

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MOJCA NASTRAN (MOŽINA)

**POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA FENTANILA PRI  
OTROCIH Z BRONHIOLITISOM**

**POPULATION PHARMACOKINETICS OF FENTANYL IN  
CHILDREN WITH BRONCHIOLITIS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos in somentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Mojci Kerec Kos in somentorju izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za številne strokovne usmeritve in nasvete tekom izvedbe in pisanja magistrske naloge.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Štefanu Grosku ter asist. mag. Mirjani Miksić za izvedbo kliničnega dela raziskave.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Robertu Roškarju za izvedbo LC-MS/MS analiz vzorcev.

Zahvaljujem se predsedniku ter članici komisije za pregled in komentarje k magistrski nalogi.

Zahvaljujem se tudi staršem, bratu, sestram in možu Andreju za izkazano podporo tekom celotnega študija.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos in izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja.

Ljubljana, september 2014

Mojca Nastran

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Članica komisije: doc. dr. Nina Kočevar Glavač

## VSEBINA

POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
UVOD .....	1
FENTANIL .....	1
FARMAKODINAMIKA FENTANILA .....	2
FARMAKOKINETIKA .....	2
Farmakokinetika pri infuziji .....	2
Farmakokinetika fentanila .....	4
MIDAZOLAM .....	5
FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE .....	5
POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA .....	6
NELINEARNO MODELIRANJE MEŠANIH UČINKOV (NONMEM) .....	9
FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA FENTANIL .....	10
NAMEN DELA .....	13
MATERIALI IN METODE .....	14
MATERIALI .....	14
BIOLOŠKI MATERIALI .....	14
STANDARDI .....	14
REAGENTI IN TOPILA .....	14
RAZTOPINE .....	15
NAPRAVE IN PRIBOR .....	16
METODE DELA .....	16
KLINIČNI DEL RAZISKAVE .....	16
MERJENJE KONCENTRACIJE FENTANILA V PLAZMI .....	17
Priprava plazemskih vzorcev za analizo .....	18
LC-MS/MS analizna metoda .....	18
GENOTPIZACIJA ABCB1 .....	20
POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE .....	20
Razvoj osnovnega modela .....	20
Razvoj modela s sočasnimi spremenljivkami .....	22
<i>Sočasne spremenljivke</i> .....	22

<b>Postopno testiranje vpliva sočasnih spremenljivk</b> .....	23
<b>Funkcija zorenja (MF)</b> .....	23
<b>Randomizacijski test</b> .....	24
Vrednotenje modela.....	25
<b>Standardni diagnostični diagrami</b> .....	25
<b>Metoda ponovljenega vzorčenja</b> .....	25
<b>Vizualno vrednotenje napovedi modela</b> .....	25
Uporaba modela za načrtovanje odmerjanja fentanila.....	26
REZULTATI.....	28
PODATKI O BOLNIKIH .....	28
PLAZEMSKA KONCENTRACIJE FENTANILA .....	28
TOČNOST IN PONOVLJIVOST ANALIZNE METODE LC-MS/MS.....	28
UREJANJE BAZE PODATKOV .....	30
RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA .....	31
OSNOVNI MODEL .....	31
MODEL Z VKLJUČENIM VPLIVOM TELESNE MASE.....	32
VKLJUČITEV SOČASNIH SPREMENLJIVK .....	34
MODEL Z VKLJUČENIM VPLIVOM TELESNE MASE IN FUNKCIJE ZORENJA (MF).....	38
VPLIV POLIMORFIZMA GENA ABCB1 NA OČISTEK FENTANILA.....	42
Model z vključenim vplivom telesne mase in starosti.....	42
Model z vključenim vplivom telesne mase in MF.....	42
UPORABA MODELA ZA INDIVIDUALNO PRILAGAJANJE ODMERJANJA FENTANILA .....	44
RAZPRAVA .....	48
SKLEP .....	54
LITERATURA.....	55

## **POVZETEK**

Otroci, ki boleajo za hujšo obliko akutnega bronhiolitisa in posledično potrebujejo mehansko predihavanje, se pogosto zdravijo s kombinacijo fentanila in midazolama v obliki dolgotrajne intravenske infuzije. Odmerjanje fentanila je pri otrocih zahtevno, saj odmerka ne moremo preprosto ekstrapolirati iz odmerka za odraslo osebo glede na telesno maso. Poleg tega obstaja tudi etična dilema glede testiranja in analiziranja določenih zdravil na otrocih.

Namen magistrske naloge je razviti populacijski farmakokinetični model fentanila, ki bo v pomoč pri individualizaciji režima odmerjanja intravenske infuzije fentanila pri otrocih z akutnim bronhiolitom.

V nalogi smo najprej s pomočjo tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo, pomerili koncentracije fentanila v plazemskih vzorcih otrok. V analizo je bilo vključenih 49 otrok, vsakemu je bilo odvzeto 5 vzorcev krvi. S pridobljenimi plazemskimi koncentracijami ter s podatki o odmerjanju in sočasnih spremenljivkah za posamezne bolnike, smo razvili populacijski farmakokinetični model fentanila. Za razvoj modela smo uporabili programski paket NONMEM.

Najprej smo razvili osnovni model, na katerem smo kasneje testirali vplive sočasnih spremenljivk. Končni model je dvoprostorni, vsebuje vpliv telesne mase, ki je vključen z alometričnim razmerjem ter vpliv funkcije zorenja na očistek. Ocene farmakokinetičnih parametrov končnega modela: očistek znaša 35,8 L/h/70 kg, volumen osrednjega prostora 2,30 L/70 kg, volumen stranskega prostora 251 L/70 kg in distribucijski očistek 219 L/h/70 kg. Interindividualna variabilnost očistka pri končnem modelu znaša 49,2 %. Model smo ovrednotili s standardnimi diagnostičnimi diagrami, metodo ponovljenega vzorčenja in metodo vizualnega vrednotenja napovedi modela. Naredili smo tudi grafični prikaz spreminjanja očistka s telesno maso in funkcijo zorenja ter posledično spreminjanje potrebne hitrosti infuzije za doseg optimalne plazemske koncentracije fentanila v stacionarnem stanju.

Končni populacijski farmakokinetični model fentanila je uporabno orodje za optimizacijo odmerjanja fentanila pri otrocih, saj upošteva spreminjanje očistka glede na njihovo telesno maso in pomenstrualno starost, očistek pa je ključnega pomena pri doseganju zelenih plazemskih koncentracij fentanila v stacionarnem stanju.

## **ABSTRACT**

Children suffering from severe acute bronchiolitis and consequently require mechanical ventilation are often treated with a combination of fentanyl and midazolam in the form of long-term intravenous infusion. Fentanyl dosing in children is challenging because the dose can not simply be extrapolated from dose used for an adult, according to body weight. In addition, there is also an ethical dilemma concerning the testing and analysing of certain medications in children.

The purpose of the master's thesis is to develop a population pharmacokinetic model of fentanyl, which will assist in the individualization of dosing regimen of intravenous infusion of fentanyl in children with acute bronchiolitis.

In the thesis we are using liquid chromatography coupled with mass spectrometry to measure concentrations of fentanyl in plasma samples of children. The analysis included 49 children and 5 blood samples were taken from each of them. With the results obtained from the analysis of plasma samples and with the data about dosing and covariates for individual patients, we have developed a population pharmacokinetic model of fentanyl. In order to develop the model, we used the NONMEM software package.

First, we have developed a basic model, on which we later tested the effects of covariates. The final model is a two-compartment model, it includes the impact of body weight, which is included with the allometric relationship, and the impact of maturation function on clearance. Estimates of pharmacokinetic parameters of the final model were: 35,8 L/h/70kg for clearance, and 2,30 L/70kg, 251 L/70kg and 219 L/h/70kg for volume of central compartment, volume of peripheral compartment and distribution clearance, respectively. Interindividual variability in clearance in the final model was 49.2 %. The model was evaluated by standard diagnostic diagrams, bootstrap re-sampling method and visual predictive check. We made a graphical representation of change in clearance as a function of body weight and maturation function and consequently changing the infusion rate required to achieve an optimal plasma concentrations of fentanyl in steady state.

The final population pharmacokinetic model of fentanyl is a useful tool for optimizing the dosage of fentanyl in children, as it follows the changing of clearance depending on their weight and postmenstrual age. Clearance value is crucial in achieving the desired plasma concentrations of fentanyl in a steady state.

**Ključne besede:**

fentanil

populacijski farmakokinetični model

otroci

bronhiolitis

NONMEM

**Keywords:**

fentanyl

population pharmacokinetic model

children

bronchiolitis

NONMEM

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

Cl – očistek

CWRES – pogojno uteženi rezidual (ang. conditional weighted residual)

CŽS – centralno živčni sistem

FD – farmakodinamika

FK - farmakokinetika

IIV – interindividualna variabilnost

IPRED – napovedana koncentracija pri posameznem bolniku (ang. individual predicted)

IWRES – individualno uteženi rezidual (ang. individual weighted residual)

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

MF – funkcija zorenja (ang. maturation function)

NONMEM – nelinearno modeliranje mešanih učinkov (ang. nonlinear mixed effects modeling)

OFV – vrednost objektivne funkcije (ang. objective function value)

PC VAR VPC – vizualno vrednotenje napovedi modela pri katerih so opažene in simulirane vrednosti normirane glede na povprečno napoved in variabilnost (ang. prediction-corrected and variability-corrected visual predictive check)

PFK – populacijska farmakokinetika

PMA – pomenstrualna starost (ang. postmenstrual age)

PRED – povprečna napovedana koncentracija v populaciji bolnikov (ang. population predicted)

Q – distribucijski očistek

RSE – relativna standardna napaka

SCM – postopno modeliranje sočasnih spremenljivk (ang. stepwise covariate modelling)



UKC – Univerzitetni klinični center

$V_1$  – volumen osrednjega prostora

$V_2$  – volumen stranskega prostora

VPC – vizualno vrednotenje napovedi modela (ang. visual predictive check)

## UVOD

### FENTANIL

Fentanil je sintetični opioid, ki se uporablja od leta 1960, ko ga je prvič sintetiziral Paul Janssen. Spada med fenilpiperidine in je najmočnejši med njimi. Fentanil je majhna in močno lipofilna molekula, kar mu omogoča hitro prehajanje membran, vključno s krvno-možgansko bariero, ter porazdelitev v tkiva (1,2). Veliko se uporablja v pediatriji zaradi visoke stopnje varnosti in močnega zaviranja odziva telesa na stres (3). V jakosti je fentanil približno 100-krat močnejši od morfinu. Toleranca se pri fentanilu pojavi prej kot pri morfinu, zato je pri dolgotrajnem jemanju potrebno večati odmerke za enak učinek (4). Ponuja večjo hemodinamsko stabilnost kot morfin, saj ne sprošča histamina, zaradi česar so spremembe hemodinamskega statusa pri uporabi fentanila zanemarljive. Tudi njegov vpliv na srčnožilni sistem je minimalen. Za fentanil je značilen hiter nastop in kratko trajanje učinka (2). Prenehanje učinka pa ni zgolj posledica hitrega odstranjevanja učinkovine iz telesa, pač pa je trajanje učinka omejeno tudi s porazdelitvijo znotraj telesa (5). Eden od možnih zapletov pri terapiji s fentanilom je rigidnost prsnega koša. Učinek fentanila lahko izničimo z antagonistom naloksonom (6). Fentanil se večinoma uporablja kot anestetik, kot analgetična komponenta pri lokalni ali splošni anesteziji, vse več tudi kot sedativ pri dojenčkih, pomembna pa je tudi uporaba fentanila v obliki transdermalnih obližev za zdravljenje kronične bolečine. V zadnjih letih se je razširila uporaba fentanila v obliki kontinuirane infuzije na področju dolgotrajnejše sedacije pri bolnikih, ki so na mehanskem predihavanju. V tem primeru je sedacija namenjena zmanjšanju bolečine in stresa, ki sta posledica intubacije, izognitvi tesnobe, vznemirjenja in preprečitvi nenamerne odstranitve medicinskih naprav. Omogoča tudi ujemanje z mehansko ventilacijo ter izvedbo potrebnih invazivnih posegov. Pri nedonošenčkih je dokazano, da jih fentanil učinkovito ščiti pred stresnimi odzivi telesa na kirurške posege in izboljša pooperativne izide. Pri dojenčkih in otrocih pa se je izkazalo, da se s fentanilom lahko učinkovito odpravlja bolečino pred, po in med samo operacijo. V preteklosti se je pri novorojenčkih sicer veliko pogosteje uporabljal morfin, kasneje pa ga je zaradi ugodnih farmakoloških lastnosti nadomestil fentanil, saj prinaša večjo predvidljivost izidov, večjo stopnjo varnosti ter ohranjanje hemodinamske stabilnosti (7).

## **FARMAKODINAMIKA FENTANILA**

Fentanil je močan agonist  $\mu$  (opioidnih) receptorjev. Receptorji  $\mu$  se nahajajo primarno v možganskem deblu in medialnem talamusu. Odgovorni so za supraspinalno analgezijo, dihalno depresijo, evforijo, sedacijo, zmanjšano motiliteto prebavnega trakta in fizično odvisnost. Podtipa sta  $\mu_1$  in  $\mu_2$ . Z  $\mu_1$  je povezana analgezija, tudi evforija; medtem ko je z  $\mu_2$  povezana depresija dihanja, srbenje, sproščanje prolaktina, odvisnost, anoreksija in sedacija (8). Vsak receptor je sestavljen iz zunajceličnega N-terminalnega dela, 7 transmembranskih proteinov, 3 zunajceličnih in znotrajceličnih zank in znotrajceličnega C-terminalnega dela. Ko se aktivira  $\mu$  receptor, se sprostí protein G, ki difundira skozi membrano, do svoje tarče (bodisi encima ali ionskega kanala). Te tarče spremenijo fosforilacijo beljakovin z zaviranjem cAMP, ki deluje kot prenašalec pri aktivaciji proteinskih kinaz (kratkoročni učinek) in beljakovin za transkripcijo genov (dolgoročni učinki) (2).

Pri odraslih je za popolno anestezijo potrebna plazemska koncentracija fentanila v območju 15 – 30 ng/mL.  $IC_{50}$  za fentanil je 10 ng/ml (2). Za doseg analgezije pri otrocih so potrebne plazemske koncentracije od 1 do 3 ng/mL, med tem ko so plazemske koncentracije, ki so potrebne za doseg sedacije, zelo spremenljive in se tekom dolgotrajne terapije lahko zaradi tolerance povečujejo (9). Režimi začetnega odmerjanja pri novorojenčkih so pogosto izkustveno pridobljeni iz terapije odraslih preko prilagajanja glede na telesno maso. Vendar razvoj in funkcije določenih organov, ki vplivajo na končni učinek zdravila, niso vedno pogojene s telesno maso, zato lahko take ekstrapolacije vodijo v terapevtske neuspehe ali v povečano izražanje neželenih učinkov. Stopnja sedacije je pogosto neustrezna tudi zato, ker se odmerjanje fentanila prilagaja predvsem na oceni vizualnih znakov sedacije in analgezije (7).

## **FARMAKOKINETIKA**

### **Farmakokinetika pri infuziji**

Pri anesteziji se učinkovine pogosto uporablja v obliki dolgotrajne intravenske infuzije, pri kateri se najlažje ohranja predvidljivo farmakodinamsko delovanje. Pri intravenski infuziji na plazemsko koncentracijo vplivajo: porazdelitev, presnova in izločanje. Obstaja več procesov, ki odstranjujejo učinkovino iz plazme. Porazdelitev je proces, pri katerem zdravilo začasno privzamejo ostala tkiva in izločanje je proces, ki dokončno odstrani učinkovino iz plazme. Izločanje učinkovine je kombinacija presnove (pretvorba učinkovine v presnovke) in izločanja učinkovine v nespremenjeni obliki (na primer preko ledvic, pljuč). Presnova, ki vodi

v aktivne produkte, lahko podaljša čas delovanja učinkovine in s tem spremeni razmerje med plazemsko koncentracijo učinkovine in farmakodinamsko aktivnostjo. Relativni pomen porazdelitve in izločanja učinkovine je osrednjega pomena za razumevanje tega, kako se plazemske koncentracije spreminjajo med in po infuziji. Osrednji volumen porazdelitve opisuje navidezni volumen v modelu, ki predpostavlja, da se določena tkiva obnašajo enako kot plazma. Volumen porazdelitve v stanju dinamičnega ravnovesja opisuje navidezni volumen v katerega bi se zdravilo porazdelilo tekom dolgotrajne infuzije; je vsota vseh volumnov prostorov v modelu, ki opisuje kinetiko zdravilne učinkovine (na primer v triprostornem modelu V1, V2 in V3). Prehajanje učinkovine med različnimi prostori je določeno s koncentracijskim gradientom med posameznimi prostori in distribucijskim očistkom (10). Pri infuziji učinkovin z večprostornimi modeli, se bo le-ta najprej porazdelila v osrednji prostor, nato pa še v stranske. Ko je infuzija prekinjena, učinkovina še prehaja v stranske prostore, dokler ni doseženo ravnotežje. Takrat učinkovina lahko zapusti plazmo le s presnovo in izločanjem. Ko plazemska koncentracija pade, se koncentracijski gradient obrne in učinkovina potuje iz stranskih prostorov nazaj v plazmo in tako vzdržuje koncentracijo v plazmi, kar podaljša farmakološki učinek (11).

Za lipofilne učinkovine je značilno, da lahko določen volumen maščobnega tkiva vsebuje veliko več učinkovine kot enak volumen krvi. Zato je volumen razporeditve v stanju dinamičnega ravnotežja pri teh učinkovinah lahko veliko večji kot celokupni volumen telesa (12).

Razpolovni čas izločanja učinkovine po prekinitvi infuzije je čas, ki preteče od prekinitve infuzije do takrat, ko koncentracija učinkovine v krvi pade za 50 %. Če je bilo z infuzijo doseženo stanje dinamičnega ravnovesja, potem je razpolovni čas izločanja enak terminalnemu razpolovnemu času izločanja (10).

Kljub temu, da se učinkovina pogosto razporedi široko po telesu, se navadno izloča samo iz krvi. To odstranjevanje opisuje očistek. Gre za farmakokinetični parameter, ki predstavlja volumen tekočine, iz katerega se učinkovina popolnoma izloči na enoto časa (L/h) preko določenega organa (13).

Farmakokinetični parametri so konstantni le za določenega bolnika v določenem kliničnem stanju in se pod vplivom patoloških procesov v telesu spremenijo, kar je še posebej pomembno pri zdravilih, ki jih prejemajo kritično bolni pacienti (10).

## **Farmakokinetika fentanila**

Fentanil se v plazmi močno veže na alfa-1 kisle glikoproteine. Le teh je manj pri novorojenčkih, zato je delež nevezanega fentanila v plazmi pri njih značilno višji do starosti enega leta v primerjavi s starejšimi otroki in odraslimi (1). Presnavlja se preko N-dealkilacije (CYP 3A4) in hidroksilacije v jetrih. Encim CYP 3A4 ima ob rojstvu nizko aktivnost, ki pa po rojstvu zelo hitro narašča. Vsi presnovki so neaktivni in netoksični. Zaviralci CYP 3A4 lahko zaradi zmanjšanje presnove fentanila povečajo njegove plazemske koncentracije, induktorji CYP 3A4 pa zmanjšujejo učinek fentanila, zaradi njegove povečane presnove. Le majhen delež fentanila (6-10%) se izloči skozi ledvice v nespremenjeni obliki (2). Fentanil ima visok intrinzični očistek in spada med učinkovine, ki se v visokem deležu izločajo preko jeter. Očistek fentanila je zelo spremenljiv parameter in je pogojen s starostjo in odvisen od pretoka krvi skozi jetra (9). Pri zdravem odraslem človeku se njegova vrednost giblje od 0,53 L/h/kg do 1,26 L/h/kg (14, 15). Na vrednost očistka pri novorojenčkih vpliva tudi gestacijska starost (16). Vrednosti očistka pri dojenčkih in otrocih se gibljejo od 0,48 L/h/kg do 1,131 L/h/kg (9, 17, 18). V dinamičnem ravnovesju je volumen porazdelitve največji pri novorojenčkih (5.9 L/kg) in pada s starostjo že v zgodnjem otroštvu (4.5 L/kg) ter vse do odraslosti (1.6 L/kg) (2). Razpolovni čas izločanja fentanila po IV bolus injekciji je kratek, od 30-60 minut (19). Pri uporabi fentanila v obliki kontinuirane infuzije, je Katz s sodelavci zabeležil povečanje volumna porazdelitve in podaljšan terminalni razpolovni čas izločanja v primerjavi s kratkotrajno infuzijo ali bolus injekcijo, kar je posledica porazdelitve in kopičenja v stranskih prostorih. Povprečna vrednost volumna porazdelitve pri kritično bolnih otrocih je bila po uporabi dolgotrajne infuzije fentanila 15,2 L/kg, povprečna vrednost terminalnega razpolovnega časa eliminacije pa 21,1 h (9).

