmi bolnikov smo določali po metodi, ki jo je v diplomski nalogi razvila Anka Peganc (41). Postopek detekcije in kvantifikacije je temeljal na tekočinski kromatografiji, sklopljeni s tandemško masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Vzorce smo predhodno pripravili z optimiziranim postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih *Strata X-C*.

#### **3.2.1 PRIPIRAVA VZORCEV Z EKSTRAKCIJO NA TRDNEM NOSILCU (SPE)**

Izolacijo in čiščenje vzorcev smo izvajali z ekstrakcijo na trdnem nosilcu na mešanem reverzno faznem ionsko-izmenjevalnem SPE adsorbentu *Strata X-C®* (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA). Ta način nam omogoča visoke izkoristke ekstrakcije bisoprolola iz plazme (88,1–99,1 %) in ponovljive rezultate. Kolona, ki smo jo uporabili, vsebuje polimerno osnovo z močnimi kationsko-izmenjevalnimi funkcionalnimi skupinami (*Strong Cation Mixed Mode*), kar omogoča več mehanizmov retencije analita (ionske, π-π in hidrofobne interakcije). Uporabili smo 3 ml SPE kartuše s 60 mg polimera. Nekatere fizikalne in kemijske značilnosti trdne faze so predstavljene v Preglednici VIII.

**Preglednica VIII:** Značilnosti delcev stacionarne faze *Strata X-C* (42)

<i>Tip trdne faze</i>	Površinsko obdelan kopolimer stirena in divinilbenzena
<i>Povprečni premer delcev</i>	33 µm
<i>Velikost por</i>	85 Å
<i>Ionska izmenjevalna kapaciteta</i>	1 mEq/g
<i>pH stabilnost</i>	1–14

**Razredčen vzorec za nanos na nosilec *Strata X-C*** smo pripravili tako, da smo v plastični epruveti združili in vorteksirali (20 sekund):

- 1100 µl plazemskega vzorca (1045 µl človeške plazme + 55 µl delovne raztopine bisoprolola z ustreznou koncentracijo – pri plazmah bolnikov je bila ta koncentracija 0 ng/ml);
- 50 µl raztopine IS s koncentracijo 1000 ng/ml;
- 2150 µl pufra (50 mM fosfatni pufer, pH 6).

V večini razredčenih vzorcev je bila prisotna velika količina »sluzi«, ki onemogoči prehod preko kolone, zato smo jih pred nanosom na SPE centrifugirali 10 minut (5000 rpm, 5 °C) na napravi *Centric 400R* (Tehnica, Železniki, Slovenija) ter nanesli supernatant.

**Optimiziran postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu *Strata X-C*:**

<b>Kondicioniranje:</b>	omočenje kolone z 2 ml MeOH ekvilibracija z 2 ml fosfatnega pufra (50 mM, pH 6)
<b>Nanos:</b>	3 ml razredčenega vzorca
<b>Spiranje 1:</b>	2 ml fosfatnega pufra (50 mM, pH 6)
<b>Spiranje 2:</b>	1 ml MeOH
<b>Sušenje:</b>	1 min pri podtlaku 5 mm Hg
<b>Elucija:</b>	2 ml 5 % (v/v) NH <sub>4</sub> OH v MeOH

Ekstrakcijo smo izvajali na vakuumski kadički s pokrovom in dvanajstimi mesti za SPE kolone proizvajalca *Macherey-Nagel* (Düren, Nemčija) (Slika 2). Tlak in pretok smo uravnavali s pomočjo oljne vakuumske črpalke DOA-P504-BN (*Gast, Benton Harbor, MI, ZDA*). Eluat smo zbirali v 2 ml mikrocentrifugirke in topilo odparili v sušilniku *Turbovap*.

LV (*Caliper, Hopkinton, MA, ZDA*) pri 40 °C. Suh preostanek smo rekonstituirali v 200 µl mobilne faze in prenesli na mikrotitrsko ploščico za analizo na masnem spektrometru.

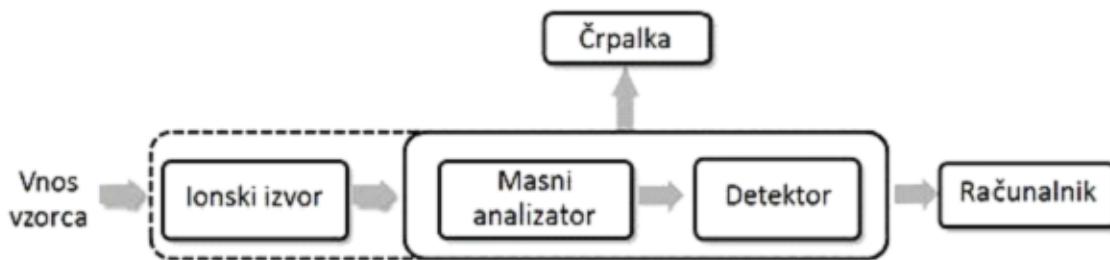


**Slika 2:** Vakuumski sistem z nastavki za SPE kartuše

### **3.2.2 ANALIZA VZORCEV BOLNIKOV S KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMSKIM MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS)**

Analizo vzorcev bolnikov smo izvajali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS). **Masna spektrometrija** je po definiciji »*analizna metoda, ki z merjenjem razmerja med maso in nabojem molekul in njihovih fragmentov omogoča določanje molekulske mase in elementne sestave*« (8). Za ponovljivo in selektivno kvantitativno analizo spojin v nizkih koncentracijah pa se pogosto uporablja **tandemska masna spektrometrija (MS/MS)**, ki uporablja trojni kvadrupolni masni analizator (QQQ). Uporabili smo multirezidualno analizo (MRM), ki obsega dva masna filtra – Q1 in Q3. Prvi kvadrupol prehajajo le ioni z izbranim razmerjem  $m/z$  (molekularni ioni analita), ki se nato v kolizijski celici (Q2) ob stiku z inertnim plinom fragmentirajo na hčerinske ione. Na drugem masnem filtru (Q3) pa ne analiziramo vseh možnih, ampak le določeno vrsto fragmentiranih ionov. Specifični pari  $m/z$  vrednosti starševskega (prekursorja) in fragmentiranega hčerinskega (produktnega) iona se imenujejo *masni prehodi* in pomembno pripomorejo k selektivnosti metode. Izboljšana je tudi občutljivost, saj z opisano metodo učinkovito odstranimo ionsko ozadje motečih nečistot (43).

Za analizo vzorcev bolnikov smo uporabili LC-MS/MS analitski sistem (Slika 3) z *Agilent 1290 Infinity LC* in *Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC-MS* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, ZDA). *1290 Infinity LC* vključuje vakuumski razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono in UV-VIS detektor z nizom diod. Kromatografsko separacijo smo izvedli na reverzno fazni koloni *Kinetex C18*,  $50 \times 2,1$  mm in z  $2,6 \mu\text{m}$  delci (*Phenomenex*, Torrance, CA, ZDA) pri temperaturi  $50^\circ\text{C}$  in tlaku, omejenem na 600 barov. Mobilna faza je bila sestavljena iz A: 0,1 % mravljične kisline v vodi in B: 98 % ACN v vodi. Elucija komponent vzorca je bila gradientna s postopnim povečevanjem odstotka ACN od 10 do 50 %. Pred analizo so vzorci stali v avtomatskem vzorčevalniku na  $4^\circ\text{C}$ , injicirali pa smo  $0,1 \mu\text{l}$  vzorca. Čas analize posameznega vzorca je znašal 2,7 min.

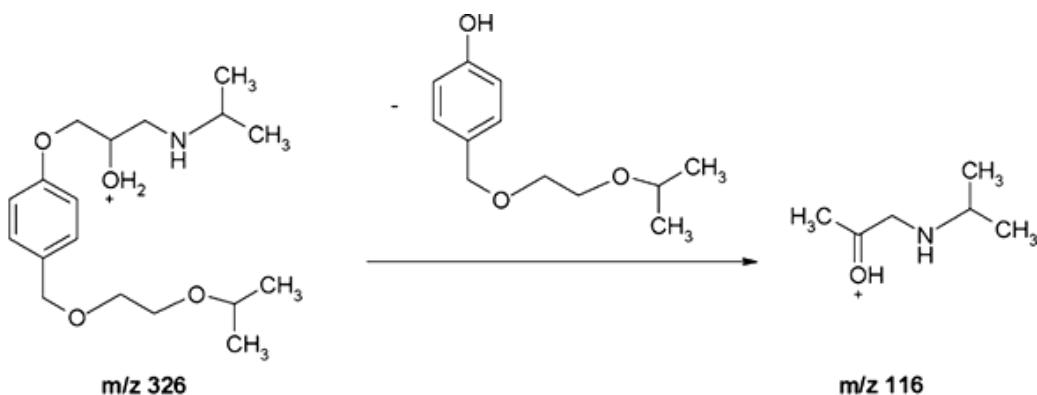


**Slika 3:** Shema masnega spektrometra

Kvantifikacijo smo izvedli s pomočjo programske opreme *MassHunter Workstation B.04.01* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, ZDA) z multirezidualno analizo MRM. MRM nastavitev so prikazane v Preglednici IX. Produktne ione, ki jih nastane največ (*quantifier*), smo uporabili za kvantitativno določanje, ostali produktni ioni pa potrjujejo identiteto analita (*qualifiers*). Slika 4 prikazuje enega izmed glavnih fragmentacijskih procesov ioniziranega bisoprolola.

**Preglednica IX:** Optimalni MRM prehodi in kolizijska energija za bisoprolol in metoprolol

	MRM $m/z$ prehodi	Kolizijska energija [eV]
Bisoprolol	$326,2 \rightarrow 56,1$	37
Bisoprolol <i>qualifier</i>	$326,2 \rightarrow 116,1$	9
Metoprolol (IS)	$268,2 \rightarrow 116$	12



**Slika 4:** Predvidena fragmentacija ionizirane molekule bisoprolola, ki daje produktni ion z m/z 116 (41)

### 3.2.3 PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE ZA IZRAČUN KONCENTRACIJE BISOPROLOLA V VZORCIH BOLNIKOV

#### 3.2.3.1 UMERITVENA KRIVULJA IN KONTROLNI VZORCI

Za izračun koncentracije bisoprolola v vzorcih bolnikov smo potrebovali umeritveno oziroma kalibracijsko krivuljo, ki podaja neposredno odvisnost odziva detektorja od koncentracije analita v vzorcu (*Enačba 2*).

$$\text{Odziv} = b \times \text{konc.} + a \quad (2)$$

**Umeritveno krivuljo** za bisoprolol smo določili vsak prvi dan v tednu tekom merjenja koncentracij vzorcev. Uporabili smo odzive šestih kalibratorjev koncentracij 0,85 ng/ml, 4,2 ng/ml, 8,5 ng/ml, 42 ng/ml, 64 ng/ml in 127 ng/ml ter odziv slepega vzorca.

*Kalibracijske standarde in kontrolne vzorce* nizke ( $\text{QC}_L$ ; 2,5 ng/ml), srednje ( $\text{QC}_M$ ; 21 ng/ml) in visoke koncentracije ( $\text{QC}_H$ ; 85 ng/ml) smo pripravili tako, da smo v 3,5-mililitrske plastične epruvete z zamaškom odpipetirali 1045 µl človeške plazme in 55 µl ustrezne delovne raztopine bisoprolola ter na zmerni moči vorteksirali 30 sekund. Postopek redčenja vzorca in ekstrakcije na trdnem nosilcu je bil kot pri vzorcih bolnikov.

Kalibracijske standarde smo pripravili sveže vsak začetek tedna, kontrolne vzorce pa vsak dan posebej. Analizirali smo po eno ponovitev vsakega izmed kalibratorjev. Umeritveno krivuljo je predstavljal graf odvisnosti površine vrha analita (relativno glede na IS) od koncentracije analita. Podatke za umeritveno premico smo analizirali v programu

*Microsoft Excel* s pomočjo utežne linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice. Naklon in odsek umeritvene premice smo optimizirali s pomočjo dodatka v programu *Microsoft Excel*, imenovanega *Reševalec (Solver)*.

### 3.2.3.1 DELNA VALIDACIJA METODE

Umeritvena krivulja, ki smo jo uporabili za izračun koncentracij vzorcev, je morala ustrezati naslednjim kriterijem (44, 45):

- Najviše dovoljeno odstopanje od 100-odstotne točnosti, izračunane po *Enačbi 3*, je pri  $LLOQ \pm 20\%$ , pri ostalih koncentracijah pa  $\pm 15\%$ .
- Naveden kriterij so morali dosegati vsaj širje od šestih kalibracijskih standardov, standard pri LLOQ in standard pri najvišji koncentraciji.
- Vrednost determinacijskega koeficienta ( $r^2$ ) je morala biti višja od 0,990.

Najmanša koncentracija standarda v umeritveni krivulji predstavlja **spodnjo mejo določljivosti (LLOQ)**. Zahteve za ustrezno točnost in ponovljivost so sledeče (44):

- odziv standarda pri LLOQ vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca,
- koeficient variacije (CV) največ 20 %,
- točnost 80–120 %.

$$\text{Točnost [\%]} = \frac{C_{\text{tamerjena}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100 \quad (3)$$

**Točnost in ponovljivost** smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj in odzivov kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij ( $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$ ). Za vsak QC smo izvedli meritev za vsak dan merjenja koncentracije posebej. Točnost smo izrazili po *Enačbi 3*, ponovljivost pa s koeficientom variacije (CV) (*Enačba 4*).

$$CV [\%] = \frac{s_d}{C} \times 100 \quad (4)$$

Določili smo znotrajtedensko in medtedensko ponovljivost. Znotrajtedensko ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije analize štirih ponovitev kontrolnih vzorcev nizke, srednje in visoke koncentracije. Medtedensko ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije rezultatov vseh različnih tednov, v katerih smo za vsak dan analizirali vsakega izmed kontrolnih vzorcev. Po FDA smernicah (44) se za veljavne meritve smatrajo tiste, pri katerih je točnost vseh QC vzorcev v okviru  $100 \pm 15\%$ , CV izračunanih koncentracij QC vzorcev pa ne sme biti višji od 15 % .

### **3.3 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIČNA ANALIZA PODATKOV**

Za farmakokinetično analizo podatkov smo uporabili nelinearni model mešanih učinkov v programskej paketu NONMEM (39). Nelinearni model mešanih učinkov je prva metoda za ocenjevanje interindividualnih razlik (IIV), ki ne zanemarja podatkov, ki jih je težje vključiti v analizo – to so npr. skopi podatki ali različni odmerni intervali (46).

