UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA MLAKAR

VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV V GENIH *OPRM1*, *ABCB1* IN *COMT* NA VARNOST IN UČINKOVITOST TERAPIJE S FENTANILOM PRI OTROCIH

IMPACT OF SELECTED POLYMORPHISMS IN *OPRM1*, *ABCB1* AND *COMT* GENES ON SAFETY AND EFFICACY OF THERAPY WITH FENTANYL IN CHILDREN

Magistrska naloga

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek in somentorstvom doc. dr. Mojce Kerec-Kos. Vse analize genotipizacije so bile opravljene na katedri za klinično biokemijo.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek in somentorici doc. dr. Mojci Kerec-Kos za nudenje strokovnih usmeritev tekom izdelave in pisanja magistrske naloge.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za vse nasvete pri statistični obdelavi podatkov.

Največja zahvala gre staršem, bratu Roku in fantu Tadeju za izkazano podporo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem izdelala magistrsko nalogo samostojno pod vodstvom mentorice doc. dr. Barbare Ostanek in somentorice doc. dr. Mojce Kerec-Kos.

Špela Mlakar

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc
Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

Ljubljana, 2014

KAZALO

POVZETEK 5
ABSTRACT 6
SEZNAM OKRAJŠAV 7
SEZNAMI SLIK IN PREGLEDNIC 8
1 UVOD 10
1.1 AKUTNI BRONHIOLITIS PRI OTROCIH 10
1.1.1 Etiologija 10
1.1.2 Patofiziologija 10
1.1.3 Merila za sprejem v bolnišnico in dejavniki tveganja 10
1.1.4 Diagnostika 11
1.1.5 Zdravljenje 12
1.1.5.1 Podporno zdravljenje 13
1.1.5.2 Farmakološko zdravljenje 14
1.2 SEDACIJA IN ANALGEZIJA 15
1.2.1 Fentanil 15
1.2.1.1 Farmakokinetika fentanila 16
1.2.1.2 Neželeni učinki fentanila 17
1.2.1.3 Farmakogenetika fentanila 17
1.2.1.3.1 Polimorfizem Val158Met v genu *COMT* 17
1.2.1.3.2 Polimorfizem C3435T v genu *ABCB1* 18
1.2.1.3.3 Polimorfizem A118G v genu *OPRM1* 19
2 NAMEN DELA 20
3 MATERIALI IN METODE 21
3.1 PREISKOVANCI 21
3.2 PROTOKOL RAZISKAVE 21
3.3 UPORABLJENI REAGENTI IN APARATURE 22
3.4 IZOLACIJA DNA 24
3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOTE IZOLIRANE DNA 27

3.6 PREVERJANJE INTEGRITETE DNA 28
3.7 PCR V REALNEM ČASU 29
3.7.1 Alelna diskriminacija s hidrolizirajočimi sondami 30
3.7.1.1 Genotipizacija izbranih polimorfizmov 30
3.8 STATISTIČNA ANALIZA 34
4 REZULTATI IN RAZPRAVA 36
4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA 36
4.2 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA 38
4.3 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI 39
4.4 STATISTIČNA ANALIZA 43
4.4.1 Pogostnost proučevanih polimorfizmov 43
4.4.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje 44
4.4.3 Vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov na terapijo s fentanilom 45
4.4.3.1 Vpliv dejavnikov na stopnjo sedacije 48
4.4.3.2 Vpliv dejavnikov na stopnjo neugodja 52
4.4.3.3 Vpliv dejavnikov na pojav odtegnitvenih simptomov 55
5 SKLEPI 58
6 LITERATURA 59
7 PRILOGE 66

POVZETEK

Akutni bronhiolitis je sezonska virusna okužba, za katero zboli več kot tretjina otrok do drugega leta starosti. Pri večini otrok bolezen poteka ugodno, 2 – 3 % obolelih pa potrebuje hospitalizacijo. Pri 1 – 2 % hospitaliziranih otrok je potrebno umetno predihavanje. Slednje je za otroka precej boleča in neprijetna izkušnja. Da bi olajšali potek zdravljenja in zagotovili optimalno zdravljenje, otroci prejemajo analgetik in sedativ. Najbolj pogosto je to kombinacija fentanila in midazolama. Fentanil je opioidni analgetik, ki ima tako analgetični kot tudi sedativni učinek.

Izbrali smo tri polimorfizme, *ABCB1* G3435A, *COMT* Val158Met in *OPRM1* A118G, za katere so v številnih študijah na odraslih že dokazali, da vplivajo na terapijo z opioidi in katerih pogostnost za Centralno Evropo je relativno velika. Pri otrocih teh študij nismo zasledili, zato smo se odločili proučiti vpliv izbranih polimorfizmov na potek terapije s fentanilom pri otrocih. V ta namen smo izolirali DNA iz 49 vzorcev krvi otrok z akutnim bronhiolitisom in s pomočjo genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami določili genotip izbranim polimorfizmom.

Po določitvi frekvence genotipov smo ugotovili, da so le-te v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem in s frekvencami določenimi za Centralno Evropo. Z multivariatno linerano regresijo in multiplo logistično regresijo smo nato ugotavljali vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov na stopnjo sedacije, stopnjo neugodja in pojav odtegnitvenih simptomov. Analiza je pokazala statistično značilen vpliv heterozigota *COMT* Val158Met na višje vrednosti BIS v 1. časovni točki (60 minut po začetku infuzije fentanila) in statistično značilen vpliv heterozigota in mutiranega homozigota *COMT* Val158Met na nižjo stopnjo neugodja, merjeno s pomočjo lestvice Comfort-B, v 2. časovni točki (tretji dan infuzije fentanila). Od okoljskih dejavnikov na višje vrednosti BIS in nižje vrednosti Comfort-B statistično značilno vpliva kumulativni odmerek v 1. časovni točki, medtem ko telesna masa statistično značilno vpliva na višje vrednosti Comfort-B v vseh časovnih točkah.

Ker smo kljub več letnemu zbiranju bolnikov imeli relativno majhen vzorec in ker le-ta vpliva na moč preizkusa, menimo, da bi bile potrebne nadaljnje študije na večjem vzorcu, ki bi z večjo gotovostjo dokazale ali genotipi izbranih polimorfizmov vplivajo na učinkovitost in varnost terapije s fentanilom.

Ključne besede: akutni bronhiolitis, umetno predihavanje, otroci, farmakogenetika, fentanil

ABSTRACT

Acute bronchiolitis is a seasonal viral infection that affects more than a third of children younger than two years. In most cases disease is self limiting but 2 – 3 % of children with acute bronchiolitis require hospitalisation and out of them 1 – 2 % require mechanical ventilation which is very painful and unpleasant. To facilitate treatment children recieve analgesic and sedative drugs, usually a combination of fentanyl and midazolam. Fentanyl is an opioid analgesic which also provides a sedative effect.

In our work we examined the impact of *COMT* Val158Met, *ABCB1* C3435T and *OPRM1* A118G polymorphisms on efficacy and safety of fentanyl therapy in children. These polymorphisms are quite frequent in Central Europe and numerous studies in adults have proven that they affect opioid therapy. However, there were no such studies in populations of children younger than two years. DNA was isolated from 49 blood samples from children with acute bronchiolitis and genotyping with hydrolysis probes was performed.

We determined the frequency of genotypes and found that they are in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium and in accordance with the frequencies determined for Central Europe. The impact of genetic and demographic variables on sedation level, comfort and the occurrence of withdrawal symptoms was evaluated by using multivariate linear regression and multiple logistic regression. A statistically significant impact on lower sedation level is determined for heterozygous of *COMT* Val158Met in first time point (60 minutes after the beginning of fentanyl intravenous infusion). Heterozygous and homozygous mutant of *COMT* Val158Met have statistically significant impact on better comfort evaluated by Comfort-B scale in second time point (third day of fentanyl intravenous infusion). Cumulative dose has statistically significant impact on lower sedation level and lower Comfort-B score in the first time point and weight has statistically significant impact on higher Comfort-B score in all time points.

Despite the fact our study lasted several years sample size was relatively small. Because sample size affects power of test we suggest further studies on larger sample size.

Key words: acute bronchiolitis, mechanical ventilation, children, pharmacogenetics, fentanyl

SEZNAM OKRAJŠAV

ABC prenašalec	prenašalec z ATP-vezavno-kaseto
ABCB1	prenašalec z ATP-vezavno-kaseto, poddružina B (MDR/TAP), član 1
BIS	bispektralni indeks
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CPAP	predihavanje s pozitivnim tlakom ob koncu izdiha
CŽS	centralno-živčni sistem
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EEG	elektroencefalogram
hMPV	humani metapnevmovirus
hRV	humani rinovirus
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
MB-COMT	membransko vezana katehol-O-metiltransferaza
OPRM1	opioidni receptor mi 1
PBS	izotonični fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo
P-gp	P-glikoprotein
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RSV	respiratorni sincicijski virus
S-COMT	topna katehol-O-metiltransferaza
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov
SpO_2	nasičenost krvi s kisikom
TAE pufer	Tris-acetat-EDTA pufer

SEZNAMI SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Strukturna formula fentanila 15
Slika 2: Princip delovanja hidrolizirajočih sond 30
Slika 3: Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA. 38
Slika 4: Primer rezultata genotipizacije za mutiranega homozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T. 39
Slika 5: Primer rezultata genotipizacije nemutiranega homozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T. 39
Slika 6: Primer rezultata genotipizacije heterozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T. 40
Slika 7: Primer rezultata alelne diskriminacije za polimorfizem *ABCB1* C3435T (n = 23). 40
Slika 8: Rezultat genotipizacije nemutiran homozigota *OPRM1* A118G po prvi genotipizaciji in po povečanju števila ciklov 41
Slika 9: Rezultat genotipizacije nemutiranega homozigota *OPRM1* A118G po prvi genotipizaciji in po uporabi drugega PCR Master Mix-a in spremembi temperaturnega programa 42
Slika 10: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na stopnjo sedacije v 1., 2. in 3. časovni točki. 51
Slika 11: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na stopnjo neugodja v 1., 2. in 3. časovni točki. 54
Slika 12: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na pojav odtegnitvenih simptomov v 1., 2. in 3. časovni točki. 57

Preglednica I: Diagnostične preiskave pri sumu na akutni bronhiolitis 11
Preglednica II: Možnosti zdravljenja akutnega bronhiolitisa 12
Preglednica III: Preračun volumnov reagentov potrebnih za izolacijo DNA pri nadomeščanju plazme z ultra čisto vodo in PBS. 25
Preglednica IV: Volumni reagentov potrebni za izolacijo DNA pri ugotavljanju vpliva razmerij ultra čiste vode in krvnih celic na koncentracijo in čistost izolirane DNA. 25
Preglednica V: Volumni reagentov potrebnih za izolacijo DNA iz 1300 µL vzorca. 26
Preglednica VI: Sestavine za pripravo 2 % agaroznega gela. 28
Preglednica VII: Sestava reagentov za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami 31
Preglednica VIII: Deli odsekov DNA s polimorfnim mestom, ki smo jih pomnoževali. 32
Preglednica IX: Določitev alelov posameznega polimorfizma na osnovi porasta fluorescence barvila VIC® oziroma FAM™. 32
Preglednica X: Volumska sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo. 32

Preglednica XI: Temperaturni program za qPCR za polimorfizma *ABCB1* C3435T in *COMT* Val158Met. 33
Preglednica XII: Temperaturni program za qPCR za polimorfizem *OPRM1* A118G. 34
Preglednica XIII: Povprečne vrednosti izmerjene koncentracije in čistosti izolirane DNA pri nadomeščanju plazme z ultra čisto vodo in PBS (n = 2). 36
Preglednica XIV: Povprečne vrednosti izmerjenih koncentracij in čistosti izolirane DNA z različnim deležem ultra čiste vode (n = 8). 37
Preglednica XV: Povprečne vrednosti čistosti in koncentracije izolirane DNA iz vzorcev bolnikov. 37
Preglednica XVI: Genotipi proučevanih polimorfizmov v izbrani populaciji otrok. 42
Preglednica XVII: Število in delež preiskovancev za posamezne genotipe v proučevani populaciji in literaturne vrednosti 43
Preglednica XVIII: Hardy-Weinbergovo ravnotežje. 45
Preglednica XIX: Prikaz podatkov o starosti, telesni masi in dobi hospitalizacije vključenih bolnikov in celokupnem odmerku fentanila glede na spol bolnikov (Ž = 16, M = 32). 46
Preglednica XX: Rezultati analize vpliva spola na povprečno starost, telesno maso, celokupni odmerek in dobo hospitalizacije. 47
Preglednica XXI: Prikaz rezultatov ugotavljanja razlik v izbranih parametrih med genotipi proučevanih polimorfizmov z ANOVA oz. Kruskall-Wallis testom 48
Preglednica XXII: Prikaz multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva izbranih dejavnikov na vrednost BIS 49
Preglednica XXIII: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva kumulativnega odmerka in gena *COMT* na vrednosti BIS 50
Preglednica XXIV: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva posameznih dejavnikov na Comfort-B. 52
Preglednica XXV: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva kumulativnega odmerka in gena *COMT* na vrednosti BIS. 53
Preglednica XXVI: Prikaz rezultatov multiple logistične regresije pri proučevanju vpliva posameznih dejavnikov na vrednosti Finnegan. 56

1 UVOD

1.1 AKUTNI BRONHIOLITIS PRI OTROCIH

Po evropskih smernicah je akutni bronhiolitis sezonska virusna bolezen s povišano telesno temperaturo, z izcedkom iz nosu in s suhim, dražečim kašljem. Pri avskultaciji pljuč so slišni drobni respiratorni poki in visokofrekvenčni ekspiratorni piski (1). Približno 12 % otrok zboli za akutnim bronhiolitisom do prvega leta in več kot tretjina otrok do drugega leta starosti (2). Pri večini otrok traja bolezen 3 – 7 dni in sprejem v bolnišnico ni potreben. 2 – 3 % obolelih otrok pa je sprejetih v bolnišnico in 1 - 2 % teh potrebuje mehansko ventilacijo (1, 3, 4, 5).

1.1.1 Etiologija

Akutni bronhiolitis je pri majhnih otrocih v 50 – 85 % posledica okužbe z respiratornim sincicijskim virusom (RSV) (2, 3). Vsakoletna epidemija okužb z RSV se na severni polobli običajno pojavi med novembrom in aprilom. Sezoni z manj virulentnimi oblikami navadno sledi takšna, v kateri razsajajo bolj patogeni sevi omenjenega virusa (1, 6). Redkeje je akutni bronhiolitis posledica okužbe z virusom influence A in B, parainfluence tipa 1 in 3, adenovirusom, koronavirusom, humanim bokavirusom, humanim rinovirusom (hRV) ali s humanim metapnevmovirusom (hMPV) (1, 2, 4, 6, 7). Možna je tudi okužba z več virusi hkrati, najpogosteje z RSV in hMPV oziroma z RSV in hRV, vendar pa heterogena okužba ne pomeni tudi hujše oblike bolezni (2, 8).

1.1.2 Patofiziologija

Vnetje se začne na veznicah in v nosni sluznici. Respiratorna sluznica bronhiolov nekrotizira znotraj 24 ur po okužbi. Peribronhialno pride do mononuklearne infiltracije, kar rezultira v submukozni in adventicijski edem. V bronhiolih tako nastanejo čepi, ki povzročijo zaporo dihalnih poti. K nehomogeni predihanosti pljuč prispevata še izrazita dinamična zapora malih dihalnih poti med izdihom in odsotnost učinkovitega kolateralnega predihavanja. Zaradi motenj predihavanja se poglobi ventilacijsko/perfuzijsko nesorazmerje in s tem tudi hipoksija (2, 3, 7).

1.1.3 Merila za sprejem v bolnišnico in dejavniki tveganja

Večina otrok ima blago obliko akutnega bronhiolitisa. Ti se lahko varno zdravijo doma, medtem ko je za tiste s hujšo obliko potrebno bolnišnično zdravljenje. Indikacije za sprejem v bolnišnico so: nezadostno hranjenje, letargija, pojavljanje dihalnih premorov, frekvenca dihanja več kot 70 vdihov na minuto, prisotnost znakov dihalne stiske, saturacija kisika na sobnem zraku manj

kot 94 %, cianoza, starost nižja od šestih mesecev in negotovost glede opredelitve diagnoze. Hujši obliki akutnega bronhiolitisa, ki zahteva hospitalizacijo, so izpostavljeni predvsem otroci, ki imajo enega ali več dejavnikov tveganja: prezgodnje rojstvo z nizko porodno težo, nizka gestacijska starost, nizka starost, kongenitalna srčna bolezen, imunska oslabljenost, bronhopulmonalna displazija (1, 2, 4, 9, 10). Na hujšo obliko bolezni vplivajo tudi dejavniki, kot so: odsotnost dojenja, nižja raven vitamina D ob rojstvu, moški spol, izpostavljenost kajenju, večje število sorojencev in nižji socialno-ekonomski status (1, 9, 11, 12, 13, 16). Pri otrocih s prisotnimi dejavniki tveganja za težji potek bolezni, oziroma otrocih iz okolja s slabimi socialno-ekonomskimi razmerami in težko dostopnostjo do bolnišnice je prag za sprejem v bolnišnico nižji (1, 3, 14, 15).

1.1.4 Diagnostika

Diagnozo akutnega bronhiolitisa se postavi na osnovi klinične slike. Otroci, ki imajo simptome in znake akutnega bronhiolitisa, ne potrebujejo diagnostičnih preiskav. Zaradi možnosti pojava redkih in neobičajnih kliničnih stanj, ki se lahko kažejo s podobnimi ali enakimi simptomi in znaki, pa je smiselno opraviti preiskave pri bolnikih s težjimi simptomi in znaki bolezni (2). Diagnostične preiskave pri sumu na akutni bronhiolitis prikazuje Preglednica I.

Preglednica I: Diagnostične preiskave pri sumu na akutni bronhiolitis (2).

Diagnostične preiskave
pulzna oksimetrija
plinska analiza krvi
rentgensko slikanje prsnih organov
virološko in bakteriološko testiranje
druge laboratorijske preiskave

Pri vseh hospitaliziranih bolnikih je potrebno narediti pulzno oksimetrijo, s katero izmerimo nasičenost hemoglobina v arterijski krvi (1, 18). Plinska analiza krvi ni indicirana pri akutnem bronhiolitisu, ima pa pomembnejšo vlogo pri otrocih, ki imajo izrazito dihalno stisko z možno hkratno dehidracijo, saj je lahko naraščajoča vrednost delnega tlaka ogljikovega dioksida pomemben kazalnik pri odločanju za uvedbo mehanskega predihavanja (1). Prav tako pri blagi obliki bolezni ni indicarano rentgensko slikanje prsnih organov, smiselno je le pri bolnikih s težko dihalno stisko in pri bolnikih, pri katerih bolezen poteka netipično, oziroma kjer je

prisotna negotovost glede opredelitve diagnoze (1, 2, 18). Po evropskih smernicah tudi virološko in bakteriološko testiranje ter laboratorijske preiskave niso nujne v primeru bolezni s tipičnim potekom. Virološko diagnosticiranje RSV pride v poštev pri hospitaliziranih otrocih z namenom kohortne osamitve teh bolnikov (1, 18). Sicer pa je virološko testiranje vseh obolelih stroškovno neučinkovito, saj ne poda končne diagnoze (1, 17). Hemokulturo in urinokulturo je priporočljivo odvzeti pri bolnikih s težko obliko bolezni, ki se zdravijo na intenzivnem oddelku, zaradi možnosti hkratne bakterijske okužbe. Prav tako je pri otrocih, ki so sprejeti na intenzivni oddelek, verjetna dehidracija in je zato potrebno spremljati vrednosti sečnine in elektrolitov (1).

1.1.5 Zdravljenje

Večina obolelih otrok ima blago obliko bolezni, ki jo je mogoče zdraviti doma in ob pomoči osebnega zdravnika. Pri teh in tudi pri hospitaliziranih otrocih je temeljno podporno zdravljenje, ki je osredotočeno na lajšanje glavnih težav kot so nezadostno hranjenje, dihalna stiska in začasno prenehanje dihanja. Ker še ni dokazov o učinkovitosti bronhodilatatorjev, glukokortikoidov, protivnetnih in protimikrobnih zdravil, le-ti za rutinsko zdravljenje akutnega bronhiolitisa niso priporočljivi, a še vedno ostajajo kot možnost izbire (3, 18). Možnosti zdravljenja akutnega bronhiolitisa prikazuje Preglednica II.

Preglednica II: Možnosti zdravljenja akutnega bronhiolitisa (1).

Podporno zdravljenje	Farmakološko zdravljenje
aspiracija nosu	bronhodilatatorji
nadomeščanje hrane in tekočine	glukokortikoidi
zdravljenje s kisikom	protimikrobna zdravila
zdravljenje z visokim pretokom kisika	protivirusna zdravila
predihavanje s pozitivnim tlakom ob koncu izdiha	hipertonična raztopina natrijevega klorida
mehansko predihavanje	

Pomembno se je zavedati, da se akutni bronhiolitis prenaša kapljično in so zato kot preventivni ukrepi izrednega pomena splošni higienski ukrepi, ki vključujejo redno umivanje rok in pravilno higieno kašlja.

