

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANEZ MEDVEDEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANEZ MEDVEDEC

**RAZVOJ FARMAKOKINETIČNEGA MODELA
ENTEROHEPATIČNE CIRKULACIJE SILIBINA ZA
ZDRAVILNI ŽVEČILNI GUMI Z IZVLEČKOM
PEGASTEGA BADLJA**

DEVELOPMENT OF A PHARMACOKINETIC MODEL OF
ENTEROHEPATIC CIRCULATION OF SILYBIN FOR A
MEDICATED CHEWING GUM WITH MILK THISTLE
EXTRACT

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za ves trud, napotke ter strokovno pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Najlepša hvala mojim staršem, da so mi omogočili študij, za vso podporo, razumevanje in skrb v študijskih letih. Hvala tudi sestri in bratoma za vse v času študija. Hvala prijateljem in sošolcem za lepe trenutke, vse študentske kavice in vzpodbudo ob zaključku, Leu za pomoč pri prevodu, in vsem ki so mi stali ob strani tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

Janez Medvedec

Predsednica magistrske komisije: prof.dr. Julijana Kristl

Mentor: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član magistrske komisije: doc. dr. Matej Sova

VSEBINA

POVZETEK.....	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1 UVOD.....	1
1.1 Pegasti badelj.....	1
1.1.1 Farmakodinamika silibina	2
1.1.2 Farmakokinetične lastnosti silibina	3
1.2 Enterohepatična cirkulacija	5
1.2.1 Enterična cirkulacija.....	7
1.2.2 Lokalna cirkulacija	7
1.3 Zdravilni žvečilni gumi (Masticabilia gummis medicata).....	8
1.4 Model dobro premešanega prostora	8
1.5 Farmakokinetični model.....	9
1.5.1 Populacijska farmakokinetika.....	10
1.5.2 Prednosti in slabosti PFK	11
1.5.3 Populacijski farmakokinetični model	11
1.5.4 Model nelinearnih mešanih učinkov.....	11
1.5.5 Razvoj in validacija modela	14
2 NAMEN.....	16
3 METODE.....	17
3.1 Podatki načrta preizkušanja medicinskega gumija na prostovoljcih	17
3.2 Korelacija med prosto in konjugirano obliko pri posameznem preizkušancu.....	18
3.3 Programska orodja.....	19

3.4	Razvoj osnovnega modela	20
3.4.1	Matematična opredelitev enterohepatične cirkulacije:	23
3.5	Vrednotenje modela.....	27
3.5.1	Vrednotenje NONMEM izhodnega poročila.....	27
3.5.2	Metoda bootstrap	28
3.5.3	Občutljivostna analiza	29
3.5.4	Diagnostični diagrami.....	29
3.5.5	VPC (grafično vrednotenje napovedi).....	31
4	REZULTATI	32
5	Podatki plazemskih koncentracij preizkušancev	32
5.1	Opredelevitev korelacije proste učinkovine z njenim glukuronidom	33
5.2	Populacijski model	34
5.2.1	Osnovni model M_1	34
5.2.2	Osnovni model M_2	36
5.2.3	VPC	52
6	RAZPRAVA.....	54
7	SKLEP	61
8	VIRI.....	62

POVZETEK

Izvleček pegastega badlja vsebuje učinkovino silibin, ki ji v zadnjem času namenjajo več pozornosti zaradi njenih antioksidativnih in hepatoprotektivnih lastnosti. Silibin je inhibitor encimov metabolizma faze I in II ter modulator P-gp, zato se lahko pojavijo interakcije z zdravili. Zaradi slabe topnosti je biološka uporabnost nizka, s pripravo farmacevtske oblike medicinski žvečilni gumi pa so dosegli večjo biološko uporabnost. Neprostrorske analize farmakokinetike silibina so dokazale hiter metabolizem, porazdeljevanje in izločanje ter prisotnost enterohepatične cirkulacije. Farmakokinetika silibina še ni bila opredeljena z metodami prostorske analize.