Ekstrapolacija farmakokinetike fentanila in ostalih zdravil iz odraslih na novorojenčke je vprašljiva zaradi znanih starostno pogojenih razlik v razvoju organov in mehanizmih presnove. Odraščanje je sestavljeno iz niza fizioloških sprememb povezanih med drugim tudi z razvojem ledvične in jetrne funkcije, sestave telesa, ekspresije receptorjev in proteinov. Na primer: odstotek vode glede na celotno telesno maso je pri novorojenčkih večji kot pri odraslih, prav tako zunajcelične tekočine. Večji delež telesne mase novorojenčka kot telesne mase odraslega predstavljajo tudi nekateri organi. Po drugi strani pa skeletno – mišična tkiva predstavljajo pri novorojenčkih manjši delež. Dojenčki imajo v primerjavi z odraslimi glede na telesno maso veliko glavo in trup, noge pa imajo kratke (18, 7). Na FK fentanila vplivajo poleg omenjenih dejavnikov še starost bolnika, vsebnost plazemskih beljakovin,

kardiovaskularna stabilnost, ravnotežje tekočin, kislinsko-bazično stanje in telesna temperatura. Pri napovedovanju ustreznega režima odmerjanja določene učinkovine za različne pediatrične podskupine, bi bilo potrebno vedno povezati vse razpoložljive podatke o farmakokinetiki in farmakodinamiki pridobljene na drugih starostnih populacijah. Temu pa pridružiti še poznane razlike v razvoju, zrelosti določenih organov ter druge z rastjo povezane značilnosti za določeno starostno skupino otrok (7).

## **MIDAZOLAM**

Midazolam spada med benzodiazepine. To je skupina visoko lipofilnih zdravilnih učinkovin z anksiolitičnim, anestetičnim, sedativnim, hipnotičnim in antikonvulzivnim učinkom. So tudi mišični relaksansi. Nimajo direktnega analgetičnega učinka, zato se pogosto kombinirajo z opioidi. Njihov učinek se lahko izniči z antagonistom flumazenilom. Midazolam je najbolj splošno uporabljen benzodiazepin za proceduralno sedacijo. Je derivat imidazobenzodiazepinske skupine. Prosta baza je lipofilna, zato se slabo topi v vodi, vendar lahko midazolam tvori vodotopne soli s kisljinami, kar omogoča pripravo stabilnih raztopin za injiciranje. Midazolam se v terapiji pogosto pojavlja v kombinaciji s fentanilom, še posebej pri mlajših bolnikih, ki so na mehanskem predihavanju. Uporablja se tudi za sedacijo pri ohranjeni zavesti, uvod v splošno anestezijo, kot sedativna komponenta pri kombinirani anesteziji, premedikacija pred uvodom v anestezijo in za sedacijo na oddelkih za intenzivno zdravljenje. Pri kombiniranju benzodiazepinov z opioidi na splošno, je potrebna pazljivost, saj lahko veliko hitreje pride do hipoksije in apneje kot pri jemanju vsake učinkovine posebej, saj gre za sinergizem učinkov (20). Za midazolam je značilen hiter nastop učinka. Presnavlja se preko encima CYP 3A4 v jetrih, pri tem nastanejo aktivni in neaktivni presnovki. V plazmi se veže na albumine. 60-80 % injiciranega odmerka se izloči skozi ledvice, manj kot 1 % odmerka v nespremenjeni obliki. Njegov razpolovni čas izločanja je kratek (21).

## **FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE**

Farmakokinetični (FK) modeli se uporabljajo za opisovanje časovno odvisne razporeditve zdravilne učinkovine v organizmu in imajo zaradi tega pomembno vlogo pri razvoju zdravil in v klinični praksi (22). Omogočajo kvantitativen opis absorpcije, porazdelitve in izločanja zdravilne učinkovine po administraciji (13). Pomembni so za razumevanje časovnega poteka kliničnih učinkov pri različnih režimih odmerjanja in s tem zagotavljajo racionalno podlago za izbor zdravila in režima odmerjanja v določenih okoliščinah ter omogočajo napoved

sprememb v FK učinkovine ob fizioloških ali patofizioloških spremembah v telesu (23, 24). FK model je lahko opisni ali napovedni. Opisni modeli se uporabljajo za razlago variabilnosti v FK zdravilne učinkovine, napovedni modeli pa se uporabljajo za ekstrapolacijo izven neposredne populacije na kateri se je izvajala določena študija (25). Gradnik FK modelov je prostor oziroma kompartment, to je del telesa, v katerem je zdravilna učinkovina dobro premešana in kinetično homogena. To pomeni, da so prostori lahko opisani z eno reprezentativno koncentracijo ob kateremkoli času. FK model je lahko eno ali večprostoren. Pri večprostornem modelu imamo osrednji ter stranske prostore (26).

## **POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA**

Populacijska farmakokinetika (PFK) je študija farmakokinetike določene populacije, o kateri smo zbirali podatke. Pri tem ne gre za obdelavo podatkov za vsakega posameznika posebej, ampak za obdelavo zbranih podatkov vseh posameznikov določene populacije hkrati. Upoštevanje različnih nivojev variabilnosti (med osebki – interindividualna, znotraj enega osebk – intraindividualna) nam omogoča uporaba nelinearnega modeliranja mešanih učinkov (20).

PFK je področje klinične farmakologije, ki si prizadeva za kvantitativne ocene tipičnih farmakokinetičnih parametrov, variabilnosti v absorpciji, porazdelitvi, presnovi in izločanju učinkovin med posamezniki ter rezidualne variabilnosti. Ko se modeli PFK uporabljajo pri neposredni oskrbi bolnikov, je njihov namen zagotoviti kvantitativne in semikvantitativne smernice za individualizirano in optimizirano odmerjanje. PFK je ključni element za ocenjevanje farmakokinetičnih parametrov posebej v primerih, ko so podatki vzorčenja skopi (27). Primarni cilj PFK je model, ki povezuje plazemske koncentracije z odmerki in sočasnimi spremenljivkami. Sočasna spremenljivka je katerakoli spremenljivka, ki je specifična za posameznika in lahko vpliva na farmakokinetiko ali farmakodinamiko učinkovine. Sočasne spremenljivke so razvrščene v dve skupini: intrinzične (starost, teža, višina, rasa) in ekstrinzične (odmerek, stopnja compliance, prisotnost sočasnih zdravil). Na splošno velja, da se intrinzične v kratkem času tekom preiskave ne spreminjajo, ekstrinzične pa se spreminjajo pogosto. Izjema pri tem je na primer fenotip presnove, ki je intrinzična sočasna spremenljivka, pri kateri lahko osebek preide od običajnega oziroma hitrega metabolizatorja do počasnega, zaradi prisotnosti nekega zunanega inhibitorja. PFK se pogosto povezuje s populacijsko farmakodinamiko, katere model se nanaša na povezavo koncentracije in učinka. Sekundarni cilj PFK je pridobiti ocene povprečnih farmakokinetičnih parametrov in virov

variabilnosti v populaciji. Pomembna prednost populacijskega farmakokinetičnega modeliranja je, da lahko identificiramo posamezne populacijske podskupine, ki jih sicer ne bi opazili ter posamezne spremenljivke, ki pojasnjujejo variabilnost. Populacijski FK in FD modeli se lahko uporabljajo tudi za pomoč pri razvoju tako imenovanih »what if« scenarijev. Eden pomembnih razlogov za uporabo populacijskih pristopov k modeliranju je, da se karakteristike, specifične za določen osebek, lahko vgradi v model preko njihovih povezav s parametri modela. Na primer, če je volumen porazdelitve odvisen od telesne mase, potem je telesna masa lahko vgrajena v model, s čimer se zmanjša nepojasnjena variabilnost v volumnu porazdelitve med osebki. Viri variabilnosti, ki prispevajo k razlikam med pričakovanjem in izidom, so običajno razdeljeni na interindividualne in rezidualne. Čeprav se za posameznika lahko izračuna pričakovane vrednosti parametrov na podlagi predhodnih raziskav, se bodo dejanske vrednosti razlikovale od pričakovanih, zaradi razlik med posameznimi osebami. Rezidualna variabilnost pa vključuje intraindividualno variabilnost (naključne spremembe v vrednosti bolnikovih parametrov v daljšem časovnem obdobju), variabilnost med posameznimi dogodki (sprememba v vrednosti bolnikovega parametra od enega dogodka do drugega) ter napake v meritvah koncentracij ter napake modela (27).

Predmet običajnih farmakokinetičnih raziskav so navadno zdravi prostovoljci ali zelo izbrani bolniki. V teh raziskavah je osrednji cilj dobiti povprečni odziv skupine (povprečni profil plazemske koncentracije v odvisnosti od časa). Prostovoljci so večinoma izbrani tako, da je skupina čim bolj homogena, k čemur stremi tudi sama zasnova raziskave, zato so te študije pogosto izvedene pod pogoji, ki niso reprezentativni za način, na katerega se uporablja učinkovina. V nasprotju s tem si PFK prizadeva pridobiti pomembne farmakokinetične podatke o bolnikih, ki so reprezentativne ciljne populacije za zdravljenje z določeno zdravilno učinkovino. PFK ozavešča pomen in vire variabilnosti, ki jih je treba identificirati in kvantificirati v procesu razvoja zdravila. Prizadeva si tudi za pojasnitev variabilnosti z opredelitvijo dejavnikov, ki lahko vplivajo na obnašanje zdravila. Ti dejavniki so:

1. Demografski: spol, telesna masa, rasa, starost
2. Okoljski: kajenje, prehrana, izpostavljenost onesnaževanju, itd
3. Genetski: fenotip, ki vpliva na očistek zdravil s presnovo v jetrih, preko polimorfni izoform citokroma P450
4. Interakcije med zdravili
5. Fiziološka in patofiziološka stanja (okvara ledvic, nosečnost, itd)
6. Nekateri drugi dejavniki (cirkadiani ritem, vpliv hrane, aderenza, aktivnost, itd)



PFK je uporabna tudi za kvantitativno oceno obsega nepojasnjene variabilnosti v populaciji bolnikov. Obseg nepojasnjene variabilnosti je pomemben, saj se z njegovim večanjem zmanjšujeta varnost in učinkovitost zdravila (27).

Prednosti PFK v primerjavi s tradicionalnimi pristopi je v tem, da lahko pri PFK uporabimo tako redko kot intenzivno vzorčene osebkke, pri tradicionalnih metodah pa morajo biti vsi osebki zelo intenzivno vzorčeni. PFK omogoča izvajanje raziskav na posebnih skupinah, kot so na primer novorojenčki, starejši, bolniki z AIDSom, rakom, kjer je število vzorcev, ki jih dobimo od enega pacienta, omejeno zaradi etičnih in zdravstvenih pomislekov. Pristop razpršenega vzorčenja za analizo PFK je tudi stroškovno učinkovit in prinaša očitne prihranke v primerjavi s tradicionalnimi pristopi, saj so bolniki navadno že hospitalizirani in prejemajo zdravilo v okviru redne terapije. PFK pristop omogoča tudi združevanje podatkov iz različnih virov. Na primer iz več različnih študij ter intenzivno in redko vzorčene populacije. Združevanje več nizov podatkov poveča možnost za prepoznavanje večprostornih ali nelinearnih modelov, za vključevanje dodatnih sočasnih spremenljivk in pridobitev natančnosti pri oceni modela. Pomanjkljivost PFK pristopa je, da zahteva usposobljene strokovnjake za izvajanje matematičnih in statističnih metod, ki se uporabljajo pri oceni PFK parametrov (27).

Populacijska farmakokinetika je naredila velik premik na področju vloge farmakokinetike pri razvoju zdravil in je danes sestavni del zakonodaje za odobritev dovoljenja za promet z zdravilom (20).

Pri raziskavah zdravil na otrocih se vedno soočamo z etično dilemo. Po eni strani ne želimo testiranja zdravil na otrocih ter kakršnihkoli raziskav, po drugi strani pa ravno zaradi nepreizkušnosti posameznih zdravil na tej občutljivi populaciji lahko pride do tega, da so na koncu oškodovani ravno otroci, bodisi zaradi prevelikih odmerkov in neželenih učinkov ali zaradi neučinkovitosti zdravila. Številna zdravila, ki se dandanes uporabljajo tudi za zdravljenje otrok, niso bila nikoli zares preizkušena na otrocih in se uporabljajo nenamensko (»off label«). Takih naj bi bilo kar 2/3 zdravil, ki so predpisana otrokom v bolnišnicah, na intenzivni negi celo do 90 %. Populacijska farmakokinetika vsaj nekoliko olajša pristop k tej dilemi, saj omogoča razvoj modela kljub maloštevilnim vzorcem posameznika, kar je pri otrocih izjemnega pomena, saj imajo manjši volumen krvi in je vzorčenje problematično tudi, če imajo zaradi zdravljenja že vstavljen venski kateter in načeloma dodaten odvzem vzorca ne bi bil problematičen z vidika invazivnost (28).

## **NELINEARNO MODELIRANJE MEŠANIH UČINKOV (NONMEM)**

NONMEM je prva programska oprema, ki je bila na voljo za PFK modeliranje. Ti modeli se imenujejo modeli mešanih učinkov zato, ker za opisovanje podatkov uporabljajo mešanico stalnih in naključnih učinkov. Stalni učinki napovedujejo povprečen vpliv sočasnih spremenljivk (na primer telesne mase), kot razlago dela interindividualne variabilnosti v FK parametrih (na primer očistku). Naključni učinki opisujejo preostalo interindividualno variabilnost, ki se je ne da napovedati iz povprečja stalnih učinkov (24). Pristop NONMEM obravnava populacijo kot enoto analize in ne posameznika, ampak pri tem upošteva strukturo individualnih naključnih učinkov. To zagotavlja ustrezno upoštevanje motečih korelacij in neravnovesij, ki se lahko pojavijo pri opazovanih podatkih (27). NONMEM omogoča pridobitev podatkov, ki so reprezentativni za tiste, pri katerih se določeno zdravilo klinično uporablja. Tak pristop zato ne stremi k pridobitvi številnih podatkov za posameznika, pač pa želi vključiti čim več posameznikov, ne glede na to, če je za vsakega posameznika le malo podatkov. S tem je zagotovljena večja reprezentativnost, informacije pridobljene za določeno populacijo pa se lahko uporabijo za izboljšanje napovedi tudi pri posamezniku, o katerem je bilo zbranih le malo podatkov (24).

Nelinearni modeli mešanih učinkov so sestavljeni iz dveh delov: strukturnega modela (lahko vsebuje sočasne spremenljivke ali ne) in statističnega modela. Strukturni model opisuje časovni potek merjenega odziva za populacijo, predstavlja najbolj tipičnega predstavnika v populaciji. Prvi korak pri razvoju populacijskega FK modela, je opredelitev strukturnega modela (eno ali večprostornega), ki najbolje opiše podatke v odsotnosti sočasnih spremenljivk. Pri sočasnih spremenljivkah je problem, ker je med njimi lahko visoka stopnja korelacije in se med seboj ne izključujejo. Kadar imamo spremenljivko, ki močno vpliva na določen parameter modela, je smiselno, da jo v model vključujemo že od samega začetka. Na primer, če se zdravilo izloča izključno skozi ledvice, je kreatininski očistek tesno povezan s sistemskim očistkom, zato ga je pametno vgraditi v model že na začetku. Statistični model opisuje naključne učinke, ki jih ne moremo predvideti vnaprej in se nanašajo na variabilnost v populaciji (29).

Za nelinearno modeliranje mešanih učinkov ni potrebno, da podatki sledijo kakšnemu posebnemu strukturiranemu časovnemu razporedu vzorčenja in imajo lahko neredne čase vzorčenja. Podatki so lahko skopi, torej zgolj z enim ali nekaj vzorčenji na osebek, ali pa zelo zgoščeni, s številnimi vzorčenji pri enem osebk. Lahko pa je tudi kombinacija obojega, torej,

da imamo pri nekaterih osebkih le nekaj podatkov tekom odmernega intervala, pri drugih pa številne (20).

NONMEM večinoma ocenjuje parametre z metodo največjega verjetja. Metoda največjega verjetja izraža verjetnost, da z izračunom ocene parametra dobimo dejansko izmerjeno vrednost (27).

## **FARMAKOKINETIČNI MODELI ZA FENTANIL**

Encinas in sodelavci so v svojih raziskavah predpostavili, da triprostorni FK model, ki je bil že prej definiran za odraslo populacijo, najbolje opisuje časovni potek plazemske koncentracije fentanila v vseh starostnih obdobjih, tudi pri novorojenčkih. Predpostavka je bila podprta tudi s predkliničnimi podatki, ki so prikazovali, da so fentanilu najprej izpostavljeni dobro prekrvavljeni organi: možgani, srce, jetra, pljuča, ledvice in vranica; naknadno pride do porazdelitve v skeletno mišičje in še veliko počasneje do terciarne prerazporeditve v maščobno tkivo (7). Tkiva v telesu se namreč združujejo v različne prostore, odvisno od njihove prekrvavljenosti. Kapaciteta posameznega prostora za skladiščenje učinkovine je določena z njegovo velikostjo in afiniteto do te učinkovine. Značilno je, da se lipofilne učinkovine, kot je fentanil, obsežneje porazdeljujejo kot hidrofilne, zato jih navadno opisujemo z večprostornimi modeli, med tem ko je za visoko ionizirane učinkovine bolj primeren opis z enoprostornim modelom (12). Številne raziskave za opis FK fentanila pri novorojenčkih navajajo dvoprostorni model. Zaradi nizkih odmerkov, neobčutljivih analitskih tehnik ter kratkega časa vzorčenja lahko pride do tega, da tretji prostor ni zaznan (7). Pri osebkih najrazličnejših starosti lahko opazimo v dveh ali več zaporednih meritvah sekundarne vrhove, ki predstavljajo 10 ali več odstotno zvišanje plazemske koncentracije fentanila med izločanjem. Vrhovi so najverjetneje posledica akumulacije fentanila v perifernih tkivih ter posledičnega vračanja v centralni prostor, zato jih lahko pripišemo triprostornemu modelu (7, 17).

Encinas s sodelavci je pripravil FK/FD model za fentanil, ki temelji na fizioloških razlikah med dojenčki in odraslimi. Pri računanju ledvičnega očistka za novorojenčke je na primer upošteval stopnjo glomerulne filtracije in nevezane frakcije fentanila pri tej starosti, pri čemer je bila nevezana frakcija določena kot funkcija plazemske koncentracije  $\alpha_1$ -kislilnih glikoproteinov. Prav tako je upošteval razlike med novorojenčki in odraslimi v zrelosti (teži) jeter in encimski aktivnosti pri izračunu jetrnega očistka za novorojenčke. Vsi izračuni so

sicer temeljili na FK parametrih značilnih za odrasle, a z upoštevanimi fiziološkimi razlikami (7).

Santeiro in sodelavci so raziskovali farmakokinetiko fentanila pri dolgotrajni IV infuziji za sedacijo in analgezijo pri novorojenčkih, ki so bili na mehanskem predihavanju. Novorojenčki, ki so prejeli fentanil, so imeli za svojo starost normalno jetrno, ledvično in srčno funkcijo. Končni odmerek fentanila je bil  $1,28 \pm 0,58 \mu\text{g/kg/h}$  (razpon: 0,53-1,9  $\mu\text{g/kg/h}$ ). Povprečni razpolovni čas je bil  $9,5 \pm 2,6 \text{ h}$  (razpon: 5,7-12,7 h) in volumen porazdelitve v stanju dinamičnega ravnovesja je bil  $17 \pm 9 \text{ L/kg}$  (razpon: 10,1-30,3 L/kg). Novorojenčki so bili hemodinamsko stabilni v času vzorčenja. Volumen porazdelitve v stanju dinamičnega ravnovesja je bil večji in razpolovni čas izločanja daljši v primerjavi z enkratnim odmerkom pri novorojenčkih (30).

Singleton in sodelavci so v raziskavi ugotovili, da so bile plazemske koncentracije fentanila tekom 4-urnega vzorčenja nižje pri dojenčkih kot pri otrocih in odraslih s primerljivimi odmerki glede na telesno maso. Med dolgotrajnimi kirurškimi posegi dojenčki, glede na telesno maso, tolerirajo višje odmerke fentanila, brez pojava depresije dihanja. Do tega pride zaradi večjega volumna porazdelitve pri dojenčkih, saj je fentanil lipofilna zdravilna učinkovina in je njegov volumen porazdelitve odvisen od deleža telesne maščobe, ki je večji pri dojenčkih (17).

Andreson in Holford v svoji raziskavi opisujeta, da očistek fentanila pri novorojenčkih znaša 70-80% vrednosti očistka pri odraslih (standardizirano na 70kg) in doseže vrednost odrasle osebe v prvih 2 tednih življenja. Kot enega od razlogov za nižji očistek, navajata nižji jetrni krvni pretok. V njihovi raziskavi je volumen porazdelitve v času dinamičnega ravnovesja pri novorojenčkih 5,9 L/kg in pada s starostjo pri dojenčkih v zgodnjem otroštvu do 4,5 L/kg, pri otrocih do 3,1 L/kg in do 1,6 L/kg pri odraslih (2).

McClain s sodelavci opisuje FK model fentanila kot triprostorni model. Skupni volumen obeh stranskih prostorov je 4 L/kg, volumen osrednjega prostora 0,356 L/kg in očistek 57,4 L/h. Parametre so ocenjevali na odraslih s povprečno telesno maso 75,4 kg (31).

Saarenmaa s sodelavci opisuje odvisnost očistka fentanila od gestacijske starosti otrok in njihove telesne mase ob rojstvu. Novorojenčki s povprečno gestacijsko starostjo 32 tednov, so imeli povprečno vrednost očistka fentanila 11,5 mL/min/kg (0,69 L/h/kg), plazemska koncentracija fentanila v stacionarnem stanju je bila 2,5 ng/mL. Večina novorojenčkov je bila na mehanskem predihavanju. (16)

Rezultate različnih raziskav učinkovitosti terapije s fentanilom pri novorojenčkih je težko primerjati med seboj, zaradi različnih metod dela in tudi zato, ker so še vedno široko

razširjene zelo subjektivne ocene učinkovitosti zdravila (obrazna mimika, motorika), namesto standardiziranih meritev, na primer elektroencefalografija. Na farmakodinamiko vpliva tudi heterogenost posameznih populacij. Viri heterogenosti so v starosti bolnikov, osnovni bolezni, sočasni terapiji, predhodni izpostavljenosti opioidom, režimu odmerjanja, časih vzorčenja ter analitični metodi za določanje fentanila v plazmi (7).