Populacijska farmakokinetika (PopFK) ima dandanes pomembno vlogo pri raziskovanju in obravnavi farmakokinetike v procesih razvoja zdravil in zdravstvenega varstva. PopFK je področje klinične farmakologije, ki si prizadeva pridobiti kvantitativne ocene farmakokinetičnih parametrov ter določiti interindividualne (IIV) in rezidualne variabilnosti absorpcije, distribucije, metabolizma in izločanja zdravil. S PopFK modelom lahko s spremeljanjem plazemskih koncentracij ali pa le s pomočjo podatkov o bolnikovem fizičnem stanju, bolnišnični zgodovini in laboratorijskih testov fizioloških funkcij zelo natančno prilagodimo odmerjanje zdravila posameznemu bolniku (46).

Na trgu je veliko različnih programskej paketov za analizo PopFK, eden najbolj zanesljivih in najpogosteje uporabljenih pa je NONMEM, ki ima veliko zbirko različnih podprogramov. Za ocenjevanje vpliva sočasnih spremenljivk na farmakokinetične parametre ta program uporablja metodo največjega verjetja (*maximum likelihood*). Verjetnost, da se izračunane vrednosti ujemajo z meritvami, program izrazi kot funkcijo vseh definiranih parametrov v modelu, ocene parametrov pa izbere tako, da je verjetnost največja (39, 47).

#### **3.3.1 POSTAVITEV OSNOVNEGA STRUKTURNEGA MODELA**

V začetnem delu razvoja PopFK modela smo v programu NONMEM za osnovni model izbrali enoprostorni model, ki je definiran s farmakokinetičnimi parametri, konstanto absorpcije, očistkom in volumnom porazdelitve. Bolniki so vse odmerke prejemali preroralno, zato biološke razpoložljivosti učinkovine (F) ni bilo mogoče izračunati, smo pa upoštevali, da le-ta direktno in v enaki meri vpliva na očistek in volumen porazdelitve učinkovine. Parametri populacije (očistek in volumen porazdelitve), ki jih s to metodo izračunamo, so sestavljeni iz stalnih učinkov oz. srednjih vrednosti porazdelitve ter naključnih učinkov oz. matrike varianca-kovarianca porazdelitve (46, 48).

### 3.3.2 STATISTIČNI MODEL

PopFK analiza nam omogoča oceniti razlike v posameznih farmakokinetičnih parametrih in poizkuša identificirati njihove vzroke. S statističnim modelom opišemo možna odstopanja strukturnega modela od realnih izmerjenih vrednosti. Na razliko med napovedano vrednostjo parametra z razvitim modelom in dejansko izmerjeno vrednostjo vplivajo različne spremenljivke, ki jih uvrščamo v dve primarni skupini, in sicer: interindividualne variabilnosti, torej lastnosti posameznikov, ki se med seboj razlikujejo; in rezidualne variabilnosti. Rezidualne variabilnosti so vse intraindividualne spremembe (znotraj posameznega pacienta), časovne spremenljivke, napake pri merjenju koncentracije in druge nespecifične napake modela. V primeru, da imamo podatke za bolnike iz dveh različnih obiskov, lahko upoštevamo še tretjo vrsto variabilnosti, in sicer med obiski. Variabilnost med obiski vključuje spremembe v farmakokinetiki učinkovine zaradi spremenjenih lastnosti bolnikov ali compliance jemanja zdravila (46, 48).

V razvoju našega modela smo ocenjevali vpliv treh vrst spremenljivk, in sicer interindividualne variabilnosti oz. razlike med osebami, variabilnosti med obiski (koncentracijo bisoprolola smo merili na dveh obiskih, časovno oddaljenih približno 6 mesecev) in rezidualne intraindividualne variabilnosti. *Enačba 5* opisuje očistek bisoprolola kot funkcijo interindividualne spremenljivke in variabilnosti med obiski.

$$Cl_{i,j} = \theta_{Cl} \times e^{\eta_i} \times (obisk \times e^{\eta_j}) \quad (5)$$

Oznaka  $Cl_{i,j}$  označuje vrednost očistka bisoprolola za posameznega bolnika,  $\theta_{Cl}$  srednjo vrednost parametra v populaciji bolnikov,  $\eta_i$  razliko med srednjo vrednostjo in vrednostjo parametra pri točno določenem bolniku,  $\eta_j$  pa razliko med vrednostjo parametra med dvema obiskoma pri določenem pacientu. Za vrednosti  $\eta_i$  in  $\eta_j$  se smatra, da so normalno porazdeljene v populaciji bolnikov s srednjo vrednostjo 0 in varianco  $\omega^2$ .

#### 3.3.2.1 INTERINDIVIDUALNE VARIABILNOSTI

Za opis interindividualne variabilnosti konstante absorpcije, očistka in volumna porazdelitve smo izbrali eksponentni model napake, kot prikazuje *Enačba 6*.

$$p_t = \theta_p \times e^{\eta_t}, \quad \eta_t \in N(0, \omega^2) \quad (6)$$

Zgornja enačba predstavlja zapis FK parametra (konstante absorpcije očistka oz. volumna porazdelitve) kot funkcijo interindividualne spremenljivke. Oznaka  $p_i$  označuje vrednost parametra za posameznega bolnika,  $\theta_p$  srednjo vrednost parametra v populaciji bolnikov,  $\eta_i$  pa razliko med srednjo vrednostjo in vrednostjo parametra pri točno določenem bolniku. Za vrednosti  $\eta_i$  se smatra, da so normalno porazdeljene v populaciji bolnikov s srednjo vrednostjo 0 in varianco  $\omega^2$ .

### 3.3.2.2 VARIABILNOSTI MED OBISKI

Variabilnost parametrov med dvema obiskoma smo opisali z eksponentnim modelom napake (*Enačba 7*).

$$p_{i,j} = \theta_p \times e^{\eta_i} \times e^{\eta_j}, \quad \eta_i, \eta_j \in N(0, \omega^2) \quad (7)$$

*Enačba 7* predstavlja zapis FK parametra kot funkcijo interindividualne spremenljivke in variabilnosti med obiski. Oznaka  $p_i$  označuje vrednost parametra (konstante absorpcije očistka oz. volumna porazdelitve) za posameznega bolnika,  $\theta_p$  srednjo vrednost parametra v populaciji bolnikov,  $\eta_i$  razliko med srednjo vrednostjo in vrednostjo parametra pri točno določenem bolniku,  $\eta_j$  razliko med vrednostjo parametra med dvema obiskoma pri določenem pacientu. Za vrednosti  $\eta_i$  in  $\eta_j$  se smatra, da so normalno porazdeljene v populaciji bolnikov s srednjo vrednostjo 0 in varianco  $\omega^2$ .

### 3.3.2.3 REZIDUALNE VARIABILNOSTI

Kljub predpostavki, da so srednje vrednosti vseh parametrov stalnih učinkov znane, pa se napovedane vrednosti plazemske koncentracije razlikujejo od meritev. Prav to razliko predstavlja rezidualna variabilnost ali »šum«. Za oceno rezidualne intraindividualne variabilnosti smo izbrali kombiniran – aditivni in proporcionalni model napake. (*Enačba 8*).

$$c_{i,j,k} = \hat{c}_{i,j,k} \times (1 + \varepsilon_p) + \varepsilon_a, \quad \varepsilon_p \in N(0, \sigma_p^2), \quad \varepsilon_a \in N(0, \sigma_a^2) \quad (8)$$

$C_{i,j,k}$  predstavlja napovedano vrednost plazemske koncentracije zdravila v določeni točki v času  $j$  in obisku  $k$ ,  $\hat{c}_{i,j,k}$  pa dejansko izmerjeno koncentracijo. Vrednosti  $\varepsilon_a$  in  $\varepsilon_p$  predstavljajo rezidualne napake (aditivno in proporcionalno) in so normalno porazdeljene s srednjo vrednostjo 0 in varianco  $\sigma_a^2$  in  $\sigma_p^2$ . Te vrednosti predstavljajo vir naključnih učinkov – to so razlike med bolniki, ki jih vnaprej ne moremo napovedati.

**3.3.2.4 KORELACIJA MED OČISTKOM IN VOLUMNOM PORAZDELITVE**

V poglavju 3.3.1 smo omenili, da ne moremo ocenjevati biološke razpoložljivosti bisoprololal, lahko pa ocenjujemo kovarianco med očistkom (Cl/F) in volumnom porazdelitve (V/F) v odvisnosti od biološke razpoložljivosti ter izračunamo korelacijo oziroma medsebojni vpliv med obema parametrom (Enačba 9).

(9)

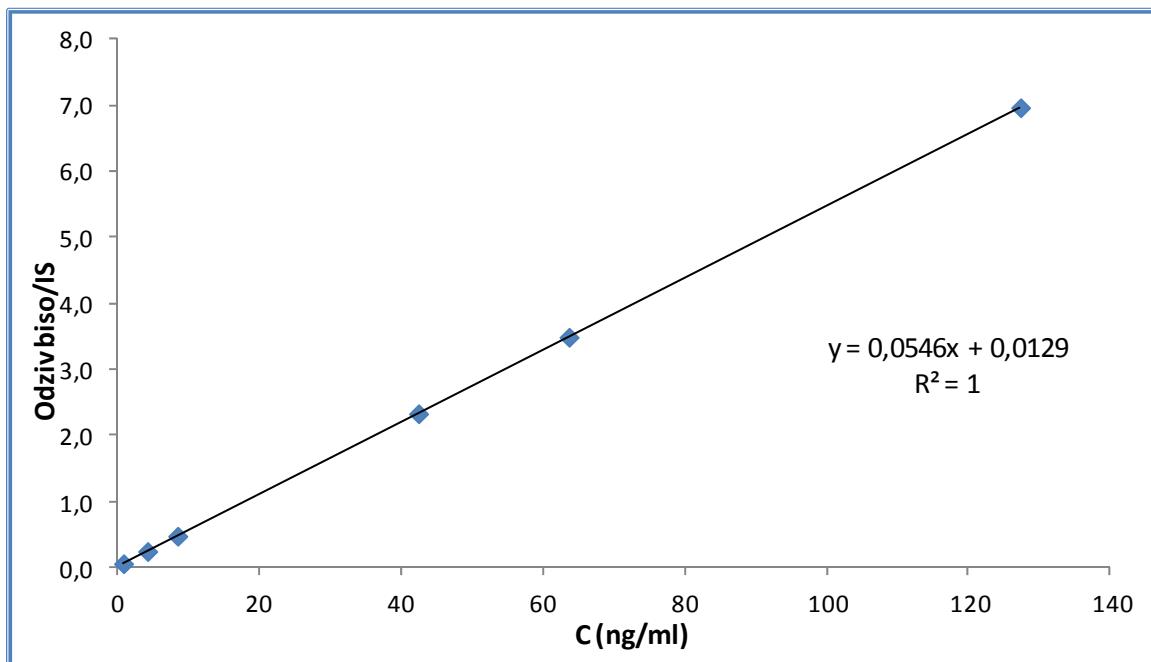


## 4 REZULTATI

### 4.1 DELNA VALIDACIJA LC-MS/MS METODE

Koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih bolnikov s srčnim popuščanjem smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS). Uporabljena metoda je bila razvita v okviru diplomske naloge Anke Peganc (41) ter validirana v skladu s FDA smernicami (44). Ker pa metoda dalj časa ni bila uporabljena, smo v okviru narejenih meritev tekom analize vzorcev bolnikov preverili, če metoda ustreza validacijskim zahtevam za točnost in ponovljivost. Hkrati smo določili še LLOQ in linearost regresijske premice ter s pomočjo razmerja odzivov med produktnim ionom za kvantifikacijo in produktnim ionom za kvalifikacijo preverili še selektivnost metode.

Koncentracijo bisoprolola v vzorcih bolnikov smo izračunali s pomočjo umeritvenih krivulj, ki predstavljajo koncentracijo bisoprolola v odvisnosti od odziva (Biso/IS). Regresijska premica z enačbo:  $odziv\ (Biso/IS) = 0,0546 \times konc. + 0,0129$  je predstavljena na Sliki 5.



**Slika 5:** Umeritvena krivulja za določanje bisoprolola v plazmi – utežena linearna regresija ( $w_i = 1/C^2$ ).

Parametre umeritvene krivulje smo določili z uporabo utežene linearne regresije in sicer s pomočjo uteži  $1/C^2$ . Linearnost regresijskih premic v koncentracijskem območju **0,85–127 ng/ml** smo dokazali z metodo najmanjših kvadratov. V preglednici X so predstavljene točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev za uporabljene regresijske premice.

**Preglednica X:** Točnost kalibracijskih standardov bisoprolola za uporabljene umeritvene krivulje pri uporabi uteži  $1/C^2$ .

$C_{\text{biso.}}$ v standardu [ng/ml]	Točnost (%)					
	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden
0,849	101,0	101,3	100,1	101,5	100,5	99,2
4,243	95,8	93,6	100,4	92,3	96,5	100,5
8,487	98,0	98,3	97,9	99,6	101,7	108,3
42,43	101,6	102,9	101,0	100,3	100,3	98,2
63,65	103,3	103,1	100,3	98,4	99,9	96,8
127,3	100,3	100,8	100,3	107,9	101,1	97,1

V Preglednici XI pa smo predstavili parametre vseh regresijskih premic, ki smo jih uporabili pri izračunu koncentracij bisoprolola v vzorcih bolnikov ter vrednosti determinacijskih koeficientov, kot merilo linearnosti.

**Preglednica XI:** Parametri umeritvenih premic

	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden
b	0,04917	0,05236	0,05460	0,05900	0,05565	0,04408
a	0,00664	0,01309	0,01287	0,02161	0,00251	0,00930
$R^2$	0,9996	0,9995	1,0000	0,9915	0,9998	0,9984

Oblika umeritvene premice: odziv (Biso/IS)= b x konc.(Biso)+ a

**Selektivnost** uporabljene metode smo preverili z izračunom razmerja med produktnim ionom za kvantifikacijo in produktnim ionom za kvalifikacijo (Preglednica XII).