Iz raziskave na 15 prostovoljcih, izvedene na univerzi v Trstu, smo povzeli rezultate, določili korelacijo plazemskih profilov proste oblike silibina in metabolita pri posameznikih in razvili populacijski semifiziološki večprostorni model enterohepatične cirkulacije silibina z uporabo metode nelinearnega modeliranja mešanih učinkov. Silibin je zmes diastereomerov A in B, zato smo izvedli razvoj modela za silibin A in silibin B ter njuna metabolita. Opredelili smo interindividualno in intraindividualno variabilnost v modelu. Zanesljivost ocen parametrov smo ocenili z »bootstrap metodo« in stabilnost z občutljivostno analizo. Ocene farmakokinetičnih parametrov so v večini nezanesljive zaradi visoke variabilnosti. Z modelom smo natančneje ocenili čase enterohepatične cirkulacije in dokazali visok delež ponovne absorpcije po izločanju silibina v žolč. Za silbin A znaša 43,4%, za silibin B pa 56,8%. Ocena intestinalega razmerja silibina in metabolita v času pred absorpcijo prav tako ni zanesljiva. Končna ocena intraindividualne napake modela je 57,8% za prosto obliko silibina A, 93,7% za metabolit ter 52,3 % za silibin B in 89,6% za njegov metabolit. Interindividualna variabilnost očistka metabolita znaša 50,7 % za silibin A in 87,5% za silibin B. Prileganje modela smo ovrednotili z diagnostičnimi diagrami, ter izvedli simulacijo z VPC analizo, ki je pokazala, da model v času od odmerka do 1 ure ne podaja ustreznih napovedi in se v tistih časovnih točkah ne prilega, kar je tudi razlog za veliko nezanesljivost ocen parametrov, za razliko je v obdobju po prvi uri do pete ure prileganje ustrezno. Za ocenitev populacijske farmakokinetike silibina model potrebuje dodatno opredelitev vpliva teže oseb in spremembo v strukturi, ker ne podaja ustreznih vrednosti.

Ključne besede: silibin, enterohepatična cirkulacija, prostorski model, NONMEM

ABSTRACT

Silybin is the main component of milk thistle extract, silymarine. Because of its antioxidative and hepatoprotective effects it recently became the focus of study. Silybin inhibits both phase I and phase II metabolism and P-gp transport, therefore it causes drug-drug interactions. Its bioavailability is limited due to its poor water solubility. To improve the bioavailability a dosage form of medicated chewing gum was created. Noncompartmental analyses of pharmacokinetics of silybin have proven a fast metabolism, distribution, excretion and the presence of an enterohepatic circulation. Pharmacokinetic of silybin is yet to be defined with the use of the compartmental analyses.

We summarized the results of a study on 15 volunteers at the Trieste University. We determined, for each individual, the correlation between plasma profiles of the parent silybin and the metabolite. Mixed effects modeling was used to develop a populational semiphysiological, multicompartmental model of enterohepatic circulation of silybin. Since silybin is a mixture of diastereoisomers A and B, we conducted the model development for silybin A, silybin B and their metabolites. We defined the interindividual and intraindividual variability in the model. The reliability of the parameter estimates was determined with bootstrap method. Stability was estimated by using sensitivity analysis. The estimates of pharmacokinetic parameters are mostly unreliable. The model helped us to make a more precise estimate of the durations of enterohepatic circulation and helped us prove the high proportion of reabsorption after silybin was excreted into bile. For the ratio of parent and the metabolite before absorption a reliable estimate could not be obtained. The final estimate of the intraindividual model error is 57,8% for parent of silybin A, 93,7% for its metabolite and 52,3% for silybin B with 89,6% for its metabolite. Interindividual variability of clearance for silybin A metabolite is 50,7% and 87,5% for silybin B metabolite, for other parameters is unreliable or not estimated. Model fit was evaluated with diagnostic diagrams and a VPC analysis simulation, which showed that the model does not give accurate predictions for the time between the dosage and one hour after it. Non-fitting of the model is the reason for the high unreliability of parameter estimates. However, the model fits the data after the first hour. Additional influence of weight must be defined and the structure of the model must be modified in order to estimate the populational pharmacokinetics of silybin.

Key words: silybin, enterohepatic circulation, compartment model, NONMEM

SEZNAM OKRAJŠAV

ALT - alanin-aminotransferaza

AST - aspartat-aminotransferaza

AUC - površina pod krivuljo (ang. "area under curve")

BCS - biofarmacevtska klasifikacija zdravil (ang. "Biopharmaceutics Classification Scheme")

CCL₄ - tetraklorometan

c_{max} - maksimalna koncentracija

CYP 450 - citrokrom P450

EHC - enterohepatična cirkulacija

FK - farmakokinetičen

GIT - gastrointestinalni trakt

GSH – glutation

IIV – interindividualna variabilnost

Mrp2 – ang. "multidrug resistance-associated protein"