1.1.5.1 Podporno zdravljenje

Aspiracija nosu je najbolj enostavno in učinkovito zdravljenje dihalne stiske. Prekomerno izločanje sluzi v nosu povzroči njegovo neprehodnost in ovira dihanje. Skrbno odstranjevanje izločka iz nosu zmanjša dihalno delo, izboljša oksigenacijo in posledično olajša hranjenje pri majhnih otrocih (1). Dihalna stiska, napadi kašlja in prekomerno izločanje sluzi v zgornjih dihalih vodijo do nezadostno zaužite količine hrane in tekočine. Poleg tega zvečana frekvenca dihanja poveča izgubo tekočine, kar lahko povzroči dehidracijo.

Nadomeščanje hrane in tekočine z večjim številom manjših obrokov je pomemben korak v podpornem zdravljenju, a otroka ne smemo volumsko preobremeniti. Še posebej je to pomembno v primeru okužbe z RSV, ki lahko rezultira v prekomernem izločanju antidiuretičnega hormona (1, 3).

Večina hospitaliziranih otrok potrebuje dihalno podporo, med katero uvrščamo: zdravljenje s kisikom, zdravljenje z visokim pretokom kisika, neinvazivno predihavanje s pozitivnim tlakom ob koncu izdiha in invazivno mehansko predihavanje (3). Po evropskih smernicah naj bi *kisik* začeli dodajati pri SpO_2 < 92 %, pri SpO_2 92 – 94 % pa je potrebno upoštevati še druge klinične kazalnike, fazo bolezni in socialne ter geografske dejavnike. Delež kisika v vdihanem zraku moramo prilagajati tako, da je dosežena ciljna vrednost SpO_2 95 – 97 %. Učinek zdravljenja s kisikom se kaže predvsem s skrajšano dobo hospitalizacije (3, 18, 19, 20). Kisik namreč zdravi hipoksemijo in zmanjša dihalno delo, a ne izboljša ventilacije in nima vpliva na vzrok za nastanek hipoksemije (20).

Pri *zdravljenju z visokim pretokom kisika* gre za dovajanje visokega pretoka ogrete in navlažene plinske mešanice preko dvoroge nosne kanile, ki omogoča izpiranje zraka iz nosno-žrelnega mrtvega prostora, zmanjšanje upora toku zraka v dihalih in vzpostavitev pozitivnega tlaka ob koncu izdiha. Zaradi omenjenih mehanizmov to zdravljenje pomembno zniža frekvenco dihanja, srčnega utripa in dihalno delo ter zmanjša potrebo po mehanski ventilaciji (21, 22).

Tudi *predihavanje s pozitivnim tlakom ob koncu izdiha (CPAP)* predstavlja neinvazivno dihalno podporo. CPAP ohranja prehodnost dihalnih poti, zmanjša dihalno delo, izboljša izmenjavo plinov in predihanost pljuč (3, 23). Čeprav so neinvazivne metode dihalne podpore učinkovite in lahko zmanjšajo potrebo po invazivnem mehanskem predihavanju, pa se slednjemu težko bolni otroci, predvsem tisti s prisotnimi dejavniki tveganja za hujšo obliko bolezni, ne morejo izogniti (23, 24). Pri teh bolnikih imajo neinvazivne metode prednost le v primeru, da pride do težav zaradi endotrahealne intubacije, kot je na primer subglotična stenoza (23).

Pri *mehanskem predihavanju* je bolnik intubiran z umetno cevko in priklopljen na umetno dihanje (ventilator). Mehansko predihavanje temelji na periodičnem prenosu zraka ali mešanice zraka in kisika med ventilatorjem in torakopulmonalnim sistemom bolnika. Zmanjša dihalno delo, poveča transport kisika k organom in nasičenost mešane venske krvi s kisikom (25).

1.1.5.2 Farmakološko zdravljenje

Bronhodilatatorji razširijo dihalne poti, katerih konstrikcija je posledica bronhospazma, ki ga na primer povzročijo sprožilci astme in virusi. Ker je eden izmed znakov akutnega bronhiolitisa piskanje, ki je značilno tudi za astmo, uporabljajo bronhodilatatorje tudi za zdravljenje akutnega bronhiolitisa (26). Za zdravljenje akutnega bronhiolitisa navajajo tri skupine bronhodilatatorjev: antiholinergike (ipratopijev bromid), agoniste receptorjev β_2 (salbutamol, fenoterol) in adrenalin. Čeprav še vedno ni trdnih dokazov o njihovi učinkovitosti in tudi po evropskih smernicah niso priporočeni za zdravljenje akutnega bronhiolitisa, jih zdravniki predpisujejo zaradi možnosti, da bodo posameznim bolnikom pomagali (1, 3). Metaanaliza 28 randomiziranih in kontroliranih kliničnih raziskav, ki vključujejo otroke z akutnim bronhiolitisom, mlajše od dveh let, je pokazala, da bronhodilatatorji (v raziskavo ni bil vključen adrenalin) nimajo vpliva na saturacijo hemoglobina s kisikom. Prav tako naj ne bi izboljšali bolezenskega stanja in skrajšali dobe hospitalizacije. Kratkotrajno naj bi izboljšali simpotome le bolnikom z blago obliko bolezni, ki niso hospitalizirani (26). Skjerven s sodelavci v raziskavi navaja, da inhalacije adrenalina pri nehospitaliziranih bolnikih zmanjšajo otekanje sluznice, izboljšajo simptome bolezni in zmanjšajo potrebo po hospitalizaciji. Pri hospitaliziranih bolnikih pa ni dokazane učinkovitosti (27). Tudi metaanaliza 19 randomiziranih in kontroliranih kliničnih raziskav, ki vključujejo otroke z akutnim bronhiolitisom, mlajše od dveh let, ni pokazala učinkovitosti inhalacij adrenalina za hospitalizirane bolnike (28).

Glukokortikoidi so protivnetna zdravila, ki jih pogosto predpisujejo bolnikom z akutnim bronhiolitisom (1, 3). Predvidevajo namreč, da imajo glukokortikoidi pri zdravljenju akutnega bronhiolitisa enakovredne učinke kot pri zdravljenju astme. Raziskave pa so pokazale, da so pri akutnem bronhiolitisu vključene še druge vnetne poti in aktivirani drugi mediatorji, zato imajo lahko glukokortikoidi le omejen učinek pri zdravljenju akutnega bronhiolitisa (29). Metaanaliza 17 randomiziranih in kontroliranih kliničnih raziskav, ki vključujejo otroke z akutnim bronhiolitisom, mlajše od dveh let, je pokazala, da tako sistemski kot tudi inhalacijski glukokortikoidi ne skrajšajo dobe hospitalizacije, nimajo vpliva na saturacijo hemoglobina s kisikom in ne izboljšajo simptomov bolezni (29).

Učinkovita pa naj bi bila *kombinacija bronhodilatatorja in glukokortikoida* (adrenalina in velikega odmerka deksometazona), ki naj bi zmanjšala potrebo po hospitalizaciji in skrajšala dobo hospitalizacije, a so za rutinsko uporabo potrebni dodatni dokazi (28, 29).

Akutni bronhiolitis je le v izredno redkih primerih posledica okužbe z znotrajceličnimi bakterijami, zato rutinska uporaba *protimikrobnih zdravil* za zdravljenje te bolezni ni smiselna (1). Zdravljenje z antibiotiki pride v poštev le pri težko bolnih in tistih, ki so na mehanskem predihavanju, saj so ti bolj izpostavljeni sekundarnim bakterijskim okužbam (3).

Med *protivirusnimi učinkovinami* so preučevali učinkovitost ribavirina in palivizumaba. Ribavirin ni učinkovit pri zdravljenju z RSV povzročenega akutnega bronhiolitisa (19). Plavizumab pa je humanizirano monoklonsko protitelo, ki preprečuje okužbo z RSV in se je izkazalo kot učinkovito v smislu zmanjševanja potrebe po hospitalizaciji otrok, ki imajo prisotne dejavnike tveganja za hujšo obliko bolezni (30). Tudi v Sloveniji se preventivno dajejo ustrezni odmerki plavizumaba posebej ogroženim otrokom petkrat v enomesečnih presledkih v času trajanja sezone RSV (6).

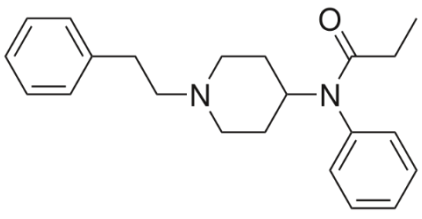
Inhalacije *hipertonične raztopine natrijevega klorida* ostajajo edina dokazano učinkovita možnost farmakološkega zdravljenja akutnega bronhiolitisa. Metaanaliza 4 randomiziranih in dvojno slepih raziskav je pokazala, da 3 % hipertonična raztopina v primerjavi z 0,9 % hipertonično raztopino skrajša čas hospitalizacije pri otrocih z blago do zmerno obliko bolezni (31). 3 % hipertonična raztopina namreč zmanjša edeme, izboljša mukociliarni očistek in posledično zmanjša obstrukcijo dihalnih poti (19).

1.2 SEDACIJA IN ANALGEZIJA

Umetno predihavanje je za otroka boleča in predvsem neprijetna izkušnja. Zato vsi otroci, ki so na mehanskem predihavanju, prejemajo še analgetik in sedativ za lajšanje bolečine, odpravljanje nemira in prestrašenosti ter za dosego optimalnega predihavanja in preprečevanje neritmičnega dihanja. Najbolj pogosto kombinacijo za analgezijo in sedacijo v pediatriji predstavljata fentanil in midazolam (32, 33).

1.2.1 Fentanil

Fentanil (IUPAC ime: *N-(1-(2-feniletil)-4-piperidinil)-N-fenilpropanamid*) je sintetični opioidni agonist, ki spada v skupino fenilpiperidinov (34). Je močan agonist μ-opioidnih receptorjev, preko katerih povzroča od odmerka odvisno



Slika 1: Strukturna formula fentanila (80).

analgezijo, dihalno depresijo, sedacijo in pri visokih odmerkih tudi nezavest (35). Visoka lipofilnost mu omogoča lažji prehod čez krvno-možgansko bariero in vezavo na centralne opioidne receptorje. To pa je vzrok, da je delovanje fentanila za kar od 50- do 100-krat učinkovitejše kot delovanje morfina (35).

1.2.1.1 Farmakokinetika fentanila

Fentanil se najbolj pogosto aplicira intravensko v obliki bolus injekcije ali infuzije (35). Možni pa sta tudi oralna (podjezična) in transdermalna aplikacija. Pri oralni aplikaciji se fentanil zelo hitro absorbira skozi sluznico v ustni votlini. Za transdermalno aplikacijo pa je značilna kontinuirana absorpcija skozi kožo (36). Njegovo delovanje sicer nastopi hitro in je kratkotrajno (37). V 80 – 89 % se veže na plazemske proteine. Vezava na albumine in lipoproteine je odvisna od vrednosti pH krvi (35). Volumen porazdelitve fentanila je 4 L/kg telesne teže. Po aplikaciji majhnih odmerkov koncentracija fentanila v plazmi in cerebrospinalni tekočini hitro pada zaradi hitre porazdelitve v mišice in maščevje (35, 38). Pri večkratnem apliciranju večjih odmerkov fentanila pride do njegove akumulacije in posledično do počasnejšega očistka ter zakasnjenega okrevanja po anesteziji (35, 39). Njegova razpolovna doba eliminacije je 1-2 uri (40). Metabolizem poteka v jetrih, z oksidativno N-dealkilacijo, z encimom CYP3A4. Z urinom se izloča manj kot 10 % nespremenjene učinkovine in 75 % odmerka v obliki metabolitov (41).

Pomembno se je zavedati, da se farmakokinetika učinkovin pri dojenčkih in otrocih razlikuje od farmakokinetike pri odraslih. Zato je potrebna previdnost pri odmerjanju učinkovine (42). Razlika v farmakokinetiki je predvsem posledica razlik v telesni sestavi ter razvitosti jetrne in ledvične funkcije (39). Delež vode pri novorojenčku znaša 75 % telesne mase in se zniža na 60 % do 5 meseca starosti. Posledično se v prvem letu življenja spreminja tudi delež zunajcelične tekočine, ki znaša ob rojstvu 45 % in 26 % pri starosti 1 leto (37). Sposobnost vezave na plazemske proteine je pri dojenčkih in otrocih manjša (43). Encim CYP3A4 polno aktivnost doseže že v prvem tednu življenja. Hitrost glomerulne filtracije je enaka kot pri odraslih pri starosti 5-6 mesecev, tubularna sekrecija pa doseže to stopnjo pri starosti 7 mesecev (37). Singleton in sodelavci v svoji raziskavi opisujejo, da je očistek fentanila pri dojenčkih večji zaradi večjega deleža vode glede na telesno težo in pospešenega izločanja. Pri dojenčkih predstavljajo jetra večji delež, glede na celotno telesno maso, kot pri odraslih. Jetrni krvni pretok na kilogram telesne mase je večji kot pri odraslih in posledično je izločanje fentanila hitrejše. Večji očistek pa vodi do nižjih plazemskih koncentracij fentanila v primerjavi z odraslimi (44). V stanju dinamičnega ravnovesja znaša volumen porazdelitve pri novorojenčku približno 5,9 L/kg, pri dojenčku 4,5 L/kg in se z naraščajočo starostjo niža (37).

1.2.1.2 Neželeni učinki fentanila

Pomemben neželen učinek fentanila je razvoj tolerance, ki zahteva povečevanje odmerka za dosego enake stopnje učinkovitosti (45, 46). Fizična odvisnost od fentanila se kaže z odtegnitvenimi simptomi, ki so običajno posledica nenadnega prevelikega znižanja odmerka ali nenadnega prenehanja dajanja in zahteva postopno ukinjanje učinkovine (45, 46). Prevladujoči odtegnitveni simpotmi pri odvisnosti od opioidov so: tahikardija, midriaza, znojenje, kihanje, zehanje, diareja, slabost, bruhanje, tahipneja, tremor, hipertonija in hiperrefleksija (45). Dominguez in sodelavci so v svoji raziskavi spremljali 19 novorojenčkov, ki so bili na mehanskem predihavanju in so prejemali dolgotrajno intravensko infuzijo fentanila. Odtegnitvene simptome so opazili pri 53 % bolnikov. Pri teh bolnikih je bil skupni odmerek fentanila večji in trajanje infuzije daljše kot pri bolnikih, ki niso kazali odtegnitvenih simptomov (47). Drugi možni neželeni učinki fentanila so: hipotenzija, rigidnost prsnega koša, bradikardija in dihalna depresija (39). Dihalna depresija spada med najhujše možne neželene učinke, a raziskav, ki bi preučevale vpliv opioidov na dihanje pri otrocih ni veliko. Niesters in sodelavci v svoji raziskavi navajajo en primer s fentanilom in midazolamom povzročene dihalne depresije pri 14 mesecev staremu otroku (48).

1.2.1.3 Farmakogenetika fentanila

V občutenje bolečine in učinkovitost opioidov so vključene številne biokemijske poti, med katere uvrščamo nevrotransmisijo, vnetje ter prenos in metabolizem učinkovine. Vsaka od teh poti vključuje genetske dejavnike, ki lahko spremenijo tako občutenje bolečine kot tudi odgovor na opioide (49, 50). Polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP) so najbolj razširjene in tudi najbolj enostavne variacije v zaporedju DNA (51). Polimorfizmi v genih, ki kodirajo encime, vključene v nevrotransmisijo, prenašalne proteine ali μ-opioidne receptorje, kot so npr. *COMT* Val158Met, *ABCB1* C3435T in *OPRM1* A118G, lahko pomembno vplivajo na zaznavo ter lajšanje bolečine z opioidi (49).

1.2.1.3.1 Polimorfizem Val158Met v genu *COMT*

Bolečina je posledica interakcije med dražljajem in transmitorskim sistemom za bolečino. Bolečinski dražljaj povzroči sproščanje nevrotransmiterjev iz senzoričnih receptorjev. Nevrotransmiterji, med katere uvrščamo tudi kateholamine (dopamin, adrenalin, noradrenalin), se nato vežejo na specifične receptorje in aktivirajo transmitorske poti za bolečino (49). Gen *katehol-O-metiltransferaza* (*COMT)* se nahaja na kromosomu 22q11.2 in kodira dve izoobliki encima, topno S-COMT in membransko vezano MB-COMT, ki se izražata različno v

posameznih tkivih (52). Encim COMT je presnovni encim kateholaminov. Katalizira prenos metilne skupine z S-adenozilmetionina (SAM) na hidroksilno skupino kateholnega akceptorja in na ta način inaktivira kateholaminske nevrotransmiterje. Slednji so pri občutenju bolečine zelo pomembni, saj v primeru inaktivacije zmanjšajo prenos bolečine ter s tem njeno občutenje (49,52). Najbolj znan polimorfizem gena *COMT* je G1947A (rs4680) v eksonu 4, katerega posledica je zamenjava aminokisline valin z metioninom na mestu 158. Polimorfizem vpliva na termostabilnost encima. Pri genotipu MetMet je encim pri 37 °C termolabilen, kar se kaže v kar od 3- do 4-krat zmanjšani aktivnosti encima COMT (53, 54). Za posameznike z MetMet genotipom je značilna znižana koncentracija enkefalinov, zmanjšan regionalni μ-opioidni sistemski odgovor na bolečino, kompenzatorno pa so povišane koncentracije μ-opioidnih receptorjev v več možganskih regijah (55). Rakvag in sodelavci so v svoji raziskavi pokazali, da rakavi bolniki z genotipom MetMet potrebujejo nižje odmerke morfina (55). Tudi De Gregori in sodelavci navajajo, da so pri MetMet genotipu potrebni manjši odmerki opioida za dosego analgezije (56). Do enakih zaključkov pa so prišli tudi Henker in sodelavci, ki so preučevali povezavo med *COMT* Val158Met in lajšanjem postoperativne bolečine z opioidi (57).

1.2.1.3.2 Polimorfizem C3435T v genu *ABCB1*

P-glikoproteini (P-gp) so membranski prenašalci, ki spadajo v družino ABC prenašalcev. Najdemo jih na apikalni membrani ledvičnih tubulov, v žolčnih kanalih, na citoplazemskih podaljških astrocitov v stiku s kapilarami centralnega živčnega sistema (CŽS) in v prebavnem traktu (58, 60). Sodelujejo pri absorpciji, porazdelitvi in izločanju mnogih učinkovin in posledično vplivajo na njihovo biološko uporabnost (59). Še posebno pomembni so P-gp kot sestavni del krvno-možganske bariere, saj preprečujejo vstop in akumulacijo mnogih hidrofobnih molekul v CŽS, sodelujejo pa tudi pri izločanju substratov iz CŽS (59). Slednje pa je še posebej pomembno pri substratih P-gp kot je fentanil (60, 64). P-gp kodira gen *ABCB1*, ki je visoko polimorfen, saj je poznanih več kot 50 SNP-jev (62). Polimorfizem *ABCB1* C3435T (rs1045642) v eksonu 26 je eden najpogosteje preučevanih polimorfizmov (48). Polimorfizem se kaže v od 2- do 3-kratnem zmanjšanju izražanja P-gp, kar zmanjša efluks in zviša koncentracije opioidov v CŽS. Izpostavljenost višjim koncentracijam pa se lahko kaže v pojavu neželenih učinkov opioidov (63). Park in sodelavci so opazili pojav dihalne depresije in večjo potrebo po dodajanju kisika bolnikom z genotipom TT po intravenski infuziji fentanila, vendar pa se slednja ni statistično značilno razlikovala od potrebe pri bolnikih z genotipom CC (60). Tudi Rhodin in sodelavci v svoji raziskavi pišejo o pojavu z opioidi povezanih neželenih

učinkov pri posameznikih z genotipom TT, ki so prejemali opioide za zdravljenje kronične bolečine v križu (49). Candioti in sodelavci opisujejo manjšo potrebo po dajanju analgetičnih zdravil bolnikom z genotipom TT (61). Da se bolniki z genotipom TT bolje odzivajo na zdravljenje z morfinom pa kaže tudi raziskava Campe in sodelavcev (64).