**Preglednica XII:** Variabilnost razmerja odziva produktnega iona za kvantifikacijo (*quantifier*) in produktnega iona za kvalifikacijo (*qualifier*) bisoprolola

	<b>Povpr. razmerje quantifier / qualifier</b>	
	(n = 13)	CV [%]
QC <sub>L</sub> (2,5 ng/ml)	0,32327	2,86
QC <sub>M</sub> (21 ng/ml)	0,32357	2,19
QC <sub>H</sub> (85 ng/ml)	0,31980	1,31

Z merjenjem koncentracij kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij (QC<sub>L</sub>, QC<sub>M</sub> in QC<sub>H</sub>) smo določili znotrajtedensko in medtedensko ponovljivost. Podatki so predstavljeni v Preglednici XIII. Znotrajtedensko ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije analize štirih ponovitev kontrolnih vzorcev nizke, srednje in visoke koncentracije znotraj enega tedna. Za ponovljivost med različnimi tedni pa smo uporabili odzive kontrolnih vzorcev treh koncentracij iz šestih različnih tednov.

**Preglednica XIII:** Ponovljivost in točnost določevanja bisoprolola znotraj tedna in med tedni

	QC	CV (%)	Točnost (%)
Znotraj tedna (n = 4)	QC <sub>L</sub>	6,0	98,3
	QC <sub>M</sub>	1,3	97,7
	QC <sub>H</sub>	1,3	99,3
Med tedni (n = 6)	QC <sub>L</sub>	6,3	99,1
	QC <sub>M</sub>	3,0	98,1
	QC <sub>H</sub>	2,3	99,5

Točnost in ponovljivost metode tekom merjenja koncentracij vzorcev bolnikov smo določili z merjenjem koncentracij 39 kontrolnih vzorcev. Tri kontrolne vzorce različnih koncentracij smo pripravili vsak dan tekom priprave vzorcev bolnikov. Točnost in ponovljivost QC smo predstavili v Preglednici XIV.

**Preglednica XIV:** Točnost in ponovljivost izračunanih koncentracij vseh kontrolnih vzorcev (QC) tekom analize.

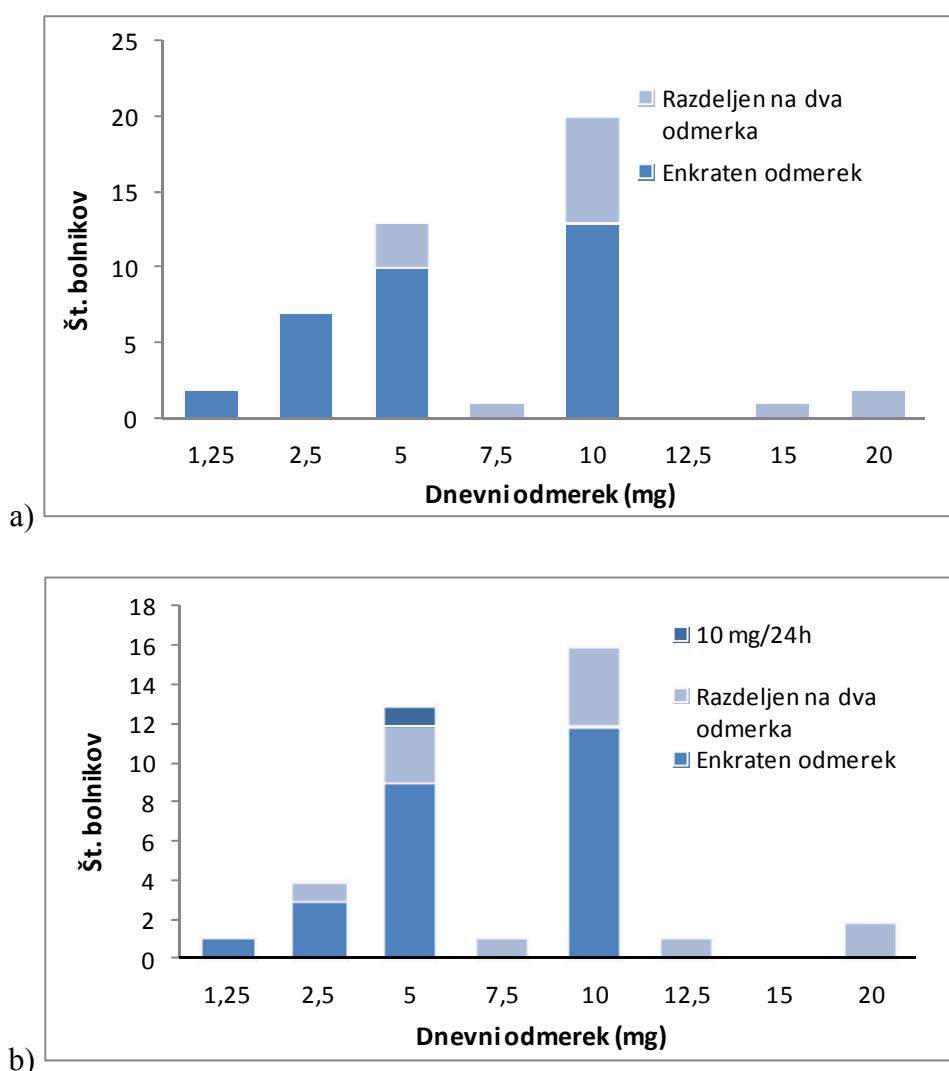
		QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
TOČNOST (%)	1. teden	99,8	95,6	98,9
	2. teden	98,3 92,0 96,8	100,3 100,4 101,3	99,1 101,8 105,7
	3. teden	96,4 91,3 105,2 100,4	96,9 96,3 98,4 99,1	100,5 98,7 100,2 97,9
	4. teden	89,3 86,4	95,7 90,9	97,4 91,1
	5. teden	108,2	103,1	103,6
	6. teden	102,5 100,7	97,1 96,0	97,5 92,4
	povprečna	97,5	97,8	98,8
	CV (%)	6,5	3,2	4,0

Točnost določanja koncentracije QC je podana v odstotkih (%) glede na dejansko koncentracijo; ponovljivost pa kot koeficient variacije (CV) v odstotkih.

## 4.2 BOLNIKI

### 4.2.1 OSNOVNI PODATKI O BOLNIKIH

Za postavitev PopFK modela bisoprolola za bolnike s kroničnim SP smo merili koncentracije bisoprolola v plazmi 46 bolnikov z znanim kroničnim SP. Bolniki, vključeni v študijo, so bili v stacionarnem stanju. S histogramom smo predstavili porazdelitev dnevnih odmerkov ter režim jemanja tablet z bisoprololijevim fumaratom pri obravnavanih bolnikih (Slika 6).



**Slika 6:** Dnevni odmerki bisoprololijevega fumarata in režimi odmerjanja pri pacientih na Obisku 1 (a) in Obisku 2 (b)

Obravnavali smo 26 bolnikov moškega spola in 20 bolnic ženskega spola, starih med 54 in 87 let. Podatki bolnikov na obeh obiskih so predstavljeni v Preglednici VII v poglavju 3.1.1. Izmerili smo koncentracije bisoprolola v 328 plazemskih vzorcih bolnikov – 177 vzorcev je bilo pridobljenih na Obisku 1, 155 pa na Obisku 2. Izmed 46 bolnikov, vključenih v raziskavo, na Obisku 2 zaradi različnih vzrokov nismo pridobili plazemskih vzorcev sedmih bolnikov. Dva bolnika in ena bolnica so zavrnili nadaljnje sodelovanje v raziskavi, dve bolnici sta umrli, o enem bolniku in eni bolnici pa nimamo podatka.

#### **4.2.2 KONCENTRACIJE BISOPROLOOLA V PLAZEMSKIH VZORCIH**

V Preglednici XV so navedene plazemske koncentracije bisoprolola pri bolnikih v štirih različnih časovnih točkah na obeh obiskih. Poleg izmerjenih koncentracij je naveden tudi dnevni odmerek pri posameznem bolniku ter režim aplikacije (enkraten odmerek ali razdeljen dnevni odmerek na dve aplikaciji – navadno zjutraj in zvečer).

**Preglednica XV:** Izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola (ng/ml) tik pred peroralno aplikacijo (ob času 0 h) ter 2 h, 3 h in 4 h po aplikaciji zdravila

Št. bolnika	1. obisk					2. obisk				
	Odm. na dan (mg)	Koncentracija bisoprolola v plazmi bolnikov (ng/ml)				Odm. na dan (mg)	Koncentracija bisoprolola v plazmi bolnikov (ng/ml)			
		0h	2h	3h	4h		0h	2h	3h	4h
K01	10	17,33	74,83	70,00	64,96	10	17,80	60,67	52,51	51,47
K02	10	13,75	70,87	67,77	61,76					NP
K03	10	28,22	64,55	63,33	62,68	10	13,37	41,33	41,26	36,28
K04	5	18,15	37,1	28,46	32,84	5	< LLOQ	10,62	11,91	10,88
K05	5	17,78	55,94	46,49	45,98	5	13,96	40,06	34,75	33,11
K06	10	9,746	47,48	46,64	49,47	10	45,19	63,36	65,89	68,89
K07	10 + 10	57,4	102,3	95,69	78,53	10 + 10	36,29	67,31	61,10	55,06
K08	10 + 5	45,15	99,85	101,2	90,56					NP
K09	2,5 + 2,5	19,3	31,25	27,35	27,54	2,5 + 2,5	12,25	18,62	18,56	16,76
K10	5	15,54	35,37	37,79	37,16	10 *	< LLOQ	37,22	37,89	34,06
K11	1,25	1,839	6,484	5,649	6,187	1,25	2,01	5,80	5,30	5,20
K12	10	38,29	113,1	107,6	81,48	10	28,95	60,62	67,66	65,62
K13	2,5	#	9,072	8,313	7,858	2,5 **	6,80	#	5,98	5,53
K14	10 + 10	89,53	136,9	129	119,3	10 + 10	59,14	78,16	#	76,63
K16	10	18,16	54,56	48,54	46,94	5	8,74	26,14	25,26	24,26
K17	5 + 5 a	35,69	52,11	47,75	44,24	5 + 5 a	45,80	61,90	54,82	53,80
K18	2,5	8,67	12,98	12,98	12,60					NP
K20	10	15,25	47,18	45,50	40,64	10	12,44	29,13	40,63	36,60
K21	5 + 5 a	48,34	52,89	57,50	55,42	5 + 5 a	46,53	#	55,15	54,78
K22	5	5,77	20,19	#	21,54	5	11,57	31,72	34,12	33,62
K23	10 a	< LLOQ	37,11	37,67	34,46	10 a	11,11	47,75	46,61	38,60
K24	10	8,94	31,50	32,69	30,11	10	8,57	32,02	29,23	26,41
K25	5	22,36	38,78	36,10	37,72	5	27,24	39,55	39,15	37,01

a Pacient jemlje Cordarone ®

\* Pacient jemlje zdravilo približno na dva dni, na dan obiska zdravila ni prejel

\*\* Pacient jemlje zdravilo zvečer in na dan obiska zdravila ni prejel

NP = pacienta ni bilo na drugem obisku

# Ni podatka o koncentraciji

< LLOQ = Izmerjene koncentracije so nižje od spodnje meje kvantifikacije (LLOQ)

**Preglednica XV:** Izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola (ng/ml) tik pred peroralno aplikacijo (ob času 0 h) ter 2 h, 3 h in 4 h po aplikaciji zdravila (nadaljevanje)

Št. bolnika	1. obisk					2. obisk				
	Odm. na dan (mg)	Koncentracija bisoprolola v plazmi bolnikov (ng/ml)				Odm. na dan (mg)	Koncentracija bisoprolola v plazmi bolnikov (ng/ml)			
		0h	2h	3h	4h		0h	2h	3h	4h
K26	5 + 5	18,32	30,43	28,14	27,37	5 + 5	18,18	28,79	27,22	24,54
K27	5 + 5	18,84	36,19	29,83	#				NP	
K28	5	15,84	32,77	30,13	29,40	5	15,19	31,43	29,45	26,22
K29	5 + 2,5	17,84	33,90	30,89	31,44				NP	
K31	10	21,10	61,24	60,85	55,18				NP	
K32	7,5 + 2,5	24,00	#	50,51	44,20	7,5 + 5	33,32	52,36	54,19	51,54
K33	2,5	6,08	14,33	13,20	12,61	2,5 + 2,5	15,30	19,40	18,97	18,21
K34	2,5	6,00	13,95	12,71	12,66	2,5	7,09	12,86	11,61	9,77
K35	5	28,22	37,75 *	45,86	#	10	23,21	35,32	64,30	61,58
K36	5 + 5 a	26,02	39,96	36,70	35,07	5+5	19,68	32,56	29,89	27,27
K37	2,5	3,74	11,22	9,83	9,50	10	13,42	42,03	39,97	36,46
K38	5 + 5	25,28	38,65	37,35	35,88	5 + 5	18,80	31,76	26,85	27,38
K39	10	51,81	#	84,06	81,21	10	59,36	88,51	81,91	80,51
K40	2,5 + 2,5	10,21	15,56	15,01	14,20	5 + 2,5	22,31	21,06	18,88	17,99
K41	2,5 + 2,5	6,42	11,23	10,21	10,74	2,5 + 2,5	10,40	15,22	13,04	12,46
K42	5	13,25	32,89	34,82	31,21	10	37,14	89,79	83,62	79,06
K43	1,25	5,14	12,62	13,03	12,75	1,25 + 1,25	19,48	25,05	23,15	22,27
K44	5	9,87	25,56	24,42	23,82	5	8,06	23,87	21,64	21,32
K45	2,5	1,07	7,41	6,38	6,12	5	2,27	13,97	12,85	11,11
K46	10	24,12	47,88	47,95	48,64	10	49,54	#	56,09	51,89
K47	2,5	2,76	9,64	10,28	8,89	2,5	2,17	8,97	8,41	7,67
K48	10	24,79	51,11	#	45,94				NP	
K49	5	8,76	24,40	23,08	20,73	5	10,51	25,78	25,31	24,20

a Pacient jemlje Cordarone ®

\* Pacient jemlje zdravilo približno na dva dni, na dan obiska zdravila ni prejel