NF-κβ – jedrni dejavnik κβ, (ang. "nuclear factor κβ")

NONMEM – program za nelinearno modeliranje mešanih učinkov ("NONlinear Mixed-Effect Modelling")

OATP - polipeptidi, ki prenašajo organske anione, (ang. "organic anion-transporting polypeptide")

OFV – vrednost objektivne funkcije

PEG - polietilenglikol

P-gp - P-glikoprotein

ROS - reaktivne kisikove zvrsti, (ang. "reactive oxygen species")

rRNA - ribosomska RNA

SMEDDS – samo-mikroemulgirajoči dostavni sistem za zdravilno učinkovino, (ang. "self-microemulsifying drug delivery system")

SOD - superoksid dismutaza

SULT – sulfotransferaza

t_{\max} - čas maksimalne koncentracije

$t_{1/2}$ - razpolovna doba

UGT - uridindifostat glukoronozil-transferaza

UGT1A1 - uridindifostat glukoronozil-transferaza 1A1

VPC - grafično vrednotenje napovedi, (ang. "visual predictive check")

1 UVOD

Zdravilne rastline in njihovi izvlečki so pogosto sestavine prehranskih dopolnil, kozmetičnih pripravkov ter zdravil. V zadnjem času se je povečala ponudba različnih pripravkov rastlinskega izvora in zaradi možnosti medsebojnega delovanja sestavin rastlinskega pripravka z zdravili se souporaba teh v določenih primerih odsvetuje. Poznavanje farmakoloških učinkov in farmakokinetičnih lastnosti sestavin omenjenih pripravkov je zato nujno z vidika varnega jemanja. Med zdravilne rastline Odbor za zdravila rastlinskega izvora (HMPC) pri Evropski agenciji za zdravila (EMA) uvršča pegasti badelj, ki ima trenutno določen status D (*Draft under discussion*). Za opredelitev uporabe, delovanja in potrditev učinkov aktivne snovi pegastega badlja, so izvedli več predkliničnih in kliničnih raziskav. Te so preiskale hepatoprotektivne, antioksidativne, citoprotektivne in protirakave učinke silimarina. Primerjava raziskav farmakokinetike silimarina je težavna zaradi visoke variabilnosti in uporabe različnih formulacij (1).

1.1 Pegasti badelj

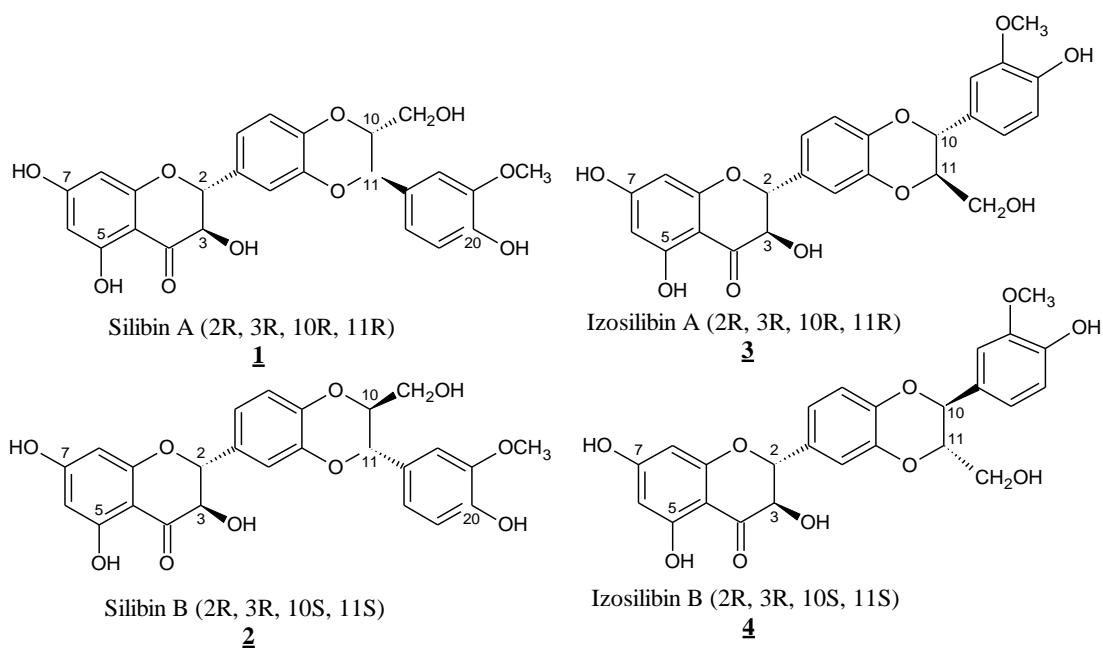
Uporaba pegastega badlja (*Silybum marianum*) kot zdravilne rastline je bila poznana že v antiki in tradicionalni evropski medicini. Pripravki pegastega badlja so se uporabljali za zdravljenja jetrnih in črevesnih obolenj, dandanes je v rabi predvsem za zdravljenje ciroze, kroničnega hepatitisa ter ostalih jetrnih obolenj, ki so povezana s prekomernim uživanjem alkohola in izpostavitvijo okoljskim toksinom (2). Glavne učinke pripisujejo ekstraktu plodov – silimarinu. Ta je kompleks različnih flavonoidov, ki se v sledih nahajajo tudi v ostalih delih zeli (3). Minimalna vsebnost silimarina v plodovih (*Silybum marianum fructus*) znaša 1,5%, v očiščenem suhem ekstraktu pa je opredeljena na od 30 do 65% (4).