1.2.1.3.3 Polimorfizem A118G v genu *OPRM1*

Opioidi delujejo preko vezave na specifične receptorje. Znane so štiri podskupine opioidnih receptorjev: μ, κ, δ in ORL1. Vsi navedeni receptorji spadajo v skupino z G-proteinom sklopljenih receptorjev oz. metabotropičnih receptorjev. Za te receptorje je značilno, da so sestavljeni iz 7 transmembranskih domen in da znotrajcelični odziv uravnava G-protein. Ko se agonist veže na opioidni receptor, pride do konformacije le-tega in do povečane afinitete receptorja za αβγ trimer G-proteina. Na α podenoti se gvanozin difosfat zamenja z gvanozin trifosfatom, to pa povzroči razpad αβγ trimera na α in βγ aktivno podenoto G-proteina (65). α in βγ podenoti se nato vežeta na encime in ionske kanale, ki povzročijo določen celični odziv. βγ podenota G-proteina aktivira kalijeve kanale in inhibira napetostno odvisne kalcijeve kanale, zaradi česar pride do zmanjšanega membranskega potenciala, zmanjšane vzdraženosti nevronov in zmanjšanega sproščanja nevrotransmiterjev (65, 66). Z vezavo na μ-opioidne receptorje opioidi povzročajo analgezijo, sedacijo, respiratorno depresijo, evforijo, zožanje zenic, zmanjšano motiliteto prebavnega trakta in fizično odvisnost (65). μ-opioidne receptorje kodira gen *OPRM1*, ki je lociran na kromosomu 6q24-q25. Znanih je več kot 100 SNP-jev tega gena, a najbolje raziskan je polimorfizem A118G (rs1799971) , ki ima za posledico spremembo aminokisline asparagin z asparaginsko kislino na mestu 40 na μ-opioidnem receptorju (66). Ta sprememba aminokislin povzroči izgubo N-glikozilacijskega mesta v zunajcelični regiji receptorja, na mestu interakcije ligand – receptor (49, 67). Polimorfizem vpliva na vezavo β-endorfinov in opioidov na μ-opioidni receptor. To pa lahko rezultira v spremenjeni potrebi po opioidih, spremenjeni občutljivosti za bolečino ali povečani nagnjenosti za razvoj odvisnosti od opioidov (49). Izsledki raziskav o povezavi med genotipom in odmerkom opioidov so si nasprotujoči. Rhodin in sodelavci opažajo potrebo po večjih odmerkih remifentanila pri bolnikih s kronično bolečino v križu, ki imajo genotip AA (49). De Gregori in sodelavci ter Henker in sodelavci v svojih študijah opisujejo potrebo po večjih odmerkih morfina za lajšanje postoperativne bolečine pri bolnikih z genotipom GG (57, 68). Chou in sodelavci navajajo potrebo po višjih odmerkih morfina posameznicam z genotipom GG za analgezijo po abdominalni histerektomiji (69). Potrebo po višjih odmerkih morfina za lajšanje bolečine pri rakavih bolnikih z genotipom GG pa opisuje Klepstad s sodelavci (70).

2 NAMEN DELA

Otroci s hujšo obliko akutnega bronhiolitisa potrebujejo umetno predihavanje. Ker je to za otroka boleča in neprijetna izkušnja, jim ob tem predpišejo intravensko infuzijo fentanila zaradi njegovih analgetičnih in sedativnih učinkov. Zdravljenje s fentanilom je pri otrocih zahtevno zaradi ozkega terapevtskega območja fentanila na eni strani in pojava neželenih učinkov na drugi strani. Ker sta pri otrocih farmakokinetika in farmakodinamika drugačni kot pri odraslih, je odmerjanje fentanila problematično. V številnih raziskavah, ki so jih sicer opravili na drugih populacijah bolnikov, so pokazali, da na odmerjanje fentanila vplivajo tudi genetski dejavniki.

Namen našega dela bo ugotoviti vpliv polimorfizmov *COMT* Val158Met, *ABCB1* C3435T in *OPRM1* A118G na učinkovitost in varnost zdravljenja s fentanilom pri otrocih. S tem namenom bomo skupini otrok z akutnim bronhiolitisom, ki so prejemali intravensko infuzijo fentanila:

- izolirali DNA in določili genotipe izbranih polimorfizmov s pomočjo reakcije PCR v realnem času ter izračunali njihovo pogostnost,
- s statistično analizo ovrednotili vpliv genotipa, trajanja zdravljenja s fentanilom, celokupnega odmerka fentanila, kumulativnih odmerkov fentanila oz. demografskih podatkov na stopnjo sedacije, stopnjo neugodja ter pojav odtegnitvenih simptomov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo, ki je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko in Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (številki odobritve 41/08/10 in 48/07/11), smo vključili 49 otrok z akutnim bronhiolitisom, ki so bili hospitalizirani na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo (UKC Ljubljana) ali na Kliniki za pediatrijo (UKC Maribor) v letih 2010 – 2013. V raziskavo so vključeni otroci obeh spolov, ki so bili na umetnem predihavanju in so bili zaradi potrebe po sedaciji vsaj 3 dni na terapiji z intravensko infuzijo fentanila. Iz raziskave so bili izključeni otroci s telesno težo manj kot 3 kg, starejši od dveh let, z možganskimi poškodbami in otroci, ki so bili na terapiji z drugimi opioidi.

3.2 PROTOKOL RAZISKAVE

Na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo (UKC Ljubljana) in na Kliniki za pediatrijo (UKC Maribor) so bolnikom po seznanitvi staršev z raziskavo in podpisu Izjave o zavestni in svobodni privolitvi za sodelovanje v raziskavi odvzeli 5 vzorcev po 1,5 mL venske krvi: 5, 15 in 60 minut po začetku infuzije, 12 ur po začetku infuzije ter ob prekinitvi infuzije. Po odvzemu krvi so s centrifugiranjem (10 min, 3000 obratov na minuto, 25 °C) ločili plazmo in celični del polne krvi. Plazmo posameznih vzorcev so uporabili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo za merjenje koncentracij fentanila in midazolama. Iz celičnega dela krvi smo izolirali DNA. Vzorce smo po ločitvi najprej hranili v zamrzovalniku na - 20 °C oziroma kasneje na - 80 °C.

Ves čas terapije s fentanilom so bolnikom merili fiziološke parametre: srčni utrip, krvni tlak, hitrost dihanja in SpO_2.

Stopnjo sedacije so vrednotili prvi dan pred začetkom infuzije fentanila ter pred odvzemom 1., 2., 3. in 4. vzorca krvi in nato vsak naslednji dan terapije dvakrat dnevno, z bispektralnim indeksom (BIS). Z monitorjem BIS se nadzira globina splošne anestezije na osnovi Fourierjeve transformacije. Posnetek elektroencefalograma (EEG) se razčleni in izrazi kot spekter frekvenčnih komponent, s čimer se dobi optimalna povezava med EEG in učinki sedativov (71). Vrednost BIS se razteza od 0 do 100, kjer 0 pomeni največjo stopnjo anestezije in 100 pomeni popolno budnost (72). Merjenje poteka tako, da se bolniku na levo stran čela namestijo štiri elektrode (srebro/srebrov klorid), četrta elektroda pa je referenčna. Tri elektrode merijo EEG,

referenčna pa meri elektromiografsko dejavnost čelne mišice. Monitor BIS nato grafično prikaže izmerjene vrednosti (71).

Stopnjo neugodja oz. bolečine so vrednotili prvi dan pred odvzemom 2., 3. in 4. vzorca krvi ter vsak naslednji dan terapije dvakrat dnevno s COMFORT-B lestvico (Priloga 1). Lestvica je sestavljena iz sedmih kategorij in sicer šest kategorij ocenjuje vedenjske znake in ena kategorija fiziološke. Vsaka kategorija je razdeljena na pet podkategorij (znakov), ki se ocenjujejo z ocenami od 1 do 5. Na koncu lestvice sledi seštevek vseh ocen, ki je lahko od 6 do 30. Seštevek, ki je enak ali večji od 17, kaže na potrebo po analgeziji (73). Prednost lestvice COMFORT-B je možnost, da se pokazatelji za vrednotenje stopnje bolečine obravnavajo v povezavi in ne ločeno.

Simptome odtegnitve so vrednotili po prekinitvi infuzije in sicer prvi dan 2, 4, 8 in 12 ur po prekinitvi infuzije in naslednje dni dvakrat dnevno, s pomočjo modificirane Finneganove lestvice (Priloga 2). Lestvica zajema 28 simptomov, ki so najbolj pogosto prisotni pri otrocih, ki so na terapiji z opioidi. Vsak simptom je ocenjen z določeno vrednostjo glede na resnost. Blagi odtegnitveni simptomi, kot so na primer blag tremor, pogosto zehanje in kihanje so ovrednoteni z oceno 1 in hujši odtegnitveni simptomi kot so generalizirane konvulzije z oceno 5. Vrednosti se na koncu vrednotenja seštejejo. Seštevek, ki je enak ali večji od 8 kaže na razvoj fizične odvisnosti in potrebo po terapiji le-te (74).

3.3 UPORABLJENI REAGENTI IN APARATURE

UPORABLJENI REAGENTI:

- FlexiGene DNA Kit: pufer FG1, pufer FG2, pufer FG3 in QIAGEN® proteinaza (Qiagen),
- 100 % izopropanol (Merck),
- 70 % etanol (absolutni etanol, Merck),
- 3 % natrijev hipoklorit za razkuževanje površin (Gram-Mol),
- avtoklavirana ultra čista voda (aparat Elga, Purelab Classic, Kemomed),
- 1 × TAE pufer (Tris-acetat in EDTA pufer, pripravljen iz 50 × TAE pufra: 121 g tris-HCl, 28,6 g ocetne kisline, 50 mL 0,5 M EDTA, ultra čista voda do 500 mL),

- pripravljeno barvilo bromfenol modro (0,25 % (m/V) bromfenol modro, 30 % (V/V) glicerol, ultra čista voda),
- označevalec velikosti DNA odsekov 0,12 – 23,1 kbp (DNA Molecular Weight Marker II, Promega),
- reagenčni komplet oligonukleotidnih začetnikov in sond za tri polimorfizme (Applied Biosystems):
    - rs4680: C__25746809_50
    - rs1045642: C___7586657_20
    - rs1799971: C__8950074_1_,
- TaqMan Genotyping MasterMix (Applied Biosystems).

UPORABLJENE APARATURE IN PRIBOR:

- Avtoklav (Steriltechnik AG Laboklav 25),
- sušilnik (Heraens),
- hladilnik H1 (Gorenje) za shranjevanje reagentov za reakcijo qtPCR
- hladilnik H4 (Gorenje) za shranjevanje izolirane DNA,
- aparatura za pridobivanje ultračiste vode (ELGA, Kemomed)
- vodna kopel (Waterbath-thermostat WB-4MS, Biosan),
- centrifuga (Centrifuge 5804R, Eppendorf),
- vrtinčasto mešalo (Biovortex V1, Biosan),
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 200-1000 µL; Eppendorf),
- škatlice z avtoklaviranimi nastavki za pipete (TipOne, Starlab),
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom (1,5 mL; Eppendorf),
- centrifugirke,
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD® Wide mini-sub cell),
- vir napetosti (BIO-RAD® Power Pac Basic),

- komora z UV svetilko in z digitalnim fotoaparatom za slikanje gelov (Syngene, Kemomed),
- polavtomatska pipeta (2-20 µL, HTL),
- parafilm »M«,
- polavtomatska pipeta (0,5-2,0 µL; Eppendorf),
- mikrotitrska ploščica s 96 vdolbinami (AbiPrism, AppliedBiosystems),
- avtoklavirani gumijasti pokrovi za mikrotitrske ploščice,
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica),
- mini centrifuga MCF-2360,
- trakovi z osmimi epruvetkami (AppliedBiosystems),
- delovna komora DNA/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR),
- analizator AbiPrism 7000 (Applied Biosystems),
- Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Naprava za slikanje gela G-box (Syngene)

3.4 IZOLACIJA DNA

Pred samo izolacijo DNA iz vzorcev, smo želeli ugotoviti, kateri nadomestek plazme daje boljše koncentracije in boljšo čistost izolirane DNA. Zato smo epruvetke sveže krvi centrifugirali 6 min pri 2500 obratih na minuto in po centrifugiranju odstranili plazmo. 1000 µL celičnega dela krvi smo odpipetirali v epruvetko s pokrovčkom in dodali 500 µL 1x PBS oz. 500 µL ultra čiste vode ter izolacijo izvedli po protokolu FlexiGene DNA Kit (http://www.qiagen.com/resources/). Pri tem smo uporabili volumne reagentov, potrebnih za izolacijo, ki jih prikazuje Preglednica III.

Preglednica III: Preračun volumnov reagentov potrebnih za izolacijo DNA pri nadomeščanju plazme z ultra čisto vodo in PBS.

Volumen vzorca	**1000 µL**
pufer FG1	2500 µL
pufer FG2/QIAGEN® proteinaza	500 µL
100 % izopropanol	500 µL
70 % etanol	500 µL
pufer FG3	200 µL

Raztopljeni izolirani DNA smo nato s pomočjo aparature NanoDrop® izmerili koncentracijo in čistoto.

Nadalje smo želeli ugotoviti vpliv različnih razmerij celičnega dela krvi in ultra čiste vode na izolacijo DNA. Sveže vzorce krvi smo zato centrifugirali 6 minut pri 2500 obratih na minuto, jim odstranili plazmo in da bi dobili čim večjo podobnost z našimi vzorci, krvne celice zamrznili na - 20 °C za 24 ur. Vzorce smo naslednji dan odmrznili in odpipetirali po 500 µL krvnih celic v epruvetke s pokrovčkom ter jim dodali 20 %, 40 %, 60 % oz. 80 % ultra čiste vode. Preračunali smo volumne reagentov, potrebnih za izolacijo (Preglednica IV) in nadaljevali z izolacijo DNA po protokolu.

Preglednica IV: Volumni reagentov potrebni za izolacijo DNA pri ugotavljanju vpliva razmerij ultra čiste vode in krvnih celic na koncentracijo in čistost izolirane DNA.

Volumen vzorca	**600 µL**	**700 µL**	**800 µL**	**900 µL**
pufer FG1	1500 µL	1750 µL	2000 µL	2250 µL
pufer FG2/QIAGEN® proteinaza	300 µL	350 µL	400 µL	450 µL
100 % izopropanol	300 µL	350 µL	400 µL	450 µL
70 % etanol	300 µL	350 µL	400 µL	450 µL
pufer FG3	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

Ko smo ugotovili, s katerim nadomestkom plazme izoliramo DNA z večjo koncentracijo in boljšo čistostjo, smo se lotili izolacije DNA iz vzorcev. DNA smo izolirali s pomočjo FlexiGene DNA Kit-a, ki vsebuje lizirni pufer (Buffer FG1), denaturacijski pufer (Buffer FG2), hidratacijski pufer (Buffer FG3) in QIAGEN® proteinazo. Prednost izolacije s FlexiGene DNA Kit-om je potek postopka v eni centrifugirki, kar zmanjša možnost napak in količino odpadnih

snovi. Poleg proizvajalčevih reagentov smo za izolacijo DNA potrebovali tudi 100 % izopropanol in 70 % etanol. Pri delu smo uporabili sterilne centrifugirke, epruvetke s pokrovčkom in nastavke za pipete. Epruvetke s pokrovčkom in nastavke smo predhodno avtoklavirali 30 minut, pri 121 °C in 1 bar nadtlaka. Material in delovne površine smo pred pričetkom dela očistili s 3 % hipokloritom in notranjost centrifuge z 10 % etanolom. Vklopili smo vodni kopeli in centrifugo, katere termostatiranje je trajalo 30 minut. Po navodilih proizvajalca smo raztopino, sestavljeno iz QIAGEN® proteinaze in pufra FG2, pripravili največ 60 minut pred uporabo. Prav tako smo pred pričetkom preračunali volumne reagentov, potrebnih za izolacijo DNA iz 1300 µL vzorca krvi (Preglednica V).

Preglednica V: Volumni reagentov potrebnih za izolacijo DNA iz 1300 µL vzorca.

Volumen vzorca	**1300 µL**
Pufer FG1	3250 µL
Pufer FG2/QIAGEN® proteinaza	650 µL/6,5 µL
100 % izopropanol	650 µL
70 % etanol	650 µL
Pufer FG3	200 µL

V vodni kopeli, nastavljeni na 37 °C, smo odtalili vzorce krvi. Za vsakega preiskovanca smo odtalili dve epruvetki krvnih celic. Med tem smo pripravili potrebno število epruvetk in centrifugirk (istočasno smo izolirali šest vzorcev) ter jih označili s številko vzorcev katerih DNA smo izolirali.

DNA smo izolirali iz 1300 µLvzorca po naslednjem protokolu:

1. V epruvetko s pokrovčkom smo odpipetirali 900 µL krvnih celic in 600 µL ultra čiste vode ter previdno premešali, da smo homogenizirali vzorec,
2. v centrifugirko smo odpipetirali 3250 µL pufra FG1, dodali 1300 µL homogeniziranega vzorca in jo petkrat premešali z obračanjem v rokah,
3. sledilo je centrifugiranje 9 minut pri 2500 obratih na minuto,
4. supernatant smo po centrifugiranju previdno odlili,
5. nastali peleti smo dodali mešanico pufra FG2 (650 µL) in proteinaze (6,5 µL) ter dobro premešali, da se je peleta popolnoma homogenizirala,

6. centrifugirko smo trikrat obrnili v rokah in inkubirali 10 min v vodni kopeli pri 65 °C,
7. dodali smo 650 µL 100 % izopropanola in centrifugirko obračali v rokah od 20- do 40-krat dokler ni postala vidna denaturirana DNA,
8. centrifugirali smo 6 minut pri 2500 obratih na minuto,
9. supernatant smo po cenrifugiranju previdno odlili,
10. nastali peleti smo dodali 70 % etanol in dobro premešali, da se je peleta odlepila s stene centrifugirke,
11. centrifugirali smo 6 minut pri 2500 obratih na minuto,
12. supernatant smo previdno odlili,
13. notranjost centrifugirke smo obrisali z vatirano palčko in pustili odprto dokler ni vsa tekočina izhlapela,
14. dodali smo 200 µL pufra FG3 in dobro premešali, da se je peleta odlepila s stene centrifugirke,
15. sledila je inkubacija v vodni kopeli pri 65 °C 60 minut ali čez noč, če se po 60 minutah peleta ni raztopila,
16. ko se je peleta raztopila, smo vzorec centrifugirali 3 minute pri 2500 obratih na minuto in odpipetirali 200 µL raztopine v epruvetko s pokrovčkom in shranili v hladilnik.

Po zaključeni izolaciji DNA smo ves material in delovne površine očistili s 3 % hipokloritom.

3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOTE IZOLIRANE DNA

Čistoto in koncentracijo izolirane DNA smo določali s spektrofotometrom NanoDrop® 1000 UV-VIS, ki ima območje merjenja od 220 nm do 750 nm. Aparatura izmeri absorbance pri valovnih dolžinah 230 nm, 260 nm in 280 nm ter preračuna razmerja absorbanc 260/280 in 260/230. Koncentracijo izračuna na osnovi absorbance pri 260 nm. Razmerje absorbanc 260/280 določa čistoto in mora biti med 1,7 in 1,9. (75). Preden smo pričeli z merjenjem vzorcev, smo le-te premešali na vrtinčastem mešalu in centrfugirali. S tem smo dosegli, da se je DNA porazdelila homogeno. Aparaturo sestavlja zgornja ročica in spodnji merilni podstavek, kamor nanesemo vzorec. Pred začetkom merjenja in po koncu vseh meritev smo oba dela očistili z deionizirano vodo. Deionizirano vodo pa smo uporabili tudi kot slepi vzorec. Na spodnji merilni podstavek smo odpipetirali 1,5 µL raztopine izolirane DNA, katere čistoto in

koncentracijo smo želeli izmeriti, zaprli ročico in s pomočjo računalniškega programa izmerili vrednosti absorbanc. Po vsaki meritvi smo ročico in podstavek obrisali, da smo onemogočili kontaminacijo med vzorci. Vsak vzorec smo izmerili dvakrat in nato izračunali povprečno koncentracijo in povprečne absorbance. Če so se vrednosti vzorca po zaporednih meritvah precej razlikovale, smo meritev izvedli še enkrat. Če se je precejšnja razlika med zaporednima meritvama pojavila pri več vzorcih zapored, smo aparaturo ponovno umerili z deionizirano vodo in ponovno izmerili absorbance.

3.6 PREVERJANJE INTEGRITETE DNA

Po zaključeni izolaciji DNA in meritvi čistote ter koncentracije DNA nas je zanimalo ali je izolirana DNA razgrajena in če je, v kakšni meri je prišlo do razgradnje. Prekomerno razgrajena DNA bi namreč lahko otežila nadaljnjo analizo, v našem primeru, genotipizacijo. Uspešnost izolacije DNA smo zato preverili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. To je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Potovanje nukleinskih kislin poteka na osnovi velikosti. Manjši odseki potujejo proti anodi hitreje kakor večji. Razmerje med velikostjo in nabojem pa je pri vseh nukleinskih kislinah enako (76). Uporabili smo 2 % agarozni gel katerega sestavo prikazuje Preglednica VI. V gel je bilo vgrajeno barvilo Midori Green, ki se interkalira med bazne pare dvovijačne DNA. Interkalirane molekule pod UV svetlobo fluorescirajo veliko močneje kakor proste molekule, kar izkoristimo za detekcijo lis na gelu (77).

Preglednica VI: Sestavine za pripravo 2 % agaroznega gela.

Sestavina	Količina
agaroza	1,5 g
1 × TAE pufer	75,0 mL
midori green	2,0 µL

Gel smo pred nanosom raztopine izolirane DNA namestili v elektroforezno kadičko in preverili, da je bil v celoti potopljen v pufer 1 × TAE. Vzorce raztopin izolirane DNA smo predhodno centrifugirali 1 minuto pri 2000 obratih na minuto. 2,0 µL vzorca smo pred nanosom v žepek, na parafilmu pomešali z 2,0 µL nanašalnega pufra bromfenol modro in nato nanesli 2,0 µL mešanice v žepek v gelu. V zadnji žepek v vrstici pa smo nanesli 2,0 µL označevalca velikosti DNA odsekov, ki smo ga prav tako pomešali z bromfenol modrim. Bromfenol modro obarva

vzorce in s tem olajša nanos le-teh v žepke ter omogoča spremljanje hitrosti potovanja odsekov proti anodi. Slednje omogoči kosedimentacija, zaradi katere nanašalni pufer bromfenol modro proti anodi potuje z enako hitrostjo kot DNA velikosti 300 bp. Elektroforeza je potekala 30 min pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v komoro G-BOX, kjer smo ga z izbrano osvetlitvijo »Transluminator« fotografirali.