## **NAMEN DELA**

Odmerjanje fentanila pri otrocih je problematično zaradi številnih dejavnikov, ki vplivajo na varnost in učinkovitost terapije z dolgotrajno intravensko infuzijo ter zaradi številnih razlik v telesni sestavi, porazdeljevanju, presnovi in izločanju med posameznimi bolniki. Pri otrocih odmerka ne moremo preprosto ekstrapolirati iz odmerka za odraslo osebo, preko telesne mase, pač pa je potrebno upoštevati tudi zrelost organizma ter vrednost očistka, ki določa hitrost izločanja zdravila iz telesa. Ker so testiranja učinkovin na otrocih problematična z vidika etike, je pomanjkanje informacij na tem področju še bolj izrazito. V magistrski nalogi bomo najprej s pomočjo validirane metode LC-MS/MS za sočasno določanje koncentracije fentanila in midazolama izmerili koncentracije obeh učinkovin v vzorcih plazme otrok z akutnim bronhiolitisom, ki so bili na mehanskem predihavanju in so prejeli fentanil in midazolam v obliki dolgotrajne intravenske infuzije. Vsakemu bolniku bomo pomerili koncentraciji učinkovin v plazmi 5 min, 15 min, 60 min in 12 ur po začetku infuzije fentanila ter tik pred prekinitvijo zdravljenja s fentanilom. V nadaljevanju magistrske naloge bomo uporabili le izmerjene plazemske koncentracije fentanila, medtem ko bodo sočasno izmerjene plazemske koncentracije midazolama uporabljene v drugih raziskavah. Na osnovi zbranih podatkov o bolnikih in o odmerkih, ki so jih prejeli, ter koncentracij fentanila, ki jih bomo izmerili v plazmi, bomo s pomočjo programskega paketa NONMEM razvili populacijski farmakokinetični model fentanila. Model bomo ovrednotili in ga po testiranju vpliva sočasnih spremenljivk poskusili s pomočjo danih podatkov čim bolj optimizirati. Končni model bo pomoč pri individualizaciji režima odmerjanja intravenske infuzije fentanila pri otrocih z akutnim bronhiolitisom.

## **MATERIALI IN METODE**

### **MATERIALI**

#### **BIOLOŠKI MATERIALI**

Uporabili smo človeško plazmo z antikoagulantom EDTA. Plazmo smo dobili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Do analize smo jo shranjevali v zamrzovalniku pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Slepo plazmo smo potrebovali za pripravo umeritvene premice in kontrolnih vzorcev. Pred uporabo smo plazmo odtalili pri sobni temperaturi. Odtaljeno smo premešali, da je bil vzorec plazme homogen.

Realne plazemske vzorce smo pridobili iz klinične študije z naslovom »Odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih« (32). Do analize smo jih prav tako shranjevali v zamrzovalniku, najprej na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in nato na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **STANDARDI**

Fentanil 1,0 mg/ml v metanolu (1ml) (Cerilliant, Round Rock, Texas, ZDA)

Fentanil D-5 100 $\mu\text{g}$ /ml v metanolu (1ml) (Cerilliant, Round Rock, Texas, ZDA)

Midazolam 1,0 mg/ml v metanolu (1ml) (Cerilliant, Round Rock, Texas, ZDA)

Diazepam D-5 1,0mg/ml v metanolu (1ml) (Cerilliant, Round Rock, Texas, ZDA)

#### **REAGENTI IN TOPILA**

Mili-Q voda, pridobljena z napravo Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost 18,2 m $\Omega\text{cm}$ , celokupni organski ogljik (TOC) 6 ppb (pri  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

Acetonitril –  $\text{CH}_3\text{CN}$  Chromasol V®; MM = 41,05 g/mol, MS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Etilacetat –  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ; MM = 88,10 g/mol (Panreac Quimica S. A. U., Barcelona, Španija)

Cikloheksan –  $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ; MM = 84,16 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Kalijev hidroksid – KOH; MM = 56,11g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

## RAZTOPINE

Raztopino standarda fentanila s koncentracijo 10 mg/L smo pripravili tako, da smo odpipetirali 20  $\mu$ L standarda fentanila (1 mg/ml) in dodali 1980  $\mu$ L mili-Q vode do 2 mL.

Raztopino delovnega standarda s koncentracijo fentanila 400  $\mu$ g/L in midazolama 20000  $\mu$ g/L smo pripravili tako, da smo odpipetirali 80  $\mu$ L raztopine standarda fentanila (10 mg/L), 40  $\mu$ L standarda midazolama (1 mg/mL) in 1880  $\mu$ L mili-Q vode v 2 mL mikrocentrifugirko. Premešali smo na vibracijskem mešalu.

Standardne raztopine učinkovin s koncentracijami fentanila od 400  $\mu$ g/L do 0,4  $\mu$ g/L in midazolama od 20000  $\mu$ g/L do 20  $\mu$ g/L smo pripravili tako, da smo v 1,5, 2 oz. 4 mL mikrocentrifugirko odpipetirali ustrezno količino raztopine delovnega standarda ter redčili z mili-Q vodo, kar prikazuje preglednica I. Na koncu smo raztopine premešali na vibracijskem mešalu.

Preglednica I: Priprava standardnih raztopin učinkovin z ustreznimi koncentracijami

Koncentracija midazolama ( $\mu$ g/L)	Koncentracija fentanila ( $\mu$ g/L)	Volumen delovnega standarda ( $\mu$ L)	Volumen mili-Q vode ( $\mu$ L)
20000	400	200	0
15000	300	150	50
10000	200	100	100
5000	100	50	150
2000	40	20	180
1000	20	20	380
500	10	25	975
200	4	20	1980
100	2	20	3980
50	1	20*	180
20	0,4	20**	180

\*namesto delovnega standarda smo odpipetirali 20  $\mu$ L standardne raztopine učinkovin s konc. midazolama 500  $\mu$ g/L in fentanila 10  $\mu$ g/L ter redčili z mili-Q vodo. \*\*namesto delovnega standarda smo odpipetirali 20  $\mu$ L standardne raztopine učinkovin s konc. midazolama 200  $\mu$ g/L in fentanila 4  $\mu$ g/L ter redčili z mili-Q vodo.

Raztopino internega standarda fentanila-D5 s koncentracijo 1 mg/L smo pripravili tako, da smo odpipetirali 50  $\mu$ L standarda fentanila-D5 (100  $\mu$ g/mL) v 5 mL bučko in dopolnili z mili-Q vodo do oznake.

Osnovno raztopino internih standardov s koncentracijo fentanila D-5 40  $\mu$ g/L in diazepam D-5 2000  $\mu$ g/L smo pripravili tako, da smo odpipetirali 400  $\mu$ L raztopine standarda fentanila



D-5 (1 mg/L) in 20  $\mu$ L standarda diazepama D-5 (100 mg/L) v 10 mL bučko in dopolnili do oznake s topilom za raztapljanje ter premešali.

Topilo za raztapljanje vzorcev smo pripravili tako, da smo v volumskem razmerju 1:1 zmešali mili-Q vodo in acetonitril.

0,5 M raztopino KOH smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,6971 g KOH, prenesli v 25 mL bučko ter dopolnili z mili-Q vodo do oznake.

## **NAPRAVE IN PRIBOR**

Hladilnik 4 °C (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

Hladilnik 4 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Turbovap® LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)

Mešalnik Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Polavtomatske pipete: 20 - 200  $\mu$ L, 100 - 1000  $\mu$ L in 1-10 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija), 2,0 mL in 4,0 mL

Plastične epruvete (Sarstedt, Nürnberg, Nemčija)

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, stojala za mikrocentrifugirke

## **METODE DELA**

### **KLINIČNI DEL RAZISKAVE**

Vsi klinični podatki o bolnikih ter njihovi plazemski vzorci, katere smo uporabili v analizi, so bili pridobljeni v okviru klinične raziskave z naslovom »Odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«. Klinična raziskava je bila odobrena tako s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko kot tudi s strani Javne agencije za zdravila in medicinske pripomočke. Klinični del raziskave je potekal na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, Kirurška klinika, UKC Ljubljana in na Kliniki za pediatrijo, UKC Maribor. Za klinični del raziskave je odgovoren zdravnik doc. dr. Štefan Grosek, dr. med., specialist pediatrije in intenzivne medicine, zaposlen na Kliničnem oddelku za otroško

kirurgijo in intenzivno terapijo, UKC Ljubljana. Starši bolnikov, ki so pristali na sodelovanje v raziskavi, so bili s potekom raziskave predhodno seznanjeni in so podpisali Izjavo o zavestni in svobodni privolitvi za sodelovanje v raziskavi. Pri izboru bolnikov, ki so bili vključeni v raziskavo, so bili upoštevani določeni vključitveni in izključitveni kriteriji.

V raziskavo so bili vključeni otroci:

- obeh spolov z akutnim bronhiolitisom, ki so bili na umetnem predihavanju
- ki so bili hospitalizirani na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, Kirurška klinika, UKC Ljubljana ali na Kliniki za pediatrijo, UKC Maribor)
- ki so bili zaradi potrebe po sedaciji vsaj 3 dni na terapiji z intravensko infuzijo fentanila
- katerih starši oz. skrbniki so seznanjenost s potekom raziskave in svoj pristanek za sodelovanje potrdili s podpisom Izjave o zavestni in svobodni privolitvi za sodelovanje v raziskavi

Iz raziskave so bili izključeni otroci:

- ki so bili na terapiji z drugimi opioidi
- z možganskimi poškodbami

Za zdravljenje s fentanilom se je uporabljal Fentanyl Torrex (50 µg/ml, raztopina za injiciranje) proizvajalca Torrex Chiesi Pharma (Dunaj, Avstrija). Raziskava ni imela vpliva na obstoječi režim odmerjanja fentanila.

Tekom infuzije je bilo vsakemu bolniku odvzeto 5 vzorcev venske krvi in sicer 5 min, 15 min, 60 min, 12 h po začetku infuzije fentanila ter tik pred prekinitvijo infuzije. Poleg odmerjanja so pri vseh bolnikih spremljali in beležili še naslednje podatke: telesna masa, vrednost serumskega kreatinina, bilirubina, albuminov ter celokupnih serumskih proteinov. O vsakem bolniku smo prejeli tudi podatke o spolu, starosti in gestacijski starosti. Iz gestacijske starosti smo naknadno izračunali vrednost pomenstrualne starosti (PMA). Bolniku je bilo pri posameznem odvzemu odvzeto največ 1,5 ml krvi oz. celokupno v času raziskave največ 7,5 ml. Kri je bila odvzeta iz centralnega venskega katetra, ki je bil otroku vstavljen že zaradi samega zdravljenja (32).

## **MERJENJE KONCENTRACIJE FENTANILA V PLAZMI**

Metoda priprave in analize vzorcev je bila razvita in validirana v okviru raziskovalne naloge Eve Rožman in Sanje Vrbeč, po kateri je tudi povzeta (33).

## **Priprava plazemskih vzorcev za analizo**

Pred vsako analizo plazemskih vzorcev, smo naredili umeritveno krivuljo, v katero smo vključili koncentracije fentanila od 0,04 µg/L do 40 µg/L ter koncentracije midazolama od 2 µg/L do 2000 µg/L. Vzorce za umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo v 1,5 mL mikrocentrifugirke odpipetirali 225 µL slepe plazme, ki smo jo predhodno odtalili na sobni temperaturi, 25 µL standardne raztopine učinkovin fentanila in midazolama v ustrezni koncentraciji (preglednica I) ter 28 µL osnovne raztopine internih standardov. Nato smo 30 sekund mešali na vibracijskem mešalniku, dodali 50 µL 0,5 M raztopine KOH ter še 30 sekund mešali na vibracijskem mešalniku. Potem je sledila še ekstrakcija tekoče – tekoče.

Plazemske vzorce bolnikov smo pred analizo prav tako odtalili na sobni temperaturi. Pred pipetiranjem smo jih rahlo premešali. Za analizo smo jih pripravljali na enak način kot plazemske vzorce za umeritveno krivuljo, le da smo namesto slepe plazme (225 µL) in raztopine fentanila in midazolama ustrezne koncentracije (25 µL), uporabili plazemski vzorec posameznega bolnika (250 µL). Potem smo prav tako dodali 28 µL raztopine internih standardov, 30 s mešali, dodali 50 µL 0,5 M raztopine KOH, 30 s mešali ter nadaljevali z ekstrakcijo tekoče – tekoče.

Ekstrakcija je potekala tako, da smo vzorcem najprej dodali 750 µL mešanice cikloheksana in etilacetata v razmerju 1:2 ter 1 minuto mešali na vibracijskem mešalu. Nato smo vzorce 10 minut centrifugirali pri 3000 g in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo v nove 1,5 mL centrifugirke prenesli 500 µL supernatanta ter sušili z dušikom pri povišanem tlaku. Za sušenje smo uporabili napravo Turbovap®. Sušili smo pri temperaturi 40 °C, 10 minut.

Sušenju je sledila rekonstrukcija suhega vzorca. Raztopili smo ga v 150 µL topila za raztapljanje ter 1 minuto mešali na vibracijskem mešalu. Tako pripravljene vzorce smo nanесли na mikrotitrsko ploščico (po 100 µL vzorca).

## **LC-MS/MS analizna metoda**

Vzorci so bili nato analizirani s pomočjo metode LC-MS/MS, ki je zelo občutljiva in selektivna in se je izkazala kot najprimernejša za sočasno določanje fentanila in midazolama v plazmi bolnikov.

Ustrezno nizko mejo kvantifikacije in selektivnost nam je omogočila uporaba LC-MS/MS tipa trojni kvadrupol (QQQ). Visoka selektivnost takšnega masnega detektorja je posledica

spremljanja tako mase starševskih kot tudi mase hčerinskih ionov. Omogočajo tudi izjemno občutljive kvantitativne analize analitov v kompleksnih bioloških vzorcih. Za kvantifikacijo na masnem spektrometru običajno uporabljamo multirezidualno analizo, katere osnova je kromatografska ločba analitov in detekcija kromatografskih vrhov z masnim spektrometrom, ki analite razbije in detektira nastale hčerinske ione (33). Nastavitve parametrov multirezidualne analize za posamezen analit so prikazane v preglednici II, ostale nastavitve masnega analizatorja pa v preglednici III. Pri MS/MS metodi smo uporabili elektrorazprševalno ionizacijo (ESI) s pozitivnim načinom ionizacije (33).

Preglednica II: Parametri multirezidualne analize za posamezen analit

Analit	MRM* prehod	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (eV)
Fentanil-D5	342,3 → 188,1	90	20
Fentanil	337,2 → 188,2	130	20
Midazolam	326,1 → 291,1	170	24
Diazepam-D5	290,1 → 198,1	140	32

\*MRM: multirezidualna analiza

Preglednica III: Parametri masnega analizatorja

Sušilni plin	275°C, pretok 5L/min
Nebulizacijski plin	45 psi
Jetstream® plin	320°C, pretok 11L/min
Napetost na kapilari	4000V
Nozzle voltage® (napetost na šobi)	1000V
Razdelilni čas	50ms

Kromatografska kolona za metodo LC je bila Gemini C<sub>6</sub>-Phenyl 50x3,0 mm s predkolono Gemini C<sub>6</sub>-Phenyl 4x2 mm. Na kolono smo injicirali 1 µL vzorca, nato pa 5 s spirali zunanost igle z 80 % metanolom. Uporabili smo gradientni pretok mobilne faze, sestavljene iz 0,1 % mravljične kisline in metanola. Čas analize je znašal 4,3 minute (33).

Točnost in ponovljivost analizne metode smo preverili s pomočjo kontrolnih vzorcev, ki so imeli znano koncentracijo analita v območju nizke, srednje in visoke koncentracije. Iz odziva posameznih kontrolnih vzorcev smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali njihove koncentracije. Metoda je točna, če povprečna vrednost ne odstopa več kot 15 % oz. več kot 20 % v primeru kontrolnega vzorca v območju nizke koncentracije. Ponovljivost je ustrezna, če relativni standardni odklon najmanj petih ponovitev pri posamezni koncentraciji ne odstopa

več kot 15 % oz. več kot 20 % v primeru kontrolnega vzorca v območju nizke koncentracije (34).

## GENOTPIZACIJA ABCB1

Fentanil je substrat prenašalca P-glikoproteina (P-gp), ki ga kodira gen ABCB1. V genu ABCB1 je opisan polimorfizem C3435T (rs1045642) v eksonu 26, ki vpliva na izražanje P-gp. Podatke o genotipih posameznih bolnikov smo pridobili iz magistrske naloge Špele Mlakar. V okviru te naloge je bila DNA izolirana iz celičnega dela krvi bolnikov po protokolu FlexiGene z oboritvijo DNA s 100 % izopropanolom. Za genotipizacijo so uporabili metodo alelne diskriminacije s hidrolizirajočimi sondami. Celični del krvi je bil pridobljen po odvzemu s centrifugiranjem (10 min, 4.000 obratov/min) (35).

## POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE

Vsi bolniki vključeni v raziskavo so prejeli fentanil v obliki dolgotrajne intravenske infuzije. Večino bolnikov je med in pred infuzijo prejela zdravilo tudi v obliki bolus injekcij, nekaterim pa se je tekom zdravljenja spremenila le hitrost infuzije. Poleg fentanila so vsi bolniki prejeli še midazolam ter večina od njih še dodatno terapijo, vendar je nismo vključili v analizo (na primer: protimikrobne učinkovine, zaviralce protonske črpalke, protibolečinska zdravila).

### Razvoj osnovnega modela

Ko smo uredili bazo podatkov, smo začeli z razvojem osnovnega modela. Najprej smo testirali enoprostorni model, nato dvo- in triprostornega. Farmakokinetične parametre smo ocenjevali s pomočjo programskega paketa NONMEM. Izhodiščne vrednosti FK parametrov smo povzeli po diplomski nalogi N. Vobornik (36). Preračunali smo jih na mediano telesne mase bolnikov naše populacije (preglednica IV).

Preglednica IV: Izračun izhodiščnih vrednosti FK parametrov

Parameter	Vrednost pri odraslih (36)	Alometrično skaliranje za 5,3 kg težkega otroka	Uporabljena vrednost
Cl	88,2 L/h	$Cl (5,3\text{kg}) = 88,2 (5,3/70)^{0,75}$	13 L/h
V	0,37 L/kg	$0,37 \text{ L/kg} * 5,3 \text{ kg}$	2,0 L

Cl – očistek, V – volumen porazdelitve

Za enoprostorni model smo v programu izbrali obliko modela ADVAN1/TRANS2 iz zbirke PREDPP. Takšen model je definiran s parametroma  $Cl$  in  $V$ . Povezava med njima je prikazana v enačbi 1, v kateri  $Cl$  predstavlja očistek,  $V$  volumen porazdelitve in  $k$  hitrostno konstanto eliminacije.

$$k = \frac{Cl}{V} \quad \text{Enačba 1}$$

Pri dvoprostornem modelu smo v programu izbrali obliko modela ADVAN3/TRANS4 iz zbirke PREDPP. V tem primeru z modelom ocenjujemo parametre  $Cl$ ,  $V_1$ ,  $V_2$ , in  $Q$  v razmerjih, katera opisujejo enačbe 2.  $Cl$  predstavlja očistek,  $V_1$  volumen centralnega prostora,  $V_2$  volumen perifernega prostora,  $Q$  distribucijski očistek,  $k$  konstanto hitrosti eliminacije,  $k_{12}$  in  $k_{21}$  pa predstavljata hitrostni konstanti porazdeljevanja iz centralnega v periferni prostor in obratno.

$$k = \frac{Cl}{V_1} \quad k_{12} = \frac{Q}{V_1} \quad k_{21} = \frac{Q}{V_2} \quad \text{Enačbe 2}$$

Pri triprostornem modelu smo v zbirki PREDPP izbrali obliko modela ADVAN11/TRANS4. V primeru triprostornega modela smo ocenjevali FK parametre  $Cl$ ,  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $Q_2$  in  $Q_3$  v razmerjih, katera opisujejo enačbe 3.  $Cl$  predstavlja očistek,  $V_1$  volumen centralnega prostora,  $V_2$  in  $V_3$  volumna perifernih prostorov,  $Q_2$  in  $Q_3$  distribucijska očistka med posameznimi prostori,  $k$  konstanto hitrosti eliminacije,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{31}$  pa predstavljajo hitrostne konstante porazdeljevanja med posameznimi prostori.

$$k = \frac{Cl}{V_1} \quad k_{12} = \frac{Q_2}{V_1} \quad k_{21} = \frac{Q_2}{V_2} \quad k_{13} = \frac{Q_3}{V_1} \quad k_{31} = \frac{Q_3}{V_3} \quad \text{Enačbe 3}$$

V vseh primerih smo za ocenjevanje rezidualne variabilnosti izbrali kombinacijo aditivne in proporcionalne napake.