Silimarin je aktivna komponenta rastline. Standardizirani ekstrakt vsebuje 70-80% silimarinskih flavonolignanov (silimarina) in 20-30% kemijsko nedefinirane frakcije sestavljene iz polimeriziranih in oksidiranih polifenolnih snovi, kvercetin in taksifolina. Strukturno med flavonolignane sodijo silibin, izosilibin, silikristin, silidianin in dehidrosilibin (2). Po Ph. Eur. 7 se predpisuje rabo očiščenega standardiziranega suhega ekstrakta plodov pegastega badlja. Ta je razvrščen med rastlinske pripravke s sestavinami,

ki izkazujejo klinične učinke. Vsebnost v ekstraktu je 90 do 110% nominalne vsebnosti silimarina, izražen kot silibinin, kar znaša 30 - 65% m/m suhega ekstrakta, ki ga sestavlja:

- silikristin in silidianin 20 - 45%,
- silibin (A in B) 40 - 65%,
- izosilibin (A in B) 10 - 20% (4).

Silibin ter izosilibin sta zmesi diastereoizomerov silibina A in silibina B (slika 1) v razmerju 1:1, ter izosilibina A in izosilibina B v razmerju 1:1 (2).



Slika 1: Struktura diastereoizomerov silibina (3,5,7-trihidroksi-2-[3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-(hidroksimetil)-2,3-dihidrobenc[1,4]dioksin-6-il]-4-kromanon) in diastereoizomerov izosilibina (3,5,7-trihidroksi-2-[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-(hidroksimetil)-2,3-dihidrobenc[1,4]dioksin-6-il]-4-kromanon)

Mr=482,4

1.1.1 Farmakodinamika silibina

Pripravki s silimarinom se uporabljajo v podpornem zdravljenju jetrnih obolenj (2). S kliničnimi raziskavami ima najmočnejše potrjene učinke silibin, njegov vodotopni pripravek Legalon® SIL kot antidot uporablja ob zastrupitvi z zeleno mušnico. V poskusih na živalih so dokazali preventivni učinek pred zastrupitvami s toksini, pozneje so odkrili tudi širše hepatoprotektivno delovanje silibina, ki poteka z različnimi mehanizmi (5).

Silibin je lovilec radikalov, modulator permeabilnosti membran in regulator celične vsebnosti GSH in ima antioksidativno delovanje. Zavira lipidno peroksidacijo ter poškodbe nastale zaradi ROS, ki nastanejo ob metabolizmu CCL₄, etanola, tiacetamida in paracetamola. Fenolna struktura silibina zagotavlja tvorbo stabilnih spojin po reakciji s hidroksilnimi in kisikovimi radikali. *In vitro* testi dokazujejo, da se pri inkubaciji s terapevtsko količino silimarina značilno poviša ekspresija SOD (3).

Sposobnost reguliranja permeabilnosti membran in večanje njihove stabilnosti preprečuje vstop toksinom v hepatocite in vpliva na strukturo lipidnih komponent membran. Silimarinski flavonolignani inhibirajo OATP transportne proteine v sinusoidalni membrani hepatocita in luminalni membrani enterocitov in zavirajo privzem v celice (6). Silibin je tudi inhibitor encimov CYP 450 (faza I metabolizma) in zavira bioaktivacijo toksinov. Dokazano je, da silibin zmanjšuje okvare jeter ob zastrupitvi s toksini zelene mušnice (*Amanita phalloides*), fenotiazini in butirofenoni. Inhibicija in vplivi na OATP, CYP450 in P-gp proteine so tudi razlogi za možne interakcije silibina z zdravili (7, 8).