3.7 PCR V REALNEM ČASU

PCR (verižna reakcija s polimerazo) omogoča *in vitro* sintezo nukleinskih kislin. Z njeno pomočjo lahko v zelo kratkem času analiziramo veliko število kopij izbranega odseka DNA. Za to pa potrebujemo le majhno količino vzorca, kar predstavlja veliko prednost PCR metode pred drugimi, klasičnimi tehnikami molekularne biologije. Reakcijsko zmes sestavljajo:

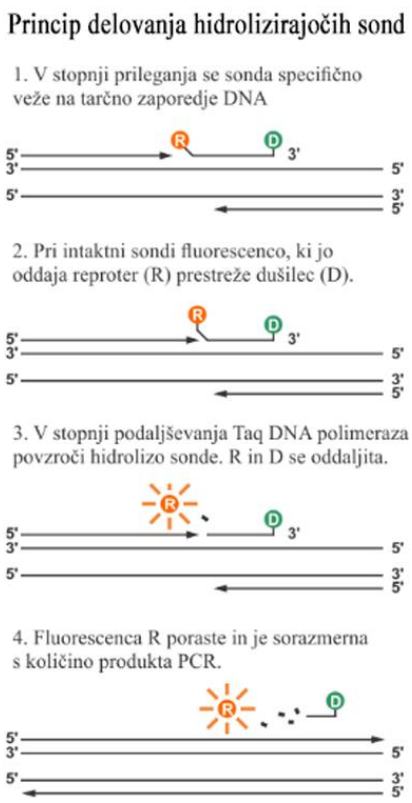
- vzorec DNA, ki služi kot matrica,
- dva začetna oligonukleotida,
- deoksinukleozid-trifosfati kot gradniki nove verige DNA,
- ioni Mg^{2+} kot kofaktorji termostabilne DNA polimeraze,
- reakcijski pufer za uravnavanje pH, ki vpliva na aktivnost in točnost DNA polimeraze,
- termostabilna DNA polimeraza.

PCR poteka v 20 – 40 ciklih, vsak cikel je sestavljen iz treh stopenj. Pred prvim ciklom se izvede začetna denaturacija. V ciklu najprej poteče denaturacija DNA, kjer pri temperaturi 94 – 95 °C poteče razklenitev verig DNA, da dobimo dve enoverižni DNA. Pri temperaturi 40 – 60 °C se na enoverižni DNA vežeta začetna oligonukleotida. Z dvigom temperature na 72 °C omogočimo vezavo encima DNA polimeraze na začetni oligonukleotid in izgradnjo komplementarne DNA verige v smeri od 5' proti 3'. DNA, ki tako nastane v prvem ciklu, služi nato v drugem ciklu kot dodatna matrica za izgradnjo novih DNA verig. Po zadnjem ciklu poteče še zaključno podaljševanje. Pri konvencionalni PCR je detekcija produktov ločena od pomnoževanja. Poteka po končani fazi pomnoževanja, kar pa pomeni večjo porabo časa in večjo možnost kontaminacije. Pri qPCR (PCR v realnem času) pa detekcija poteka sočasno s pomnoževanjem. Merjenje količine produkta je tako mogoče v vsakem ciklu, kar omogoča lažjo kvantifikacijo nukleinskih kislin. Merjenje poteka v eksponentni fazi reakcije, detekcija pa temelji na merjenju fluorescence. Načine detekcije razdelimo na specifične in nespecifične načine, torej ali z njimi prepoznamo samo specifični produkt ali tudi prisotne nespecifične produkte. Eden izmed specifičnih načinov detekcije je uporaba hidrolizirajočih sond, ki se uporabljajo tudi za genotipizacijo (78).

3.7.1 Alelna diskriminacija s hidrolizirajočimi sondami

Hidrolizirajoče sonde predstavljajo kratko zaporedje DNA in imajo na 5' koncu vezan reporter in na 3' koncu dušilec. Sonda, ki jo dodamo v reakcijsko zmes, specifično prepozna in se v stopnji prileganja veže na tarčno zaporedje DNA. Pri intaktni sondi dušilec prestreže fluorescenco, ki jo oddaja reportersko barvilo in fluorescence zato ne zaznamo. Med PCR pa 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq* DNA-polimeraze povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča, dušilec ne prestreže več fluorescence reporterja in zato zaznamo porast fluorescence, ki pa je v sorazmerju s količino produkta PCR (Slika 3) (78).

Alelna diskriminacija s hidrolizirajočimi sondami je hitra in občutljiva metoda za detekcijo znanih polimorfizmov in mutacij. Za detekcijo uporabimo dve TaqMan® sondi. Sondi se med seboj razlikujeta v nukleotidnem zaporedju, tako da se ena prilega zaporedju mutiranega alela in druga zaporedju nemutiranega alela. Za detekcijo smo uporabili sondo z barvilom VIC®, ki je kovalentno vezano na 5' koncu ene sonde za detekcijo alela 1 in FAM™ na drugi za detekcijo alela 2. Znaten porast samo ene od fluorescenc pomeni, da je osebek homozigot za alel 1 oz. alel 2, porast obeh fluorescenc pa pomeni, da je oseba heterozigot (79).



Slika 2: Princip delovanja hidrolizirajočih sond

Povzeto po (85).

3.7.1.1 Genotipizacija izbranih polimorfizmov

Pri genotipizaciji smo za uspešno izvedbo morali upoštevati nekaj pravil. PCR-reakcija je izredno občutljiva na kontaminacijo, ki ima lahko za posledico nepravilne rezultate. Zato je zelo pomembno, da upoštevamo osnovne ukrepe za preprečevanja kontaminacije. PCR-reakcije tako izvajamo v PCR-laboratoriju, ki je prostorsko ločen od stopenj, ki se izvajajo pred PCR-reakcijo, oblečeno pa imamo haljo, ki jo uporabljamo samo v PCR-laboratoriju. Reakcijsko zmes smo pripravljali v komori, ki smo jo pred začetkom priprave očistili z 10 % etanolom, s 3 % hipokloritom pa smo očistili ves pribor in material, ki smo ga vnesli v komoro. Po vnosu vsega potrebnega pribora smo zaprli komoro in za 30 minut vklopili UV-lučko. Med tem časom

smo reagente, zaščitene pred svetlobo, ki smo jih shranjevali v zamrzovalniku pri - 20 °C, prenesli v hladilnik na + 4 °C. Po končani uporabi pa smo jih zopet vrnili v zamrzovalnik. S tem smo zmanjšali velike temperaturne preskoke, z zaščito pred svetlobo pa smo preprečili, da bi svetloba kakorkoli vplivala na fluorescenco barvil. Delovne raztopine izolirane DNA smo shranjevali v hladilniku na + 4 °C.

Genotipizacijo smo izvajali v dveh korakih in sicer smo najprej v komori pripravili reakcijsko zmes in nato s pomočjo programa 7000 System Software izvedli PCR in alelno diskriminacijo. Reakcijska zmes je bila sestavljena iz predhodno izolirane DNA, dvakrat destilirane avtoklavirane vode, PCR Master Mix-a in TaqMan analizne mešanice. Sestavo slednjih podaja Preglednica VII.

Preglednica VII: Sestava reagentov za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami (79).

Reagent	Sestava
TaqMan PCR Master Mix	• AmpliTaq Gold® DNA polimeraza • mešanica dNTP z dUTP • pasivno referenčno barvilo • optimiziran reakcijski pufer
TaqMan analizna mešanica	• specifična zaporedja sond, ki se vežejo na tarčno zaporedje • reportersko barvilo na 5' koncu vsake sonde: VIC® ali FAM™ • dve molekuli MGB, ki se vežeta v mali jarek DNA • nefluorescentni dušilec (NFQ) na 3' koncu vsake sonde

Ker smo proučevali tri polimorfizme, smo uporabili tri različne TaqMan analizne mešanice, specifične za posamezen polimorfizem. Analizne mešanice se razlikujejo v sestavi nukleotidnega zaporedja sond, ki se vežejo na odseke DNA s polimorfnim mestom, kar prikazuje Preglednica VIII.

Preglednica VIII: Deli odsekov DNA s polimorfnim mestom, ki smo jih pomnoževali.

Polimorfizem	Tarčno zaporedje DNA
ABCB1 C3435T	TGTTGGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC**[A/G]**ATCTCTTCCTGTGACACCACCCGGC
COMT Val158Met	CCAGCGGATGGTGGATTTCGCTGGC**[A/G]**TGAAGGACAAGGTGTGCATGCCTGA
OPRM1 A118G	GGTCAACTTGTCCCACTTAGATGGC**[A/G]**ACCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAA

Barvilo VIC® je označevalo prvi alel in barvilo FAM™drugi alel, kar smo morali upoštevati pri odčitavanju rezultatov genotipizacije. Preglednica IX prikazuje, na katere alele se je vezalo določeno barvilo.

Preglednica IX: Določitev alelov posameznega polimorfizma na osnovi porasta fluorescence barvila VIC® oziroma FAM™.

Polimorfizem	VIC®	FAM™
ABCB1 C3435T	A (mutiran)	G (nemutiran)
COMT Val158Met	A (mutiran)	G (nemutiran)
OPRM1 A118G	A (nemutiran)	G (mutiran)

Dela smo se lotili na sledeč način:

- Reagente smo prenesli iz zamrzovalnika v hladilnik,
- v programu 7000 System Software smo pripravili datoteko za genotipizacijo,
- preračunali smo volumsko sestavo reagentov, potrebnih za sestavo reakcijske zmesi. Pri tem smo upoštevali število vzorcev z izolirano DNA, en slepi vzorec in 10 % prebitek. Preglednica X prikazuje primer preračuna za analizo 15 vzorcev.

Preglednica X: Volumska sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo.

Število vzorcev	1	(15+1) + 10 %
ddH2O	5,0 µL	88,0 µL
20× TaqMan analizna mešanica	0,4 µL	7,04 µL
5× PCR Master Mix	1,6 µL	28,16 µL

- TaqMan analizno mešanico smo na hitro centrifugirali in PCR Master Mix na hitro premešali na vrtinčastem mešalu,
- v 1,5 mL epruvetko s pokrovčkom smo pripravili reakcijsko zmes glede na predhoden preračun in ponovno na hitro premešali na vrtinčastem mešalu,
- mikrotitrsko ploščico z vzorci izolirane DNA smo centrifugirali 2 min pri 1900 obratih na minuto,
- v stripe (trak, sestavljen iz 8 vdolbinic) smo vnesli po 7,0 µL reakcijske zmesi in v sedem vdolbinic 1,0 µL vzorca izolirane DNA,
- v zadnjo vdolbinico na stripu pa smo namesto vzorca izolirane DNA vnesli 1,0 µL dvakrat destilirane avtoklavirane vode, kar je predstavljalo slepi vzorec,
- strip smo zaprli s pokrovčkom in ga centrifugirali 2 min pri 1900 obratih na minuto,
- med tem smo vklopili aparaturo AbiPrism 7000 in odprli predhodno nastavljen program za genotipizacijo,
- vzorce smo prenesli v ciklični pomnoževalnik in pričeli z analizo po predhodno nastavljenem programu.

Za genotipizacijo smo uporabili tehniko vročega začetka (hot start PCR), s katero preprečimo nastanek nespecifičnih produktov in omogočimo nastanek večjih količin specifičnega produkta. Pri tej tehniki pred začetkom PCR reakcije podaljšamo začetno denaturacijo na 10 – 15 min, s čimer zagotovimo zadostno aktivacijo encima *Taq* DNA-polimeraze (79). Temperaturni program qPCR prikazujeta Preglednici XI in XII.

Preglednica XI: Temperaturni program za qPCR za polimorfizma *ABCB1* C3435T in *COMT* Val158Met.

	Temperatura	**Čas**	**Število ciklov**
Aktivacija AmpliTaq Gold polimeraze	95 °C	15 min	1
Začetna denaturacija	92 °C	15 s	50
Podaljševanje in polimerizacija	60 °C	60 s	50
Alelna diskriminacija	60 °C	60 s	1

Preglednica XII: Temperaturni program za qPCR za polimorfizem *OPRM1* A118G.

	Temperatura	**Čas**	**Število ciklov**
Aktivacija AmpliTaq Gold polimeraze	95 °C	15 min	1
Začetna denaturacija	92 °C	15 s	40
Podaljševanje in polimerizacija	60 °C	60 s	40
Alelna diskriminacija	60 °C	60 s	1

3.8 STATISTIČNA ANALIZA

S statistično analizo, ki smo jo izvedli s pomočjo programa IBM SPSS 20.0, smo želeli ugotoviti ali je pogostnost proučevanih genotipov v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWE). Zato smo uporabili test χ^2. Ker je bilo v tem primeru število prostostnih stopenj enako ena, smo upoštevali Yatesovo korekturo (Enačba 1). Nato smo želeli ugotoviti ali se frekvence genotipov proučevanih polimorfizmov značilno razlikujejo od frekvenc določenih za Centralno Evropo. Tudi v tem primeru smo uporabili test χ^2, vendar brez Yatesove korekture (Enačba 2).

$$\chi^2 = \sum \frac{((f_u - f_p) - 0{,}5)^2}{f_p} \qquad \textit{Enačba 1}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_u - f_p)^2}{f_p} \qquad \textit{Enačba 2}$$

V enačbi f_u predstavlja ugotovljeno frekvenco in f_p pričakovano frekvenco.

Sledila je izvedba opisne statistike in ugotavljanje normalnosti porazdelitve. Normalnost porazdelitve smo za vse skupine podatkov preverili s Shapiro-Wilkovim testom. Vrednosti spremenljivk, ki se niso porazdeljevale normalno, smo logaritmirali in nato ponovno preverili normalnost porazdeljevanja. Določanje normalnosti porazdelitve je potrebno zaradi nadaljnje izbire testov statistične analize. Če so se vrednosti po logaritmiranju porazdeljevale normalno, smo uporabili parametrične teste, v nasprotnem primeru pa neparametrične. Da bi ugotovili ali se izbrani dejavniki značilno razlikujejo med genotipi izbranih polimorfizmov, smo za normalno porazdeljene dejavnike uporabili ANOVO, za nenormalno porazdeljene dejavnike pa Kruskal-Wallis test.

Nadalje nas je zanimalo ali izbrani dejavniki značilno vplivajo na stopnjo sedacije, stopnjo neugodja in pojav odtegnitvenih simptomov, ki so povezani z zdravljenjem s fentanilom. Vpliv na stopnjo sedacije (BIS) in stopnjo neugodja (Comfort-B) smo analizirali z multivariatno linearno regresijo, saj nas je zanimal vpliv več neodvisnih spremenljivk (telesna masa, starost, kumulativni odmerki fentanila, proučevani genotipi) na eno odvisno spremenljivko (BIS oz. Comfort-B). Za analizo vpliva izbranih dejavnikov na pojav odtegnitvenih simptomov smo

izbrali multiplo logistično regresijo, saj nas je tudi tukaj zanimal vpliv več neodvisnih spremenljivk (telesna masa, starost, celokupni odmerek fentanila, doba hospitalizacije, proučevani genotipi) na eno odvisno spremenljivko (Finnegan), le da je bila slednja dihotomna. Seštevek točk po Finneganu smo razdelili v dve skupini. Prvo skupino so predstavljale vrednosti nižje od osem, drugo skupino pa vrednosti višje ali enake osem. Število osem smo izbrali kot mejo, ker ta vrednost že kaže na razvoj fizične odvisnosti in potrebo po terapiji le-te.

Vse za statistično analizo potrebne podatke smo vnesli v SPSS in jih statistično obdelali (Priloga 3). Razlike pri stopnji značilnosti $p < 0,05$ smo opredelili kot statistično značilne.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti vpliv polimorfizmov *COMT* Val158Met, *ABCB1* C3435T in *OPRM1* A118G na varnost in učinkovitost terapije s fentanilom pri otrocih z akutnim bronhiolitisom. Zato smo morali najprej izolirati DNA iz krvnih vzorcev bolnikov. Uspešni izolaciji DNA je sledila genotipizacija, s katero smo bolnikom določili genotipe, ki so nam nato služili za izvedbo statistične analize.

4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA

Ker nismo imeli vzorcev polne krvi, temveč le celične dele, smo morali plazmo nadomestiti. Da bi ugotovili kateri nadomestek plazme daje boljše rezultate (koncentracije in čistosti izolirane DNA), smo pri vzorcih krvi plazmo nadomestili z ultra čisto vodo ali s PBS. Preglednica XIII prikazuje, da so izmerjene vrednosti boljše pri vzorcih, kjer smo plazmo nadomestili z ultra čisto vodo.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti izmerjene koncentracije in čistosti izolirane DNA pri nadomeščanju plazme z ultra čisto vodo in PBS (n = 2).

Nadomestek plazme	A260/A280	A260/A230	C (ng/µL)
ultra čista voda	1,83	2,23	342,4
PBS	1,75	1,95	75,5

Nadalje smo ugotavljali vpliv različnih razmerij celičnega dela krvi in ultra čiste vode na uspešnost izolacije DNA. S pomočjo aparature NanoDrop® smo ugotovili, da različna razmerja krvnih celic in ultra čiste vode ne vplivajo bistveno na končni rezultat izolacije DNA (Preglednica XIV).

Volumni krvnih celic posameznih vzorcev so zelo variirali. Zato smo se odločili, da bomo med seboj združili po dve epruvetki vsakega vzorca in za izolacijo DNA uporabili volumen krvnih celic, ki predstavlja 61 % polne krvi in volumen ultra čiste vode, ki predstavlja 39 % polne krvi.

Preglednica XIV: Povprečne vrednosti izmerjenih koncentracij in čistosti izolirane DNA z različnim deležem ultra čiste vode (n = 8).

% ultra čiste vode	A260/A280	A260/A230	C (ng/µL)
20 %	1,74	1,63	90,0
20 %	1,76	1,63	91,0
40 %	1,72	1,48	89,8
40 %	1,78	1,75	97,0
60 %	1,74	1,74	91,2
60 %	1,73	1,67	71,3
80 %	1,77	1,85	81,4
80 %	1,74	1,66	78,7

DNA smo iz vseh vzorcev uspešno izolirali in nato s pomočjo aparature NanoDrop® določili koncentracije in čistosti, kar prikazuje Preglednica XV.

Preglednica XV: Povprečne vrednosti čistosti in koncentracije izolirane DNA iz vzorcev bolnikov.

VZOREC	A260/A280	A260/A230	C [ng/µL]	VZOREC	A260/A280	A260/A230	C [ng/µL]
FEN-1	1,745	1,44	408,4	FEN-32	1,79	1,51	345,9
FEN-2	1,78	1,44	229,0	FEN-33	1,82	0,97	195,4
FEN-3	1,80	1,57	259,3	FEN-34	1,84	1,11	199,2
FEN-4	1,73	1,50	195,7	FEN-35	1,76	1,16	183,2
FEN-5	1,765	1,48	577,3	FEN-36	1,81	1,27	393,2
FEN-6	1,78	1,70	380,8	FEN-37	1,79	1,64	357,1
FEN-7	1,81	0,87	188,7	FEN-38	1,73	1,55	507,7
FEN-8	1,78	1,35	482,8	FEN-39	1,84	1,44	442,3
FEN-9	1,78	1,54	194,9	FEN-40	1,84	1,55	441,7
FEN-10	1,80	0,74	118,7	FEN-41	1,78	1,54	315,5
FEN-11	1,78	1,13	103,6	FEN-42	1,74	1,03	101,0
FEN-12	1,81	1,54	974,9	FEN-43	1,87	1,52	942,1
FEN-13	1,78	1,37	469,2	FEN-44	1,81	1,50	212,3
FEN-14	1,80	1,91	968,0	FEN-45	1,79	1,52	353,7
FEN-15	1,79	1,37	230,4	FEN-46	1,82	1,47	177,4
FEN-16	1,78	1,48	531,9	FEN-47	1,84	1,22	242,9
FEN-18	1,83	1,11	264,9	FEN-48	1,84	1,42	393,5
FEN-19	1,85	0,61	94,5	FEN-49	1,77	1,27	186,6
FEN-20	1,84	1,68	542,4	FEN-50	1,83	1,27	300,1
FEN-25	1,83	1,70	890,6	FEN-51	1,86	1,00	175,5
FEN-26	1,77	0,86	183,9	FEN-55	1,78	1,37	177,8
FEN-27	1,75	1,17	199,7	FEN-61	1,77	1,48	575,1

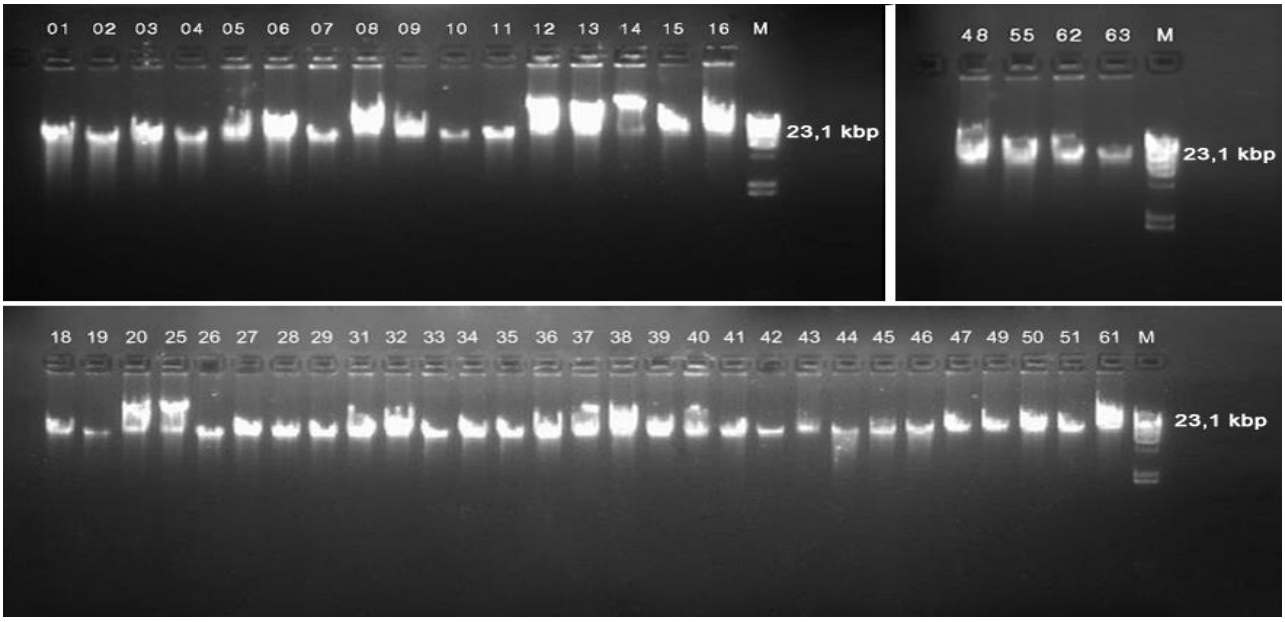
Nadaljevanje preglednice XV:

VZOREC	A260/A280	A260/A230	C [ng/µL]	VZOREC	A260/A280	A260/A230	C [ng/µL]
FEN-28	1,77	1,29	489,8	FEN-62	1,79	0,96	173,7
FEN-29	1,81	0,98	171,9	FEN-63	1,86	0,66	74,0
FEN-31	1,83	1,37	364,6				

Pred pričetkom genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami smo morali raztopine izoliranih DNA redčiti na 10 ng/µL, saj je v protokolu za TaqMan Genotyping Assays priporočeno, da analiziramo vzorce, ki vsebujejo med 3 in 20 ng očiščene DNA. Vzorce smo redčili z ultra čisto vodo v dveh stopnjah. Najprej smo vzorce, katerih koncentracija je bila bistveno višja od 100 ng/µL redčili do koncentracije približno 100 ng/µL. Koncentracije in čistosti smo preverili s pomočjo aparature NanoDrop®. Vsi vzorci DNA so bili tudi po redčenju ustrezne čistosti. Nato smo te raztopine redčili na 10 ng/µL v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami.