Naslednji korak k izboljšanju osnovnega modela je bila vključitev vpliva telesne mase v predhodni strukturni dvoprostorni model. Telesno maso smo v model vključili brez predhodnega testiranja vpliva, saj je njen vpliv na FK parametre znan in tudi s fiziološkega vidika pričakovan. Telesno maso smo vključili z alometričnim razmerjem, katerega smo povzeli po literaturi. Tipična vrednost volumna porazdelitve vsakega prostora je povezana s telesno maso preko alometričnega razmerja z eksponentom 1, kot je prikazano v enačbi 4, v

kateri  $V_{std}$  predstavlja tipično vrednost volumna porazdelitve za odraslo osebo, ki tehta 70 kg (28).

$$V_{tip.} = V_{std.} \frac{\text{telesna masa}}{70} \quad \text{Enačba 4}$$

Tipična vrednost sistemskega očistka in distribucijskih očistkov je povezana s telesno maso preko alometričnega razmerja z eksponentom 0,75, kot je prikazano v enačbi 5, v kateri  $Cl_{std}$  predstavlja tipično vrednost očistka pri odrasli osebi, ki tehta 70 kg (28).

$$Cl_{tip.} = Cl_{std.} \left( \frac{\text{telesna masa}}{70} \right)^{0,75} \quad \text{Enačba 5}$$

Model z vključenim vplivom telesne mase smo določili za naš osnovni model. Z njim smo določali očistek, volumen centralnega prostora, volumen perifernega prostora ter distribucijski očistek. Vse parametre smo ocenjevali na 70 kg. Ocenjevali smo tudi interindividualno variabilnost (predstavlja delež nepojasnjene variabilnosti med osebki za posamezen parameter) ter aditivno in proporcionalno napako. Mediano, standardno napako in interval zaupanja smo določili s pomočjo metode ponovljenega vzorčenja.

## Razvoj modela s sočasnimi spremenljivkami

### *Sočasne spremenljivke*

V nadaljnjem razvoju modela smo testirali vpliv sočasnih spremenljivk. Te opisujejo interindividualno variabilnost FK parametrov strukturnega modela. Za testiranje smo imeli na voljo naslednje sočasne spremenljivke: spol, starost, vrednost serumskega kreatinina, bilirubina, albuminov, celokupnih serumskih proteinov ter genotip ABCB1. Sočasne spremenljivke so lahko zvezne ali diskretne. Diskretne sočasne spremenljivke lahko zavzemajo le dve vrednosti, primer je spol bolnika (na primer moški spol = 0, ženski spol = 1). Enačba 6 opisuje zvezo med diskretno sočasno spremenljivko in očistkom.  $\theta_1$  je tipična vrednost parametra (Cl) pri bolniku moškega spola,  $\theta_2$  pa predstavlja zvečanje/zmanjšanje vrednosti parametra pri bolnicah.

$$TVCl = \theta_1 + \theta_2 X \quad (X=1, X=0) \quad \text{Enačba 6}$$

Primer zvezne sočasne spremenljivke je vrednost bilirubina. Zvezne sočane spremenljivke lahko zavzemajo več vrednosti. Odnos med sočasno spremenljivko in parametrom modela je lahko linearen (enačba 7) ali potenčen (enačba 8).

$$\mathbf{TVCI} = \boldsymbol{\theta}_1 + \boldsymbol{\theta}_2 \mathbf{X} \quad \text{Enačba 7}$$

$$\mathbf{TVCI} = \boldsymbol{\theta}_1 \mathbf{X}^{02} \quad \text{Enačba 8}$$

### ***Postopno testiranje vpliva sočasnih spremenljivk***

Postopno testiranje vpliva sočasnih spremenljivk (SCM) je metoda, pri kateri smo osnovnemu modelu postopoma dodajali posamične sočasne spremenljivke. Pri tem smo spremljali zmanjšanje vrednosti OFV ob vključitvi posamezne sočasne spremenljivke, v primerjavi z vrednostjo OFV pri osnovnem modelu. Nato smo postopoma vključili sočasne spremenljivke, ki so imele značilen vpliv (znižanje OFV za več kot 3,84; stopnja tveganja  $p < 0,05$ ). Ko smo vključili vse sočasne spremenljivke z značilnim vplivom, smo dobili polni model. Nato pa smo iz polnega modela postopoma odstranjevali posamezne sočasne spremenljivke, katere smo prej vključili. Zopet smo spremljali vpliv na OFV. Če se je po odstranitvi posamezne sočasne spremenljivke OFV povišala za več kot 6,63 (stopnja tveganja  $p < 0,01$ ), smo jo vrnili v model, sicer smo jo odstranili. Tako smo delali z vsemi sočasnimi spremenljivkami, kar nam prinaša končni model, ki vsebuje samo sočasne spremenljivke, ki imajo značilen vpliv.

### ***Funkcija zorenja (MF)***

Kot zadnji korak pri izboljšavah na poti do končnega modela, smo preizkusili vpliv funkcije zorenja (MF). MF upošteva s starostjo povezano višanje vrednosti očistka ločeno od učinka, ki ga ima na očistek telesna masa. Ta je v model že vključena z alometričnim razmerjem. MF zajema vrednosti od 0 do 1 in na ta način prikazuje delež tipične vrednosti očistka pri odraslem.

Na razpolago smo imeli gestacijske starosti otrok. Gestacijska starost je čas, ki je pretekel od prvega dne materine zadnje menstruacije do rojstva otroka. Gestacijski starosti smo prišteli kronološko starost in tako dobili PMA (pomenstrualna starost), katero smo vključili v model preko MF (enačba 9).

$$\mathbf{MF} = \frac{\mathbf{PMA}^s}{(\mathbf{PMA}50^s + \mathbf{PMA}^s)} \quad \text{Enačba 9}$$



$PMA_{50}$  predstavlja PMA pri kateri očistek doseže polovico svoje maksimalne vrednosti, medtem ko »s« predstavlja naklon v sigmoidni krivulji v diagramu MF v odvisnosti od PMA.

Parametre smo ocenjevali na 70 kg.

### ***Randomizacijski test***

Ko smo testirali vpliv polimorfizma gena ABCB1 na očistek fentanila, smo ugotovili, da dobimo pri polimorfem homozigotu precej veliko znižanje očistka (32,9 % pri modelu, ki ne vključuje MF in 37,8 % pri modelu, ki vključuje MF), v primerjavi s heterozigoti in homozigoti divjega tipa. Zato smo se odločili za združitev heterozigotov in homozigotov divjega tipa v eno skupino, saj heterozigoti niso pomembno vplivali na znižanje očistka v primerjavi s homozigoti divjega tipa. Polimorfne homozigote smo dali v drugo skupino. Še vedno smo dobili precej veliko znižanje očistka (29,2 % pri modelu, ki ne vključuje MF in 26,6 % pri modelu, ki vključuje MF). Kljub temu je bilo znižanje OFV neznačilno. OFV je v tem primeru le eden od pokazateljev neznačilnosti vpliva, zato smo se odločili še za randomizacijski test.

Randomizacija sočasnih spremenljivk temelji na tem, da v primeru, ko med sočasno spremenljivko in farmakokinetičnim parametrom ni statistično značilne povezave, ni pomembno, katero od vrednosti sočasne spremenljivke pripišemo posamezniku. Tako dobimo nov randomiziran niz podatkov, ki ustreza modelu z vključeno sočasno spremenljivko. Rezultat randomizacije je empirična porazdelitev opazovanih vrednosti, v našem primeru so to vrednosti OFV ter vrednost znižanja očistka v primeru polimorfne homozigota. Te vrednosti se potem razporedijo po velikosti. Mejna vrednost OFV pri 5 % tveganju je vrednost 5. centila (razlika je možna le v eni smeri, saj se OFV lahko le manjša). Vpliv sočasne spremenljivke bi bil značilen, če bi bil OFV končnega modela nižji. Pri vrednostih, ki opisujejo spremembe očistka, imamo spodnjo in zgornjo mejo (razlika je možna v obe smeri): spodnjo mejo predstavlja vrednost 2,5. centila, zgornjo vrednost 97,5. centila. Vpliv bi bil značilen, če bi bila vrednost pod spodnjo ali nad zgornjo mejo.

## **Vrednotenje modela**

### ***Standardni diagnostični diagrami***

Kot prvo metodo vrednotenja modela smo vedno uporabili standardne diagnostične diagrame, pri katerih smo opazovali kako so posamezne vrednosti razpršene okoli črte enakosti  $y=x$  in kakšen je trend podatkov, katerega prikazuje trendna črta. Vsak model smo analizirali z naslednjimi diagnostičnimi diagrami: meritve v odvisnosti od populacijskih ter individualnih napovedi, pogojno utežene rezidualne v odvisnosti od napovedane koncentracije, individualno utežene rezidualne v odvisnosti od individualne napovedane koncentracije in pogojno utežene rezidualne v odvisnosti od časa.

### ***Metoda ponovljenega vzorčenja***

Metodo ponovljenega vzorčenja (ang. bootstrapping) smo pri naših različicah modelov izvajali iz dveh različnih razlogov. Prvi razlog je, da smo s pomočjo te metode pridobili statistične parametre (standardno napako, mediano, aritmetično sredino ter meje intervala zaupanja). Drugi razlog za izvedbo ponovljenega vzorčenja je vrednotenje posameznih različic FK modela, saj s to metodo lahko preverjamo točnost in natančnost vrednosti posameznih FK parametrov modela.

Princip metode je tak, da iz naših originalnih vzorcev, ki naj bi bili reprezentativni za določeno populacijo, z naključnim ponovljenim vzorčenjem z zamenjavo generiramo nove nize vzorcev. Metoda podatke naključno izbira iz osnovne populacije, s čimer zagotovi reprezentativnost. Kakšen od podatkov se lahko zaradi naključnega izbiranja večkrat pojavlja v novih nizih, kakšen nikoli. Te podatke potem NONMEM uporabi za ponovno določitev parametrov modela. Nato pa za te parametre, ki so določeni na novo, izračuna še statistične parametre (standardno napako, mediano, interval zaupanja). Ko vidimo, kako se porazdeljujejo vzorci, pridobljeni z metodo ponovljenega vzorčenja, lahko sklepamo na skladno porazdeljevanje osnovnega vzorca (37).

### ***Vizualno vrednotenje napovedi modela***

Tudi vizualno vrednotenje napovedi modela (VPC) je ena izmed metod za vrednotenje modelov pridobljenih s programskim paketom NONMEM. Metoda na pregleden in preprost način sporoča veliko informacij o modelu in je lahko pomembna pri usmerjanju oblikovalca,

vrednotenju modela, odkrivanju potencialnih napak. Temelj VPC metode je grafično oceniti, ali so simulacije, pridobljene iz osnovnega modela, sposobne prikazovati osrednji trend in spremenljivost opazovanih podatkov glede na čas. V idealnem primeru bi lahko z metodo VPC diagnosticirali tako stalne kot naključne učinke v modelu mešanih učinkov. Diagnostika poteka tako, da primerjamo določene centile opazovanih ter simuliranih podatkov. Predstavljena je mediana ter 5. in 95. centil. V našem primeru smo z metodo VPC pridobili 1000 simuliranih ponovitev podatkov, katere smo nato primerjali z opazovanimi. V določenih primerih nam osnovna oblika te metode pove premalo, še posebej pri diagnostiki naključnih učinkov. Osnovna VPC metoda ni primerna kadar imamo veliko variabilnost v odmerkih in kadar imamo vplivne sočasne spremenljivke. V takšnih primerih bi bila lahko taka diagnostika zavajajoča, zato je primerneje uporabiti pcVPC (prediction-corrected VPC), ki ohranja osnovni princip interpretacije podatkov, le da je odvisna spremenljivka pred izračunom statističnih podatkov korigirana glede na tipično napovedano vrednost za populacijo. PcVPC lahko nadgradimo še v pcVAR VPC (prediction-corrected and variability-corrected VPC), pri katerem je upoštevana tudi variabilnost med posamezniki ter med posameznimi dogodki za vsak parameter (38). V našem primeru smo izvedli pcVAR VPC. Pred tem smo v tabelo s podatki vnesli novo kategorijo, v kateri smo časovno opredelili začetek infuzije fentanila pri vsakem posamezniku, saj so pred začetkom skoraj vsi prejeli bolus injekcije. Na tak način smo pri vseh imeli enako izhodišče.

### **Uporaba modela za načrtovanje odmerjanja fentanila**

Koncentracija fentanila v stacionarnem stanju je odvisna od hitrosti infuzije fentanila in njegovega očistka (enačba 10). Na osnovi razvitega farmakokinetičnega modela smo grafično prikazali odvisnost očistka fentanila od telesne mase otroka in pomenstualne starosti.

Srednje plazemske koncentracije fentanila za dosego analgezije pri otrocih se gibljejo od 1-3ng/mL, plazemske koncentracije za dosego sedacije pa so zelo variabilne (9). Po raziskavi Saarenmaa s sodelavci je primerna srednja plazemska koncentracija fentanila v stacionarnem stanju za novorojenčke na mehanskem predihavanju 2,5 ng/mL (16). Ker so v naši raziskavi prav tako vključeni otroci, ki so na mehanskem predihavanju, smo grafično prikazali še optimalno hitrost infuzije za dosego želene plazemske koncentracije v stacionarnem stanju (2,5 ng/mL), ki se spreminja v odvisnosti od očistka pri določeni telesni masi in pomenstualni starosti.

$$K_0 = C_{ss} Cl$$

Enačba 10

## REZULTATI

### PODATKI O BOLNIKI

Obravnavali smo 49 bolnikov, ki so bili hospitalizirani zaradi hudega akutnega bronholitisa v letih 2010 - 2013 v UKC Ljubljana in UKC Maribor. 33 je bilo dečkov in 16 deklic. Bolniki so prejeli fentanil v obliki bolus injekcij in dolgotrajne intravenske infuzije. Od 49 otrok je bilo 36 normalno donošenih, 13 je bilo nedonošenčkov. Sočasne spremenljivke, ki so jih spremljali in beležili tekom zdravljenja, so prikazane v preglednici V.

Preglednica V: Sočasne spremenljivke (n=49)

	Aritmetična sredina	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
Starost (mesece)	5,74	2,20	0,50	29,9
Telesna masa (kg)	6,08	5,28	2,80	13,5
Serumski kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	24,3	23,0	9,00	44,0
Plaz. albumini (g/L)	35,3	35,0	25,0	44,0
Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	16,4	6,0	2,00	136
Plaz. proteini (g/L)	55,1	54,0	44,0	73,0
PMA (mesece)	14,6	11,2	8,90	39,2

### PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE FENTANILA

#### TOČNOST IN PONOVLJIVOST ANALIZNE METODE LC-MS/MS

Rezultate izračuna točnosti in ponovljivosti analizne metode za določanje fentanila prikazuje preglednica VI. Točnost analizne metode za določanje fentanila je ustrezna, saj so odstopanja v vseh primerih manjša od 15 %. Ponovljivost smo definirali z izračunom relativnega standardnega odklona. Ponovljivost je ustrezna, saj relativni standardni odklon v območjih srednje in visoke koncentracije ne presega 15 % ter v območju nizke koncentracije ne presega 20 %.

Preglednica VI: Točnost in ponovljivost analizne metode za določanje fentanila (n=5-6 za vsako referenčno koncentracijo)

Referenčna koncentracija [ng/mL]	TOČNOST		PONOVLJIVOST
	Aritmetična sredina izmerjenih vrednosti [ng/mL]	Točnost izmerjenih vrednosti [%]	Relativni standardni odklon [%]
<b>0,04</b>	0,042	106,1	16,00
<b>2</b>	2,096	104,8	8,83
<b>40</b>	40,495	101,2	2,86

Vseh odvzetih plazemskih vzorcev, v katerih smo merili koncentracije fentanila, je bilo 243. Vrednosti vseh izmerjenih koncentracij plazemskih vzorcev so zbrane v preglednici VII.

Preglednica VII: Plazemske koncentracije fentanila ob različnih časovnih točkah (ng/mL)

ID bolnika	5 min	15 min	60 min	720 min	konec infuzije
<b>1</b>	<b>28,48</b>	2,19	<b>44,30</b>	<b>36,98</b>	2,99
<b>2</b>	6,70	1,32	1,38	2,41	5,08
<b>3</b>	8,74	<b>22,96</b>	4,97	<b>20,45</b>	2,32
<b>4</b>	1,42	1,63	1,77	1,59	1,36
<b>5</b>	1,25	1,40	1,40	2,80	2,95
<b>6</b>	4,93	<b>36,96</b>	<b>28,54</b>	7,96	<b>11,93</b>
<b>7</b>	1,92	1,38	1,29	5,51	1,25
<b>8</b>	4,56	9,65	<b>11,01</b>	4,25	2,16
<b>9</b>	2,07	1,16	1,54	2,16	8,74
<b>10</b>	0,77	0,75	2,84	1,88	2,09
<b>11</b>	1,54	1,65	1,46	3,58	3,83
<b>12</b>	3,57	2,60	2,93	3,81	3,60
<b>13</b>	<b>4,03</b>	<b>2,99</b>	<b>1,31</b>	<b>54,37</b>	<b>1,10</b>
<b>14</b>	2,56	2,57	6,62	6,91	3,40
<b>15</b>	1,08	0,88	0,83	1,87	5,23
<b>16</b>	5,33	1,39	3,41	3,58	2,90
<b>18</b>	0,65	0,58	<b>13,30</b>	<b>11,25</b>	1,05
<b>19</b>	0,24	0,30	0,58	9,10	<b>186,15</b>
<b>20</b>	4,01	3,21	7,02	<b>13,32</b>	9,91
<b>25</b>	3,96	1,19	<b>34,41</b>	1,40	4,42
<b>26</b>	1,67	1,64	2,51	<b>19,76</b>	2,84
<b>27</b>	<b>124,20</b>	<b>280,78</b>	<b>302,97</b>	<b>164,24</b>	<b>98,40</b>
<b>28</b>	<b>10,98</b>	3,66	<b>61,65</b>	1,45	<b>43,83</b>
<b>29</b>	1,91	/	<b>23,53</b>	<b>24,72</b>	2,38
<b>31</b>	2,60	2,37	2,84	7,55	6,23
<b>32</b>	1,89	<b>18,50</b>	<b>15,05</b>	<b>16,82</b>	0,87
<b>33</b>	2,03	<b>26,23</b>	3,52	4,45	4,82
<b>34</b>	0,87	0,76	1,37	3,11	8,31
<b>35</b>	0,58	0,45	0,51	<b>17,78</b>	<b>363,06</b>
<b>36</b>	2,50	4,16	<b>11,52</b>	<b>11,31</b>	9,35

ID bolnika	5 min	15 min	60 min	720 min	konec infuzije
37	0,74	2,77	1,43	5,81	9,38
38	3,28	<b>17,78</b>	9,70	<b>22,59</b>	3,56
39	1,93	1,71	3,02	7,19	5,74
40	4,79	4,93	5,64	<b>63,17</b>	5,52
41	<b>19,28</b>	<b>38,42</b>	<b>15,05</b>	2,87	3,34
42	1,14	8,08	8,00	<b>29,29</b>	2,35
43	6,93	6,14	<b>10,04</b>	7,66	5,26
44	0,82	1,20	1,42	3,48	9,17
45	0,55	0,50	0,37	0,84	0,64
46	3,40	3,67	/	4,83	4,89
47	0,70	1,61	1,07	2,45	0,88
48	2,85	2,53	1,66	0,92	0,88
49	3,44	4,46	6,89	7,50	1,10
50	3,57	3,14	2,92	6,02	4,51
51	1,39	1,69	1,54	3,97	0,82
55	2,01	1,85	2,37	4,90	<b>70,41</b>
61	0,27	0,26	0,56	<b>138,93</b>	2,72
62	0,53	0,49	0,80	<b>890,51</b>	<b>114,71</b>
63	1,37	1,03	0,89	2,37	1,37

ID: identifikacijska številka bolnika

Vrednosti zapisane *krepko in poševno* smo izločili iz farmakokinetične analize.

## UREJANJE BAZE PODATKOV

Izkazalo se je, da so nekatere izmerjene koncentracije v plazmi odvzetih vzorcev nerealno visoke ali pa so razlike v koncentracijah znotraj enega bolnika nesorazmerno velike. Vzrok za tako visoke vrednosti je lahko napačen način odvzema vzorca pri bolniku, na primer slabo spran kateter; nekateri vzorci so bili rahlo rdečkasti, kar nakazuje na hemolizo eritrocitov in bi lahko vplivalo na natančnost meritve. Koncentracije višje od 40 µg/L tudi niso relevantne, saj je uporabljena metoda za določanje koncentracije fentanila v plazmi linearna le v območju od 0,04 - 40 µg/L (33). Pri nekaterih bolnikih ni bilo zabeleženega časa odvzema posameznega plazemskega vzorca. Takih vrednosti, ki so ali odstopale ali so bile brez podatka o času odvzema, je bilo 50, kar predstavlja 20,6 % vseh izmerjenih koncentracij, in smo jih izločili iz baze podatkov, saj bi lahko občutno vplivale na rezultate, hkrati pa nam metoda populacijskega farmakokinetičnega modeliranja omogoča razvoj modela tudi v primeru, ko količina in časovna razporeditev odvzetih vzorcev nista pri vseh bolnikih enaki.

V preglednici VIII so prikazana območja, aritmetična sredina, minimalna vrednost in maksimalna vrednost koncentracij fentanila ob določenih časovnih točkah ter skupno za vse koncentracije fentanila, katere smo vključili v farmakokinetično analizo.

Preglednica VIII: Območja izmerjenih koncentracij fentanila, vključenih v farmakokinetično analizo.

konc. [ng/mL]	5 min	15 min	60 min	12 h	konec infuzije	celokupno
aritmetična sredina	2,65	2,36	2,77	4,13	4,00	3,09
razpon	0,24-8,74	0,26-9,65	0,37-9,70	0,84-9,10	0,64-9,91	0,24-9,91

## RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

### OSNOVNI MODEL

Pri opredelitvi osnovnega modela smo testirali enoprostorni, dvoprostorni in triprostorni model. Ugotovili smo, da je v našem primeru najprimernejši dvoprostorni model, kar nakazujejo tudi OFV (vrednost objektivne funkcije) vrednosti za posamezne modele (preglednica IX).