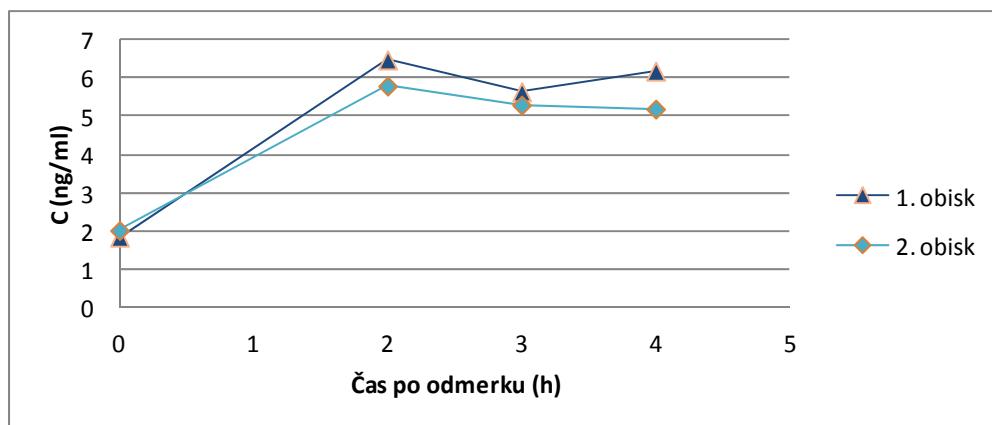
\*\* Pacient jemlje zdravilo zvečer in na dan obiska zdravila ni prejel

NP = pacienta ni bilo na drugem obisku

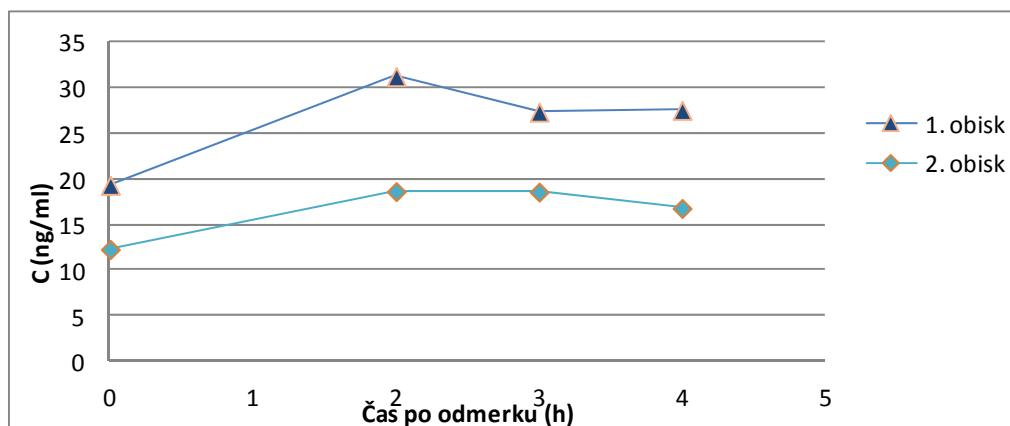
# Ni podatka o koncentraciji

< LLOQ = Izmerjene koncentracije so nižje od spodnje meje kvantifikacije (LLOQ)

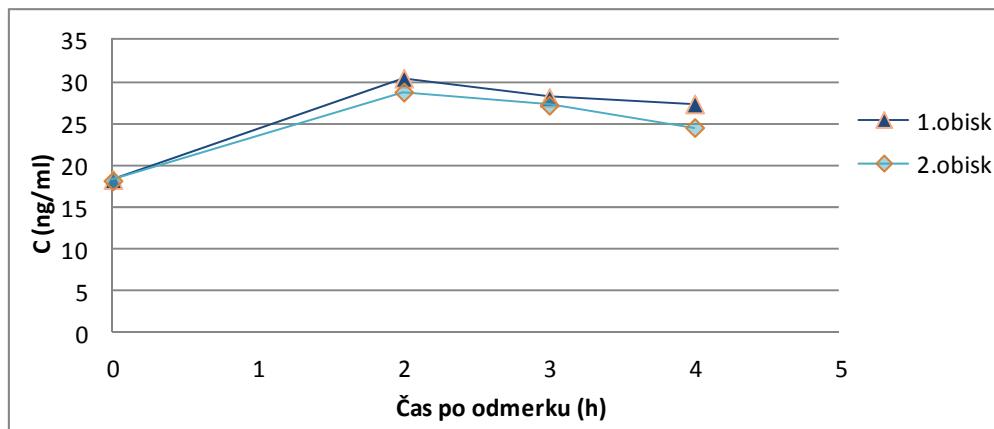
Izračunane koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih bolnikov smo predstavili grafično. Za vsakega bolnika smo v graf vnesli plazemske koncentracije bisoprolola z obema obiskov. Nekaj plazemskih koncentracijskih profilov je prikazanih na spodnjih slikah: profil bolnika, ki jemlje enkrat na dan tableto z 1,25 mg bisoprololijevega fumarata, po aplikaciji 1,25 mg zdravila (Slika 7); profil bolnika, ki jemlje dvakrat na dan tableto z 2,5 mg bisoprololijevega fumarata, po aplikaciji 2,5 mg zdravila (Slika 8); profil bolnika, ki jemlje enkrat na dan tableto s 5 mg bisoprololijevega fumarata, po aplikaciji zdravila (Slika 9); profil bolnika, ki jemlje enkrat na dan tableto z 10 mg bisoprololijevega fumarata, po aplikaciji zdravila (Slika 10); profil bolnika, ki jemlje dvakrat na dan tableto z 10 mg bisoprololijevega fumarata, po aplikaciji 10 mg zdravila (Slika 11).



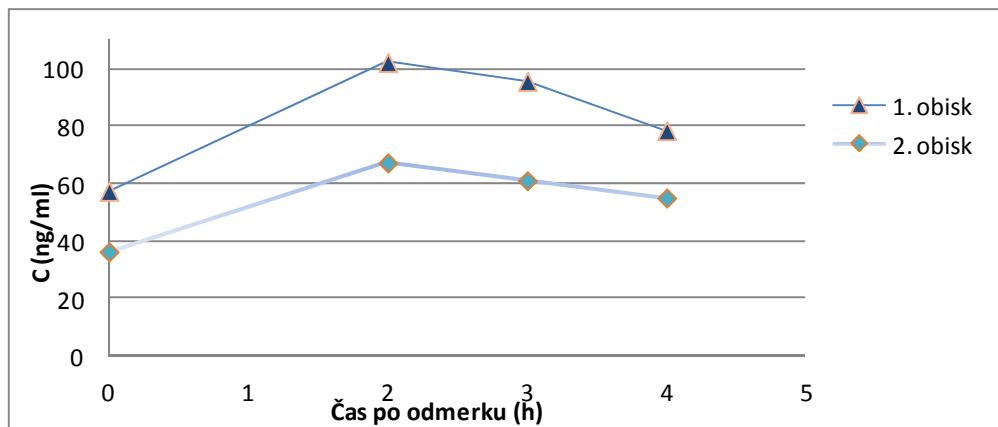
**Slika 7:** Koncentracijski profil bisoprolola pri bolniku K11 na 1. in 2. obisku po aplikaciji 1,25 mg zdravila (bolnik jemlje enkrat na dan tableto z 1,25 mg bisoprololijevega fumarata)



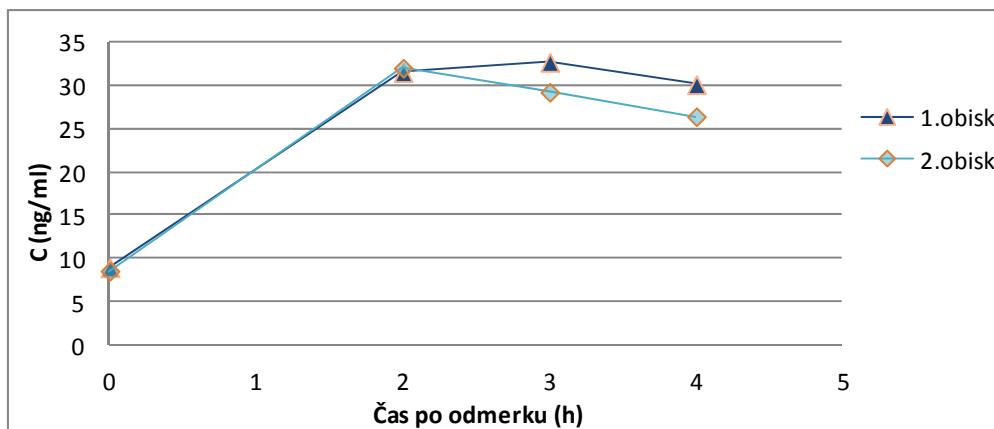
**Slika 8:** Koncentracijski profil bisoprolola pri bolniku K09 na 1. in 2. obisku po aplikaciji 2,5 mg zdravila (bolnik dvakrat na dan jemlje tableto z 2,5 mg bisoprololijevega fumarata)



**Slika 9:** Koncentracijski profil bisoprolola pri bolniku K26 na 1. in 2. obisku po aplikaciji 5 mg zdravila (bolnik jemlje enkrat na dan tableto s 5 mg bisoprololijevega fumarata)



**Slika 10:** Koncentracijski profil bisoprolola pri bolniku K07 na 1. in 2. obisku po aplikaciji 10 mg zdravila (bolnik dvakrat na dan jemlje tableto z 10 mg bisoprololijevega fumarata)



**Slika 11:** Koncentracijski profil bisoprolola pri bolniku K24 na 1. in 2. obisku po aplikaciji 10 mg zdravila (bolnik jemlje enkrat na dan tableto z 10 mg bisoprololijevega fumarata)

### 4.3 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

Za osnovni farmakokinetični model smo izbrali enoprostorski model, definiran z naslednjimi farmakokinetičnimi parametri: konstanto absorpcije bisoprolola ( $k_a$ ), očistkom bisoprolola (Cl/F) in volumnom porazdelitve bisoprolola (V/F). Osnovne enačbe modela so zapisane z *Enačbami 10–12*, kjer je  $\eta$  slučajna razlika ocene parametra pri posamezniku od tipične vrednosti parametra v populaciji ( $\theta$ ).

$$k_a = \theta_{k_a} \times e^{\eta_{k_a}} \quad (10)$$

$$\frac{Cl}{F} = \theta_{Cl/F} \times e^{\eta_{Cl/F}} \quad (11)$$

$$\frac{V}{F} = \theta_{V/F} \times e^{\eta_{V/F}} \quad (12)$$

V razvoju našega modela smo ocenjevali vpliv treh vrst spremenljivk, in sicer interindividualno variabilnost, variabilnost med obiski in rezidualno intraindividualno variabilnost. Za opis interindividualne variabilnosti ter variabilnosti med obiski osnovnih parametrov modela (konstante absorpcije, očistka in volumna porazdelitve) smo izbrali eksponentni model napake. Rezidualne intraindividualne napake pa smo opisali s kombinacijo aditivnega ( $\varepsilon_a$ ) ali proporcionalnega ( $\varepsilon_p$ ) modela napake.

Predpostavili smo, da so osnovni obravnavani parametri v populaciji porazdeljeni logaritemsko normalno, zato smo morali izračun ocene variance ( $\omega^2$ ), ki nam ga je podal program NONMEM, pretvoriti v koeficient variacije (CV). Za izračun variabilnosti, podan s koeficientom variacije v procentih, smo uporabili *Enačbo 13*.

$$CV(\%) = \sqrt{e^{\omega^2} - 1} \times 100\% \quad (13)$$

Osnovne parametre modela z relativno standardno napako ocene ter ocene obravnavanih variabilnosti (CV %) z relativno standardno napako so podane v Preglednici XVI.

Ocenili smo tudi koeficient korelacije med očistkom in volumnom porazdelitve (*Enačba 9*, poglavje 3.3.2.4), ki je znašal 0,57 (Pregledica XVI).

**Preglednica XVI:** Ocene vrednosti osnovnih PopFK parametrov (konstante absorpcije,

očistka in volumna distribucije) in slučajnih napak modela izračunanih z metodo NONMEM

Parameter	Ocena PopFK parametra (RSE %)	Interindividualna variabilnost CV % (RSE %)	Variabilnost med obiski CV % (RSE %)
$k_a$ [ $h^{-1}$ ]	2,18 (19,3)	69,3 (75,9)	64,4 (71,7)
Cl/F [l/h]	10,2 (5,47)	32,9 (29,1)	24,8 (34,8)
V/F [l]	230 (4,56)	17,3 (23,0)	13,6 (46,9)
Cl/F - V/F korelacija	0,568 (45,1)		
Rezidualna variabilnost			
aditivna [ng/ml]	0,358 (46,9)		
proporcionalna (%)	4,87 (13,2)		

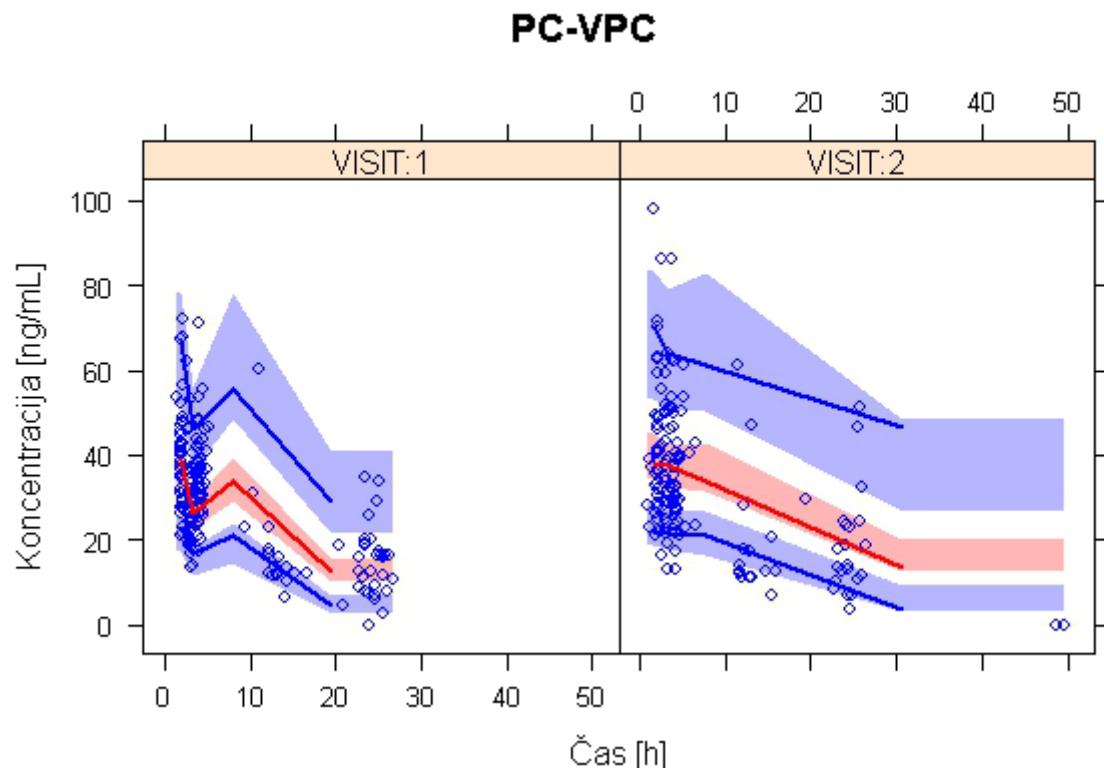
Podane so ocene parametrov (v oklepaju RSE %) in variabilnosti s koeficientom variacije v % (v oklepaju RSE %)

$k_a$  = konstanta absorbcije podana v  $h^{-1}$ ; Cl/F = očistek bisoprolola v l/h; V/F = volumen porazdelitve bisoprolola v litrih; RSE = relativna standardna napaka v procentih

Za grafično predstavitev podatkov smo uporabili diagrame, ki prikazujejo izmerjene koncentracije v odvisnosti od populacijskih napovedi in individualnih napovedi (Slike 14–15, priloga). Za vsakega bolnika pa smo za oba obiska oblikovali tudi graf, kjer smo predstavili izmerjene koncentracije bisoprolola ter koncentracije bisoprolola, napovedane z razvitim modelom (Slike 16–21, priloga).