Podporno zdravljenje akutnega hepatitisa zmanjšuje verjetnost zapletov, skrajšuje hospitalizacijo ter spodbuja okrevanje. Pri pacientih z dokazano cirozo jeter je srednje preživetje značilno daljše pri bolnikih, ki so bili zdravljeni s silimarinom. Raziskave na pacientih z jetrnimi obolenji zaradi zlorabe alkohola potrjujejo, da po dajanju silimarina nivo encimov AST in ALT upade. Silimarin vpliva tudi na jedrno izražanje in zvišuje sintezo rRNA preko stimulacije RNA polimeraze 1 in sinteze ribosomov. S tem se pospešuje sinteza proteinov kar stimulira regeneracijo jeter in tkiv po poškodbah zaradi hepatotoksinov. Preko inhibicije NF- κ B silimarin izkazuje protivnetno, imunomodulatorno in antifibrotično delovanje. Inhibira tudi pretvorbo zvezdastih hepatocitov v miofibroblaste, ki so odgovorni za nalaganje kolagenskih vlaken v procesih fibroze in ciroze jeter (3, 5).

1.1.2 Farmakokinetične lastnosti silibina

1.1.2.1 Absorpcija

Flavonolignani imajo nizko biološko uporabnost. Absorpcija izomerov silimarina pri ljudeh in živalskih modelih je slaba. Topnost silimarina je nizka zaradi hidrofobne kemijske strukture, ki ne ionizira. Zaradi slabe topnosti silibina nastajajo mikrokristali, ki se ne

absorbirajo (9). V vodi znaša 0,04 mg/ml, v pogojih, ki so podobni pogojem v tankem črevesju (37 °C, pH=7,2) je topnost silibina A 0,0033 mg/ml, silibina B pa 0,0077 mg/ml. Silibin zato sodi v drugi razred po BCS klasifikaciji, med slabo topne in visoko permeabilne snovi (10). Delež absorpcije silimarina je od 20 do 50%. Po predklinični študiji na podganah je delež intestinalne absorpcije radioaktivno označenega silibina 35%. Absolutna biološka uporabnost silibina pri podganah pa je 0,95% (11). Klinična študija na 14 prostovoljcih opredeljuje povprečno biološko uporabnost silimarina na $0,45 \pm 0,28\%$ (povprečje \pm SD) (12). Nizke vrednosti so posledica slabe absorpcije zaradi slabe topnosti, metabolizma prvega prehoda in hitre konjugacije. Kompleksi silibina s fosfatidilholinom, β -ciklodekstrini, tvorba β -glikozidov, liofilizatov, trdnih disperzij s hidrofilnimi polimeri kot je PEG 6000 ter uporaba formulacij SMEDDS so načini, s katerimi so povečali biološko uporabnost silibina (8, 9, 10).

1.1.2.2 Distribucija

Prosta in konjugirana oblika silibina se hitro porazdelujeta v tkiva. Maksimalno koncentracijo v plazmi (c_{max}) doseže v času (t_{max}) 1-2 h po peroralni aplikaciji. Silibin se pri podganah v $70,3 \pm 4,6\%$ veže na plazemske proteine. Vezava na albumine pri človeku je visoka in reverzibilna (6). Vrednosti c_{max} konjugiranega silibina so 2-12-krat višje od proste oblike. AUC za celokupni silibin je 4-13 krat višja kot za prosto obliko. AUC silibina B je višji od AUC silibina A. Razpolovna doba ($t_{1/2}$) izločanja po peroralni aplikaciji za silibin znaša 1,3 ure za prosti in 6 ur za glukuronid silibina A ter 2,3 ure za prosti in 3,5 ure za glukuronid silibina B (13). Ostale vrednosti c_{max} , t_{max} in AUC so v tabeli 1.

Tabela 1: Podatki farmakokinetičnih parametrov za silibin. Povzeto po Wenu (13).