Preglednica IX: Primerjava OFV vrednosti eno-, dvo- in triprostornega modela

Model	OFV
1-prostorni	<b>461.18</b>
2-prostorni (eta na CL in V1)	<b>457.32</b>
3-prostorni (eta na CL in V1)	<b>457.40</b>

Pri osnovnem dvoprostornem modelu smo definirali naslednje farmakokinetične parametre: očistek (Cl), volumen centralnega prostora (V1), volumen stranskega prostora (V2) in distribucijski očistek (Q). Ocenjevali smo tudi interindividualno variabilnost posameznih parametrov ter rezidualno variabilnost - s kombinacijo aditivne in proporcionalne napake. Parametri osnovnega modela so zbrani v preglednici X.

Preglednica X: FK parametri osnovnega modela

Parameter	Ocena	IIV [CV %]
Cl [L/h]	3,50	96,4
V1[L]	0,236	199
V2[L]	20,1	120
Q [L/h]	28,4	15300
<b>Rezidualna variabilnost</b>		
Aditivna [ng/mL]	0,499	
Proporcionalna [%]	38,9	

Cl – očistek, V1 – volumen osrednjega prostora, V2 – volumen stranskega prostora, Q – distribucijski očistek, IIV – interindividualna variabilnost



## MODEL Z VKLJUČENIM VPLIVOM TELESNE MASE

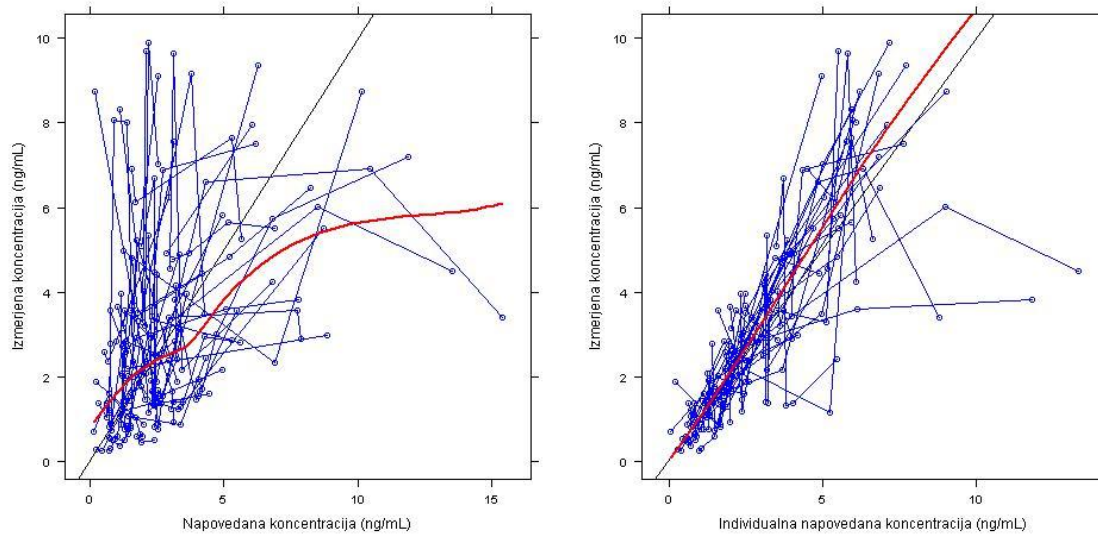
V nadaljnjem razvoju smo v osnovni dvoprostorni model alometrično vključili vpliv telesne mase. Parametre, ki smo jih določali, smo opredelili na 70 kg. Določali smo tudi interindividualno variabilnost za posamezne parametre. Ko smo opredelili model, smo izvedli še metodo ponovljenega vzorčenja, s pomočjo katere smo naše ocene parametrov ovrednotili ter opredelili tudi mediano, relativno standardno napako in interval zaupanja za vse parametre. Dobljeni FK parametri so zbrani v preglednici XI. Pričakovano se je po vključitvi vpliva telesne mase v FK model vrednost OFV močno znižala (iz 457,32 na 413,98).

Preglednica XI: FK parametri modela z vključenim vplivom telesne mase

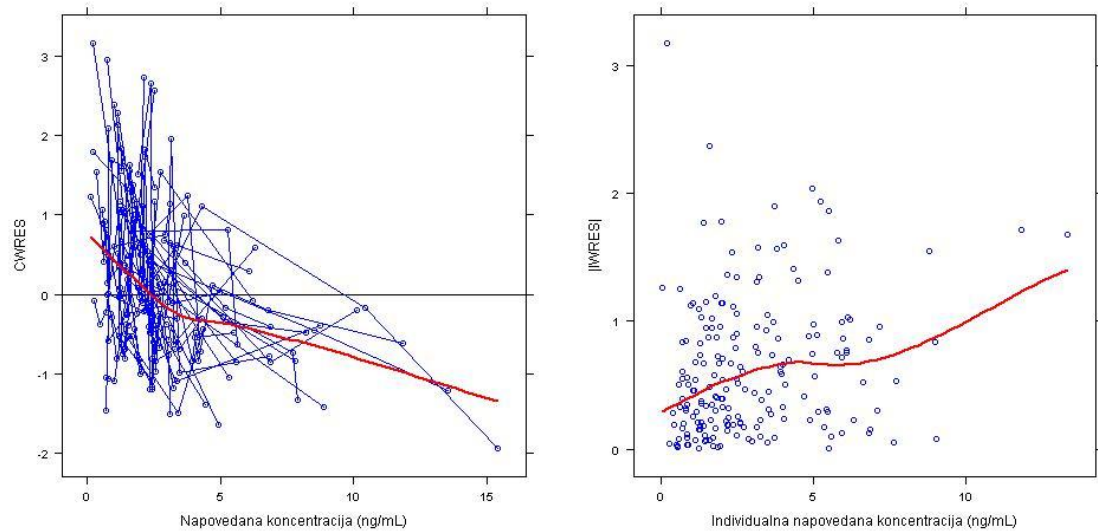
Parameter	Ocena	Ponovljeno vzorčenje		
		Mediana	RSE [%]	95 % CI
CI [L/h/70kg]	23,5	23,3	10,0	(19,1; 28,3)
V1 [L/70kg]	2,49	2,60	56,8	(0,371; 4,91)
V2 [L/70kg]	229	227	24,5	(138; 354)
Q [L/h/70kg]	228	228	187	(64,3; 3660)
IIV CI [CV%]	63,8	64,8	21,2	(50,4; 81,3)
IIV V1 [CV%]	29,1	63,7	203	(2,16; 317)
IIV V2 [CV%]	126	124	35,1	(56,7; 190)
IIV Q [CV%]	13300	19900	94,1	(495; 3,21*10 <sup>13</sup> )
<b>Rezidualna variabilnost</b>				
Aditivna [ng/mL]	0,529	0,546	37,0	(0,0794; 0,828)
Proporcionalna [%]	39,3	38,4	10,7	(29,9; 46,5)

CI – očistek, V1 – volumen osrednjega prostora, V2 – volumen stranskega prostora, Q – distribucijski očistek, IIV – interindividualna variabilnost, RSE – relativna standardna napaka, 95 % CI – 95 % interval zaupanja

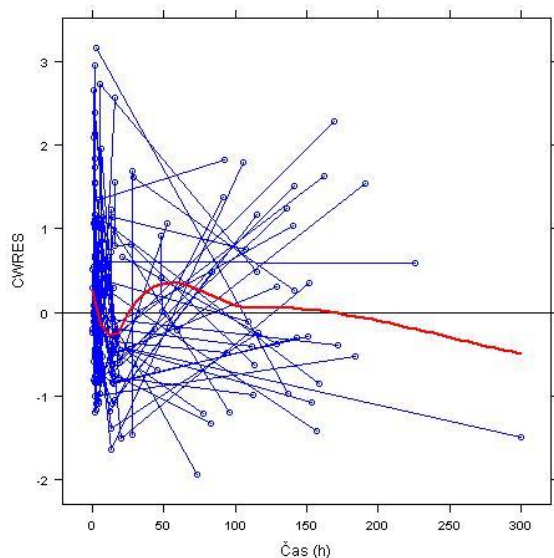
Model smo ovrednotili še z diagnostičnimi diagrami (slike 1 - 3). Na sliki 1 so prikazane meritve v odvisnosti od populacijskih ter individualnih napovedi. Točke na diagramu naj bi se čim bolj prilegale premici  $y=x$  (črna črta), oziroma bi bile enakomerno razpršene okoli premice. Diagnostični diagrami so potrdili tudi smiselnost izbire kombiniranega modela napake pri vseh različicah modela. To se vidi na slikah, ki prikazujejo utežene rezidualne v odvisnosti od napovedane koncentracije ter iz intervalnih ocen obeh delov napake (aditivne in proporcionalne), ki so v vseh primerih značilno različne od nič.



Slika 1: Izmerjene koncentracije v odvisnosti od napovedanih koncentracij (levo) in izmerjene koncentracije v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij (desno) za osnovni model. Črna črta prikazuje črto enakosti, premico  $y=x$ , rdeča črta prikazuje trend podatkov.



Slika 2: Pogojno uteženi reziduali (CWRES) v odvisnosti od napovedane koncentracije (levo) in individualno uteženi reziduali (IWRES) v odvisnosti od individualne napovedane koncentracije (desno) za osnovni model.



Slika 3: Prikaz pogojno uteženih rezidualov (CWRES) v odvisnosti od časa za osnovni model.

### VKLJUČITEV SOČASNIH SPREMENLJIVK

Pri našem modelu smo testirali vpliv sočasnih spremenljivk na očistek in volumen osrednjega prostora. Osnovni model, katerega smo vzeli za primerjavo, je že vključeval vpliv telesne mase, katerega smo vključili z alometričnim razmerjem. Poleg tega smo imeli na voljo še naslednje sočasne spremenljivke: starost, spol, vrednost serumskega kreatinina, bilirubina, albuminov ter celokupnih serumskih proteinov in genotip ABCB1. Značilna sta bila le vpliv starosti na očistek ter vpliv vrednosti bilirubina na očistek. Izbrali smo sočasno spremenljivko, ki je vrednost OFV največ znižala, v našem primeru je bila to starost, in smo jo vključili v model. Potem smo temu novemu modelu dodali sočasno spremenljivko, ki je za starostjo naslednja najbolj znižala vrednost OFV, v našem primeru vrednost bilirubina, vendar po vključitvi v model, ki je že vseboval vpliv starosti, vpliv vrednosti bilirubina ni bil več značilen. Če bi bil v prvem krogu značilen še vpliv kakšne druge sočasne spremenljivke, bi testirali še naprej, toliko časa, da vključitev nobene dodatne sočasne spremenljivke ne bi znižala vrednosti OFV za več kot 3,84. Na koncu smo našemu polnemu modelu odvzeli edino vključeno sočasno spremenljivko - starost. OFV se je povečala za 8,558, kar zadostuje, da smo jo vključili nazaj v model, saj ima značilen vpliv na očistek. Tako smo dobili končni model. Starost je vključena v obliki potenčnega modela. Pri modelu z vključenim vplivom telesne mase in starosti na očistek, smo parametre ocenili na 5,3 kg, kar predstavlja mediano vrednosti pri bolnikih vključenih v preiskavo. Enačba 11 prikazuje izračun očistka za takšen model, FK parametri modela pa so zbrani v preglednici XII.

$$CL (L/h) = 3,00 \left( \frac{\text{telesna masa}}{5,3} \right)^{0,75} \left( \frac{\text{starost}}{2,20} \right)^{0,242}$$

Enačba 11

Povezava sočasne spremenljivke (starosti) in parametra (očistka) je tudi biološko povsem smiselna.

Na volumen centralnega prostora ni imela nobena sočasna spremenljivka značilnega vpliva.

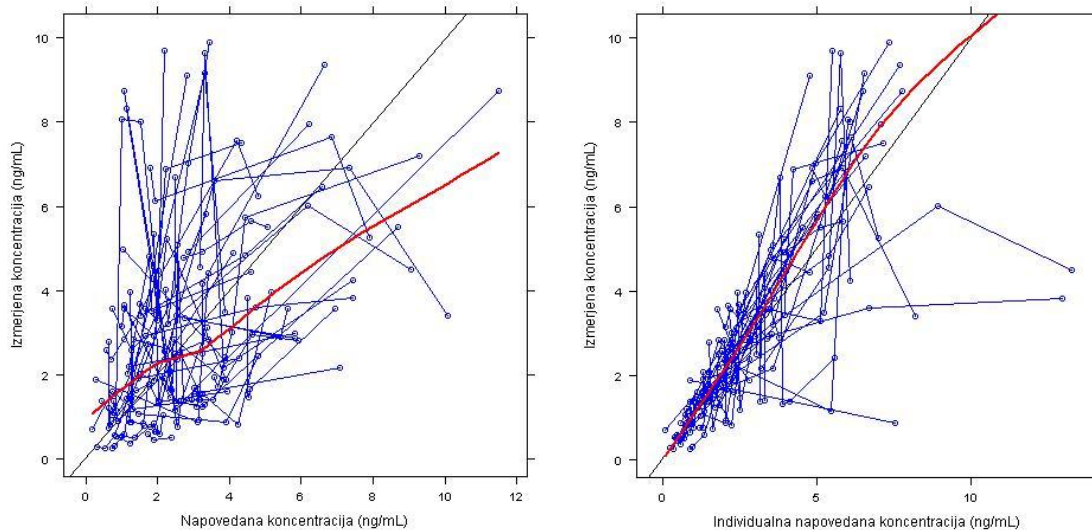
Testiranje vpliva sočasnih spremenljivk je prikazano v prilogi 1.

Preglednica XII: FK parametri modela z vključenim vplivom telesne mase ter starosti

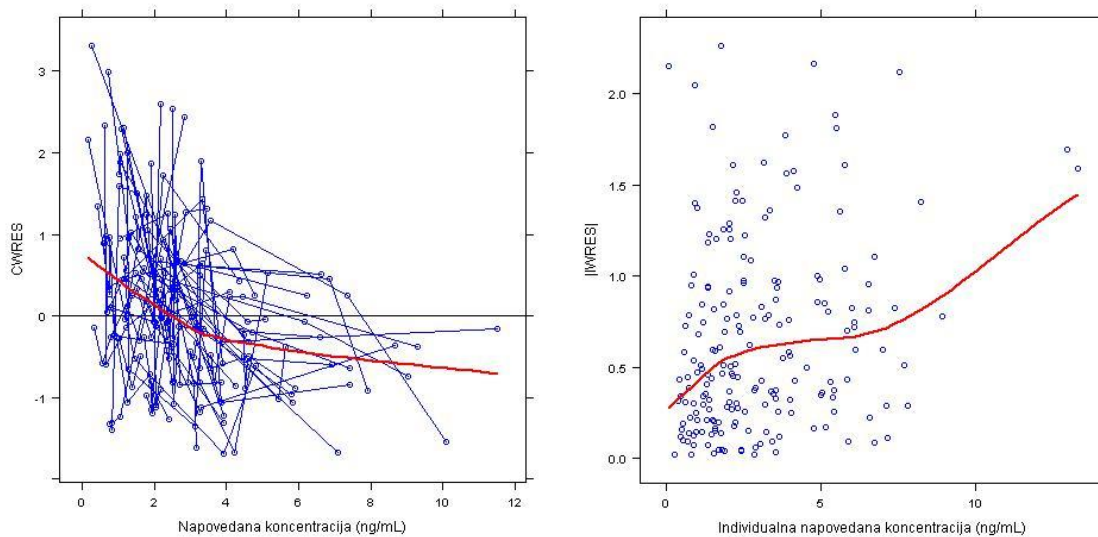
Parameter	Ocena	Ponovljeno vzorčenje		
		Mediana	RSE [%]	95 % CI
CL [L/H/5,3kg]	3,00	3,10	10,4	(2,49; 3,77)
V1[L/5,3kg]	0,164	0,164	90,7	(0,0132; 0,438)
V2 [L/5,3kg]	17,7	17,6	26,6	(10,4; 29,5)
Q [L/h/5,3kg]	36,3	34,3	567	(9,03; 658)
Vpliv starosti na Cl	0,242	0,217	34,1	(0,0733; 0,372)
IIV CI [CV %]	60,7	58,3	25,9	(39,2; 75,2)
IIV V1 [CV %]	39,5	62,0	121	(4,43; 423)
IIV V2 [CV %]	145	132	36,8	(60,9; 203)
IIV Q [CV %]	13800	12500	154	(244; 5,76*10 <sup>14</sup> )
<b>Rezidualna variabilnost</b>				
Aditivna [ng/mL]	0,290	0,327	52,3	(0,0237; 0,809)
Proporcionalna [%]	41,6	39,7	11,1	(30,5; 48,4)

Cl – očistek, V1 – volumen osrednjega prostora, V2 – volumen stranskega prostora, Q – distribucijski očistek, IIV – interindividualna variabilnost, RSE – relativna standardna napaka, 95 % CI – 95 % interval zaupanja

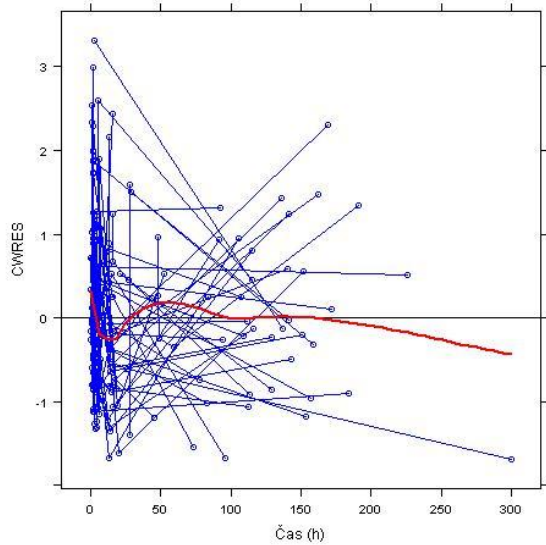
Tudi pri tej različici modela smo model najprej ovrednotili z diagnostičnimi diagrami (slike 4 - 6). Izvedli smo tudi vizualno vrednotenje napovedi modela (VPC) (slika 7).



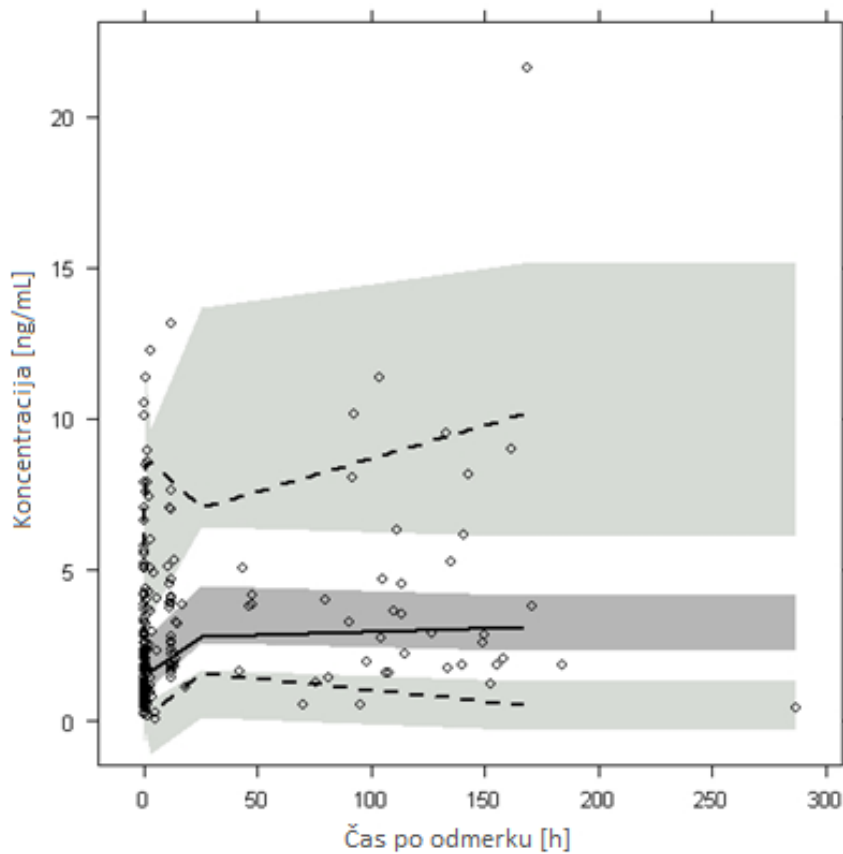
Slika 4: Izmerjene koncentracije v odvisnosti od napovedanih koncentracij (levo) in izmerjene koncentracije v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij (desno) za model z vključenim vplivom starosti na očistek. Črna črta prikazuje črto enakosti, premico  $y=x$ , rdeča črta prikazuje trend podatkov.



Slika 5: Pogojno uteženi rezidualoi v odvisnosti od napovedane koncentracije (levo) in individualno uteženi reziduali v odvisnosti od individualne napovedane koncentracije (desno) za model z vključenim vplivom starosti na očistek.



Slika 6: Pogojno uteženi reziduali (CWRES) v odvisnosti od časa za model z vključenim vplivom starosti na očistek.