4.2 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost izolacije DNA. Po končani elektroforezi smo gel odcedili in ga s pomočjo aparata G-Box fotografirali. Lise na agaroznem gelu po končani elektroforezi niso bile vedno enako močno obarvane, kar je posledica razlik v koncentraciji izolirane DNA. Sicer pa je bila izolacija DNA uspešna, DNA posameznih vzorcev ni bila preveč razgrajena, kar prikazuje Slika 3.

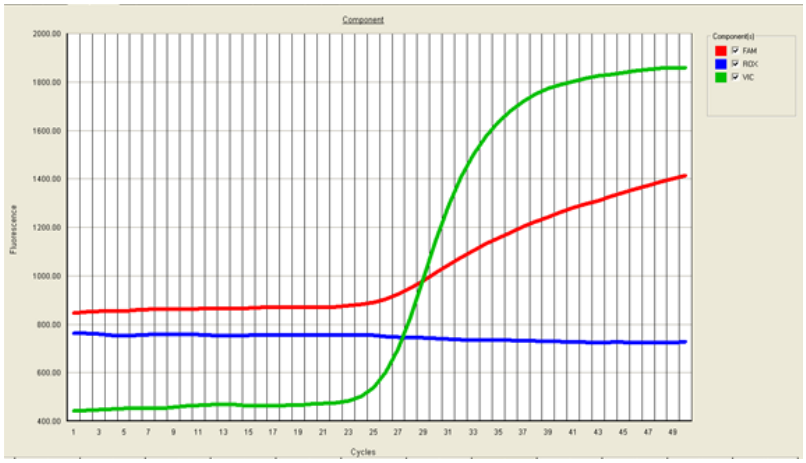


Slika 3: Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA.

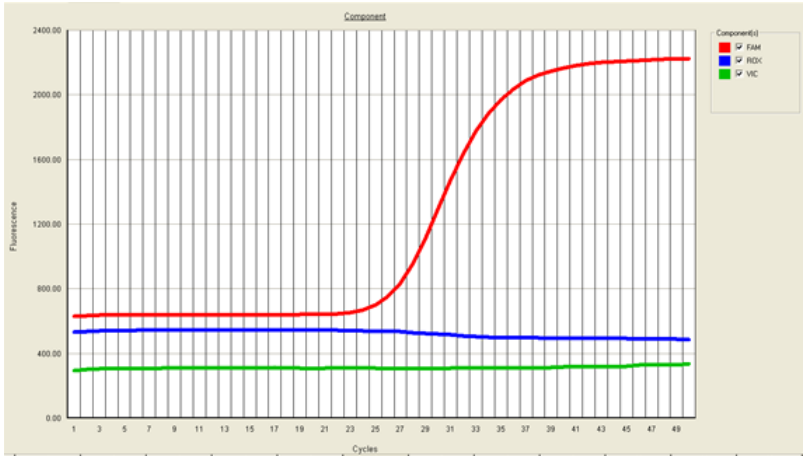
(2% agaroza, 100 V, 30 min, marker velikosti 0,12 – 23,1 kbp)

4.3 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

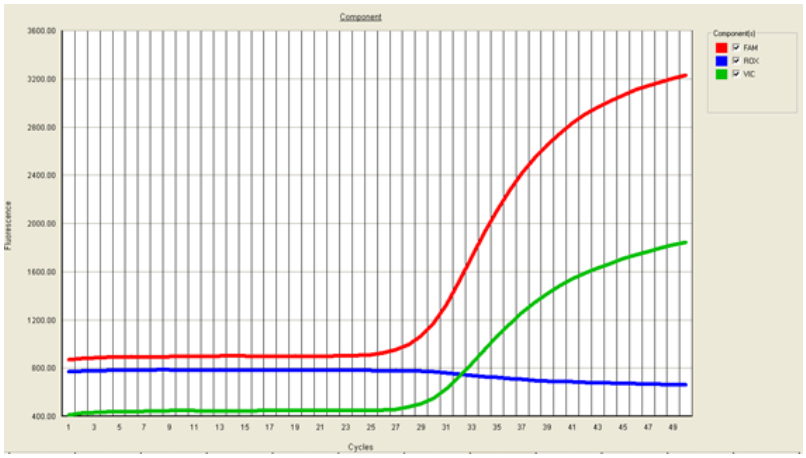
V cikličnem pomnoževalniku je najprej potekla qPCR in po končani reakciji smo dobili rezultate v obliki grafa. Na grafu smo videli porast ene ali obeh fluorescenc, kot prikazujejo slike 4 – 6 (prikazan je primer za polimorfizem *ABCB1* C3435T). Na sliki 4 je viden porast fluorescence barvila VIC® nad fluorescenco barvila FAM™, kar pomeni, da je opazovan vzorec homozigot za alel A. Slika 5 prikazuje porast fluorescence barvila FAM™, kar pomeni, da je opazovan vzorec homozigot za alel G. Slika 6 prikazuje porast fluorescenc obeh barvil, kar pomeni, da je opazovan vzorec heterozigot.



Slika 4: Primer rezultata genotipizacije za mutiranega homozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T.

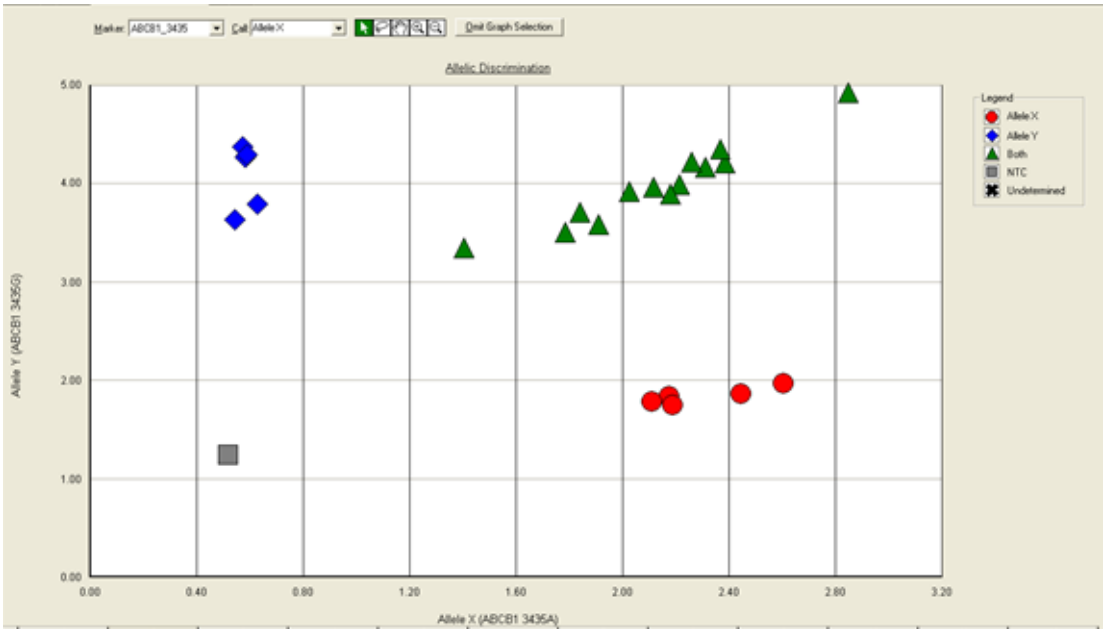


Slika 5: Primer rezultata genotipizacije nemutiranega homozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T.



Slika 6: Primer rezultata genotipizacije heterozigota za polimorfizem *ABCB1* C3435T.

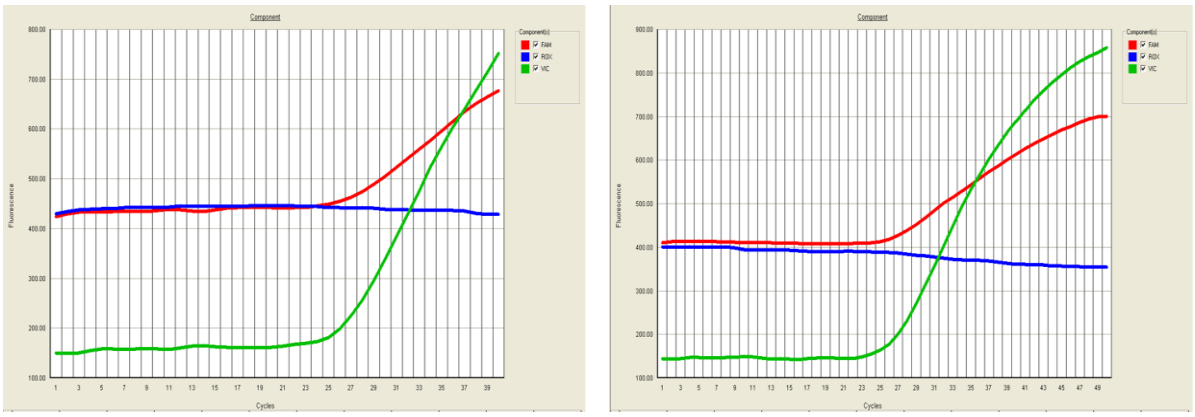
Končni rezultat alelne diskriminacije prikazuje Slika 7, kjer je prikazan primer določanja alelov za polimorfizem *ABCB1* C3435T. Iz razmerja jakosti fluorescenc smo določili genotip. Rdeče obarvani krogi predstavljajo nemutirane homozigote, modri kvadrati mutirane homozigote in zeleni trikotniki predstavljajo heterozigote. Sivi kvadrat v levem spodnjem kotu predstavlja slepi vzorec brez DNA.



Slika 7: Primer rezultata alelne diskriminacije za polimorfizem *ABCB1* C3435T (n=23).

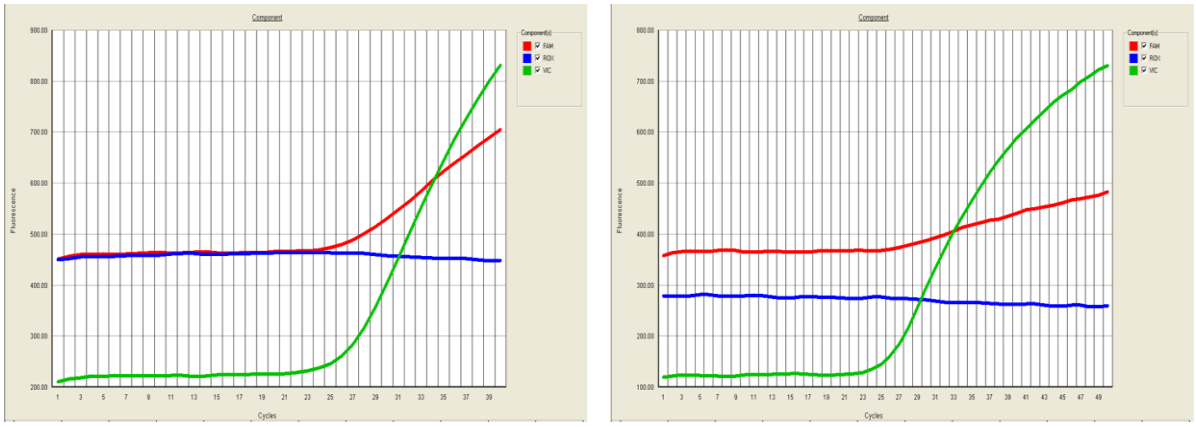
Da smo se prepričali o uspešnosti izvedene genotipizacije, smo za vsak polimorfizem ponovili analizo za 20 % vzorcev, ki smo jih izbrali tako, da so bili prisotni vsi možni genotipi.

Postopek genotipizacije za polimorfizem *OPRM1* A118G smo najprej izvajali v skladu z navodili proizvajalca, kjer je predvideno 40 ciklov pomnoževanja. Po končani analizi smo ugotovili, da krivulje, ki prikazujejo porast fluorescenc, niso dosegle platoja (Slika 8), poleg tega pa se je fluorescenca barvila FAM™ v primeru homozigota za prvi alel, dvignila dokaj visoko in je bila razlika med krivuljama VIC® in FAM™ precej majhna. Da bi se prepričali, da so bili z genotipizacijo določeni pravilni genotipi, smo ponovili analizo za 7 vzorcev, temperaturni program pa smo spremenili tako, da smo povečali število ciklov iz 40 na 50. Krivulje so sedaj dosegle plato (Slika 8), s čimer smo potrdili že predhodno določene genotipe.



Slika 8: Rezultat genotipizacije nemutiran homozigota *OPRM1* A118G po prvi genotipizaciji (levo) in po povečanju števila ciklov (desno).

Z namenom morebitnega še dodatnega povečanja razlike med krivuljama VIC® in FAM™, smo izvedli dodatni eksperiment, v katerem smo poleg povečanja števila ciklov na 50, uporabili še drug reagent za pomnoževanje (2 x TaqMan Genotyping Master Mix), ki je posebej prilagojen za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami v primerih, ko z običajnim reagentom ta ni mogoča. Glede na navodilo za delo s tem reagentom smo v temperaturnem programu spremenili čas trajanja aktivacije polimeraze s 15 min na 10 min. S ponovno genotipizacijo smo sicer res ugotovili, da pride do manjšega porasta fluorescence barvila FAM™, vendar pa to ne vpliva na odčitavanje genotipov (Slika 9). Zaključimo lahko, da genotipe sicer pravilno določimo že z uporabo osnovnega protokola, kljub temu pa bi za nadaljnje analize priporočili optimiziran protokol (uporaba Genotyping Master Mix-a).



Slika 9: Rezultat genotipizacije nemutiranega homozigota *OPRM1* A118G po prvi genotipizaciji (levo) in po uporabi drugega PCR Master Mix-a in spremembi temperaturnega programa (desno).

Z genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami smo za vse vzorce uspešno določili genotipe vseh proučevanih polimorfizmov, kar je prikazano v Preglednici XVI.

Preglednica XVI: Genotipi proučevanih polimorfizmov v izbrani populaciji otrok.

VZOREC	ABCB1 G3435A	COMT G1947A	OPRM1 A118G	VZOREC	ABCB1 G3435A	COMT G1947A	OPRM1 A118G
FEN-1	AG	GG	AA	FEN-32	AG	AG	AA
FEN-2	AG	AA	AA	FEN-33	AA	AA	AA
FEN-3	AA	AG	GA	FEN-34	GG	AG	AA
FEN-4	AG	AG	AA	FEN-35	AA	AA	AA
FEN-5	GG	AG	AA	FEN-36	AG	AG	AA
FEN-6	AG	AA	AA	FEN-37	AA	AA	AA
FEN-7	GG	AG	AA	FEN-38	AG	AG	AA
FEN-8	GG	AG	AA	FEN-39	AG	AA	GA
FEN-9	GG	AA	AA	FEN-40	AG	AA	AA
FEN-10	AA	AG	GA	FEN-41	GG	AG	AA
FEN-11	AG	AG	AA	FEN-42	GG	AG	AA
FEN-12	AA	AG	GA	FEN-43	GG	AG	AA
FEN-13	GG	AA	GA	FEN-44	AA	AG	GA
FEN-14	AG	GG	AA	FEN-45	AG	AA	AA
FEN-15	AA	GG	AA	FEN-46	GG	AG	AA
FEN-16	AG	AG	AA	FEN-47	GG	AG	GA
FEN-18	AG	AA	AA	FEN-48	AA	AA	AA
FEN-19	AG	AA	GA	FEN-49	AG	AA	GA
FEN-20	AA	AA	GA	FEN-50	GG	AG	AA
FEN-25	AG	AG	AA	FEN-51	GG	AG	AA
FEN-26	AG	AG	AA	FEN-55	AG	AG	AA
FEN-27	AG	GG	AA	FEN-61	AA	AG	AA
FEN-28	AG	GG	GA	FEN-62	AG	AA	AA
FEN-29	AG	AA	AA	FEN-63	AG	AG	GA
FEN-31	GG	AA	AA				

4.4 STATISTIČNA ANALIZA

4.4.1 Pogostnost proučevanih polimorfizmov

Po uspešno določenih genotipih, smo želeli ugotoviti pogostnost le-teh v izbrani populaciji bolnikov in jo primerjati s pogostnostjo v drugih državah. Izbrani polimorfizmi genov *ABCB1*, *COMT* in *OPRM1* pri otrocih s hujšo obliko akutnega bronhiolitisa v Sloveniji še niso bili raziskani. Preglednica XVII prikazuje število in odstotek preiskovancev s posameznim genotipom. Ugotovili smo, da v naši izbrani populaciji za gena *ABCB1* in *COMT* največji odstotek predstavljajo heterozigoti (49 % oz. 55 %) in za gen *OPRM1* največji odstotek predstavljajo nemutirani homozigoti (76 %). Za gen *OPRM1* v naši populaciji ni bilo mutiranih homozigotov. Največ mutiranih homozigotov je bilo ugotovljenih za gen *COMT* (35 %), medtem ko smo za gen *ABCB1* ugotovili 22 % mutiranih homozigotov. Proučevane frekvence genotipov smo primerjali s frekvencami podanimi za Centralno Evropo (81). S testom χ^2 smo ugotovili, da so frekvence genotipov za proučevane polimorfizme primerljive s podatki za Centralno Evropo ter da med njimi ni značilnih razlik (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Število in delež preiskovancev za posamezne genotipe v proučevani populaciji in literaturne vrednosti (81).

		Proučevane vrednosti		**Literatura (81)**
Gen	**Genotip**	**Število**	**Odstotek**	**Odstotek**
ABCB1	*GG* (nemutiran homozigot)	14	29 %	17,7 %
	AG (heterozigot)	24	49 %	48,2 %
	AA (mutiran homozigot)	11	22 %	34,1 %
χ^2 = 2.41; p vrednost: 0,30				
COMT	*GG* (nemutiran homozigot)	5	10 %	29,4 %
	AG (heterozigot)	27	55 %	47,1 %
	AA (mutiran homozigot)	17	35 %	23,5 %
χ^2 = 5.92; p vrednost: 0,05				
OPRM1	*AA* (nemutiran homozigot)	37	76 %	69,4 %
	GA (heterozigot)	12	24 %	28,2 %
	GG (mutiran homozigot)	0	/	2,4 %
χ^2 = 0.20; p vrednost: 0,65				

Glede na to, da smo izbrali polimorfizme, ki so za Centralno Evropo precej pogosti, smo takšen rezultat pričakovali. V primeru, da ti polimorfizmi v naši izbrani populaciji ne bi bili pogosti, ne bi bilo smiselno proučevati njihovega vpliva na terapijo s fentanilom. V primeru polimorfizma *COMT* Val158Met je p vrednost enaka 0,05, kar je na meji značilne razlike. Razlog za to bi lahko bil v tem, da smo mi ugotavljali frekvenco tega polimorfizma na vzorcu otrok, mlajših od dveh let, ki so bolehali za hujšo obliko akutnega bronhiolitisa, frekvence populacije iz literature (81) pa so bile določene na zdravi populaciji, starejši od 18 let.