#### Grafično vrednotenje napovedi (prediction-corrected Visual predictive check)

Za simulacijo končnega populacijskega farmakokinetičnega modela smo uporabili vrednosti parametrov, ki smo jih dobili v končnem modelu. Na vseh podatkih smo naredili 1000 ponovitev, simulirane in izmerjene vrednosti smo predstavili na grafu PC-VPC (Slika 12). Za meritve, opravljene ob določenem času, smo izračunali mediano napovedanih aktivnosti (50. centil) in 95-odstotni napovedni interval (5. in 95. centil).



**Slika 12:** Primerjava simuliranih koncentracij z izmerjenimi koncentracijami za prvi obisk (levo, Visit 1) in drugi obisk (desno, Visit 2) po odmerku bisoprololijvega fumarata 1,25 mg–10 mg.

Graf PC-VPC vključuje podatke iz nove simulirane podatkovne baze, ki smo jih predpostavili glede na parametre modela, ter obstoječe izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola. Točke predstavljajo izmerjene koncentracije bisoprolola v vzorcih bolnikov. Rdeča črta predstavlja mediano predvidenih koncentracij z modelom, modri črti pa 5. in 95. centil. Z osenčenim področjem pa je prikazan neparametričen 95-odstotni interval zaupanja okrog predvidenih vrednosti.

## 5 RAZPRAVA

Bisoprolol je selektivni zaviralec  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev in se zelo pogosto uporablja za zdravljenje kroničnega srčnega popuščanja. Z LC-MS/MS metodo smo določili plazemske koncentracije bisoprolola v vzorcih, ki smo jim odvzeli bolnikom s kroničnim srčnim popuščanjem tik po aplikaciji ter ob času 2, 3 in 4 ure po aplikaciji. S pomočjo izračunanih koncentracij smo določili osnovne farmakokinetične parametre ter variabilnosti le-teh. Populacijski farmakokinetični model smo postavili z namenom, da bi služil kot pomoč pri določanju primerenega režima odmerjanja bisoprolola pri bolnikih s srčnim popuščanjem.

V plazemskih vzorcih bolnikov smo določili koncentracijo bisoprolola z LC-MS/MS metodo. Bisoprolol smo ekstrahirali s pomočjo trdnih nosilcev (izolacija in čiščenje) mešanega reverzno faznega in ionsko-izmenjevalnem tipa *Strata X-C®*. Za LC-MS/MS metodo smo v okviru delne validacije določali točnost, ponovljivost, linearnost, LLOQ in selektivnost.

Umeritvene krivulje ustrezajo kriterijem FDA smernic (44). Točnost vseh povratno izračunanih kalibracijskih standardov je bila med 92,3–108,3 %, torej znotraj intervala  $100 \pm 15\%$ . Determinacijski koeficient, ki opisuje linearnost, je bil pri vseh umeritvenih premicah  $\geq 0,990$ , in sicer med 0,991 in 1,00. Spodnja meja določljivosti (LLOQ) je znašala 0,85 ng/ml. To je bila najmanjša koncentracija kalibratorja, ki je ustrezala kriteriju za točnost  $100 \pm 20\%$ . Odziv kalibratorja pri LLOQ je bil večji od 5-kratne višine odziva slepe plazme, točnost pa je znašala 99,2–101,5 %, z zelo dobro ponovljivostjo s koeficientom variacije 0,9 %.

Povprečen naklon umeritvene premice oblike:  $odziv (Biso/IS) = a \times konc.(Biso) + b$  je znašal 0,052 in se je razlikoval od povprečnega naklona kalibracijskih krivulj v diplomski nalogi Anke Peganc (41), kjer je znašal 0,013. Z razmerjem odzivov produktnega iona za kvantifikacijo (*quantifier*) in produktnega iona za potrjevanje identitete analita (*qualifier*) smo potrjevali selektivnost metode. Razmerje odzivov je bilo konstantno s koeficientom variacije, manjšim od 2,9 %. Razmerje je bilo 0,32, kar je višje v primerjavi z vrednostjo v diplomski nalogi Anke Peganc (41), kjer je znašalo 0,22. Razlike v naklonu ter razmerju odzivov niso presenetljive, saj je za masni spektrometer značilno, da se odzivi s časom lahko spreminja. Glede na rezultate naklona umeritvene krivulje ter razmerja

*quantifier/qualifier*, ki imata v našem primeru višje vrednosti, pa lahko trdimo, da se je občutljivost spektrometra povečala.

Točnost in ponovljivost metode smo potrdili z merjenjem koncentracij kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij ( $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$ ). Določili smo znotrajtedensko in medtedensko točnost in ponovljivost. Točnost je bila visoka, in sicer je bila znotraj tedna v območju med 97,7 in 99,3 %, med tedni pa v območju 98,1–99,5 %. Ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije (CV). Znotraj tedna je znašala največ 6,0 %, med tedni pa največ 6,3 %. Določene vrednosti ponovljivosti so primerljive s ponovljivostjo, ki jo je določila Anka Peganc v svoji diplomske nalogi, saj je ponovljivost znotraj dneva znašala največ 5,8 %, medtem ko je med dnevi znašala največ 10,6 % (41). Potrdili smo, da je bila uporabljena metoda v območju linearnosti 0,85–127 ng/ml točna (97,7–99,5 %) in ponovljiva s koeficientom variacije 1,3–6,4 %.

Za kontrolo točnosti smo skupaj z vzorci bolnikov izvedli 39 meritev QC vzorcev treh različnih koncentracij. Kriterij veljavnosti meritve je bil, da vsaj dve tretjini QC vzorcev, analiziranih med sekvenco realnih vzorcev, odstopa od kontrolne vrednosti za manj kot 15 %. Ena tretjina kontrolnih vzorcev lahko odstopa za več kot 15 %, vendar ti ne smejo biti enake koncentracije (52). V Preglednici XIV smo predstavili točnost vseh kontrolnih vzorcev tekom analize, ki je znašala 86–108 %. Točnost vseh QC vzorcev je torej bila znotraj okvira  $100 \pm 15\%$ , CV izračunanih koncentracij QC vzorcev pa ni bil višji od 15 %.

V študijo smo vključili 46 bolnikov z znanim kroničnim SP, ki so vsaj 3 dni prejemali konstanten odmerek bisoprolola. Plazemske vzorce bolnikov smo pridobili na dveh rednih pregledih bolnikov, ki sta bila časovno oddaljena vsaj 6 mesecev. Podatke bolnikov ter plazemske vzorce smo pridobili v bolnišnici Golnik, kjer je potekala prospektivna observacijska študija z naslovom »Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksiji na farmakokinetične parametere bisoprolola in ramiprilja ter na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem«. Izmed 46 bolnikov je bilo 26 moških in 20 žensk v povprečju starih 71 let (v območju 54–87 let), s povprečno telesno težo 82 kg (v območju 44–116 kg), s povprečnim iztisnim deležem levega prekata (LVEF) 48 % (v območju 25–77 %) in očistkom kreatinina (po enačbi MDRD) 64 ml/min (v območju 9–142 ml/min). Štirje pacienti so prejemali tudi *Cordarone®* (amiodaron), štirje pa so imeli diagnosticirano kaheksijo. Izmed 46 bolnikov, vključenih v raziskavo, so trije zavrnili

sodelovanje v raziskavi na Obisku 2, dve bolnici sta umrli, o enem bolniku in eni bolnici in pa nimamo podatka.

Povprečen dnevni odmerek bisoprololjevega fumarata, ki so ga prejemali bolniki na prvem obisku, je bil 7,55 mg, na drugem obisku pa 7,85 mg. Najbolj pogost dnevni odmerek je bil na obeh obiskih 10 mg bisoprololjevega fumarata v enkratnem dnevnem odmerku.

Povprečne vrednosti kreatininskega očistka so bile na prvem obisku 65,3 ml/min, na drugem obisku pa 60,9 ml/min. Pri večini bolnikov so bile vrednosti nad  $40 \text{ ml/min} \times 1,73 \text{ m}^2$ , pri petih bolnikih na prvem obisku in osmih bolnikih na drugem obisku pa so bile vrednosti nižje. Kreatininski očistek je bil pri enem bolniku na obeh obiskih celo manjši od 10 ml/min, kar kaže na hudo ledvično insuficienco in lahko močno vpliva na očistek bisoprolola. V raziskavi, omenjeni v uvodu (37), vidimo, da se lahko skupni očistek bisoprolola pri bolnikih, ki imajo vrednost kreatininskega očistka  $< 20 \text{ ml/min}$ , zmanjša tudi do 50 % v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Vključitev teh bolnikov bi zato lahko zmotno vplivala na parametre PopFK modela.

Podatke, ki smo jih pridobili na obeh obiskih, ter izmerjene koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih bolnikov, smo vnesli v bazo, ki je primerna za nadaljnjo analizo s programom NONMEM. Za populacijsko farmakokinetično analizo podatkov smo uporabili metodo nelinearnih modelov mešanih učinkov. Za osnovni strukturni model smo izbrali enoprostorski model, definiran s konstanto absorpcije, očistkom in volumnom porazdelitve bisoprolola. V razvoju našega modela smo ocenjevali vpliv treh vrst variabilnosti: interindividualno variabilnost oz. razlike med osebami, variabilnost med obiski in rezidualno intraindividualno variabilnost. Za opis interindividualne variabilnosti ter variabilnosti med obiski konstante absorpcije, očistka in volumna porazdelitve bisoprolola smo izbrali eksponentni model napake. Rezidualne intraindividualne napake pa smo opisali s kombiniranim tipom aditivne in proporcionale napake. Eksponentni model za interindividualno variabilnost ter kombinirani tip napake za opis rezidualne variabilnosti je ob širokem razponu podatkov najprimernejši, saj pri nizkih in visokih vrednostih napovedi dobro odraža odstopanje napovedi od meritev. V osnovnem PopFK modelu smo določili srednjo vrednost konstante absorpcije bisoprolola  $2,2 \text{ h}^{-1}$  z RSE 19 %, očistka bisoprolola 10,2 l/h z RSE 5,5 % in volumen porazdelitve 230 l z RSE 4,6 %. Ocena vpliva interindividualnih variabilnosti na konstanto absorpcije znaša 69 % z RSE 76 %, na očistek

bisoprolola 33 % z RSE 29 % ter na volumen porazdelitve 17 % z RSE 23 %. Ocena vpliva variabilnosti med obiski na konstanto absorpcije pa znaša 64 % z RSE 71 %, na očistek bisoprolola 25 % z RSE 35 % ter na volumen porazdelitve 14 % z RSE 47 %. Natančne ocene parametrov so zelo pomembne za določitev ustrezega modela. Stopnja natančnosti se sicer razlikuje glede na velikost baze, a za večino farmakokinetičnih podatkovnih baz velja, da naj bi bila stopnja natančnosti za osnovne parametre v okviru 30 odstotkov, za naključne učinke pa 50 odstotkov (48). Ocena osnovnih parametrov očistka in volumna porazdelitve ter njunih interindividualnih variabilnosti ustreza kriterijem natančnosti. Tudi ocena konstante absorpcije je znotraj 30 % odstopanja, medtem ko ocene variabilnosti omenjenega parametra precej slabo opisujejo lastnost populacije. Konstanto absorpcije z obstoječimi podatki zelo težko ocenimo, saj imamo na voljo zelo malo plazemskih koncentracij bisoprolola v začetnem delu krivulje koncentracijskega profila. Iz navedenega razloga težko natančno določimo tako parameter kot njegovo variabilnost. Izračunali smo tudi koeficient korelacije med očistkom in volumnom porazdelitve, ki je znašal 0,57 z RSE 45 %. Iz rezultata lahko sklepamo, da težko opišemo odvisnost med očistkom in volumnom porazdelitve bisoprolola za našo populacijo.

Glede na to, da je šlo za iste bolnike na obeh obiskih so nas nekoliko presenetile vrednosti variabilnosti med obiski za osnovne parametre. Za konstanto absorpcije visoke ocene variabilnosti sicer niso nepričakovane, saj imamo premalo podatkov o koncentracijah v absorpcijski fazi, za očistek in volumen porazdelitve pa težko ocenimo vzroke. Med prvim in drugim obiskom se je v povprečju zmanjšala vrednost kreatininskega očistka (izračunan po MDRD enačbi se spremeni iz 64 na 60 ml/min, izračunan po metodi Cockroft-Gault pa iz 60 na 50 ml/min), kar bi lahko vplivalo na razlike v farmakokinetiki bisoprolola. Ostale lastnosti bolnikov se niso bistveno spremenile. Ne smemo pa zanemariti dejstva, da so ocene osnovnih parametrov pravzaprav razmerja Cl/F in V/F. Obseg absorpcije pa se lahko spremeni od obiska do obiska. Vsekakor pa ne smemo tudi izključiti vpliva kompliance jemanja zdravila. Bolniki so prišli v bolnišnico samo na dan obeh obiskov, medtem ko so ostale odmerke zdravila jemali sami.