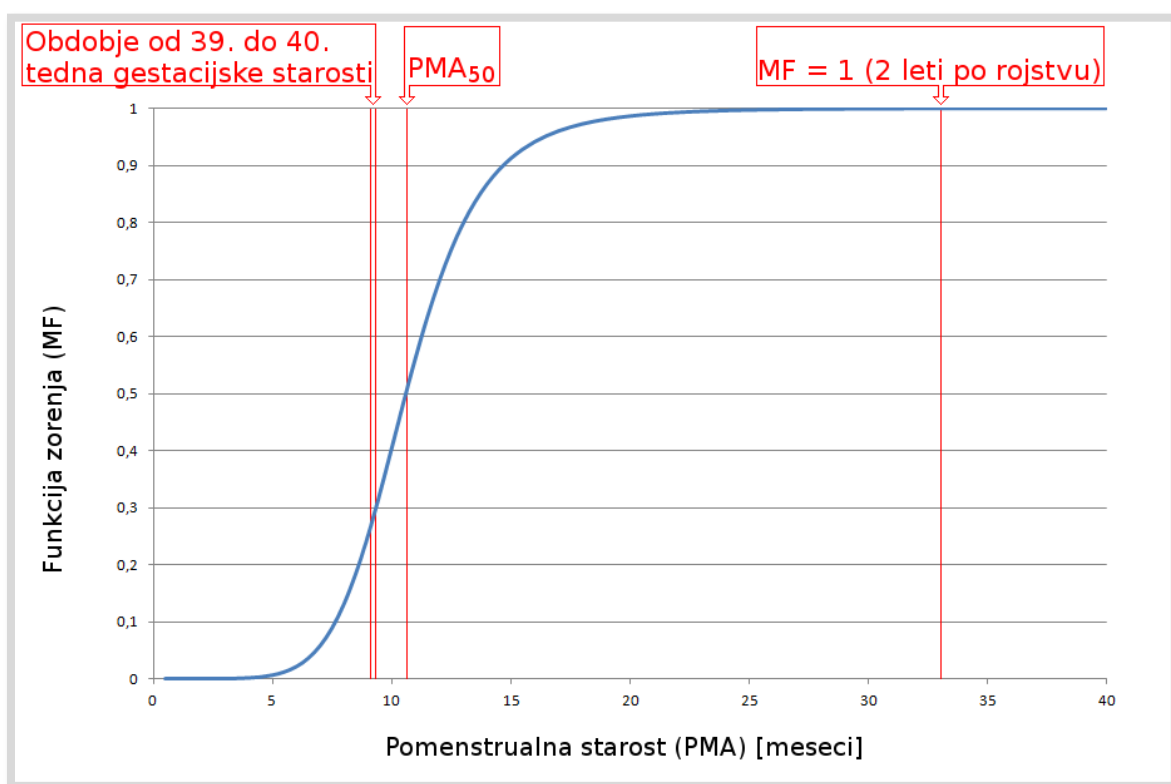


Slika 7: Rezultati VPC za model z vključenim vplivom starosti na očistek. Točke prikazujejo izmerjene vrednosti, siva območja predstavljajo 95 % intervale zaupanja napovedanih

vrednosti, črte pa mediano (polna črta), 5. centil in 95. centil (prekinjeni črti) izmerjenih vrednosti.

## MODEL Z VKLJUČENIM VPLIVOM TELESNE MASE IN FUNKCIJE ZORENJA (MF)

Kot zadnji poizkus izboljšave modela, smo vanj vključili vpliv funkcije zorenja (MF). MF smo vključili preko vrednosti PMA (pomenstrualna starost), katero smo izračunali iz gestacijske in kronološke starosti otrok (enačba 9). Spreminjanje funkcije zorenja s pomenstrualno starostjo prikazuje slika 8.



Slika 8: Grafični prikaz spreminjanja funkcije zorenja (MF) s pomenstrualno starostjo (PMA). Rojstvo otroka v obdobju od dopolnjenih 39. tednov (9,1 meseca) in do zadnjega dne 40. tedna (9,3 meseca) gestacijske starosti pomeni, da je otrok normalno donošen. V tem obdobju se MF otroka giblje med 0,264 in 0,293. Vrednost MF = 1 je dosežena šele pri pomenstrualni starosti 33 mesecev, kar je približno 2 leti po rojstvu. Od takrat dalje je MF enaka vrednosti pri odraslem.

Enačba 12 prikazuje izračun očistka za model, ki vključuje poleg vpliva telesne mase, tudi vpliv MF.

$$CL (L/h) = 35,8 \left( \frac{\text{telesna masa}}{70} \right)^{0,75} \left( \frac{PMA^{6,73}}{(10,6^{6,73} + PMA^{6,73})} \right)$$

Enačba 12

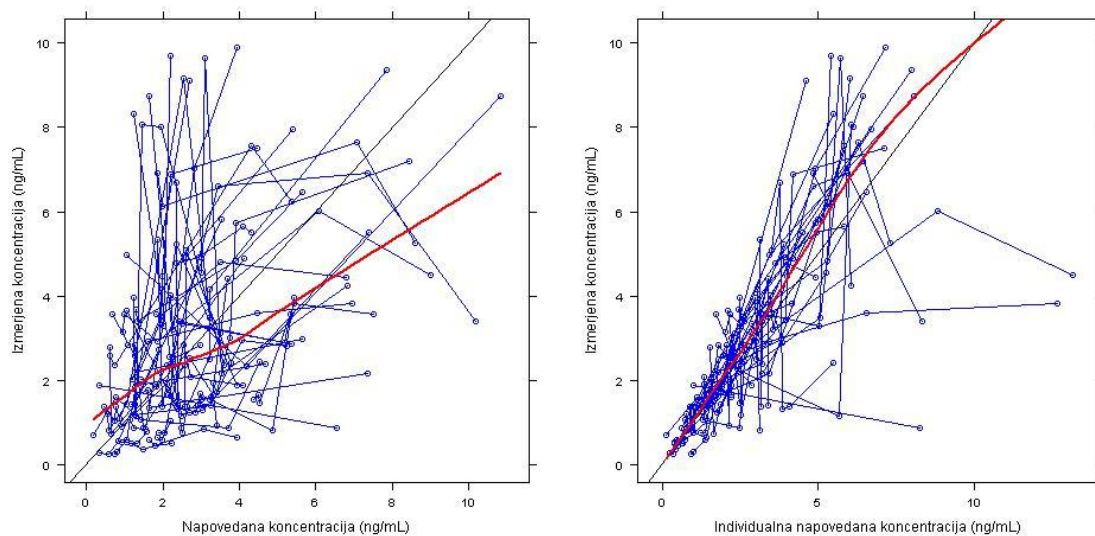
Preglednica XIII prikazuje pridobljene ocene posameznih parametrov ter njihove mediane, RSE in intervale zaupanja za model z vključenim vplivom telesne mase in MF. Model smo ovrednotili s standardnimi diagnostičnimi diagrami (slike 9 - 11) ter VPC (slika 12).

Preglednica XIII: FK parametri modela z vključenim vplivom telesne mase in MF

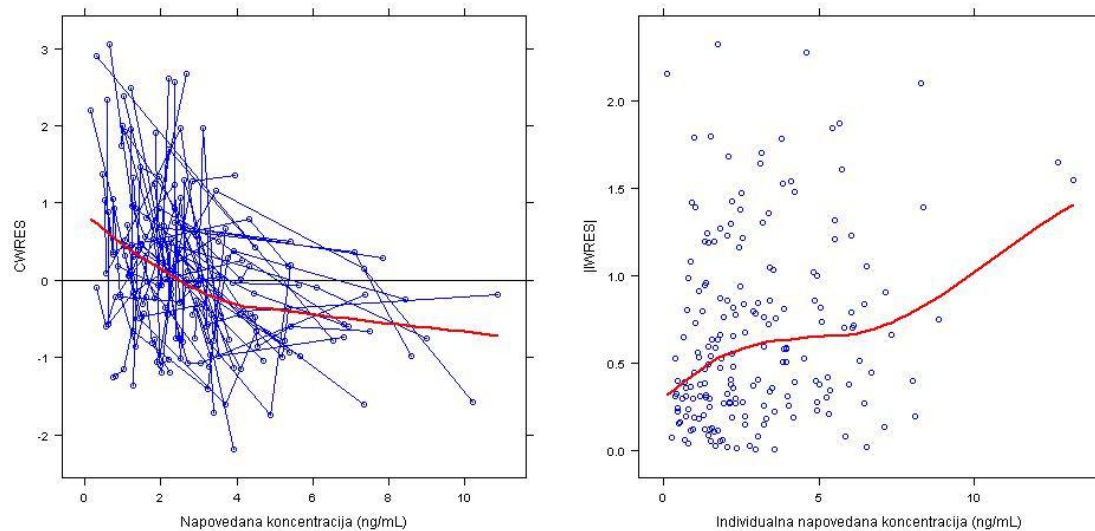
Parameter	Ocena	Ponovljeno vzorčenje		
		Mediana	RSE [%]	95% CI
CL [L/H/70kg]	35,8	36,3	182	(26,3; 67,1)
V1[L/70kg]	2,30	2,29	97,1	(0,211; 8,95)
V2 [L/70kg]	251	234	28,7	(125; 404)
Q [L/h/70kg]	219	229	1860	(64,6; 5320)
PMA <sub>50</sub> [meseci]	10,6	10,5	614	(6,97; 19,3)
s	6,73	5,16	78,2	(0,861;17,1)
IIV CI [CV %]	49,2	51,8	35,4	(27,6; 69,5)
IIV V1 [CV %]	28,1	46,4	135	(1,99; 388)
IIV V2 [CV %]	165	140	44,4	(58,4; 336)
IIV Q [CV %]	6560	10700	518	(99,2; 1,61*10 <sup>15</sup> )
<b>Rezidualna variabilnost</b>				
Aditivna [ng/mL]	0,272	0,305	53,7	(0,0227; 0,787)
Proporcionalna [%]	42,3	40,4	11,0	(31,5; 49,6)

Cl – očistek, V1 – volumen osrednjega prostora, V2 – volumen stranskega prostora, Q – distribucijski očistek, IIV – interindividualna variabilnost, RSE – relativna standardna napaka, 95 % CI – 95 % interval zaupanja, s – naklon sigmoidne krivulje v diagramu MF v odvisnosti od PMA, PMA<sub>50</sub> – PMA pri kateri je vrednost MF 0,5

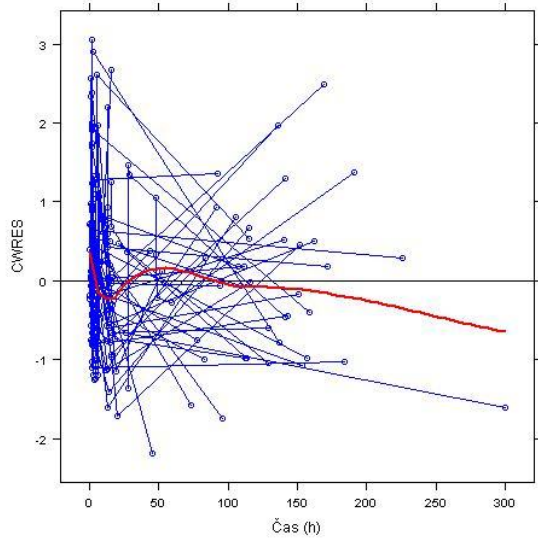




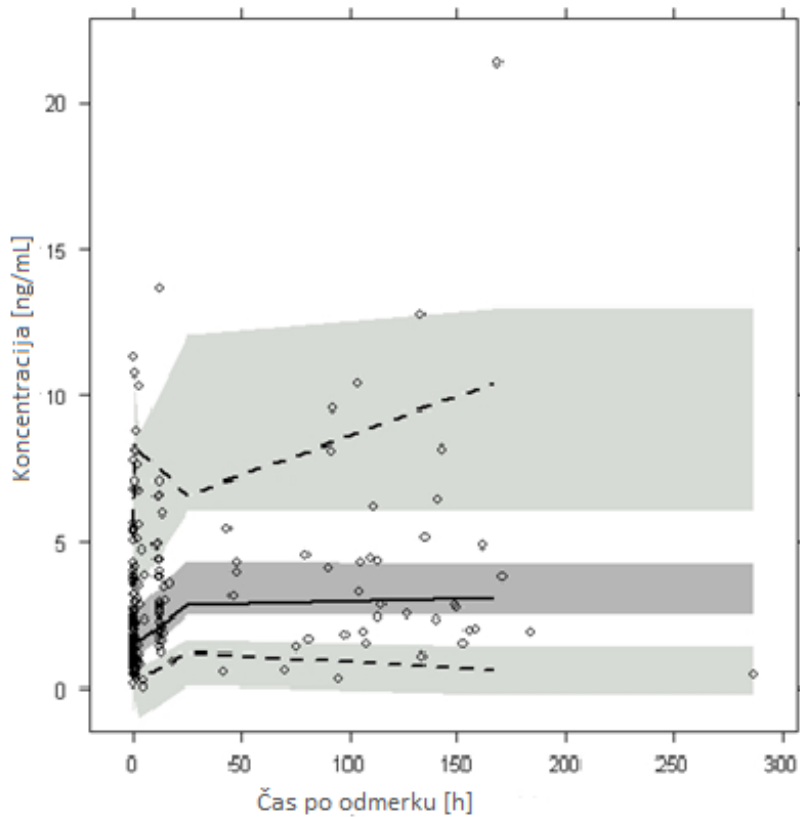
Slika 9: Izmerjene koncentracije v odvisnosti od napovedanih koncentracij (levo) in izmerjene koncentracije v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij (desno) za model z vključenim vplivom MF. Črna črta prikazuje črto enakosti, premico  $y=x$ , rdeča črta prikazuje trend podatkov.



Slika 10: Pogojno uteženi reziduali v odvisnosti od napovedane koncentracije (levo) in individualno uteženi reziduali v odvisnosti od individualne napovedane koncentracije (desno) za model z vključenim vplivom MF.



Slika 11: Pogojno uteženi reziduali v odvisnosti od časa za model z vključenim vplivom MF.



Slika 12: Rezultati VPC za model z vključenim vplivom MF. Točke prikazujejo izmerjene vrednosti, siva območja predstavljajo 95 % intervale zaupanja napovedanih vrednosti, črte pa mediano (polna črta), 5. centil in 95. centil (prekinjeni črti) izmerjenih vrednosti.

## VPLIV POLIMORFIZMA GENA ABCB1 NA OČISTEK FENTANILA

Na končnih dveh modelih smo testirali tudi vpliv polimorfizma gena ABCB1 na očistek. V obeh modelih polimorfizem ni imel značilnega vpliva, kar je potrdilo premajhno zmanjšanje OFV vrednosti (preglednici XIV in XV) ter randomizacijski test (sliki 13 in 14).

### Model z vključenim vplivom telesne mase in starosti

Preglednica XIV: Vpliv genotipa na vrednost OFV pri modelu z vključenim vplivom telesne mase in starosti

Model	OFV	Razlika v OFV vrednosti
Brez vpliva genotipa	402,289	/
<b>Aditivni genetski model</b> Razdelitev na 3 skupine: GG, AG, AA	400,690	1,599
<b>Recesivni genetski model</b> Razdelitev na 2 skupini: (GG+AG) in AA	400,703	1,586

GG – homozigoti divjega tipa, AG – heterozigoti, AA – polimorfni homozigoti

Vpliv heterozigotov na znižanje Cl v primerjavi s homozigoti divjega tipa: **7,81 %**

Vpliv polimorfni homozigotov na znižanje Cl v primerjavi s homozigoti divjega tipa: **32,9%**

Vpliv polimorfni homozigotov na znižanje Cl v primerjavi z združenimi homozigoti divjega tipa in heterozigoti: **29,2 %**

### Model z vključenim vplivom telesne mase in MF

Preglednica XV: Vpliv genotipa na vrednost OFV pri modelu z vključenim vplivom telesne mase in MF

Model	OFV	Razlika v OFV vrednosti
Brez vpliva genotipa	405,425	/
<b>Aditivni genetski model</b> Razdelitev na 3 skupine: GG, AG, AA	402,722	2,703
<b>Recesivni genetski model</b> Razdelitev na 2 skupini: (GG+AG) in AA	402,837	2,588

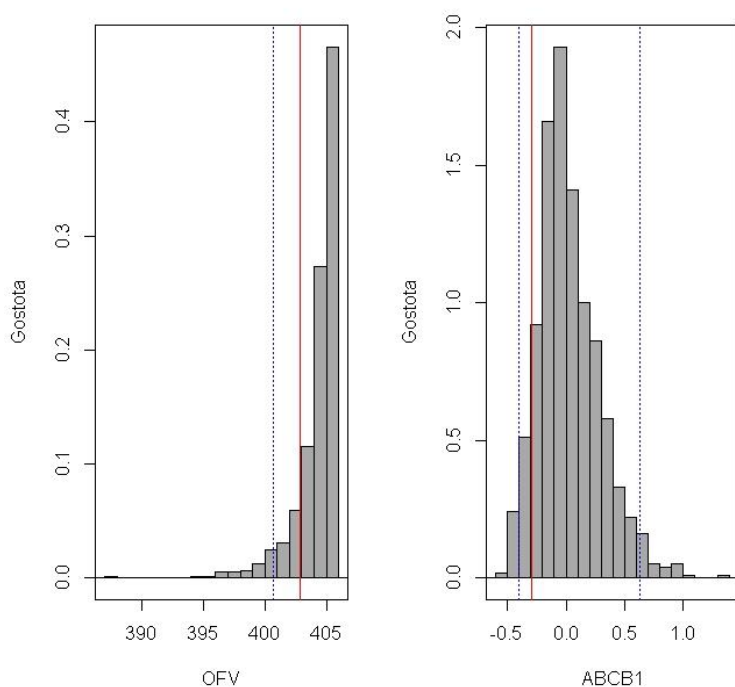
GG – homozigoti divjega tipa, AG – heterozigoti, AA – polimorfni homozigoti

Vpliv heterozigotov na znižanje CI v primerjavi s homozigoti divjega tipa: **2,55 %**

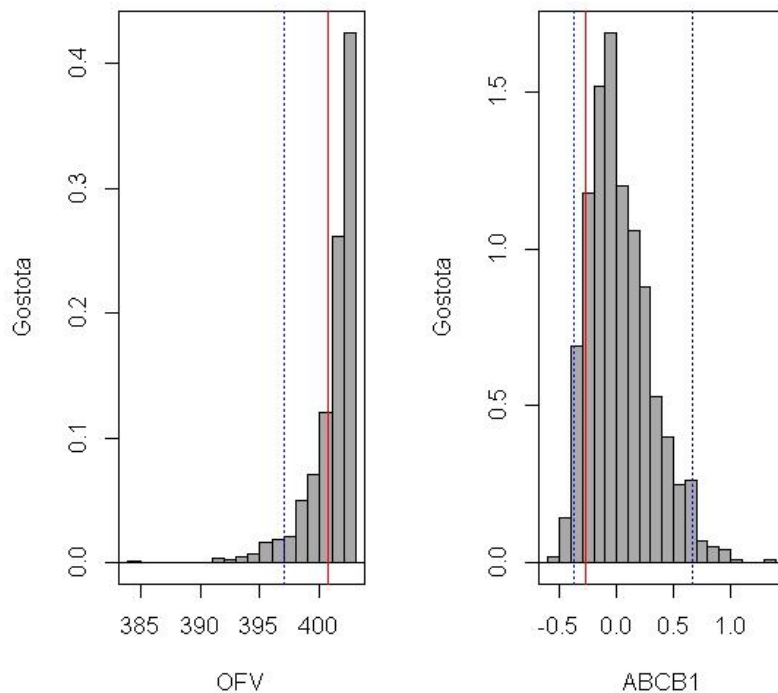
Vpliv polimorfnih homozigotov na znižanje CI v primerjavi s homozigoti divjega tipa: **37,8%**

Vpliv polimorfnih homozigotov na znižanje CI v primerjavi z združenimi homozigoti divjega tipa in heterozigoti: **26,6 %**

Sliki 13 in 14 prikazujeta rezultate randomizacijskih testov za model z vključenim vplivom telesne mase in starosti in za model z vključenim vplivom telesne mase in MF. Iz slik je razvidno, da je tako glede na spremembo OFV, kot tudi glede na velikost vpliva genotipa ABCB1, vpliv polimorfizma ABCB1 neznačilen in ga zato nismo vključili v končni model.



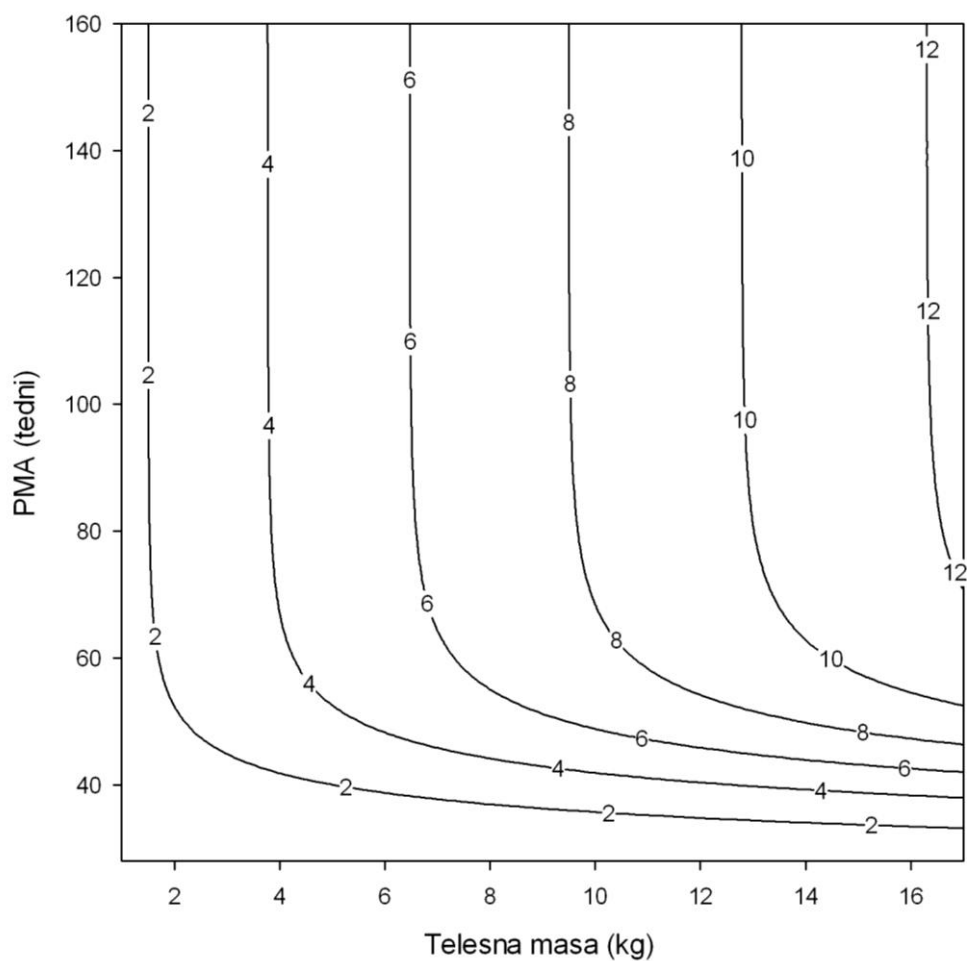
Slika 13: Rezultat randomizacijskega testa za model z vključenim vplivom telesne mase in starosti. Rdeče črte predstavljajo naše opažene vrednosti. Modra črta pri diagramu, ki se nanaša na OFV, predstavlja mejo 5. centila (5 % vrednosti OFV pridobljenih z randomizacijskim testom je manjših od te vrednosti). Vpliv sočasne spremenljivke bi bil značilen, če bi bila OFV končnega modela nižja od te meje (bolj levo). Modri črti pri diagramu, ki se nanaša na vrednost vpliva polimorfizma ABCB1, predstavljata zgornjo mejo (97,5. centila) in spodnjo mejo (2,5. centila). Da bi bil vpliv značilen, bi morala biti opažena vrednost nižja od spodnje ali višja od zgornje meje, kar v našem primeru ni bila.