Odmerek: 600mg standardiziranega ekstrakta pegastega badlja v obliki kapsul		c_{max} (ng/ml)	t_{max} (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)
Silibin A	prosti	$23 \pm 7,9$	$1,3 \pm 0,5$	63 ± 38
	konjugirani	$26 \pm 6,8$	$6,0 \pm 1,9$	208 ± 65
	skupni	45 ± 16	$5,3 \pm 2,3$	260 ± 85
Silibin B	prosti	$15 \pm 7,4$	$0,83 \pm 0,1$	51 ± 19
	konjugirani	118 ± 21	$1,5 \pm 0,5$	597 ± 234
	skupni	131 ± 28	$1,3 \pm 0,3$	647 ± 204

1.1.2.3 Metabolizem

Metabolizem silibina v fazi I je minimalen, v večji meri pride do O-demetilacije, manj pa nastane monohidroksi in dihidroksi metabolitov silibina v reakcijah s citokromi P-450. Poznani so inhibitorni vplivi silibina na encima CYP3A4 in CYP2C9, kar je pomembno za predvidevanje interakcij z zdravili. V fazi II poteka konjugacija s sulfati in glukuronsko kislino na mestu C-7 in C-20 pri obeh izomerih (5,14). Glukuronidacija poteka z UGT1A1 in lahko vpliva na hitrost presnove drugih substratov tega encima (8). Študija na modelu mikrosomov govejih jeter je pokazala, da izmed glukuronidov nastane največ 20-O- β -D-glukuronida silibina B, delež 7-O- β -D-glukuronidov silibina A in B ter 20-O- β -D-glukuronida silibina A je primerljiv (15). Zaznali so naslednje metabolite: silibin monoglukuronid, silibin diglukuronid, silibin monosulfat, silibinglukuronid sulfat, O-demetil silibin glukuronid, silibin triglukuronid (16). Deleži proste, sulfatirane ter glukuronidirane oblike silimarinskih flavonolignanov v času vrha plazemskega profila (1-3 h po prejetju odmerka) so 17%, 28% in 55%, za diastereoizomera pa velja, da je delež glukuronida silibina B (70,7%) trikrat večji od deleža glukuronida silibina A (25 %) (13). To se sklada s stereoselektivnostjo glukuronidacije silibina, ki jo potrjujejo z *in vitro* testi.

1.1.2.4 Eliminacija

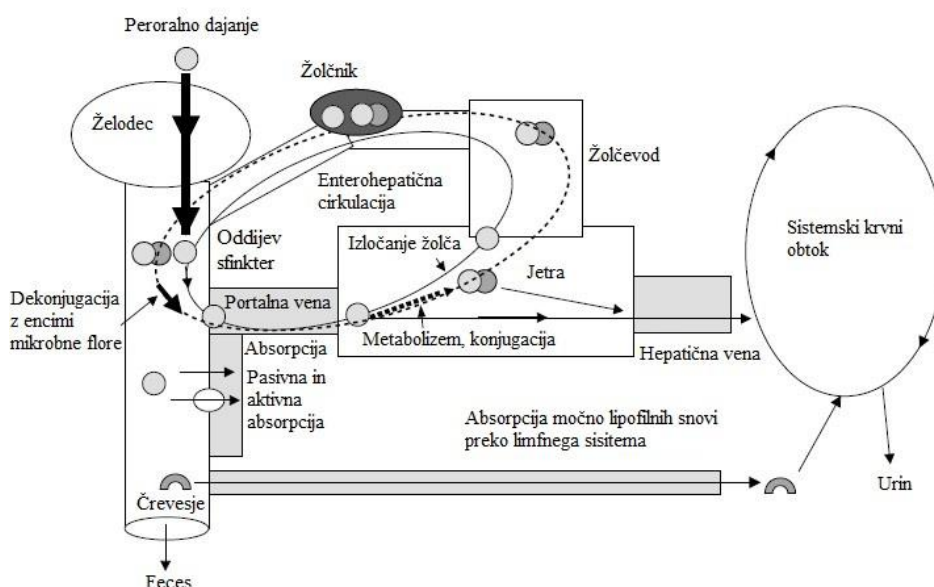
Večinoma se silibin izloča z žolčem, kjer so koncentracije 100-krat višje kot v serumu. Delež izločanja z žolčem je 80%. Z urinom se izloča le nizek delež, 3% skupnih flavonolignanov (18) oz. 2-5% silibina (8). Značilna je hitra eliminacija s kratko razpolovno dobo (1-2 uri) za prosto obliko, za glukuronida je razpolovna doba 3-6 ur (13). V enterohepatično cirkulacijo (EHC) vstopa 10% odmerka silibina, ki jo dokazujejo na podlagi dodatnih vrhov v plazemskem profilu v času po dosegu c_{max} (5, 13, 18).