4.4.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

S Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWE) ocenjujemo spremembe pogostnosti alelov med generacijami. Po HWE se pogostnosti alelov ne spreminjajo v velikih populacijah, kjer prihaja do naključnega parjenja in v katerih ni prehajanja posameznikov iz in v populacijo. Prav tako naj bi pogostnosti ostale konstantne v populacijah, kjer ni mutacij, zaradi katerih bi se pojavili novi aleli in v populacijah, kjer ni prisotna naravna selekcija, zaradi katere bi prišlo do prevlade enega alela. Ker vse omenjeno vpliva na evolucijo populacije, lahko s HWE enačbo ugotavljamo pravilnost izvedene genotipizacije. Če pogostnost alelov ne bi bila v HWE, bi to lahko pomenilo, da je med genotipizacijo prišlo do napake (82).

Za ugotavljanje HWE se lahko uporabijo Freeman-Tukey test, Mantel-Li test, Fisherjev eksaktni test in test χ^2, ki je eden izmed najbolj pogosto uporabljenih testov in smo ga uporabili tudi mi. V enačbo smo vstavili število preiskovancev z določenim genotipom in naredili primerjavo s pričakovano pogostnostjo v HWE. Preglednica XVIII prikazuje rezultate preverjanja HWE.

Pri ugotavljanju HWE smo upoštevali Yatesov popravek, s katerim od razlike med ugotovljeno in pričakovano frekvenco odštejemo vrednost 0,5. Yatesov popravek uporabimo kadar imamo eno stopinjo prostosti in ko je katera izmed frekvenc nižja od 5 (83). Ker je bila v primeru gena *OPRM1* ena izmed pričakovanih frekvenc nižja od 1, smo združili polja kontigenčnih tabel. Združili smo frekvence mutiranega homozigota in heterozigota, s čimer smo omogočili izvedbo χ^2 testa. Pri izbranih genih smo potrdili skladnost proučevanih genotipov s HWE. To pa potrjuje, da smo imeli naključen vzorec populacije, ki je posledično reprezentativen.

Preglednica XVIII: Hardy-Weinbergovo ravnotežje.

Gen	Genotip	Proučevana pogostnost	Pričakovana pogostnost
ABCB1	*GG* (nemutiran homozigot)	14	13,80
	AG (heterozigot)	24	24,41
	AA (mutiran homozigot)	11	10,80
χ^2 = 0.015; p vrednost: 0,90			
COMT	*GG* (nemutiran homozigot)	5	6,61
	AG (heterozigot)	26	22,78
	AA (mutiran homozigot)	18	19,61
χ^2 = 0.57; p vrednost: 0,45			
OPRM1	*AA* (nemutiran homozigot)	37	37,73
	GA (heterozigot)	12	10,53
	GG (mutiran homozigot)	0	0,73
χ^2 = 0.16; p vrednost: 0,69			

4.4.3 Vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov na terapijo s fentanilom

Nadalje smo želeli ugotoviti, kako genetski in okoljski dejavniki vplivajo na učinkovitost terapije s fentanilom. Zato smo ugotavljali vpliv izbranih dejavnikov na stopnjo sedacije in na stopnjo neugodja. Slednji sta predstavljali odvisno spremenljivko, ki sta bili določeni v treh časovnih točkah: v točki 1 (60 minut po začetku infuzije fentanila), 2 (tretji dan infuzije med 17:00 in 19:00 uro) in 3 (peti dan infuzije med 17:00 in 19:00 uro). V obeh primerih so bile neodvisne spremenljivke genotipi izbranih genov, starost, telesna masa in kumulativni odmerek fentanila, ki smo ga izračunali od pričetka infuzije do časovne točke meritve in je vključeval poleg odmerkov infuzije tudi odmerke bolus injekcij fentanila. Prav tako nas je zanimal vpliv izbranih dejavnikov na varnost terapije s fentanilom. V tem primeru je odvisno spremenljivko predstavljal pojav odtegnitvenih simptomov, ki je bil ovrednoten po lestvici Finnegan. Vrednost Finnegan je bila določena v treh časovnih točkah: v točki 1 (2 uri po prekinitvi infuzije fentanila), v točki 2 (8 ur po prekinitvi infuzije) in v točki 3 (naslednji dan po prekinitvi infuzije). Neodvisne spremenljivke pa so bile starost, telesna masa, genotipi izbranih polimorfizmov in celokupni odmerek, ki smo ga izračunali od pričetka in do konca dajanja infuzije in je vseboval poleg odmerkov infuzije tudi odmerke bolus injekcij. Da bi čim bolje prikazali vpliv izbranih dejavnikov na terapijo s fentanilom, smo izbrali tri časovne točke, ki so

bile podane za večino bolnikov in so bile dovolj narazen, da bi lahko prikazali trend vpliva izbranih dejavnikov skozi čas.

V statistično analizo smo vključili 48 bolnikov, 16 deklic in 32 dečkov. Enega bolnika smo iz analize izključili, saj so bili podatki o terapiji s fentanilom podani nepopolno in zato izračun kumulativnih odmerkov in celokupnega odmerka ni bil mogoč. Podatki, potrebni za statistično analizo so prikazani v Prilogi 3.

Zanimalo nas je ali se povprečna starost, telesna masa, celokupni odmerek in doba hospitalizacije med spoloma značilno razlikujejo oz. ali spol vpliva na vrednotene parametre. Podatki o izbranih parametrih glede na spol so prikazani v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Prikaz podatkov o starosti, telesni masi in dobi hospitalizacije vključenih bolnikov in celokupnem odmerku fentanila glede na spol bolnikov (Ž = 16, M = 32).

(Ž = ženski, M = moški, m = mesec, min = najmanjša vrednost, max = največja vrednost)

	Spol	**Mediana**	**Min**	**Max**	**25. percentil**	**75. percentil**
Starost (m)	Ž	2	0,5	28	1	11,25
	M	2	0,5	29	1	3,75
Telesna masa (kg)	Ž	5,28	3,35	12,00	3,95	8,52
	M	5,28	2,80	13,50	4,14	7,03
Doba hospitalizacije (dan)	Ž	5,22	1,85	18,85	3,94	7,06
	M	5,80	1,77	14,51	4,33	7,21
Celokupni odmerek (µg)	Ž	1941,76	295,32	19521,59	951,41	3173,84
	M	2169,36	134,82	22004,46	1096,18	5444,24

Najprej smo uporabili Levenov test, s katerim smo ugotovili ali sta varianci pri obeh skupinah enaki in nato neodvisni t-test. Rezultati so prikazani v preglednici XX. Ugotovili smo, da se povprečna starost, telesna masa, celokupni odmerek in doba hospitalizacije med spoloma ne razlikuje značilno. Iz tega lahko sklepamo, da sam spol v proučevani skupini bolnikov ne vpliva na terapijo s fentanilom. Posledično spola nismo vključili v statistično analizo za ugotavljanje vpliva posameznih dejavnikov na stopnjo sedacije, stopnjo neugodja in pojav odtegnitvenih simptomov.

Preglednica XX: Rezultati analize vpliva spola na povprečno starost, telesno maso, celokupni odmerek in dobo hospitalizacije.

(F = F test, t = t-test, df = stopinje prostosti)

Starost				
Levenov test			t-test	
F	p	t	df	p
0,016	0,901	0,064	46	0,949
Telesna masa				
Levenov test			t-test	
F	p	t	df	p
0,065	0,799	0,132	46	0,895
Celokupni odmerek				
Levenov test			t-test	
F	p	t	df	p
0,030	0,863	- 0,80	46	0,937
Doba hospitalizacije				
Levenov test			t-test	
F	p	t	df	p
0,236	0,629	- 0,69	46	0,945

S Shapiro-Wilkovim testom smo preverili normalnost porazdelitve vseh spremenljivk. Ugotovili smo, da se telesna masa, doba hospitalizacije, vrednosti BIS porazdeljujejo normalno v vseh časovnih točkah, vrednosti Finnegan pa samo v 1. in 3. časovni točki, saj je bila v teh primerih $p > 0,05$. Po logaritmiranju so je normalno porazdeljeval tudi celokupni odmerek. Starost, vrednosti Comfort-B in vrednosti Finnegan v 2. časovni točki pa se niso porazdeljevale normalno.

Z ANOVO oz. s Kruskal-Wallis testom smo proučili ali se vrednosti posameznih parametrov (telesna masa, starost, kumulativni in celokupni odmerki, vrednosti BIS, Comfort-B in Finnegan) značilno razlikujejo med posameznimi genotipi polimorfizmov (Preglednica XXI). Ugotovili smo, da so razlike med genotipi polimorfizma *COMT* Val158Met v drugi časovni točki za vrednost Comfort-B blizu značilnim ($p = 0,079$), medtem ko so razlike med genotipi *OPRM1* A118G za vrednosti Finnegan značilne v 1. ($p = 0,005$) in 2. časovni točki ($p = 0,027$).

Preglednica XXI: Prikaz rezultatov ugotavljanja razlik v izbranih parametrih med genotipi proučevanih polimorfizmov z ANOVA oz. Kruskall-Wallis testom

	***ABCB1* C3435T**	***COMT* Val158Met**	***OPRM1* A118G**
Izbrani parametri	**p**	**P**	**p**
Telesna masa (kg)	0,801	0,516	0,306
Doba hospitalizcije (dan)	0,357	0,942	0,994
Celokupni odmerek (µg)	0,840	0,764	0,861
BIS 1[1]	0,753	0,377	0,263
BIS 2[1]	0,954	0,402	0,323
BIS 3[1]	0,826	0,517	0,255
Comfort-B 1[2]	0,634	0,269	0,522
Comfort-B 2[2]	0,604	**0,079**	0,771
Comfort-B 3[2]	0,687	0,666	0,369
Finnegan 1[3]	0,692	0,123	**0,005**
Finnegan 2[3]	0,829	0,937	**0,027**
Finnegan 3[3]	0,952	0,592	0,580

[1] Vrednosti BIS določene v 1., 2. oz. 3. časovni točki

[2] Vrednosti Comfort-B določene v 1., 2. oz. 3. časovni točki

[3] Vrednosti Finnegan določene v 1., 2., oz. 3. časovni točki

4.4.3.1 Vpliv dejavnikov na stopnjo sedacije

Da bi ugotovili vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov na variabilnost vrednosti BIS, s katerim se je merila stopnja sedacije, smo uporabili metodo multivariatne linearne regresije. Preglednica XXII prikazuje rezultate multivariatne linearne regresije. Značilen vpliv na vrednosti BIS ima samo kumulativni odmerek v 1. točki merjenja. Blizu značilnemu vplivu v 1. časovni točki je tudi genotipski dejavnik *COMT* GA. Koeficient determinacije R^2, ki ga dobimo kot enega izmed rezultatov linearne regresije, pove delež variabilnosti odvisne spremeniljivke za katerega so odgovorne neodvisne spremenljivke. Iz preglednice XXII tako razberemo, da naš model v 1., 2. oz. 3. točki meritve opisuje 44,6 %, 8,1 % oz. 16 % delež variabilnosti odvisne spremenljivke. Popravljalni koeficient determinacije $R^2_{Adj.}$ te vrednosti posploši na populacijo, pove namreč delež variabilnosti za katerega bi bili odgovorni dejavniki, če bi model predstavljal celotno populacijo iz katere je bil vzet vzorec. $R^2_{Adj.}$ je vedno manjši od R^2. R^2_{Adj} se v SPSS določi z Wherryjevim obrazcem in je lahko v primeru, ko imamo glede na velikost vzorca preveliko število parametrov, negativen (84).

Preglednica XXII: Prikaz multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva izbranih dejavnikov na vrednost BIS

(m = mesec, B = regresijski koeficient, SE = standarna napaka regresijskega koeficienta, R^2 = koeficient determinacije, $R^2_{Adj.}$ = popravljalni koeficient determinacije)

1. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	0,657	0,423	0,129	0,446	0,332
Telesna masa (kg)	- 1,854	1,709	0,285		
Kumulativni odmerek (µg)	0,036	0,015	**0,017**		
ABCB1 AG[1]	- 1,518	3,943	0,702		
ABCB1 AA[2]	- 1,581	4,897	0,749		
COMT AG[3]	9,211	5,455	**0,099**		
COMT AA[4]	4,114	5,375	0,449		
OPRM1 GA[5]	1,837	3,882	0,639		
2. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	0,169	0,675	0,803	0,081	- 0,148
Telesna masa (kg)	- 0,700	2,176	0,750		
Kumulativni odmerek (µg)	0,002	0,004	0,657		
ABCB1 AG[1]	0,049	5,598	0,993		
ABCB1 AA[2]	- 5,023	8,286	0,549		
COMT AG[3]	- 8,813	9,897	0,380		
COMT AA[4]	- 7,998	10,046	0,432		
OPRM1 GA[5]	1,799	6,891	0,796		
3. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	1,133	0,822	0,181	0,16	- 0,132
Telesna masa (kg)	- 1,805	2,855	0,533		
Kumulativni odmerek (µg)	- 0,002	0,004	0,665		
ABCB1 AG[1]	- 2,527	7,352	0,734		
ABCB1 AA[2]	- 7,698	9,590	0,430		
COMT AG[3]	- 12,704	13,106	0,342		
COMT AA[4]	- 6,050	12,883	0,643		
OPRM1 GA[5]	1,577	8,189	0,849		

[1] Vpliv *ABCB1* AG glede na *ABCB1* GG; [2] Vpliv *ABCB1* AA glede na *ABCB1* GG; [3] Vpliv *COMT* AG glede na *COMT* GG; [4] Vpliv *COMT* AA glede na *COMT* GG; [5] Vpliv *OPRM1* GA glede na *OPRM1* AA.

Da bi se prepričali o značilnem vplivu neodvisnih spremenljivk, smo dodatno naredili še tri modele. V te modele smo vključili le tiste spremenljivke, ki so v prvem modelu značilno vplivale na odvisno spremenljivko oz. so se temu precej približale ($p < 0,1$). V modele smo torej dodali kumulativni odmerek, izračunan od pričetka infuzije do prve časovne točke in

polimorfizem gena *COMT*. Tri modele smo naredili zato, da bi lahko bolj podrobno proučili vpliv posameznega genotipa gena *COMT* na odvisno spremenjivko. Genotipe smo tudi tokrat predstavili kot kategorične spremenljivke. Rezultate dodatne linearne regresije prikazuje preglednica XXIII.

Preglednica XXIII: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva kumulativnega odmerka in gena *COMT* na vrednosti BIS

(B = regresijski koeficient, SE = standarna napaka regresijskega koeficienta, R^2 = koeficient determinacije, $R^2_{Adj.}$ = popravljalni koeficient determinacije)

1. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Kumulativni odmerek (µg)	0,036	0,007	< **0,001**		
COMT AG[1]	10,819	5,032	**0,037**	0,398	0,357
COMT AA[2]	5,049	5,206	0,337		
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Kumulativni odmerek (µg)	0,35	0,007	< **0,001**	0,353	0,324
COMT AG in *COMT* AA[3]	8,446	4,984	0,097		
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Kumulativni odmerek (µg)	0,033	0,007	< **0,001**	0,335	0,305
COMT AG in *COMT* GG[4]	4,007	3,180	0,214		

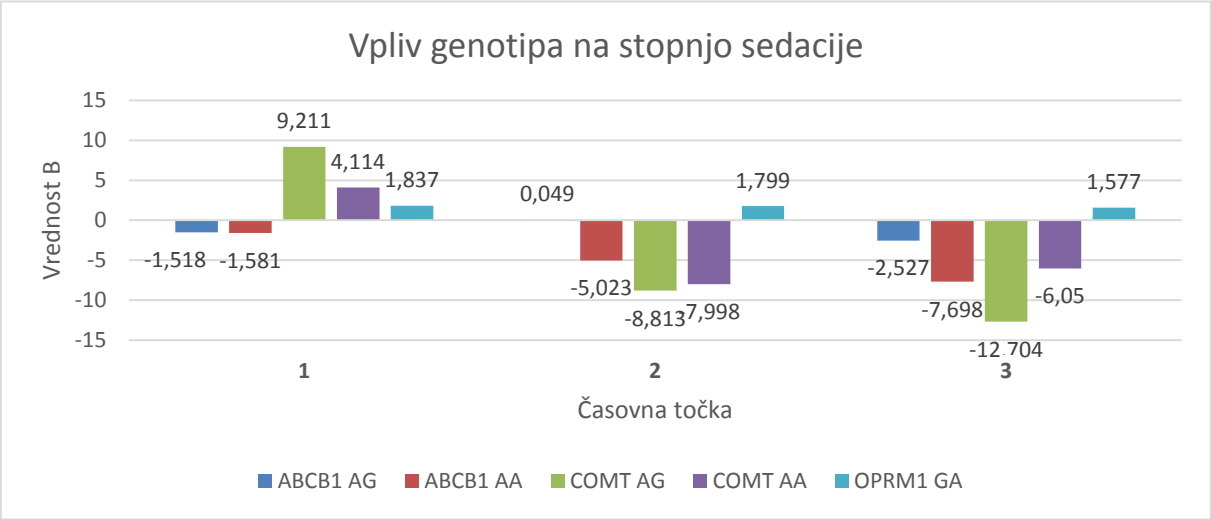
[1] Vpliv *COMT* AG glede na *COMT* GG; [2] Vpliv *COMT* AA glede na vpliv *COMT* GG; [3] Vpliv *COMT* AG in *COMT* AA glede na *COMT* GG; [4] Vpliv *COMT* AG in *COMT* GG glede na *COMT* AA.

Iz preglednice XXIII razberemo, da kumulativni odmerek v 1. točki meritve res vpliva na stopnjo sedacije. Na vrednosti BIS pa glede na nemutiran homozigot značilno vpliva tudi heterozigot *COMT* AG. Vpliv mutiranega homozigota glede na nemutirani homozigot ni značilen. Vidimo, da je v primeru, ko smo opazovali vpliv *COMT* AG in *COMT* AA glede na *COMT* GG, le-ta bližje značilnemu, kot v primeru ko smo opazovali vpliv *COMT* AG in *COMT* GG glede na *COMT* AA.

Skupino bolnikov, ki bi ustrezala vsem pogojem za vključitev v našo raziskavo, smo zbirali več let. Glede na to, da ima hujšo obliko akutnega bronhiolitisa, ki zahteva terapijo s fentanilom, le 1-2 % hospitaliziranih otrok (1) je zelo težko zbrati večji vzorec, ki bi bil bolj reprezentativen. Naš vzorec je premajhen, da bi lahko z veliko gotovostjo potrdili značilnost vplivov posameznih genotipov na stopnjo sedacije. Zato smo se odločili, da s pomočjo koeficienta B iz multivariatne linearne regresije prikažemo smer vpliva proučevanih polimorfizmov na vrednosti BIS. S tem

sicer ne moremo sklepati o značilnosti vpliva, lahko pa prikažemo trende vpliva, kot jih prikazuje slika 10 in bi jih lahko potrdili z nadaljnjo analizo na večjem vzorcu.

Koeficient B nam pove, kako bi se spremenila odvisna spremenljivka, če bi se neodvisna spremenljivka spremenila za eno enoto. Genotipe smo predstavili kot dihotomno spremenljivko. Na primer pri *ABCB1* AG bi to pomenilo, da v 1. točki meritve sprememba iz referenčne skupine (*ABCB1* GG) v primerjalno skupino *ABCB1* AG vpliva na znižanje vrednosti BIS.



Slika 10: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na stopnjo sedacije v 1., 2. in 3. časovni točki.

Na sliki vidimo, da heterozigot in mutirani homozigot *ABCB1* kažeta negativen vpliv na vrednosti BIS in s tem na višjo stopnjo sedacije. Zlasti v 2. in 3. časovni točki lahko opazimo, da je pri mutiranem homozigotu *ABCB1* trend padanja vrednosti B večji od trenda padanja heterozigota. To bi lahko pomenilo, da je za dosežen učinek fentanila pri mutiranem homozigotu potreben nižji odmerek, kar je v skladu z že opravljenimi raziskavami pri odraslih (61, 64).

Heterozigot in mutirani homozigot *COMT* vplivata na vrednosti BIS v 1. točki pozitivno, v 2. in 3. točki pa negativno. Drugačen vpliv v 1. točki bi lahko bil posledica še ne vzpostavljenega stacionarnega stanja infuzije fentanila. Negativni vpliv v 2. in 3. točki pa nakazuje, da je v primeru prisotnosti genotipov AG in AA vrednost BIS nižja oz. stopnja sedacije višja, kar je v skladu z rezultati že več opravljenih raziskav na odraslih. V raziskavah namreč navajajo, da so

pri mutiranem homozigotu gena *COMT* za dosego učinkovitosti opioidov potrebni nižji odmerki (54, 55, 56).

Heterozigot *OPRM1* kaže v vseh treh točkah meritve pozitiven vpliv na vrednost BIS oz. na nižjo stopnjo sedacije. Iz tega bi lahko sklepali, da so za ustrezno sedacijo pri heterozigotu potrebni višji odmerki. Te ugotovitve ustrezajo tistim v raziskavah, kjer navajajo, da so pri nemutiranem homozigotu *OPRM1* za učinek opioida potrebni nižji odmerki (57, 68, 69, 70).