Osnovna parametra, očistek in volumen porazdelitve smo primerjali z obstoječimi podatki iz raziskav. Oceno očistka v populaciji lahko primerjamo z obstoječo PopFK raziskavo, kjer je bil povprečen očistek bisoprolola 11,4 l/h (39). V tej raziskavi so sicer prišli do zaključka, da je očistek odvisen le od dnevnega odmerka. Povprečen dnevni odmerek (3,7

mg) je bil v raziskavi več kot za polovico manjši od povprečja pri naših pacientih (7,6 mg na prvem in 7,9 mg na drugem obisku).

Grafično smo prikazali ujemanje med izmerjenimi plazemskimi koncentracijami bisoprolola ter predvidenimi koncentracijami z modelom. Diagrama (Slika 13 in 14, priloga) predstavlja izmerjene koncentracije v odvisnosti od populacijskih napovedanih koncentracij in od individualnih napovedanih koncentracij. Želimo si, da bi se trend napovedanih podatkov (rdeča črta), kar najbolj prilegal premici enakosti  $y = x$  (črna črta). Točke na slikah bi v idealnem primeru morale ležati na premici, v realnosti pa želimo, da so okoli premice čim bolj enakomerno razporejene.

Končni model smo uporabili za simulacijo novih podatkovnih nizov in napovedovanja intervala zaupanja (običajno 95 %) ter pripravo simuliranih koncentracijskih profilov v odvisnosti od časa. Izmerjene koncentracijske profile smo predstavili na grafu VPC (Slika 12). Večina točk na grafu, ki predstavljajo izmerjene koncentracije bisoprolola, leži znotraj intervala zaupanja simuliranih vrednosti. Iz grafične predstavitve lahko sklepamo, da je razviti PopFK model ustrezen.

V okviru diplomske naloge smo uspešno potrdili ponovljivost ter natančnost LC-MS/MS metode ter izračunali plazemske koncentracije bisoprolola pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem. V programu NONMEM smo določili osnovne farmakokinetične parametre in njihovo variabilnost ter postavili končni PopFK model. Razvit model dobro opisuje farmakokinetiko bisoprolola pri bolnikih s kroničnim SP in lahko služi za pomoč pri odmerjanju bisoprolola pri omenjenih bolnikih.

Model bi lahko nadgradili z vključevanjem sočasnih spremenljivk ter ocenili njihov vpliv na osnovne parametre, s čimer bi izboljšali napovedovanje individualnih koncentracij bolnikov. Razvit model, izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola ter pridobljene lastnosti bolnikov vključenih študijo so zbrane ter so na voljo za nadaljnji razvoj modela.

Za bolnike vključene v diplomsko naložo so na voljo podatki o demografskih lastnostih (spol, teža, velikost, starost), podatki o telesni sestavi (delež maščob, puste telesne mase, vode), telesni površini, očistku kreatinina in jetnih testov. Pri optimizaciji osnovnega modela predlagamo, da je smiselno za vse zgoraj naštete sočasne spremenljivke preveriti ali značilno vplivajo na osnovne parametre modela.

## 6 SKLEP

V diplomski nalogi smo razvili populacijski farmakokinetični model, ki dobro opisuje farmakokinetiko bisoprolola pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem.

Plazemske koncentracije bisoprolola v plazemskih vzorcih bolnikov smo izmerili s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Plazemske vzorce smo predhodno ekstrahirali na trdnem nosilcu mešanega tipa. Rezultate analizne metode smo delno validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. Metoda je bila linearna v območju 0,85–127 ng/ml, točna (97,7–99,5 %) in ponovljiva s koeficientom variacije 1,3–6,3 %.

V programu NONMEM smo za končni model izbrali enoprostorski model, definiran s konstanto absorpcije, očistkom in volumnom porazdelitve bisoprolola. Interindividualna variabilnost in variabilnost med obiski je bila opisana z eksponentnim modelom, rezidualna variabilnost pa s kombinacijo aditivne in proporcionalne napake. Srednje vrednosti osnovnih parametrov v končnem modelu so: konstanta absorpcije  $2,2 \text{ h}^{-1}$ , očistek 10,2 l/h in volumen porazdelitve bisoprolola 230 l. Ocena vpliva interindividualnih variabilnosti ter variabilnosti med obiski na konstanto absorpcije znaša 69 % in 64 %, na očistek 33 % in 25 % ter na volumen porazdelitve 17 % in 14 %.

Razvit populacijski farmakokinetični model za bisoprolol pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem lahko služi za pomoč pri odmerjanju bisoprolola. Izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola ter pridobljene lastnosti bolnikov, ki so bili vključeni v študijo, pa so na voljo za nadaljnji razvoj modela s postopnim vključevanjem posameznih sočasnih spremenljivk.



## 7 VIRI

- 1.Adams KF, Zannad F, et. al.; Clinical definition and epidemiology of advanced heart failure. Am Heart J 1998; 135: 204–15.
- 2.McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al.; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 2012; 33(14): 1787–847.
- 3.Vrtovec B, Poglajen G; Sodobni načini zdravljenja srčnega popuščanja. Zdrav Vestn 2011; 80: 302–315.
- 4.Trobec K; Konično srčno popuščanje - vidik farmacevta. Zdrav Vestn 2013; 64: 11–17.
- 5.McMurray J, et al.; Practical recommendations for the use of ACE inhibitors, beta-blockers, aldosterone antagonists and angiotensin receptor blockers in heart failure: Putting guidelines into practice. The European Journal of Heart Failure 2005; 7(5): 710–721
- 6.McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al.; ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: Addenda. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 2012;33(14):1787–847.
- 7.Jošt M: Posebnosti pri zavircih adrenergičnih receptorjev β. Zdrav Vestn 2013; 64: 64–65
- 8.Dobre D, van Veldhuisen DJ, van Veldhuisen DJ, Goulder AM, Krum H, Willenheimer R; Clinical Effects of Initial 6 Months Monotherapy with Bisoprolol versus Enalapril in the Treatment of Patients with Mild to Moderate Chronic Heart Failure. Data from the CIBIS III Trial. Cardiovascular Drugs and Therapy 2008; 22(5): 399–405
- 9.Lek: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Byol.  
[http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/032255\\_smpc.pdf](http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/032255_smpc.pdf), oktober 2009
- 10.Merck: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Concor.  
[http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/011444\\_smpc.pdf](http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/011444_smpc.pdf), junij 2011.
- 11.Cao J, Hamilton-Craig I, Sun J, Howes L, Edwards J, Jayasinghe R; Bisoprolol vs. Carvedilol: A Comparison of Clinical Efficacy and Tolerability in Congestive Cardiac Failure. Australasian Medical Journal 2009; 1(5): 1–19
- 12.Obreza A, et al.; Farmacevtski terminološki slovar. Založba ZRC, Ljubljana, 2011: 19, 20, 30, 145.
- 13.Merck: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Concor COR.  
[http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/024236a\\_smpc.pdf](http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/024236a_smpc.pdf), junij 2011
- 14.Leizorovicz A, et al.; Bisoprolol for the treatment of chronic heart failure: a meta-analysis on individual data of two placebo-controlled studies - CIBIS and CIBIS II.

- Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *The American heart journal* 2002; 143(2): 301–307.
- 15.Talbert L. R, et. al; Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Beta Blockers in Heart Failure. *Heart Failure Reviews* 2004; 9: 131–137
- 16.Lechat P, et al.; A randomized trial of beta-blockade in heart-failure – The cardiac-insufficiency bisoprolol study (CIBIS). *Circulation* 1994; 90(4): 1765–1773
- 17.López-Sendón J, et. al.; Expert consensus document on β-adrenergic receptor blockers. The Task Force on Beta-Blockers of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 2004; 25(15): 1341–1362
- 18.DiNicolantonio J. J, Lavie J. C, Fares H, Menezes A. R, O'Keefe J. H; Meta-Analysis of Carvedilol Versus Beta 1 Selective Beta-Blockers (Atenolol, Bisoprolol, Metoprolol, and Nebivolol). *The American Journal of Cardiology* 2013; 111(5): 765–769
- 19.Aygul N, Ozdemir K, Duzenli M. A, Aygul M. U; The Comparative Effects of Long-Term Carvedilol versus Bisoprolol Therapy on QT Dispersion in Patients with Chronic Heart Failure. *Cardiology* 2009;112(3):168–173
- 20.Dargie H J, Lechat P, et. al.; The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 9–13.
- 21.Leopold G, Ungethcm W, Pabst J, Simane Z, Buhring K. U, Weimann H; Pharmacodynamic profile of bisoprolol, a new β<sub>1</sub>-selective adrenoceptor antagonist. *Br. J. clin. Pharmac.* 1986. 22: 293–300.
- 22.Al-Hesayen A, Azevedo E R, Floras J S, Hollingshead S, Lopaschuk G D, Parker J D; Selective versus nonselective h-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure: differential effects on myocardial energy substrate utilization. *The European Journal of Heart Failure* 2005; 7(4):618–623
- 23.Baxter A J, Spensley A, Hildreth A, Karimova G, et. al.; β blockers in older persons with heart failure: Tolerability and impact on quality of life. *Heart* 2002; 88 (6):611–614
- 24.Stankovic I, et al.; Sinus rhythm versus atrial fibrillation in elderly patients with chronic heart failure – Insight from the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study in Elderly. *Int J Cardiol* 2012; 161(3): 160–165.
- 25.Stoschitzky K, Stoschitzky G, Klein W, Muller, F, et al.; Different Effects of Exercise on Plasma Concentrations of Nebivolol, Bisoprolol and Carvedilol. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2004; 18(2): 135–138
- 26.Lechat P, Escolano S, Golmard JL, Lardoux HS, Witchitz, Henneman JA , Maisch B, Hetzel M, Jaillon P, Boissel J-P, Mallet A; Prognostic Value of Bisoprolol-Induced Hemodynamic Effects in Heart Failure During the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation* 1997; 96(7): 2197–205  
<http://circ.ahajournals.org/content/96/7/2197.long>
- 27.Dubach P, Myers J, Bonetti P, et al.; Effects of bisoprolol fumarate on left ventricular size, function, and exercise capacity in patients with heart failure: analysis with magnetic resonance myocardial tagging. *Am Heart J* 2002; 143 (4): 676–83
- 28.Guo YF, An Y, et. al.; Is heart rate reduction more important than target dose in chronic heart failure therapy with a beta-blocker? *J Geriatr Cardiol* 2011; 8: 260–262.

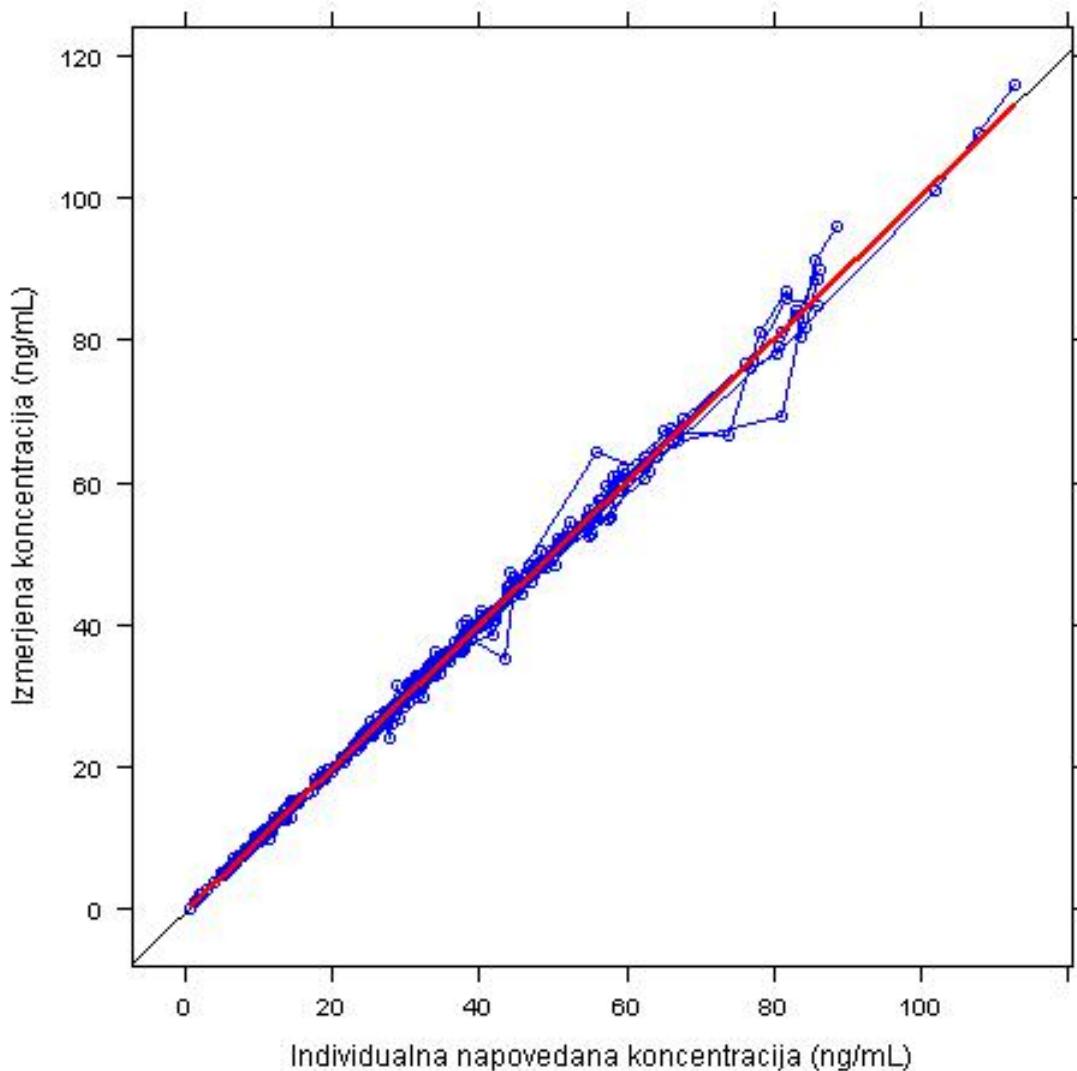
29. Lechat P, Hulot J-S, Escolano S, et al.; Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II Trial. *Circulation* 2001; 103 (10): 1428–33
30. McGavin JK, Keating GM; Bisoprolol. A Review of its Use in Chronic Heart Failure. *Drugs* 2002; 62 (18): 2677–2696
31. Merck; Bisoprolol, Cardioselective Beta-Blocker. <http://www.bisoprolol-slides.info/homesite/teaser.pdf>, avgust 2013.
32. Lawson G, Cocks E, Tanna S.; Bisoprolol, ramipril and simvastatin determination in dried blood spot samples using LC-HRMS for assessing medication adherence. *J Pharm Biomed Anal.* 2013; 81–82: 99–107
33. Liu MY, Zhang D, Sun YT, Wang YW, Liu ZY, Gu JK; Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of bisoprolol in human plasma. *Biomedical chromatographx* 2007; 21(5): 508–513
34. Tjandrawinata RR, Setiawati E, Yunaidi DA, Santoso ID, Setiawati A, Susanto LW; Bioequivalence study of two formulations of bisoprolol fumarate film-coated tablets in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy* 2012; 6:311–316.
35. Jovanovic D, Cusic S, Rancic D, Srnic D, Perkovic-Vukcevic N; A pharmacokinetic comparison of generic tablets containing bisoprolol with the innovator formulation in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2006; 46(10): 1217–1222.
36. Horikiri Y, Suzuki T, Mizobe M.; Pharmacokinetics and Metabolism of Bisoprolol Enantiomers in Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998; 87(3): 298–294
37. Kirch W, Rose I, Demers HG, Leopold G, Pabst J, Ohnhaus EE.; Pharmacokinetics of bisoprolol during repeated oral administration to healthy volunteers and patients with kidney or liver disease. *Clinical Pharmacokinetics* 1987; 13(2):110–117
38. Lewis R, Maclean D, Ioannides C, et al.; A comparison of bisoprolol and atenolol in the treatment of mild to moderate hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 1988 Jul; 26 (1): 53–9
39. Nikolic VN, Jevtovic-Stoimenov T, Velickovic-Radovanović R, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, Pesic S, Zecevic DR, Milovanovic JR, Jankovic SM; Population pharmacokinetics of bisoprolol in patients with chronic heart failure. *European journal of clinical Pharmacology* 2013;69(4):859–65
40. Trobec K; Protokol raziskave: Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetične parametere bisoprolola in ramiprila ter na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem, Golnik 2011
41. Peganc A; Analiza bisoprolola v plazmi s tekočinsko kromatografijo: razvoj in validacija metode. [Ljubljana]: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2013.
42. Phenomenex, Inc.; Efficient extraction of basic drugs from biological matrices using a polymeric cationic mixed-mode sorbent Strata<sup>TM</sup> X-C. <http://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/4179f1e5-36f8-4e52-824b-b3fa9d2cb5d6.pdf>, februar 2012.