1.2 Enterohepatična cirkulacija

Večkratni vrhovi v plazemskem koncentracijskem profilu se pojavljajo zaradi različnih razlogov. Ti so posledica fizikalno kemijskih lastnosti ali pa lastnosti formulacije. Sem sodi s slabo topnostjo omejena absorpcija, tvorba netopnih kompleksov ter uporaba dostavnih oblik s prirejenim sproščanjem. Lahko pa so razlogi fiziološke narave, kot so enterohepatična cirkulacija, praznjenje želodca, prehod skozi tanko črevo, lokalno specifična

absorpcija, entero-salivarno kroženje s poznejšim zaužitjem sline in absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta (19).

Ksenobiotiki se absorbirajo preko enterocitov v portalni venski krvni obtok, od tam sledi privzem v hepatocite, izločanje v žolč ter z njim v intestinalni lumen, kjer se lahko ponovno absorbirajo. To kroženje poimenujemo enterohepatična cirkulacija, ki je prikazana na sliki 2. Pojav je pogosto povezan s podaljšanjem razpolovne dobe izločanja snovi in številčnejšimi vrhovi v plazemskem koncentracijskem profilu.

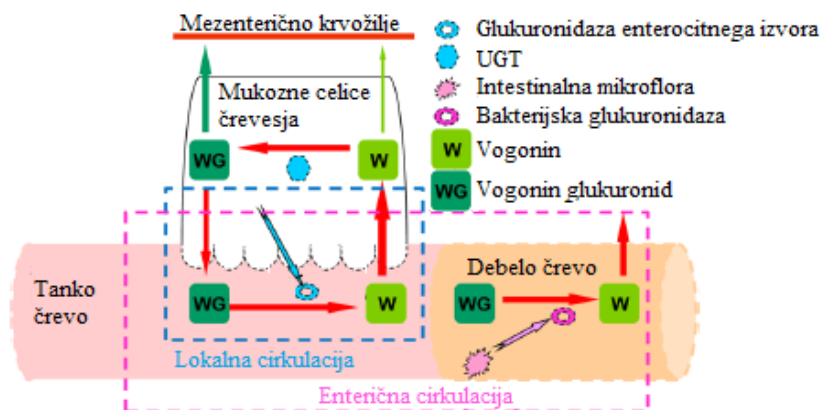


Slika 2: Osnovna shema enterohepatične cirkulacije. Prirejeno po Robertsu (20)

Absorpcija je odvisna od formulacije in fizikalno kemijskih lastnosti snovi ter fiziologije GIT. Na količino, ki doseže sistemske krvni obtok, vpliva celokupni metabolizem prvega prehoda. Po absorpciji ter biotransformaciji v steni črevesja, sledi transport iz vene porte preko sinusoidne membrane v hepatocite. Po biotransformaciji v hepatocitih se metaboliti izločajo v žolčevode preko Mrp2 ali pa vstopijo v hepatočno veno in sistemske krvni obtok. Za snovi ki se izločajo z žolčem je prag molekulske mase ocenjen na 500-600 Da, snovi z nižjo maso se praviloma izločajo z urinom. Žolč, ki se skladišči v žolčniku se hipno na podlagi dražljajev ob zaužitju hrane izprazni preko Oddijevega sfinktra v dvanajstnik. Izločanje žolča je zato sporadično in ob ponovni absorpciji je v plazemskem

koncentracijskem profilu prisotnih več sekundarnih vrhov. Kroženje se zaključi z izločanjem v feces, ali z vstopom v sistemske cirkulacije in od tu z izločanjem v urin (20, 21).

Pri flavonoidih so dokazali tudi naslednji cirkulaciji, ki sta prikazani na sliki 3:



Slika 3: Prikazana je enterična in lokalna cirkulacija flavonoida vagonina. Prirejeno po Xia (22).

1.2.1 Enterična cirkulacija

Kroženje med intestinalnim lumnem ter enterociti poteka ob prisotnosti β -glukuronidaze ter enteričnih encimov. Metaboliti faze II se iz enterocitov izločajo v lumen, kjer poteče hidroliza do proste oblike. Ta se nato ponovno absorbira. Encimska aktivnost UGT in SULT je višja v tankem črevesju, β -glukuronidaze pa višja v debelem črevesju. Tako se kroženje sklene čez celotno črevesje (intestinalno področje).