4.4.3.2 Vpliv dejavnikov na stopnjo neugodja

Tudi pri ugotavljanju vpliva izbranih dejavnikov na stopnjo neugodja smo uporabili metodo multivariatne linearne regresije. Iz preglednice XXIV je razvidno, da naš model opiše 34,9 %, 33,8 % oz. 46,2 % delež variabilnosti odvisne spremenljivke v 1., 2. oz. 3. časovni točki. Iz preglednice XXIV razberemo, da ima telesna masa v 1. in 3. časovni točki značilen vpliv na vrednost Comfort-B. Tudi v 2. časovni točki je vpliv telesne mase na Comfort-B blizu značilnemu. V 1. časovni točki ima značilen vpliv še kumulativni odmerek, v 2. časovni točki pa sta blizu značilnemu vplivu tudi genotipa AG in AA gena *COMT*.

Preglednica XXIV: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva posameznih dejavnikov na Comfort-B.

(m = mesec, B = regresijski koeficient , SE = standarna napaka regresijskega koeficienta, R^2 = koeficient determinacije, $R^2_{Adj.}$ = popravljalni koeficient determinacije)

1. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	- 0,174	0,111	0,125	0,349	0,208
Telesna masa (kg)	1,587	0,433	**0,001**		
Kumulativni odmerek (µg)	- 0,012	0,004	**0,003**		
ABCB1 AG[1]	0,758	1,021	0,462		
ABCB1 AA[2]	0,493	1,325	0,712		
COMT AG[3]	- 0,863	1,398	0,541		
COMT AA[4]	- 1,424	1,375	0,307		
OPRM1 GA[5]	0,486	0,993	0,627		

Nadaljevanje preglednice XXIV:

2. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	- 0,135	0,150	0,377	0,338	0,172
Telesna masa (kg)	0,893	0,503	**0,085**		
Kumulativni odmerek (µg)	0,000	0,001	0,767		
ABCB1 AG[1]	1,034	1,339	0,446		
ABCB1 AA[2]	0,687	1,803	0,706		
COMT AG[3]	- 4,361	2,326	**0,070**		
COMT AA[4]	- 4,332	2,345	**0,074**		
OPRM1 GA[5]	- 1,121	1,505	0,462		
3. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Starost (m)	- 0,026	0,227	0,911	0,462	0,275
Telesna masa (kg)	2,103	0,779	**0,013**		
Kumulativni odmerek (µg)	- 0,001	0,001	0,367		
ABCB1 AG[1]	2,148	1,931	0,277		
ABCB1 AA[2]	1,563	2,333	0,509		
COMT AG[3]	- 2,088	3,508	0,558		
COMT AA[4]	- 3,232	3,520	0,368		
OPRM1 GA[5]	- 2,400	2,421	0,332		

[1] Vpliv *ABCB1* AG glede na *ABCB1* GG; [2] Vpliv *ABCB1* AA glede na *ABCB1* GG; [3] Vpliv *COMT* AG glede na *COMT* GG; [4] Vpliv *COMT* AA glede na *COMT* GG; [5] Vpliv *OPRM1* GA glede na *OPRM1* AA.

Da bi potrdili značilnost smo naredili dodatne tri modele za 2. časovno točko, v katere smo vključili le telesno maso in genotipe gena *COMT* (Preglednica XXV).

Preglednica XXV: Prikaz rezultatov multivariatne linearne regresije pri proučevanju vpliva kumulativnega odmerka in gena *COMT* na vrednosti BIS.

(m = mesec, B = regresijski koeficient, SE = standarna napaka regresijskega koeficienta, R^2 = koeficient determinacije, $R^2_{Adj.}$ = popravljalni koeficient determinacije)

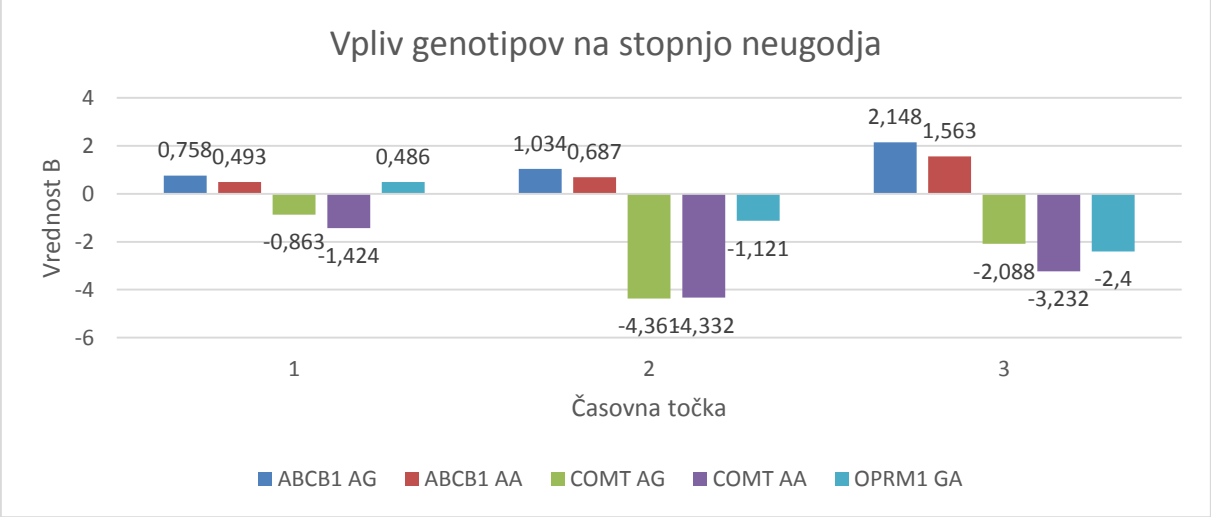
2. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Telesna masa (kg)	0,394	0,179	**0,034**	0,287	0,231
COMT AG	- 4,550	1,759	**0,014**		
COMT AA	- 4,069	1,836	**0,033**		
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Telesna masa (kg)	0,396	0,177	**0,031**	0,283	0,247
COMT AG in *COMT* AA	- 4,368	1,695	**0,014**		

Nadaljevanje preglednice XXV:

2. časovna točka					
Napovednik	**B**	**SE**	**p**	**R^2**	**$R^2_{Adj.}$**
Telesna masa (kg)	0,508	0,186	**0,009**	0,162	0,119
COMT AG in *COMT* GG	0,146	1,107	0,896		

[1] Vpliv *COMT* AG glede na *COMT* GG; [2] Vpliv *COMT* AA glede na vpliv *COMT* GG; [3] Vpliv *COMT* AG in *COMT* AA glede na *COMT* GG; [4] Vpliv *COMT* AG in *COMT* GG glede na *COMT* AA.

Tudi v tem primeru smo želeli proučiti trende vplivov genotipskih dejavnikov na vrednost Comfort-B, kar prikazuje slika 11.



Slika 11: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na stopnjo neugodja v 1., 2. in 3. časovni točki.

Na sliki vidimo, da heterozigot in mutirani homozigot gena *ABCB1* v vseh treh točkah meritve pozitivno vpliva na vrednosti Comfort-B, kar pomeni višji seštevek točk po lestvici Comfort-B in s tem višjo stopnjo neugodja.

Heterzigot in mutirani homozigot gena *COMT* v vseh točkah dajeta negativen vpliv na vrednosti Comfort-B. Ta ugotovitev bi bila v skladu z mehanizmom delovanja polimorfizma *COMT* in v skladu z rezultati že opravljenih raziskav (54, 55, 56).

Heterozigot gena *OPRM1* v 2. in 3. časovni točki na seštevek točk Comfort-B kaže negativen vpliv, kar pomeni, da je stopnja neugodja nižja.

Iz grafa 2 lahko razberemo smer vpliva, vendar ne moremo zaključiti kaj to pomeni za terapijo s fentanilom, saj bi bile potrebne nadaljnje analize. Poleg tega je potrebno poudariti, da je vrednotenje po lestvici Comfort-B precej subjektivno. V idealnem primeru bi moralo biti vrednotenje v vseh točkah meritve izvedeno s strani iste osebe. Subjektivnost in vrednotenje stanja s strani različnih oseb bi lahko vplivala na rezultat raziskave.

4.4.3.3 Vpliv dejavnikov na pojav odtegnitvenih simptomov

Da bi analizirali vpliv izbranih dejavnikov na pojav odtegnitvenih simptomov smo izbrali metodo multiple logistične regresije. Preiskovance smo razdelili v dve skupini in sicer so eno skupino predstavljali tisti, katerih vrednost določena po Finneganu je bila nižja od 8, drugo skupino pa so predstavljali preiskovanci, katerih vrednost je bila višja od 8. Število 8 smo izbrali, ker je to meja, pri kateri je že potrebno zdravljenje odtegnitvenih simptomov Preglednica XXVI prikazuje rezultate statistične analize iz katerih je razvidno, da nobeden od dejavnikov ne vpliva značilno na pojav odtegnitvenih simptomov.

Eden izmed rezultatov multiple logistične regresije je tudi razmerje obetov (Exp(B)) (Preglednica XXVI). Razmerje obetov oceni spremembo v obetih, ki je posledica spremembe neodvisne spremenljivke za eno enoto. V primeru polimorfizmov sprememba za eno enoto pomeni drug genotip polimorfizma. Če je Exp(B) večje od 1 pomeni, da je pri povečanju vrednosti napovednika, verjetnost pojava dogodka večja. Če je Exp(B) manjše od nič pomeni, da je pri povečanju vrednosti napovednika, verjetnost pojava dogodka manjša. Dogodek je v našem primeru vrednost Finnegan večja od 8.

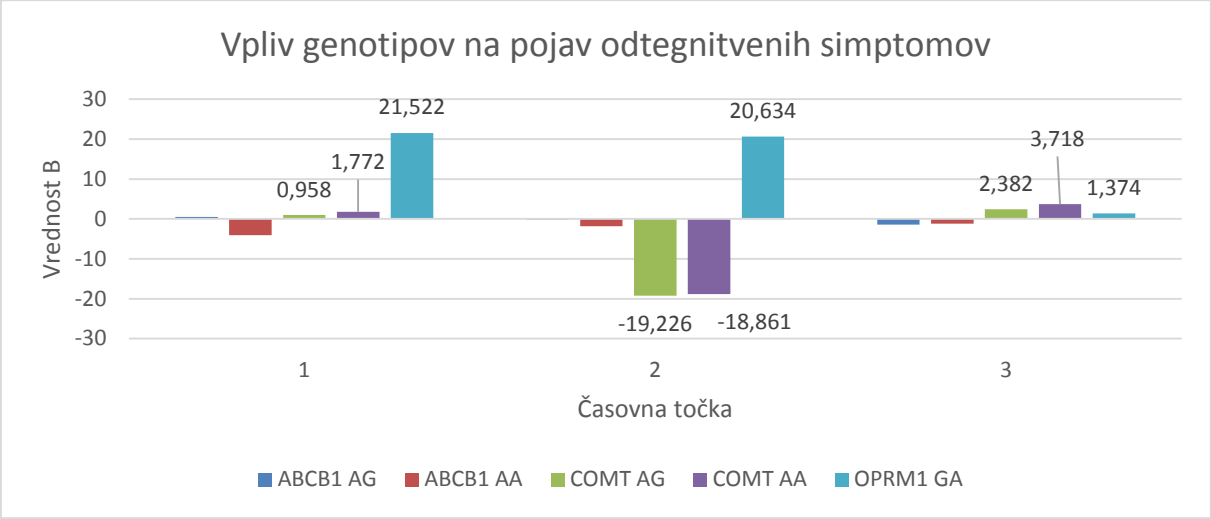
Preglednica XXVI: Prikaz rezultatov multiple logistične regresije pri proučevanju vpliva posameznih dejavnikov na vrednosti Finnegan.

(m = mesec, B = regresijski koeficient, SE_B = standarna napaka regresijskega koeficienta, Exp(B) = razmerje obetov)

1. časovna točka				
Napovednik	**B**	**SE_B**	**p**	**Exp(B)**
Starost (m)	- 0,519	0,316	0,101	0,595
Telesna masa (kg)	1,172	0,775	0,130	3,230
Celokupni odmerek (µg)	0,000	0,000	0,221	1,000
Doba hospitalizacije (dan)	- 0,877	0,607	0,149	0,416
ABCB1 AG[1]	0,461	1,574	0,770	1,585
ABCB1 AA[2]	- 4,094	2,657	0,123	0,017
COMT AG[3]	0,958	2,294	0,676	2,606
COMT AA[4]	1,772	2,259	0,433	5,885
OPRM1 GA[5]	21,522	10890,862	0,998	2221910975
2. časovna točka				
Napovednik	**B**	**SE_B**	**p**	**Exp(B)**
Starost (m)	- 0,270	0,266	0,310	0,763
Telesna masa (kg)	0,854	0,61	0,189	2,350
Kumulativni odmerek (µg)	0,000	0,001	0,847	1,000
Doba hospitalizacije (dan)	- 0,275	0,425	0,518	0,759
ABCB1 AG[1]	- 0,108	1,248	0,931	0,897
ABCB1 AA[2]	- 1,821	1,908	0,340	0,162
COMT AG[3]	- 19,226	19606,356	0,999	0,000
COMT AA[4]	- 18,861	19606,356	0,999	0,000
OPRM1 GA[5]	20,634	13242,757	0,999	914442001,2
3. časovna točka				
Napovednik	**B**	**SE_B**	**p**	**Exp(B)**
Starost (m)	- 0,450	0,304	0,139	0,638
Telesna masa (kg)	0,773	0,547	0,158	2,166
Kumulativni odmerek (µg)	0,000	0,000	0,720	1,000
Doba hospitalizacije (dan)	- 0,032	0,263	0,903	0,968
ABCB1 AG[1]	- 1,427	1,155	0,217	0,240
ABCB1 AA[2]	- 1,217	1,646	0,460	0,296
COMT AG[3]	2,382	2,660	0,371	10,826
COMT AA[4]	3,718	2,745	0,176	41,173
OPRM1 GA[5]	1,374	2,015	0,495	3,952

[1] Vpliv *ABCB1* AG glede na *ABCB1* GG; [2] Vpliv *ABCB1* AA glede na *ABCB1* GG; [3] Vpliv *COMT* AG glede na *COMT* GG; [4] Vpliv *COMT* AA glede na *COMT* GG; [5] Vpliv *OPRM1* GA glede na *OPRM1* AA.

Ker vrednosti po Finneganu ni bilo podanih v kar precej primerih in zaradi majhnosti vzorca, smo se odločili, da se osredotočimo na prikaz vpliva genotipov na vrednosti Finnegan, kar prikazuje slika 12.



Slika 12: Vpliv genotipa (koeficient B iz multivariatne linearne regresije) na pojav odtegnitvenih simptomov v 1., 2. in 3. časovni točki.

Iz grafa je razvidno, da v 1. in 2. časovni točki izstopajo vrednosti za heterozigot gena *OPRM1* in sicer kažejo pozitiven vpliv na vrednosti Finnegan.

V 2. časovni točki precej izstopata tudi vrednosti za heterozigota in mutiranega homozigota gena *COMT*. V tem primeru se kaže negativen vpliv, kar bi lahko pomenilo, da vpliva na nižji seštevek točk po Finneganu.

Iz dobljenih rezultatov smo sicer nakazali smer vpliva posameznih genotipov na pojav odtegnitvenih simptomov, vendar bi bil potreben precej večji vzorec ter objektivno vrednotenje in redno podajanje rezultatov po Finneganu, da bi lahko z večjo verjetnostjo ugotovili in potrdili smer vpliva.

5 SKLEPI

S farmakogenetsko analizo smo ugotovili oz. določili naslednje:

- Frekvence polimorfizma *ABCB1* C3435T so bile: GG 29 %, AG 49 % in AA 22 %.
- Frekvence polimorfizma *COMT* Val158Met so bile: Val/Val 10 %, Met/Val 55 % in Met/Met 35 %.
- Frekvence polimorfizma *OPRM1* A118G so bile: AA 76 % in GA 24 %. Mutiranih homozigotov v tem primeru nismo zasledili.
- Frekvence vseh proučevanih genotipov so v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem ter v skladu s frekvencami določenimi za Centralno Evropo.
- Pri primerjavi povprečne starosti in telesne mase, povprečnega celokupnega odmerka in povprečne dobe hospitalizacije med spoloma nismo ugotovili značilnih razlik.
- Pri določanju vpliva okoljskih in genetskih dejavnikov na stopnjo sedacije smo ugotovili, da: v 1. točki meritve na višje vrednosti BIS značilno vplivata kumulativni odmerek in prisotnost genotipa GA gena *COMT*.
- Na stopnjo neugodja v vseh točkah meritve značilno vpliva telesna masa v pozitivni smeri, medtem ko kumulativni odmerek v 1. točki meritve ter heterozigot in mutiran homozigot polimorfizma *COMT* Val158Met v 2. časovni točki značilno vplivajo na nižjo stopnjo neugodja.
- Izbrani dejavniki nimajo značilnega vpliva na pojav odtegnitvenih simptomov, vrednotenih z vrednostjo Finnegan.

To je prva raziskava vplivov genetskih dejavnikov na terapijo s fentanilom pri otrocih z akutnim bronhiolitisom, mlajših od dveh let. V raziskavi smo ugotovili, da polimorfizem *COMT* Val158Met značilno vpliva na terapijo s fentanilom in sicer so v primeru heterozigota in mutiranega homozigota potrebni nižji odmerki fentanila za dosežen učinek. Da bi lahko z večjo gotovostjo sklepali o vplivu izbranih polimorfizmov na stopnjo sedacije, stopnjo neugodja in pojav odtegnitvenih simptomov predlagamo ugotavljanje vplivov na večjem vzorcu otrok, mlajših od dveh let, ki zaradi potrebe po sedaciji prejemajo intravensko infuzijo fentanila.

6 LITERATURA

(1) Bronchiolitis in children – a national clinical guideline. Scottish Intercollegiate Guidelines Network 2006. Gradivo dostopno na 10. 6. 2013: http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf.

(2) Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: Recent evidence on diagnosis and management. Pediatrics 2010; 125(2): 342-349.

(3) Nagakumar P, Doull I. Current therapy for bronchiolitis. Arch Dis Child 2012; 97(9): 827-830.

(4) Ricart S, Marcos MA, Sarda M, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. Pediatric Pulmonology 2012; 1-8.

(5) Mansbach JM, Piedra PA, Stevenson MD, et al. Prospective multicenter study of children with bronchiolitis requiring mechanical ventilation. Pediatrics 2012; 130(3): 492-500.

(6) Sočan M., Petrovec M., Berginc N., et al. Uvedba laboratorijskega spremljanja respiratornega sincicijskega virusa v Sloveniji. Zdravniški vestnik 2007; (7): 1-7.

(7) Košnik M., Mravlje F., Štajer D., et al. Interna medicina. Slovensko medicinsko društvo 2011: 410-412.

(8) Brand H. K., De Groot R., Galama J.M.D., et al., Warris A. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. Pediatric Pulmonology 2012; (47): 393-400.

(9) Jat KR, Chawla D. Surfactant therapy for bronchiolitis in critically ill infants. The Cochrane Database of Systemic Reviews 2012; (9): CD009194.

(10) Chan PWK, Goh AYT, Lum LCS. Respiratory failure requiring ventilation in acute bronchiolitis. Med J Malaysia 1999; 54(4): 487-491.

(11) Maxwell CS, Carbone ET, Wood RJ. Better newborn vitamin D status lowers RSV-associated bronchiolitis in infants. Nutrition Reviews 2012; 70(9): 548-552.

(12) Dornelles CTL, Piva JP, Marostica PJC. Nutritional status, breastfeeding, and evolution of infants with acute viral bronchiolitis. Journal of Health, Population and Nutrition 2007; 25(3): 336-343.

(13) Carroll KN, Gebretsadik T, Griffin MR, et al. Maternal asthma and maternal smoking are associated with increased risk of bronchiolitis during infancy. Pediatrics 2007; 119(6): 1104-1112.

(14) Parker MJ, Allen U, Stephens D, et al. Predicotrs of major intervention in infants with bronchiolitis. Pediatric Pulmonology 2009; (44): 358-363.

(15) Ebell MH. Risk stratification of children with bronchiolitis. American Family Physician 2012; 86(3): 278-279.

(16) Lanari M, Silvestri M, Rossi GA. Respiratory syncytial virus in late preterm infants. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2009; 22(3): 102-107.

(17) Hall CB, Lieberhal AS. Viral testing and isolation of patients with bronchiolitis. Pediatrics 2007; 120(4): 893-894.

(18) Diagnosis and management of bronchiolitis – Clinical practice guideline. Pediatrics 2006; 118(4): 1774-1793.

(19) Eber E. Treatment of acute viral bronchiolitis. The Open Microbiology Journal 2011; (5): 159-164.

(20) Unger S, Cunningham S. Effect of oxygen supplementation on length of stay for infants hospitalized with acute viral bronchiolitis. Pediatrics 2008; 121(3): 470-475

(21) Dysart K, Miller TL, Wolfson MR, et al. Research in high flow therapy: Mechanism of action. Respiratory Medicine 2009; (103): 1400-1405.

(22) Schibler A, Pham TMT, Dunster KR, et al. Reduced intubation rates for infants after introducing of high-flow nasal prong oxygen delivery. Intensive Care Med 2011; 37(5): 847-852.