43. Broad Institute; MRM (Multiple Reaction Monitoring). <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/mrm-multiple-reaction-monitoring>, marec 2012.
44. U.S. Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>, december 2011.
45. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M; A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14(4): 375–388.
46. Ette EI, Williams PJ. Population Pharmacokinetics I; Background, Concepts, and Models. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2004 Oct 1;38(10):1702–6.
47. Ette EI, Williams PJ. Population Pharmacokinetics II; Estimation Methods. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2004 Nov 1;38(11):1907–15.
48. Mould D R, Upton R N; Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2 Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013; 2(4): e38.

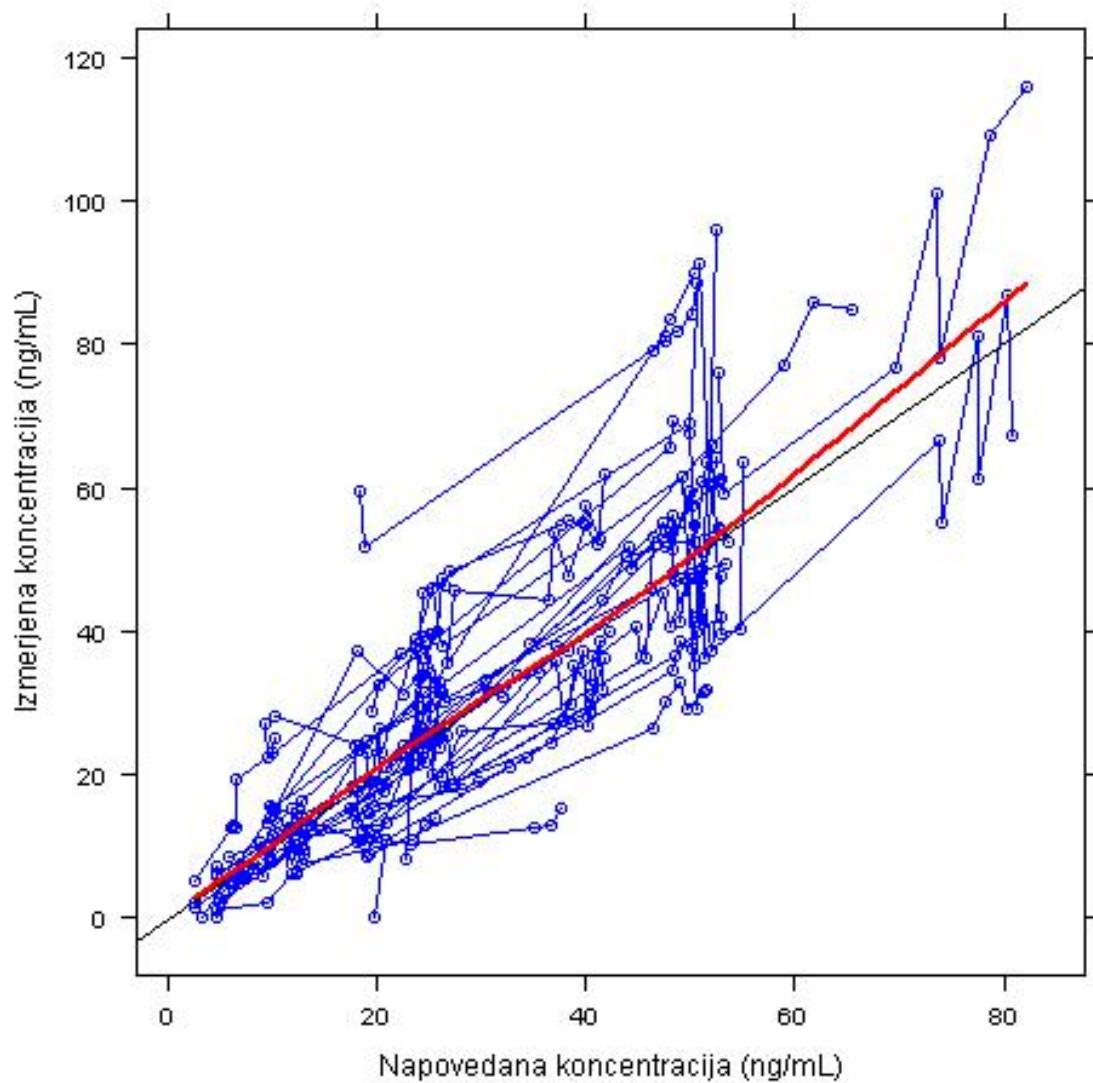
49.

## 8. PRILOGA: GRAFIČNA PREDSTAVITEV REZULTATOV KONČNEGA MODELA

Slike 13 in 14 prikazujeta izmerjene koncentracije v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij (zgoraj) in populacijskih napovedanih koncentracij (spodaj).

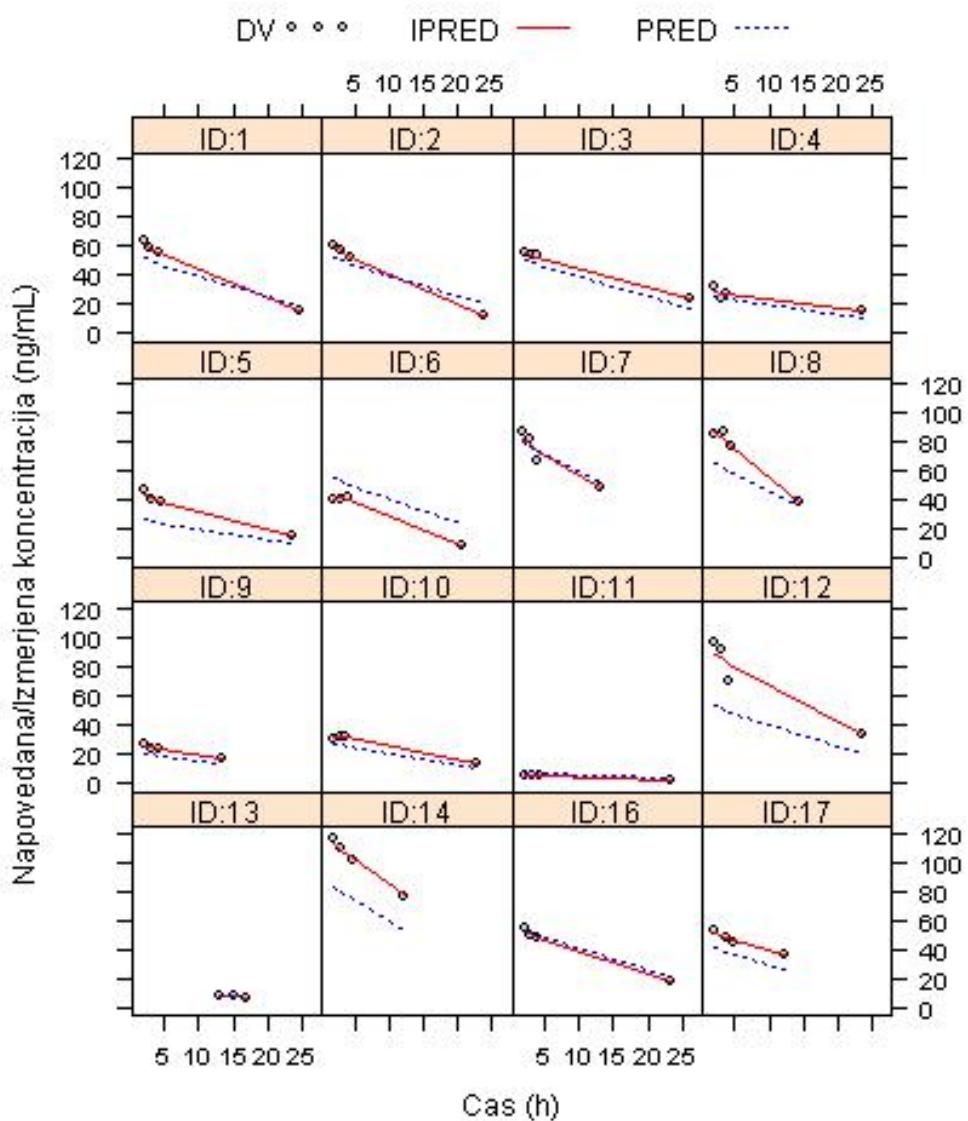


**Slika 13:** Izmerjene koncentracije (točke) v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij. Rdeča črta predstavlja trend podatkov napovedanih vrednosti, črna črta pa premico  $y = x$ .

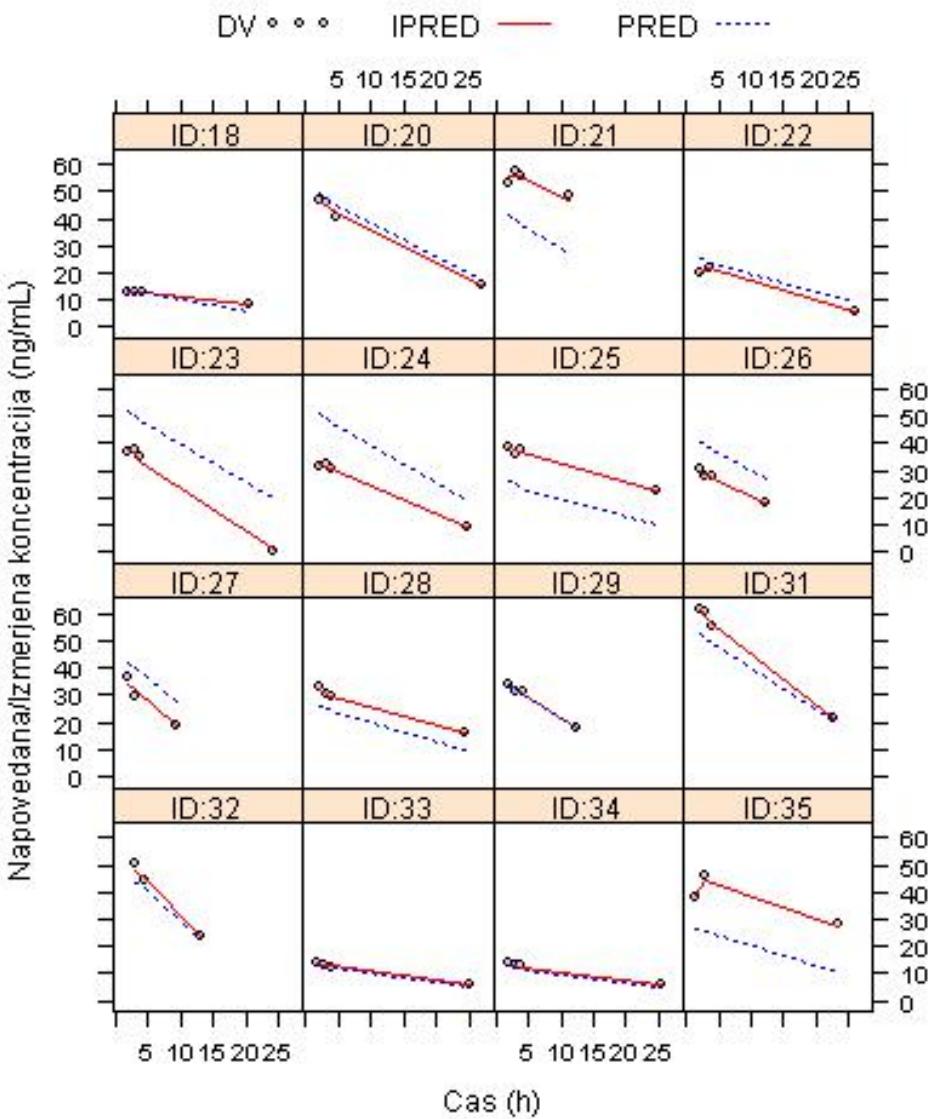


**Slika 14:** Izmerjene koncentracije v odvisnosti populacijskih napovedanih koncentracij. Rdeča črta predstavlja trend podatkov napovedanih vrednosti, črna črta pa premico  $y = x$ .