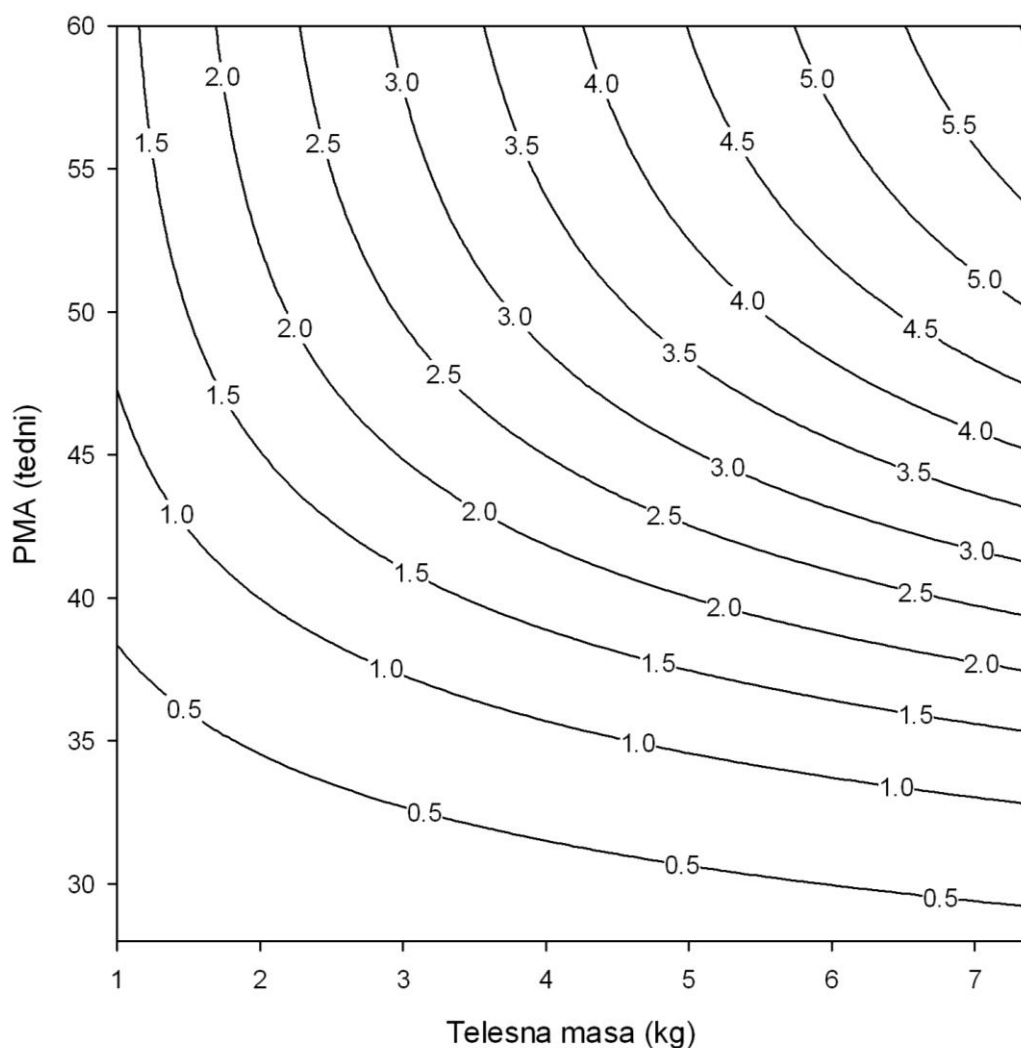
Slika 14: Rezultat randomizacijskega testa za model z vključenim vplivom telesne mase in MF. Oznake so enake kot pri sliki 13.

### **UPORABA MODELA ZA INDIVIDUALNO PRILAGAJANJE ODMERJANJA FENTANILA**

Kot pomoč pri individualizaciji odmerjanja fentanila pri otrocih smo pripravili tudi grafični prikaz spreminjanja očistka v odvisnosti od telesne mase in funkcije zorenja (slika 15). Funkcija zorenja je v izračun vključena preko PMA. Ker so največje spremembe v očistku takoj po rojstvu, predvsem pri nedonošenčkih, smo za natančnejši vpogled v spremembe očistka na sliki 16 prikazali spreminjanje očistka v območju starosti od 28 do 60 tednov PMA in telesne mase od 1 do 8 kg.

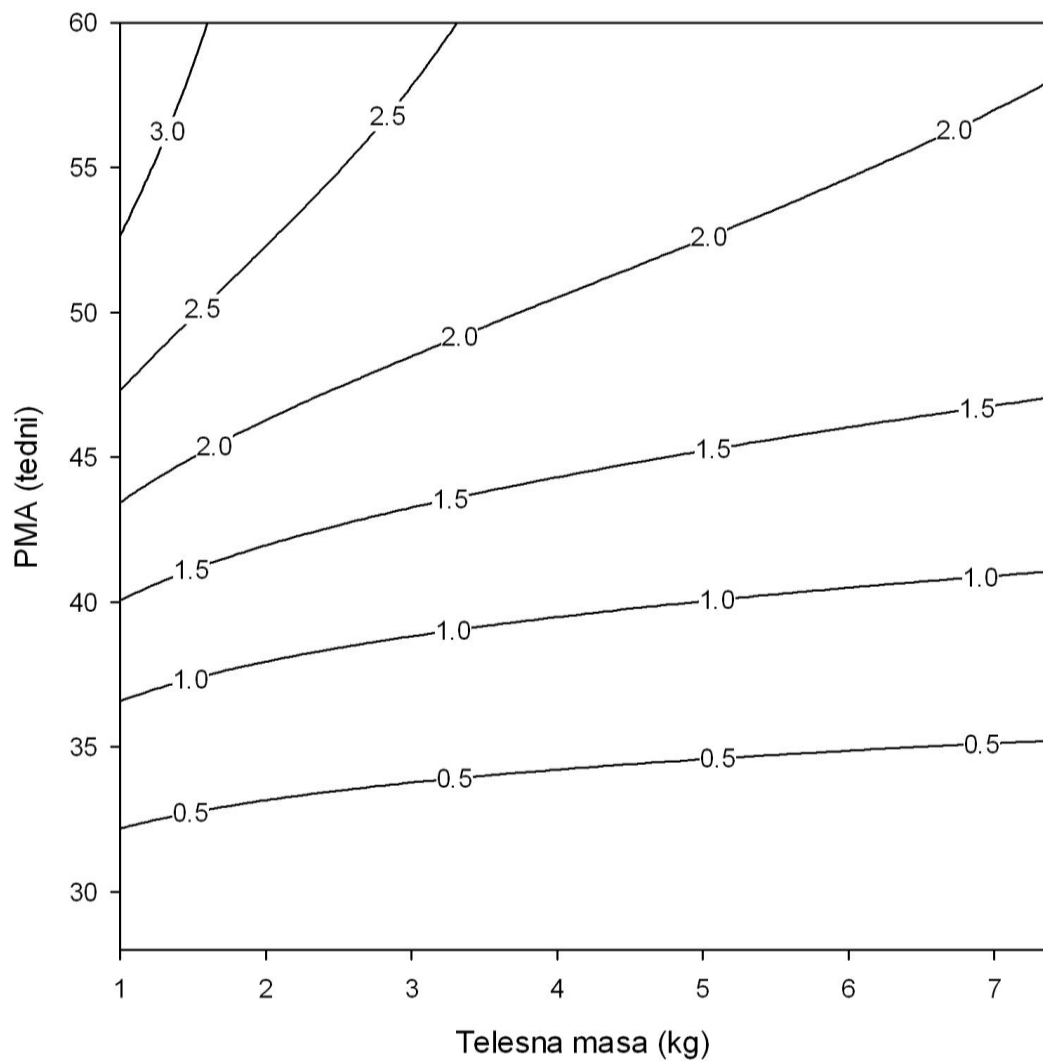


Slika 15: Spreminjanje očistka s telesno maso in PMA. Črte prikazujejo vrednosti očistka (L/h) pri določeni telesni masi in PMA.



Slika 16: Spreminjanje očistka s telesno maso in PMA v območju starosti od 28 do 60 tednov PMA in telesne mase od 1 do 8 kg. Črte predstavljajo vrednosti očistka (L/h) pri določeni telesni masi in PMA.

Glede na vrednost očistka pri določeni telesni masi in PMA lahko izračunamo hitrost infuzije  $k_0$ , ki je potrebna za doseg želene plazemske koncentracije v stacionarnem stanju. Ustrezne hitrosti infuzije za doseg plazemske koncentracije v stacionarnem stanju 2,5 ng/mL pri različnih vrednostih telesne mase in PMA, ki določata očistek, so prikazane na sliki 17.



Slika 17: Spreminjanje hitrosti infuzije  $k_0$  ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ ), ki je pri določeni telesni masi in PMA potrebna, da dosežemo koncentracijo fentanila v stacionarnem stanju  $2,5 \mu\text{g}/\text{L}$ .



## RAZPRAVA

Raziskovali smo farmakokinetiko fentanila pri otrocih, ki so bili na mehanskem predihavanju zaradi hujše oblike akutnega bronhiolitisa. Mehansko predihavanje je za otroke neprijetna in boleča izkušnja, zato ti otroci poleg ostale terapije prejemajo analgetik in sedativ za lajšanje bolečine, zmanjšanje stresa in nelagodja ter za doseg optimalnega predihavanja. Kot analgetik se v takih primerih najpogosteje uporablja fentanil. Farmakokinetika fentanila pri dojenčkih se razlikuje od farmakokinetike pri odraslih, zato je potrebna posebna previdnost pri odmerjanju. Z razvojem FK modela smo želeli olajšati samo individualizacijo odmerjanja fentanila pri otrocih, saj je uporabnih podatkov s tega področja malo, tudi zaradi etičnih pomislekov ob raziskavah na populaciji majhnih otrok.

Preiskovanih bolnikov je bilo 49, hospitalizirani so bili v UKC Maribor ali v UKC Ljubljana. Pregledali smo vpliv telesne mase, starosti, genotipa ABCB1, MF (funkcije zorenja), serumske vrednosti bilirubina, kreatinina, albumina ter celokupnih proteinov na farmakokinetiko fentanila. Analizirali smo plazemske vzorce bolnikov, ki so bili odvzeti med dolgotrajno intravensko infuzijo fentanila in sicer 5, 15, 60 in 720 minut po začetku infuzije ter tik pred prekinitvijo infuzije.

Pridobljene podatke smo analizirali s programom NONMEM. Za osnovni strukturni model smo določili dvoprostorni model, katerega smo definirali z očistkom, volumnom osrednjega prostora, volumnom stranskega prostora ter distribucijskim očistkom (preglednica X). Dvoprostorni model smo izbrali zato, ker je imel najnižjo OFV vrednost, poleg tega pa je tudi smiseln, saj je fentanil lipofilna učinkovina in je zanj značilno, da se porazdeljuje predvsem periferno. Tako smo že pri osnovnem strukturnem modelu prišli do rezultata, da je stranski prostor bistveno večji od osrednjega ( $V_1 = 0,236L$  in  $V_2 = 20,1L$ ). Ocenjena vrednost očistka pri osnovnem modelu je  $3,50 L/h$ . Literaturne vrednosti očistka fentanila pri dojenčkih in otrocih so se gibale od  $2,54 L/h$  do  $5,99 L/h$  (9, 17), preračunano na mediano vrednosti telesne mase bolnikov, katere smo obravnavali v magistrski nalogi. Naša vrednost očistka osnovnega strukturnega modela je torej znotraj literaturnih vrednosti. Vir variabilnosti smo določali z interindividualno variabilnostjo parametrov  $Cl$ ,  $V_1$ ,  $V_2$  in  $Q$  ter z rezidualno variabilnostjo, katero smo opisovali s kombinacijo aditivne in proporcionalne napake. Že pri osnovnem strukturnem modelu se je izkazalo, da model ne ocenjuje najboljše vrednosti distribucijskega očistka, saj smo določili zelo visoko interindividualno variabilnost. Tudi pri nadgradnjah modela se je nenatančnost ocene tega parametra ponavljala, kar se je pokazalo tudi v zelo

širokih intervalih zaupanja, tako da je ocena distribucijskega očistka pri našem modelu vsekakor nezanesljiva.

Ker je vpliv telesne mase na farmakokinetične parametre znan, smo osnovni model nadgradili z vključitvijo vpliva telesne mase z alometričnim razmerjem. Ta korak se je izkazal kot pravilen, saj se je poleg vrednosti OFV zmanjšala interindividualna variabilnost očistka, volumna osrednjega prostora ter distribucijskega očistka (preglednica XI). Za malenkost se je zvišala le IIV volumna stranskega prostora. Tokrat smo parametre ocenjevali na 70 kg. V primerjavi z literaturnimi vrednostmi očistka pri zdravem odraslem, ki se gibljejo od 37,2 L/h/70 kg ter celo do 88,2 L/h/70 kg, je naša ocena vrednosti očistka (23,5 L/h/70kg) izven tega območja (14, 15). To si lahko razlagamo s tem, da smo pri modeliranju uporabili podatke pridobljene na otrocih, kateri so bili večinoma vsi mlajši od dveh let. Meja 2 leti (33 mesecev PMA) predstavlja tisto starost, pri kateri funkcija zorenja (MF) doseže vrednost 1. To pomeni, da je od te starosti dalje vrednost očistka pri otroku enaka kot pri odraslem. Nekoliko nižja vrednost določenega očistka je zato povsem logična, glede na vir podatkov, ki so bili v izračun vključeni.

Pridobljene ocene parametrov smo še dodatno ovrednotili z metodo ponovljenega vzorčenja. S to metodo smo pridobili zelo podobne mediane izračunanih vrednosti posameznih parametrov, kot so ocene vrednosti parametrov, pridobljene z modelom, ki vključuje vpliv telesne mase. To potrjuje kvaliteto samega modela ter kredibilnost dobljenih ocen parametrov. Poleg tega nam ta metoda omogoča še določitev RSE in intervalov zaupanja, ki prav tako pripomoreta k vrednotenju samega modela. RSE očistka je 10,0 % pri ostalih parametrih pa je nekoliko večja.

Nadaljnje izboljšave modela so vključevale dodajanje sočasnih spremenljivk. V model smo vključili le starost, saj je le ta značilno vplivala na vrednost očistka (preglednica XII). Tudi OFV vrednost modela se je ob vključitvi starosti značilno zmanjšala, kar je tudi glavni kriterij za vključitev določene sočasne spremenljivke. FK parametre modela smo ocenjevali na 5,3 kg (mediana populacije). IIV posameznih parametrov se je nekoliko povišala v primerjavi z modelom, ki je vključeval samo vpliv telesne mase, vendar je delež nepojasnjene variabilnosti med tema dvema modeloma težko primerjati saj starost in telesna masa pri otrocih zelo korelirata. Prav tako se je povišala RSE, ki smo jo ponovno določili s pomočjo metode ponovljenega vzorčenja.

Vključitev funkcije zorenja (MF) v model se nam je zdela zelo pomembna, saj se nanaša na višanje vrednosti očistka, ki je povezano s starostjo in zorenjem. To je bistvenega pomena pri populaciji, kakršno smo obravnavali v našem primeru, saj se MF spreminja ravno v zgodnjem otroštvu (do 2 let). Med vsemi obravnavanimi bolniki so samo trije presegli starostno mejo, ko naj bi njihov očistek že dosegel končno vrednost in še ti ne več kot za pol leta. 16 od 49 otrok iz raziskave spada po zrelosti v skupino tistih, katerih očistek je dosegel manj kot polovico končne vrednosti. Izmed teh 16 je eden od otrok, katerega PMA je 8,9, saj je bil rojen pri 34 tednih gestacijske starosti in njegova MF znaša 0,236. Preostalih 20 bolnikov se giblje med doseženo polovično vrednostjo in končno vrednostjo očistka. MF nam pojasnjuje spremembe očistka, ki pridejo s starostjo, neodvisno od telesne mase, zato je pomembno, da njen vpliv upoštevamo poleg vpliva telesne mase, še posebej pri tako mladih bolnikih. Pomembno pri MF je, da vključuje tudi vpliv gestacijske starosti otrok.

Parametra, ki opisujeta funkcijo zorenja, sta  $PMA_{50}$  in 's'. V našem primeru  $PMA_{50}$  znaša 10,6 meseca pomenstrualne starosti, kar pomeni, da je vrednost MF 0,5 dosežena približno 1,5 meseca po rojstvu otroka, ki je normalno donošen (od 1,3 do 1,5 meseca). Parameter 's' opisuje strmino funkcije zorenja in v našem primeru znaša 6,73. Ti dve vrednosti lahko primerjamo z vrednostmi enakih parametrov pri vankomicinu in aciklovirju.  $PMA_{50}$  za vankomicin je 6 mesecev in 's' je 3,7. Vendar je za vankomicin značilno, da se izloča večinoma z glomerulno filtracijo, v čemer se razlikuje od fentanila.  $PMA_{50}$  za aciklovir, ki se prav tako izloča večinoma skozi ledvice in sicer z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo, je 13 mesecev, parameter 's' pa znaša 6,2 (28). Vsekakor je tudi iz primerov drugih učinkovin razvidno, da je funkcija zorenja pomemben, a specifičen faktor, ki ga je pri določanju FK parametrov in odmerjanju potrebno upoštevati, ne glede na to, kako se učinkovina izloča. Ker pa se fentanil izloča predvsem preko jeter, lahko vrednost  $PMA_{50}$  ter PMA, pri kateri je dosežena MF 1, primerjamo z ontogenezo encima CYP 3A4, ki sodeluje pri izločanju fentanila. Z raziskavami, kjer so preučevali ontogenezo CYP 3A4 so z *in vitro* metodami določili, da je aktivnost encima CYP 3A4 pri starosti 1 leta enaka 72 % aktivnosti, ki je značilna za odraslo osebo (39). V drugi takšni raziskavi pa so ugotovili, da je 50 % aktivnosti encima CYP 3A4, ki je značilna za odraslo osebo, dosežena med 6 in 12 meseci. Pred rojstvom je aktivnost tega encima zanemarljiva, vendar po rojstvu zelo hitro narašča (40). Za primerjavo, v našem primeru je pri normalno donošenem otroku eno leto po rojstvu vrednost MF znašala 99 % vrednosti, ki je značilna za odraslo osebo. Iz tega vidimo, da se bistvene

spremembe zgodijo v prvem letu po rojstvu, na kar ima glaven vpliv prav zorenje encima CYP 3A4.

Tudi pri *in vivo* raziskavah očistka midazolama, so bili rezultati podobni, saj se midazolam tako kot fentanil presnavlja s CYP 3A4. Ob rojstvu je bila vrednost očistka zelo nizka, po rojstvu pa je zelo hitro naraščala in nekako v obdobju od enega do dveh let po rojstvu dosegla vrednost očistka pri odrasli osebi (40).

Pri modelu z vključenim vplivom telesne mase in MF, smo opazili, da je prišlo do zmanjšanja IIV v primerjavi z modelom, ki vključuje vpliv telesne mase in starosti, razen IIV V2 se je nekoliko povečala. Zmanjšanje IIV pri večini parametrov pomeni, da MF bolje pojasnjuje razlike v FK parametrih med posameznimi osebki kot sama starost. Vrednosti RSE so se povečale pri vseh parametrih (preglednica XIII). Vrednost OFV se je v primerjavi s prejšnjimi različicami modela kar precej zmanjšala (iz 405,425 na 402,289).

Če vrednost očistka, pridobljeno z našim končnim modelom, ki vključuje vpliv MF, primerjamo z že prej omenjenimi literaturnimi vrednostmi, ki se gibljejo od 37,2 L/h/70 kg do 88,2 L/h/70 kg (14, 15), vidimo, da je tokrat naša vrednost bližje podatkom iz literature kot pri prejšnjih različicah modelov, saj znaša 35,8 L/h/70 kg. Tudi pri tej primerjavi lahko vidimo, da ima vključitev MF v model izjemen pomen.