(23) Greenough A. Role of ventilation in RSV disease: CPAP, ventilation, HFP, ECMO. Pediatric Respiratory Reviews 2009; 10(1); 26-28.

(24) Mansbach JM, Piedra PA, Stevenson MD, et al. Prospective multicenter study of children with bronchiolitis requiring mechanical ventilation. Pediatrics 2012; 130(3): 492-500.

(25) 21. mednarodni simpozij intenzivne medicine in 18. seminar intenzivne medicine za medicinske sestre in zdravstvene tehnike. Slovensko združenje za intenzivno medicino 2012: 53-56. Gradivo dostopno na 10. 6. 2013: http://www.szim.si/e_zbornik2012.pdf.

(26) Gadomski AM, Brower M. Bronchodilators for bronchiolitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010; (12): CD001266.

(27) Skjerven HO, Hunderi JOG, Brügmann-Pieper SK, et al. Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis. The New England Journal of Medicine 2013; 368(24): 2286-2293.

(28) Harding L, Bialy LM, Vandermeer B, Tjosvold L, et al. Epinephrine for bronchiolitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2011; (6): CD003123.

(29) Fernandes RM, Bialy LM, Vandermeer B, et al. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013; (6): CD004878.

(30) Mejias A, Ramilo O. Review of plavizumab in the prophylaxix of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. Biologics: Targets & Therapy 2008; 2(3): 433-439.

(31) Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, et al. Nebulized hypertonic saline for acute bronchiolitis in infants. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008; (4): CD006458.

(32) Bellu R, de Waal KA, Zanini R. Opioids for neonates receiving mechanical ventilation. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013; (2): CD004212.

(33) Welzing L, Oberthuer A, Junghaenel S, et al. Remifentanil/midazolam versus fentanyl/midazolam for analgesia and sedation of mechanically ventilated neonates and young infants: a randomized controlled trial. Intensive Care Medicine 2012; (38): 1017-1024.

(34) Somogyi AA, Barratt DT, Coller JK. Pharmacogenetics of Opioids. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2007; 81(3): 429-444.

(35) Mather LE. Clinical pharmacokinetics of fentanyl and its newer derivatives. Clinical pharmacokinetics 1983; (8): 422-446.

(36) Povzetki glavnih značilnosti zdravila (SmPC). Gradivo dostopno na 10. 6. 2014: http://si.draagle.com/#!/browse/group/fGFdArAKwIkk36-wG4jmZg==/

(37) Anderson BJ, Holford NHG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of analgesic drugs. Gradivo dostopno na 12. 6. 2013: http://www.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780444520616/9780444520616.pdf.

(38) Trivedi M, Shaikh S, Gwinnutti C. Pharmacology of opioids II. Gradivo dostopno na: http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100946.

(39) Simons SHP, Anand KJS. Pain control: Opioid dosing, population kinetics and side-effects. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 2006; (11): 260-267.

(40) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. Rang and Dale's pharmacology. Elsevier Churchill Livingstone 2012; 518.

(41) Drug information for the health care professional Volume I. Micromedex Thomson Healthcare 2002, 22nd edition: 1464-1466.

(42) Shargel L. Applied biophramaceutics & pharmacokinetics. McGraw Hill 2012, 6th edition: 584-585.

(43) Casarett & Doull's. Toxicology, the basic science of poisons. McGraw Hill 2001, 6th edition: 877-878.

(44) Singleton MA, Rosen JI, Fisher DM. Plasma concentrations of fentanyl in infants, children and adults. Canadian Journal of Anaesthesia 1987; 34(2): 152-155.

(45) Thornton SR, Smith FL. Long-term alterations in opiate antinociception resulting from infant fentanyl tolerance and dependance. European Journal of Pharmacology 1998; (363): 113-119.

(46) Franck LS, Naughton I, Winter I. Opioid and benzodiazepine withdrawal symptoms in paediatric intensive care patients. Intensive and Critical Care Nursing 2004; (20): 344-351.

(47) Dominguez KD, Lomako DM, Katz RW, et al. Opioid withdrawal in critically ill neonates. The Annals of Pharmacotherapy 2003; (37): 473-477.

(48) Niesters M, Overdyk F, Smith T, et al. Opioid-induced respiratory depression in pediatrics: a review of case reports. British Journal of Anaesthesia 2013; 110(2): 175-182.

(49) Shi Q, Cleeland CS, Klepstad P, et al. Biological pathways and genetic variables involved in pain. Quality of Life Research 2010; (19): 1407-1417.

(50) Rhodin A, Grönbladh A, Ginya H, et al. Combined analysis of circulating beta-endorphin with gene polymorphisms in OPRM1, CACNAD2 and ABCB1 reveals corelation with pain, opioid sensitivity and opioid-related side effects. Molecular Brain 2013; 6(8): 1-25.

(51) Mlinarič-Raščan I. Farmakogenomika. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2012:18-20.

(52) Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia?. Schizophrenia Bulletin 2007; 33(3): 635-641.

(53) Bertocci B, Miggiano V, Da Prada M, et al. Human catehol-O-methyltransferase: Cloning and expression of the membrane-associated form. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1991; (88): 1416-1420.

(54) Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, et al. COMT Val158Met genotype affects μ-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. Science 2003; (299): 1240-1243.

(55) Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, et al. The Val158Met polymorphism of the human catehol-O-methyltransferase (COMT) gene may influance morphine requirements in cancer pain patients. Pain 2005; (116): 73-78.

(56) De Gregori M, Garbin G, De Gregori S, et al. Genetic variability at COMT but not at OPRM1 and UGT2B7 loci modulates morphine analgesic response in acute postoperative pain. European Journal of Clinical Pharmacology 2013; (69):1651-1658.

(57) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang and Dale's pharmacology. Elsevier Churchill Livingstone 2012; 103.

(58) Henker RA, Lewis A, Dai F, et al. The association between OPRM1 and COMT genotypes and postoperative pain, opioid use and opioid induced sedation. Biological Research for Nursing 2013; 15(3): 309-317.

(59) Mercer SL, Coop A. Opioid analgesics and P-glycoprotein efflux transporters: A potential systems-level contribution to analgesic tolerance. Curr Top Med Chem 2011; 11(9): 1157-1164.

(60) Demule M, Regina A, Jodoin J, et al. Drug transport to the brain: Key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-braun barrier. Vascular Pharmacology 2002; (38): 339-348.

(61) Park HJ, Shin HK, Ryu SH, et al. Genetic polymorphisms in the ABCB1 gene and the effects of fentanyl in Koreans. Clinical pharmacology & therapeutics 2007; 81(4): 539-546.

(62) Hung CC, Chiou MH, Teng YN, et al. Functional impact of ABCB1 variants on interactions between P-glycoprotein and methadone. Plos One 2013; 8(3): 1-12.

(63) Candiotti K, Yang Z, Wue L, et al. Single-nucleotide polymorphism C3435T in the ABCB1 gene is associated with opioid consumption in postoperative pain. Pain medicine 2013; 14(8): 1-8.

(64) Campa D, Gioia A, Tomei A, et al. Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. Clinical pharmacology & therapeutics 2008; 83(4): 559-566.

(65) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. Rang and Dale's pharmacology. Elsevier Churchill Livingstone 2012; 30, 42.

(66) Mura E, Govoni S, Racchi M, et al. Consequences of the 118A>G polymorphism in the OPRM1 gene: translation from bench to bedside? Journal of Pain Research 2013; (6): 331-353.

(67) Wachman EM, Hayes MJ, Brown MS, et al. Association of OPRM1 and COMT single-nucleotid polymorphisms with hospital length of stay and treatment of neonatal abstinence syndrome. JAMA 2013; 309(17): 1821-1827.

(68) De Gregori M, Garbin G, De Gregori S, et al. Genetic variability at COMT but not at OPRM1 and UGT2B7 loci modulates morphine analgesic response in acute postoperative pain. European Journal of Clinical Pharmacology 2013; (69):1651-1658.

(69) Chou WY, Wang CH, Liu PH, et al. Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy. Anesthesiology 2006; 105(2): 334-337.

(70) Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, et al. The 118 A>G polymorphism in the human μ-opioid receptor gene may increase morphine requriements in patients with pain caused by malignant disease. Acta Anaesthesiologica Scandinavica 2004; (48): 1232-1239.

(71) Möller Petrun A, Kamenik M. Nadzor globine anestezije z monitorjem BIS. Zdravniški vestnik 2010; (79): 43-47.

(72) Lera dos Santos M, Maluf-Filho F, Chaves DM, et al. Deep sedation during gastrointestinal endoscopy: Propofol-fentanyl and midazolam-fentanyl regimens. World Journal of Gastroenterology 2013; 19(22): 3439-3446.

(73) Bai J, Hsu L, Tang Y, Van Dijk M. Validation of the COMFORT Behavior Scale and the FLACC Scale for pain assessment in Chinese children after cardiac surgery. Pain Management Nursing 2012; 13(1): 18-26.

(74) Lifshitz M, Gavrilov V, Galil A, Landau D. A four year survey of neonatal narcotic withdrawal: Evaluation and treatment. IMAJ 2001; (3): 17-20.

(75) FlexiGene® DNA Handbook, QIAGEN Sample & Assay Technologies 2010: 12-13.

(76) http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis. 8. 9. 2013

(77) http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide. Dostopano: 8. 9. 2013

(78) Černe D, Ostanek B, Biomedicinska analitika 1. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2012: 120-121, 136-140.

(79) TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Protocol, AppliedBiosystems 2005: 2-5.

(80) http://en.wikipedia.org/wiki/Fentanyl. Dostopano: 7. 1. 2014

(81) http://www.ensembl.org/index.html. Dostopano: 7. 1. 2014

(82) Graffelman J, Sanchez M, Cook S, et al. Statistical Inference for Hardy-Weinberg Proportions in the Presence of Missing Genotype Information. Plos One 2013; 8 (12): 1 – 11.

(83) Adamič Š. Temelji biostatistike. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 1989; 70 – 72; 103 – 104.

(84) Field A. Discovering Statistics Using SPSS. SAGE Publications 2nd Edition 2005: 143 – 215.

(85) http://www.biosyn.com/TEW/TaqMan-vs-SYBR-Green-Chemistries.aspx.

7 PRILOGE

Priloga 1: Lestvica Comfort-B

LESTVICA COMFORT-B

	Točke	4. dan		5. dan		6. dan		7. dan	
		1. MERITEV	2. MERITEV	1. MERITEV	2. MERITEV	1. MERITEV	2. MERITEV	1. MERITEV	2. MERITEV
Budnost, živahnost									
Globoko spe	1								
Rahlo spe	2								
Dremav, zaspan	3								
Popolnoma buden in živahen	4								
Hiperaktiven	5								
Mirnost/vznemirjenost									
Miren	1								
Rahlo zaskrbljen	2								
Zaskrbljen	3								
Zelo zaskrbljen	4								
Paničen	5								
Respiratorni odziv (predihavani otroci)									
Brez kašlja in brez spontanega dihanja	1								
Spontano dihanje z malo ali nič odziva na predihavanje	2								
Občasen kašelj ali upiranje ventilatorju	3								
Aktivno dihanje proti ventilatorju ali reden kašelj	4								
Neujemanje z ventilatorjem (»tepe« se z ventilatorjem), kašelj ali dušenje	5								
Jok (nepredihavani otroci)									
Mirno dihanje, brez joka	1								
Ihtenje ali lovljenje sape	2								
Stokanje	3								
Jok	4								
Kričanje	5								
Fizično gibanje									
Ni gibanja	1								
Občasni, rahli gibi	2								
Pogostejši, rahli gibi	3								
Energični gibi omejeni na ekstremitete	4								
Energični gibi vključujoč trup in glavo	5								
Mišični tonus									
Mišice popolnima sproščene, brez mišičnega tonusa	1								
Zmanjšan mišični tonus	2								
Normalen mišični tonus	3								
Povečan mišični tonus in upogibanje prstov rok in nog	4								
Ekstremna mišična rigidnost in upogibanje prstov rok in nog	5								
Obrazna tenzija									
Obrazne mišice popolnima sproščene	1								
Normalen tonus obraznih mišic, brez vidne tenzije	2								
Vidna tenzija nekaterih obraznih mišic	3								
Vidna tenzija vseh obraznih mišic	4								
Spačene obrazne mišice in pačenje	5								
Celokupno									

Priloga 2: Lestvica Finnegan

VREDNOTENJE SIMPTOMOV ODTEGNITVE - FINNEGAN

Sistem	Znaki in simptomi	Točke	1. DAN				2. DAN		3. DAN	
			1. MERITEV	2. MERITEV	3. MERITEV	4. MERITEV	1. MERITEV	2. MERITEV	1. MERITEV	2. MERITEV
MOTNJE CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA	Piskav jok	2								
	Dolgotrajen piskav jok	3								
	Spi < 1 uro po hranjenju	3								
	Spi < 2 uri po hranjenju	2								
	Spi < 3 uri po hranjenju	1								
	Blag tremor, ko je vznemirjen	1								
	Zmeren-hujši tremor, ko je vznemirjen	2								
	Blag tremor, ko je miren	3								
	Zmeren-hujši tremor, ko je miren	4								
	Povečan mišični tonus	2								
	Odrgnine (navedi področje)	1								
	Miokloničnі krči	3								
	Generalizirane konvulzije	5								
METABOLIČNE, VAZOMOTORIČNE, DIHALNE MOTNJE	Potenje	1								
	Vročina (37.5-38.3°C)	1								
	Vročina (38.4°C in več)	2								
	Pogosto zehanje (> 3-4 krat)	1								
	Zapolnjen nos	1								
	Kihanje (> 3-4 krat)	1								
	Širjenje nosnic	2								
	Hitrost dihanja > 60/min	1								
	Hitrost dihanja > 60/min z ugrezanjem	2								
GASTROINTESTINALNE MOTNJE	Prekomerno sesanje	1								
	Slabo hranjenje	2								
	Spahovanje, bruhanje	2								
	Bruhanje v loku	3								
	Mehko blato	2								
	Vodeno blato	3								
	Celokupne točke									
	Začetnici ocenjevalca									

Priloga 3: Podatki o preiskovancih

ID	Spol	Starost (m)	Telesna masa (kg)	Trajanje hospitalizacije (dan)	Celokupni odmerek fentanila (µg)	Kumulativni odmerek 1	Kumulativni odmerek 2	Kumulativni odmerek 3	BIS 1	BIS 2	BIS 3	COMFORT-B 1	COMFORT-B 2	COMFORT-B 3	Finnegan 1	Finnegan 2	Finnegan 3
1	Ž	18	11	9,63	19521,59	599,28	3326,51	8078,51	62	63	70	14	17	24	9	7	6
2	M	2	4,1	5,84	1793,77	134,28	798,79	1618,46	39	31	80	7	11	8	5	5	3
3	Ž	28	12	5,67	10156,08	559,92	2626,08	6136,08	74	44	49	9	8	18	*	*	*
4	Ž	6	6,8	4,81	1569,60	242,12	748,58	1399,66	56	39	63	12	10	15	4	7	8
5	Ž	2	5,3	5,88	4078,04	249,38	1662,63	3409,21	55	50	55	7	7	11	4	2	8
6	M	3	5,7	3,31	2403,74	279,85	1182,16	*	52	57	*	6	17	*	2	4	2
7	M	4	8	6,35	4302,56	547,20	2347,70	3562,64	56	26	31	10	7	17	1	5	4
8	Ž	2	5,3	4,48	1894,49	298,92	1166,54	1735,09	62	60	60	8	13	18	1	1	6
9	M	0,5	3,5	4,33	1086,25	155,33	842,96	*	54	61	*	7	6	*	4	5	5
10	Ž	0,5	4,2	3,40	295,32	115,33	*	*	48	76	*	14	*	*	1	2	2
11	M	1	5	5,30	2281,25	201,25	1221,25	2121,25	51	55	46	*	*	7	2	4	10
12	M	29	8,7	6,25	6601,56	462,84	2898,84	5286,12	61	51	83	7	11	14	1	1	*
13	M	*	9	*	*	*	*	*	34	*	*	15	*	*	*	*	*
14	M	22	12	2,99	6117,60	913,86	4462,68	*	61	62	*	9	20	*	1	1	1
15	M	1	4,4	3,81	820,91	132,36	*	*	40	*	*	10	*	*	*	*	*
16	Ž	17	9,1	3,43	3372,01	560,56	2691,36	*	80	60	*	10	10	*	5	4	4
18	M	2	5,1	7,70	2397,71	209,10	777,75	1573,73	34	65	60	6	10	13	3	1	1
19	M	2	5,7	5,75	1125,98	119,20	508,16	948,14	44	60	67	13	12	10	1	3	*
20	Ž	1	4,6	3,92	1051,05	210,26	*	*	48	*	*	6	*	*	1	*	*
25	Ž	1	3,4	4,75	711,24	88,04	316,94	616,33	62	65	53	10	12	11	6	6	6
26	M	3	6,6	4,34	1524,80	173,38	798,82	1432,42	49	66	70	15	17	24	5	6	4
27	M	2	6	3,47	2070,72	189,35	*	*	37	*	*	11	13	14	14	*	14
28	M	2	4,2	8,50	1002,92	71,06	248,47	497,44	41	61	57	9	9	8	4	6	9
29	M	1	4,1	4,52	911,10	99,78	578,10	896,10	53	59	*	12	12	15	3	3	6
31	M	1	4,3	4,36	1034,32	119,50	529,94	1007,13	48	43	*	7	7	9	4	4	6

ID	Spol	Starost (m)	Telesna masa (kg)	Doba hospitalizacije (dan)	Celokupni odmerek (µg)	Kumulativni odmerek 1	Kumulativni odmerek 2	Kumulativni odmerek 3	BIS 1	BIS 2	BIS 3	COMFORT-B 1	COMFORT-B 2	COMFORT-B 3	Finnegan 1	Finnegan 2	Finnegan 3
32	M	1	3	5,58	1769,10	178,75	1044,99	1705,17	33	34	41	6	6	8	5	2	9
33	M	2	3	6,77	1143,72	121,275	490,05	877,89	56	54	60	11	11	12	3	4	*
34	Ž	3	5,5	7,08	1989,02	202,675	888,14	1858,34	39	34	44	6	7	7	4	4	4
35	M	3	6,8	14,51	9221,68	510,816	2799,70	4331,06	41	39	35	*	8	9	6	6	6
36	M	3	4,9	9,33	3223,61	120,54	643,72	1043,84	48	55	44	6	6	8	6	4	3
37	M	29	13,5	14,00	22004,46	459,00	2378,70	*	36	38	*	17	13	*	*	*	*
38	M	2	4,7	5,63	1546,30	188,00	620,40	1301,90	42	46	46	9	7	11	2	12	4
39	Ž	13	10	1,85	2500,00	925,25	*	*	73	*	*	6	*	*	2	0	3
40	M	11	9,5	6,36	6902,32	586,521	2357,33	5266,42	61	56	71	7	6	*	3	8	9
41	M	2	5,5	3,30	1441,58	241,685	891,73	1441,58	52	46	69	14	12	*	11	8	12
42	M	1	3,1	4,69	1031,78	151,424	524,16	966,26	73	85	59	7	6	6	4	3	5
43	Ž	1	3,9	18,85	2579,33	200,72	864,35	1421,35	50	37	59	10	8	8	6	6	*
44	Ž	5	5,8	7,58	2329,32	195,413	1172,48	2014,92	63	*	44	8	8	12	1	3	*
45	M	1	2,8	1,77	134,82	50,932	131,82	*	28	30	*	6	6	*	2	2	2
46	M	8	7,1	7,63	6026,27	262,70	1609,14	3450,64	52	47	29	6	14	6	1	*	*
47	M	2	5,5	12,00	3983,10	220,00	936,38	1700,88	47	56	63	9	10	*	0	3	4
48	M	3	4,7	6,29	2335,34	138,838	*	2148,04	53	*	51	6	*	6	2	2	3
49	M	28	10	7,07	8497,50	437,50	2887,50	6147,50	76	59	50	10	6	14	*	*	*
50	M	21	12	3,17	5824,80	682,548	4624,80	*	79	76	*	9	13	*	8	*	*
51	Ž	1	3,8	3,98	918,19	146,553	746,76	*	34	40	*	6	6	18	4	8	1
55	Ž	1	4,1	6,99	1322,74	109,21	537,72	923,61	49	32	35	6	6	10	6	6	*
61	Ž	1	3,9	5,63	656,29	65,627	371,10	619,26	60	62	*	6	8	11	12	13	9
62	M	2	6,3	7,25	2268,00	178,92	640,08	1260,00	47	54	33	12	12	12	9	17	9
63	M	1	3,6	5,92	500,80	70,06	379,19	462,40	39	42	61	12	10	12	*	*	*

* Podatek ni bil podan. Ž = ženski spol, M = moški spol, m = mesec; Kumulativni odmerek 1: 60 min po pričetku infuzije fentanila, Kumulativni odmerek 2: 3. dan po pričetku infuzije oz. Kumulativni odmerek 3: 5. dan po pričetku infuzije; BIS 1, Comfort-B 1: 60 min po pričetku infuzije fentanila; BIS 2, Comfort-B 2: 3. dan po pričetku infuzije , BIS 3, Comfort-B 3: 5. dan po pričetku infuzije; Finnegan 1: 2 uri po prekinitvi infuzije, Finnegan 2: 3 dan po prekinitvi infuzije in Finnegan 3: 5 dan po prekinitvi infuzije.