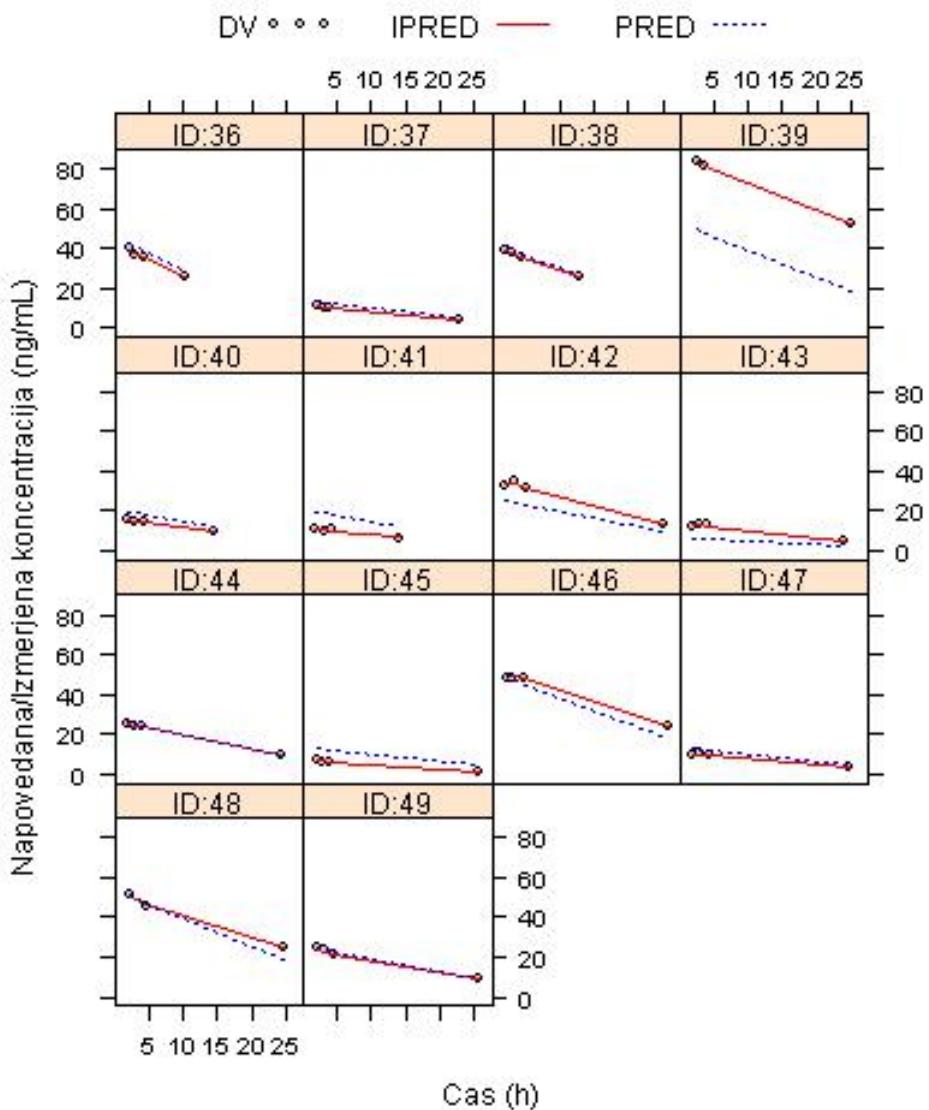
Slike od 15 do 20 prikazujejo individualne napovedane in populacijsko napovedane koncentracije za posamezne bolnike.



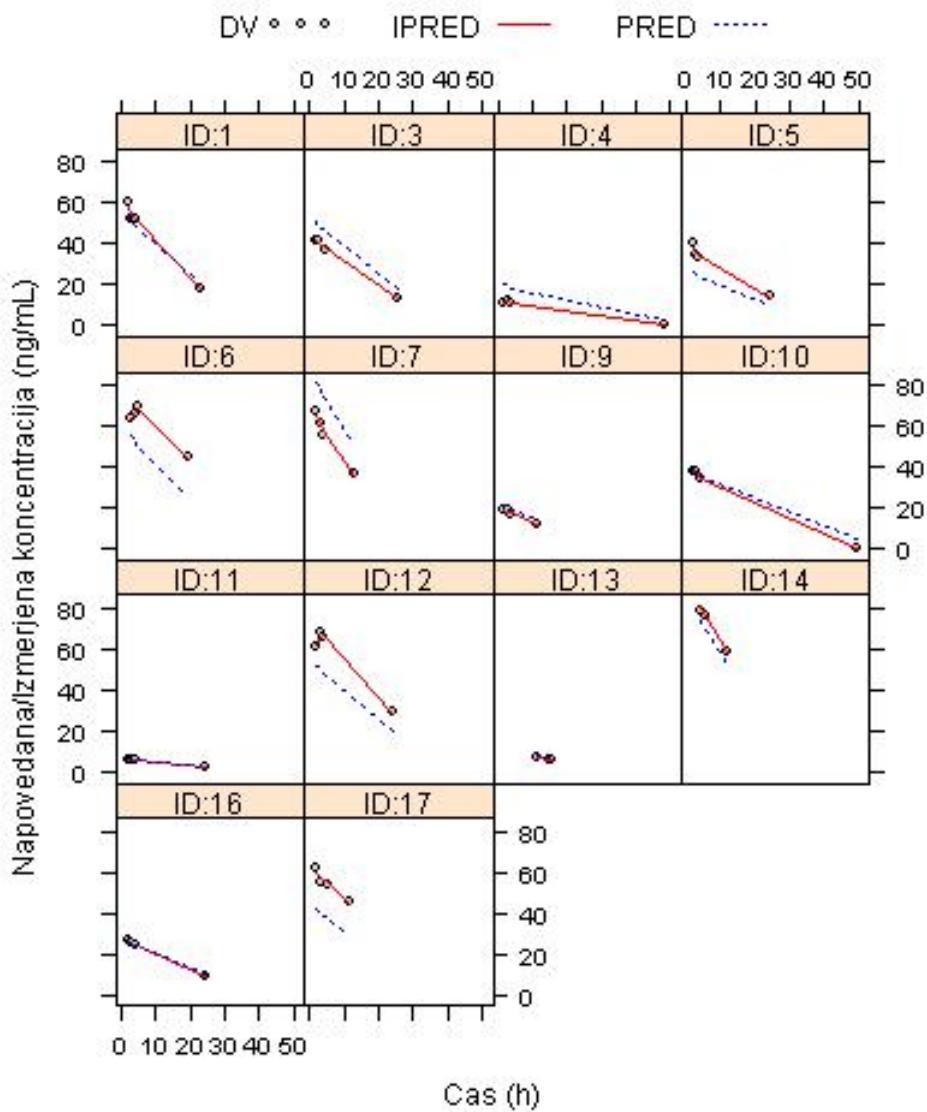
**Slika 15:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na prvem obisku za bolnike K01–K17. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.



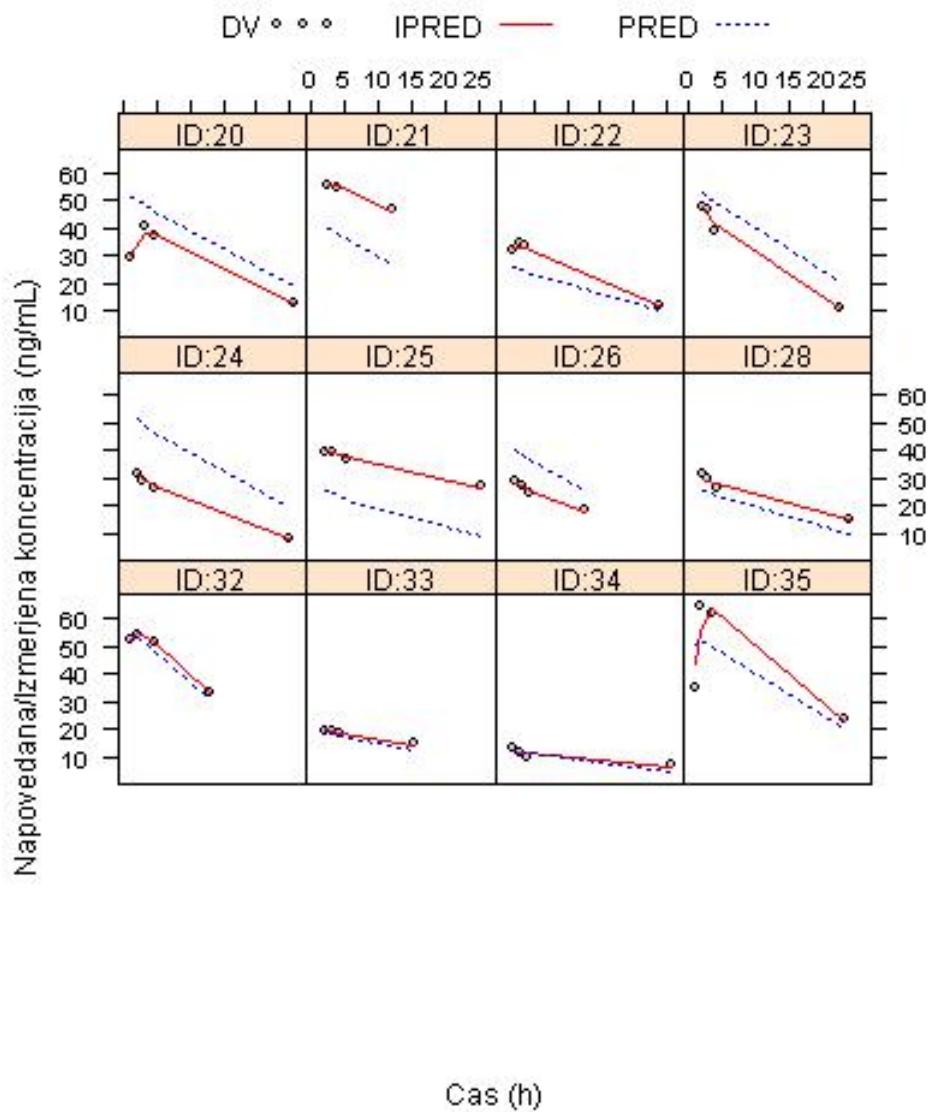
**Slika 16:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na prvem obisku za bolnike K18–K35. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.



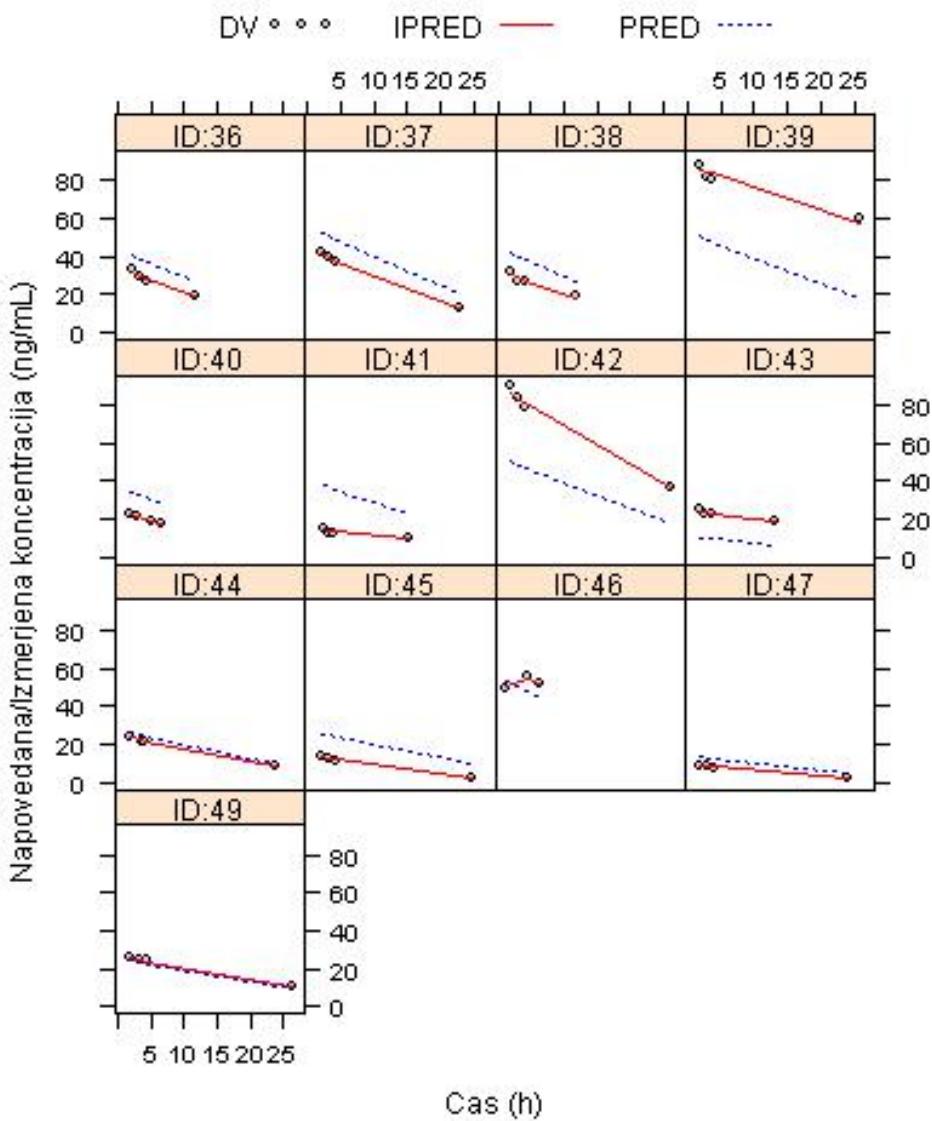
**Slika 17:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na prvem obisku za bolnike K36–K49. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.



**Slika 18:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na drugem obisku za bolnike K01–K17. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.



**Slika 19:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na drugem obisku za bolnike K18–K35. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.



**Slika 20:** Individualno napovedane (rdeča črta, IPRED) in populacijsko napovedane koncentracije (črna črtkana črta, PRED) na drugem obisku za bolnike K36–K49. Točke (DV) predstavljajo izmerjene koncentracije.