Pri vseh različicah modelov je bila pristranskost največja pri oceni distribucijskega očistka, prav tako RSE in interval zaupanja, tako da je razvidno, da je ocena tega parametra nezanesljiva. Vzrok pristranskosti je v tem, da imamo v tem delu profila zelo malo podatkov (distribucijska faza je kratka).

Vse različice modela, razen čisto osnovnega, smo ovrednotili z diagnostičnimi diagrami. Izkazalo se je, da so pri diagramu, ki prikazuje izmerjene koncentracije v odvisnosti od populacijskih napovedanih koncentracij, vrednosti širše razpršene okrog premice  $y = x$  kot v primeru diagrama, ki prikazuje izmerjene vrednosti v odvisnosti od individualnih napovedanih koncentracij. Tak rezultat je bil pričakovan in tudi zaželeno je, da se vrednosti čim bolj prilegajo sami premici  $y = x$ . Naredili smo še diagnostične diagrame, ki prikazujejo pogojno utežene reziduale v odvisnosti od napovedane koncentracije, individualno utežene reziduale v odvisnosti od individualne napovedane koncentracije in pogojno utežene reziduale v odvisnosti od časa. Diagnostični diagrami, ki prikazujejo vrednosti uteženih rezidualov,

potrjujejo smiselnost uporabe kombiniranega modela napake za prikaz rezidualne variabilnosti.

Zadnja dva modela smo dodatno vrednotili še s testom VPC (vizualno vrednotenje napovedi modela). Ugotovili smo, da model uspešno opisuje FK fentanila, saj je tako mediana opazovanih podatkov, kot tudi 5. in 95. centil opazovanih podatkov, v primeru obeh modelov znotraj 95% intervala zaupanja mediane, 5. in 95. centila simuliranih podatkov.

Pri zadnjih dveh različicah modela smo izvedli tudi randomizacijski test, da bi dodatno preiskali vpliv polimorfizma v genu ABCB1 na očistek. Gen ABCB1 kodira membranski prenašalec P-glikoprotein. Ta sodeluje pri absorpciji, porazdelitvi in izločanju mnogih učinkovin. Preko tega vpliva na njihovo biološko uporabnost. Posebej so pomembni P-glikoproteini kot sestavni del krvno-možganske bariere, kjer preprečujejo vstop in akumulacijo mnogih hidrofobnih molekul v CŽS in sodelujejo pri izločanju substratov iz CŽS, kar je še posebej pomembno pri spojinah kot je fentanil. Gen ABCB1 je visoko polimorfen. Polimorfizem se kaže v od 2- do 3-kratnem zmanjšanju izražanja P-glikoproteina. Posledično pride do višje koncentracije opioidov v CŽS, kar lahko vodi v neželene učinke fentanila. Pri tako majhnih otrocih, kot je bila naša populacija, bi to lahko imelo velik pomen. Z vključitvijo vpliva polimorfizma v genu ABCB1 v model smo dobili 30 % znižanje očistka pri polimorfni homozigoti, kar pomeni precejšnjo razliko v primerjavi s homozigoti divjega tipa. Za otroke s takšnim genotipom bi bilo smiselno prilagoditi odmerek fentanila. Polimorfni homozigoti so namreč precej razširjeni v populaciji, v naši raziskavi je bilo med bolniki 23 % polimorfni homozigotov. Kljub tolikšni spremembi očistka pa vpliv ni bil značilen, kar je potrdil tudi randomizacijski test. Verjetno bi ob obravnavi večje populacije bolnikov ta vpliv lahko opredelili kot značilen.

Na koncu smo želeli rezultate modeliranja prikazati še na način, ki bi bil lahko uporaben tudi v praksi, zato smo naredili nekaj grafov, kjer lahko vidimo kako se s PMA in telesno maso spreminja očistek ter posledično potrebna hitrost infuzije za doseg določene plazemske koncentracije v stacionarnem stanju. Iz grafov se lepo vidi, da je spreminjanje očistka odvisno tako od PMA kot od telesne mase. Tako si lahko pomagamo pri določitvi potrebne hitrosti infuzije za doseg določene plazemske koncentracije fentanila v stacionarnem stanju, katero izberemo glede na namen uporabe zdravila (analgezija, anestezija). Iz grafov (slika 15 in slika 16) lahko, glede na starost otroka in njegovo telesno maso, odčitamo očistek, ki ga potem uporabimo pri določitvi optimalne hitrosti infuzije za doseg želene plazemske koncentracije

v stacionarnem stanju. Lahko pa hitrost infuzije odčitamo direktno iz grafa, katerega smo naredili kot primer za želeno  $C_{ss} = 2,5 \text{ ng/mL}$ , za otroke s telesno maso od 1 do 7 kg in PMA od 28 do 60 tednov (slika 17). To vrednost  $C_{ss}$  smo izbrali na podlagi literaturnih podatkov, saj naj bi bila primerna za analgezijo novorojenčkov na mehanskem predihavanju (16).

Pomen individualizacije terapije, ki jo pridobljeni podatki precej olajšajo, lahko ponazorimo tudi na primeru enega bolnika iz naše populacije. Rojen je bil pri 31. tednih gestacijske starosti, za akutnim bronhiolitisom je zbolel pri starosti 9 tednov in pol, kar predstavlja PMA 40,5 tednov, ker je bil nedonošen. Pri tej starosti je tehtal 3 kg. Hitrost dolgotrajne intravenske infuzije fentanila, ki jo je prejel ob hospitalizaciji, je bila  $3,3 \text{ } \mu\text{g/h/kg}$ . Pol ure pred tem je prejel tudi bolus injekcijo fentanila  $8 \text{ } \mu\text{g}$ . Po nekaj dneh so hitrost infuzije znižali na  $1,48 \text{ } \mu\text{g/h/kg}$  ter kasneje še na  $1,15 \text{ } \mu\text{g/h/kg}$ . Po podatkih pridobljenih z modeliranjem bi lahko že na začetku določili optimalno hitrost infuzije za dosego koncentracije  $2,5 \text{ } \mu\text{g/L}$  v stacionarnem stanju in sicer bi v primeru tega bolnika znašala  $1,2 \text{ } \mu\text{g/h/kg}$ . Na tem primeru lahko vidimo, da lahko zaradi pomanjkanja informacij s področja farmakokinetike zdravilnih učinkovin pri otrocih zelo hitro pride do prekoračitve odmerka, kar pa lahko vodi v neželene učinke. Posebna previdnost je potrebna prav pri nedonošenčkih, ki imajo ob rojstvu še nižjo vrednost funkcije zorenja, kar se potem odraža pri nižji vrednosti očistka.

## SKLEP

Razvili smo populacijski farmakokinetični model, ki dobro opisuje farmakokinetiko fentanila pri otrocih. Končna različica je dvoprostorni model, definiran z naslednjimi parametri: očistek, volumen osrednjega prostora, volumen stranskega prostora in distribucijski očistek. Model vključuje vpliv telesne mase ter vpliv funkcije zorenja na očistek.

Končni parametri modela so: očistek 35,8 L/h/70 kg, volumen osrednjega prostora 2,30 L/70 kg, volumen stranskega prostora 251 L/70 kg in distribucijski očistek 219 L/h/70 kg. IIV očistka je 49,2 %, IIV volumna osrednjega prostora je 28,1 %, IIV volumna stranskega prostora je 165 % ter IIV distribucijskega očistka 6560 %.

Rezidualna variabilnost je opisana s kombinacijo aditivne in proporcionalne napake.

Vpliv polimorfizma gena ABCB1 se ni izkazal za značilnega, prav tako tudi vpliv ostalih sočasnih spremenljivk (vrednost serumskega kreatinina, bilirubina, albuminov, proteinov), z izjemo starosti, PMA in telesne mase.

Končni model je uporaben kot pomoč pri optimizaciji režimov odmerjanja fentanila pri otrocih. Očistek namreč doseže vrednost, ki je značilna za odraslo osebo, šele pri starosti dveh let, kar naš končni model tudi upošteva, saj smo bili še posebej osredotočeni na dojenčke in otroke. Bronhiolitis je namreč bolezen, ki se tipično pojavlja v prvih dveh letih življenja in je nevarna predvsem za dojenčke in majhne otroke. Prav zato pri tem obolenju pogosto pride do potrebe po mehanskem predihavanju, ki ga dostikrat spremlja terapija z dolgotrajno intravensko infuzijo fentanila. Pri odmerjanju zdravil dojenčkom in majhnim otrokom je potrebna previdnost, da ne pride zaradi neustreznih odmerkov do neželenih učinkov ali do premajhne učinkovitosti zdravila.

## LITERATURA

1. Yaster M, Traystman RJ: **Anesthesia for the Newborn: Past, Current, and Future** (Dostopano 23. aprila 2014 na spletni strani: [http://www.pedsanesthesia.org/meetings/2011annual/syllabus/submissions/The%20Present-Opioids\\_MYaster.pdf](http://www.pedsanesthesia.org/meetings/2011annual/syllabus/submissions/The%20Present-Opioids_MYaster.pdf))
2. Anand KJ, Stevens BJ, McGrath P: **Pain in neonates and infants**, Chapter 9, Anderson BJ; Holford NHG: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of analgesic drugs**, Elsevier, 2007: 115-31
3. Arnold JH, Truog RD, Scavone JM, Fenton T: **Changes in the pharmacodynamic response to fentanyl in neonates during continuous infusion**, The journal of pediatrics, Volume 119, 1991: 639-43
4. Simons SH, Anand KJ: **Pain control: Opioid dosing, population kinetics and side-effects**, Seminars in fetal & neonatal medicine, Volume 11, 2006: 260-7
5. Mather LE: **Clinical pharmacokinetics of fentanyl and its newer derivatives**, Clinical pharmacokinetics, Volume 8, 1983: 422-46
6. Coruh B, Tonelli MR, Park DR: **Fentanyl-induced chest wall rigidity**, Chest, Volume 143, 2013: 1145-6
7. Encinas E, Calvo R, Lukas JC, Vozmediano V, Rodriguez M, Suarez E: **A Predictive Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model of Fentanyl for Analgesia/Sedation in Neonates Based on a Semi-Physiologic Approach**, Pediatric drugs, Volume 15, 2013: 247-57
8. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H: **Opioid Pharmacology**, Pain Physician, Volume 11, 2008, 144-46
9. Katz R, Kelly W, **Pharmacokinetics of continuous infusions of fentanyl in critically ill children**, Clinical care medicine, Volume 21, 1993: 995-1000
10. Hill SA: **Pharmacokinetics of drug infusions**, Continuing education in anaesthesia, critical care & Pain, Volume 4, 2004: 76-80
11. Hughes MA, Glass PSA, Jacobs JR: **Context-sensitive Half-time in Multicompartment pharmacokinetic Models for Intravenous Anesthetic Drugs**, Anesthesiology, Volume 76, 1992: 334-41
12. Roberts F, Freshwater-Turner D: **Pharmacokinetics and anaesthesia**, Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain, Volume 7, 2007: 25-29



13. Hedaya MA: **Basic Pharmacokinetics**, 2. izdaja, CRC Press Pharmacy Education series, Broken Sound Parkway, 2012: 4
14. Shafer SL, Varvel, JR: **Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and rational opioid selection**, *Anesthesiology*, Volume 74, 1991: 53-63
15. Han T, Harmatz JS, Greenblatt DJ, Martyn JA: **Fentanyl clearance and volume of distribution are increased in patients with major burns**, *Journal of clinical pharmacology*, Volume 47, 2007: 674-80
16. Saarenmaa E, Neuvonen PJ, Fellman V: **Gestational age and birth weight effects on plasma clearance of fentanyl in newborn infants**, *The journal of pediatrics*, Volume 136, 2000: 767-70
17. Singleton MA, Rosen JI, Fisher DM: **Plasma concentrations of fentanyl in infants, children and adults**, *Canadian journal of anaesthesia*, Volume 34, 1987: 152-5
18. Koehntop DE, Rodman JH, Brundage DM, Hegland MG, Buckley JJ: **Pharmacokinetics of Fentanyl in Neonates**, *Anesthesia & Analgesia*, Volume 65, 1986, 227-32
19. Playfor S, Jenkins I, Boyles C, Choonara I, Davies G, Haywood T, Hinson G, Mayer A, Morton N, Ralph T, Wolf A: **Consensus guidelines on sedation and analgesia in critically ill children**, *Intensive care medicine*, Volume 32, 2006: 1125-36
20. Bonate PL: **Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation**, Springer, San Antonio, 2006: 205-230
21. **SMPC zdravila Dormicum**, raztopina za injiciranje ali infundiranje 1mg/ml (Dostopano 23. 4. 2014 na spletni strani: [http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/001244\\_smpc.pdf](http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/001244_smpc.pdf))
22. Leonard E., Gerlowski, Rakesh K. Jain: **Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Principles and Applications**, *Journal of pharmaceutical sciences*; Volume 72, 1983: 1103-1127
23. Löttsch J: **Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of Opioids**, *Journal of pain and symptom management*, Volume 25, 2005: 90-101
24. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH: **Population clinical pharmacology of children: general principles**, *European journal of pediatrics*, Volume 165, 2006: 741-

25. Ette EI, Williams PJ, Kim YH, Lane JR, Liu MJ, Capparelli EV: **Model Appropriateness and Population Pharmacokinetic Modeling**, The Journal of Clinical Pharmacology, Volume 43, 2003: 610–623
26. Mould DR, Upton RN: **Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development**, Pharmacometrics & systems pharmacology, 2012 (Dostopano 23. 4. 2014 na spletni strani: <http://www.nature.com/psp/journal/v2/n4/full/psp201314a.html>)
27. Ette EI, Williams PJ: **Population Pharmacokinetics I: Background, Concepts, and Models**, The annals of pharmacotherapy, Volume 38, 2004: 1702-6
28. Tod M, Jullien V, Pons G: **Facilitation of drug evaluation in children by population methods and modelling**, Clin Pharmacokinet., Volume 47, 2008: 231-243
29. Anderson BJ, Allegaert K, Holford NH: **Population clinical pharmacology of children: modelling covariate effects**, European journal of pediatrics, Volume 165, 2006: 819-29
30. Santeiro ML, Christie J, Stromquist C, Torres BA, Markowsky SJ: **Pharmacokinetics of continuous infusion fentanyl in newborns**, Journal of perinatology, Volume 17, 1997: 135-9
31. McClain DA, Hug CC: **Intravenous fentanyl kinetics**, Clinical Pharmacology and Therapeutics, Volume 28, 1980: 106–114
32. Grabnar I, Grosek Š: **Odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih**, 2010
33. Rožman E, Vrbek S: **Razvoj in validacija LC-MS/MS metode za sočasno določanje fentanila in midazolama v plazemskih vzorcih**. Raziskovalno delo na FFA, 2012
34. **Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation** U. S. Department of Health and Human Services FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2013
35. Mlakar Š: **Vpliv izbranih polimorfizmov v genih *OPRM1*, *ABCBI* in *COMT* na varnost in učinkovitost terapije s fentanilom pri otrocih**, FFA, 2014
36. Vobornik N: **Optimizacija načrta klinične pediatrične raziskave fentanila s populacijskim farmakokinetično – farmakodinamičnim modeliranjem in simulacijo**, FFA, 2010, str. 56

37. Bolton S, Bon C: **Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications**, 4th edition, Marcel Dekker, New York, 2004: 458
38. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO: **Prediction-corrected visual predictive check for diagnosing nonlinear mixed-effects models**, The AAPS journal, Volume 13, 2011: 143-51
39. Johnson TN, Tucker GT, Rosami-Hodjegan A: **Development of CYP2D6 and CYP3A4 in the first year of life**, Clinical pharmacology & therapeutics, Volume 83, 2008: 670-71
40. Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, N. Van den Anker J: **Cytochrome P450 3A, Ontogeny and drug disposition**, Clin Pharmacokinet, Volume 37, 1999: 491-96

## Priloga 1: Testiranje vpliva sočasnih spremenljivk - SCMlog.lst

Model directory C:\Data\Diplom\Fentanil\_Mojca\SCM\scm\_run1\m1

MODEL	TEST	BASE OFV	NEW OFV	TEST OFV (DROP)	GOAL	dDF	SIGNIFICANT	PVAL
CLABCB1_1-2	PVAL	413.98345	411.57030	2.41315 >	3.84150	1		0.120320
CLABCB1_2-2	PVAL	413.98345	410.98503	2.99841 >	3.84150	1		0.083346
CLAGE-2	PVAL	413.98345	408.63878	5.34467 >	3.84150	1	YES!	0.020786
CLAGE-5	PVAL	413.98345	405.42539	8.55806 >	3.84150	1	YES!	0.003440
CLALB-2	PVAL	413.98345	413.55089	0.43256 >	3.84150	1		0.510730
CLALB-5	PVAL	413.98345	413.53000	0.45345 >	3.84150	1		0.500700
CLBIL-2	PVAL	413.98345	406.95954	7.02391 >	3.84150	1	YES!	0.008043
CLBIL-5	PVAL	413.98345	406.09725	7.88620 >	3.84150	1	YES!	0.004981
CLPROT-2	PVAL	413.98345	411.85001	2.13343 >	3.84150	1		0.144120
CLPROT-5	PVAL	413.98345	411.81881	2.16463 >	3.84150	1		0.141220
CLSCR-2	PVAL	413.98345	410.31380	3.66964 >	3.84150	1		0.055412
CLSCR-5	PVAL	413.98345	411.16616	2.81728 >	3.84150	1		0.093254
CLSX-2	PVAL	413.98345	413.89036	0.09309 >	3.84150	1		0.760290
VIABCB1_1-2	PVAL	413.98345	412.63800	1.34544 >	3.84150	1		0.246080
VIABCB1_2-2	PVAL	413.98345	413.21844	0.76501 >	3.84150	1		0.381770
VIAGE-2	PVAL	413.98345	413.33115	0.65229 >	3.84150	1		0.419290
VIAGE-5	PVAL	413.98345	413.33686	0.64659 >	3.84150	1		0.421340
VIALB-2	PVAL	413.98345	412.93018	1.05326 >	3.84150	1		0.304760
VIALB-5	PVAL	413.98345	412.97209	1.01136 >	3.84150	1		0.314580
VIPROT-2	PVAL	413.98345	413.45369	0.52976 >	3.84150	1		0.466710
VIPROT-5	PVAL	413.98345	413.45505	0.52840 >	3.84150	1		0.467280
VISX-2	PVAL	413.98345	413.58472	0.39873 >	3.84150	1		0.527750

Parameter-covariate relation chosen in this forward step: CL-AGE-5

CRITERION	PVAL < 0.05
BASE_MODEL_OFV	413.98345
CHOSEN_MODEL_OFV	405.42539

Relations included after this step:

CL AGE-5  
V1

Model directory C:\Data\Diplom\Fentanil\_Mojca\SCM\scm\_run1\forward\_scm\_dir1\m1

MODEL	TEST	BASE OFV	NEW OFV	TEST OFV (DROP)	GOAL	dDF	SIGNIFICANT	PVAL
CLABCB1_1-2	PVAL	405.42539	405.03521	0.39018 >	3.84150	1		0.532200
CLABCB1_2-2	PVAL	405.42539	402.83682	2.58857 >	3.84150	1		0.107640
CLALB-2	PVAL	405.42539	404.55702	0.86837 >	3.84150	1		0.351410
CLALB-5	PVAL	405.42539	404.37851	1.04687 >	3.84150	1		0.306230
CLBIL-2	PVAL	405.42539	402.40076	3.02463 >	3.84150	1		0.082009
CLBIL-5	PVAL	405.42539	403.47662	1.94876 >	3.84150	1		0.162720
CLPROT-2	PVAL	405.42539	405.36596	0.05943 >	3.84150	1		0.807400
CLPROT-5	PVAL	405.42539	405.36386	0.06153 >	3.84150	1		0.804100
CLSCR-2	PVAL	405.42539	404.51948	0.90591 >	3.84150	1		0.341200
CLSCR-5	PVAL	405.42539	404.88149	0.54390 >	3.84150	1		0.460820
CLSX-2	PVAL	405.42539	404.80290	0.62249 >	3.84150	1		0.430120
VIABCB1_1-2	PVAL	405.42539	403.78900	1.63639 >	3.84150	1		0.200820
VIABCB1_2-2	PVAL	405.42539	404.86746	0.55793 >	3.84150	1		0.455100
VIAGE-2	PVAL	405.42539	405.21231	0.21308 >	3.84150	1		0.644360
VIAGE-5	PVAL	405.42539	405.07134	0.35405 >	3.84150	1		0.551830
VIALB-2	PVAL	405.42539	404.80612	0.61926 >	3.84150	1		0.431320
VIALB-5	PVAL	405.42539	404.90630	0.51909 >	3.84150	1		0.471230
VIPROT-2	PVAL	405.42539	405.20303	0.22236 >	3.84150	1		0.637250
VIPROT-5	PVAL	405.42539	405.20994	0.21545 >	3.84150	1		0.642530
VISX-2	PVAL	405.42539	405.01430	0.41109 >	3.84150	1		0.521420

Parameter-covariate relation chosen in this forward step: --

CRITERION	PVAL < 0.05

Forward search done. Starting backward search inside forward top level directory

Model directory C:\Data\Diplom\Fentanil\_Mojca\SCM\scm\_run1\backward\_scm\_dir1\m1

MODEL	TEST	BASE OFV	NEW OFV	TEST OFV (DROP)	GOAL	dDF	INSIGNIFICANT	PVAL
CLAGE-2	PVAL	405.42539	408.66951	-3.24413 >	0.00000	0		0.00e+000
CLAGE-1	PVAL	405.42539	413.98345	-8.55806 >	-6.63490	-1		0.003440

Parameter-covariate relation chosen in this backward step: --

CRITERION	PVAL > 0.01