1.2.2 Lokalna cirkulacija

Za flavonoide se predpostavlja da hidroliza glukuronida poteče tudi s hidrolitičnimi encimi enterocitnega izvora v tankem črevesju, in ne le z mikrobno β -glukuronidazo, ki je izvorno del mikroflora v debelem črevesju. Kroženje se zato lahko lokalizira na področja v tankem črevesju, kjer se podaljša čas zadrževanja. Lahko se pojavi neodvisno od enterohepatičnega in enteričnega kroženja. V primeru hkratnega poteka vseh treh mehanizmov pa se bistveno podaljša razpolovna doba izločanja aglikona in konjugatov, kot bi bilo pričakovano za slabo topne snovi (22).

1.3 Zdravilni žvečilni gumi (Masticabilia gummis medicata)

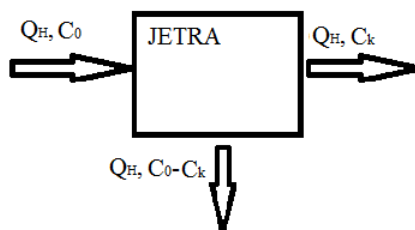
Zdravilni žvečilni gumi je farmacevtska oblika, ki zagotavlja absorpcijo učinkovin skozi ustno sluznico v 5 do 10 minut. Sproščanje lahko topnih snovi iz te formulacije je hitro, zato so na trgu poznani proizvodi z učinkovinami, ki zahtevajo hiter učinek, kot so acetisalicilna kislina, nikotin, kofein, dimenhidrinat. Za razliko je sproščanje težko topnih snovi odvisno od intenzitete in frekvence žvečenja, kar lahko vpliva na absorpcijo. Z absorpcijo skozi ustno sluznico se učinkovina izogne metabolizmu prvega prehoda v jetrih. To je primerno za učinkovine, ki se hitro presnavljajo, kar velja tudi za silibin. Zato preide v sistemski krvni obtok večji delež, ki bi se sicer presnovil pri prvem prehodu skozi intestinalni sistem in jetra. Izogne se tudi vplivom v gastrointestinalnem traktu, kjer se zaradi slabe topnosti in pH pogojev učinkovina lahko obori in ne absorbira. Težave te dostavne oblike predstavljajo permeabilnost skozi mukozno plast ustne sluznice, draženje na mestu aplikacije ter možnost zaužitja skozi prebavni trakt, zaradi česar se lahko zmanjša končna biološka uporabnost. S tem načinom aplikacije nudimo rešitev za izboljšanje compliance zdravljenja pri pacientih, katerim je peroralna aplikacija neutrezna ali jim povzroča težave. Med slednje uvrščamo paciente s poškodbami sluznice požiralnika in želodca, osebe z večjo občutljivostjo centra za bruhanje in tudi otroke, ki imajo težave z zaužitjem peroralnih farmacevtskih oblik. V primeru poškodovane sluznice požiralnika in želodca, lahko peroralna farmacevtska oblika (npr. kapsule) draži in izzove refleks bruhanja ter s tem poslabša uspešnost zdravljenja. Lahko pa učinkovina sama draži sluznico prebavil, kot je to v primeru acetilsalicilne kisline. Zdravilni žvečilni gumi je možno uporabiti kadarkoli brez dodatne vode in se v primeru pojava neželenih učinkov žvečenje enostavno prekine, kar zagotavlja večjo varnost in prestavlja dodatno prednost te novejši oralne farmacevtske oblike (23, 24).

1.4 Model dobro premešanega prostora

Jetrni očistek učinkovine iz celotnega krvnega obtoka se v enačbi 1 opredeli kot funkcija jetrnega pretoka krvi (Q_H), deleža proste koncentracije učinkovine v plazmi (f_u) in intrinzičnega metabolnega očistka nevezane učinkovine v jetrih ($Cl_{int,H}$). Masna bilanca modela je na sliki 4 ter odnos med deležem ekstrakcije (E) in deležem, ki se izogne ekstrakciji jeter (F) v enačbi 2.

$$Cl_H = Q_H * E = Q_H * \frac{C_0 - C_k}{C_0} = Q_H * \frac{f_u * Cl_{int_H}}{Q_H + f_u * Cl_{int_H}} \quad (\text{Enačba 1})$$

$$F = 1 - E \quad (\text{Enačba 2})$$



Slika 4: Model dobro premešanega prostora

Model predpostavlja, da se učinkovina v jetrih v trenutku homogeno porazdeli, koncentracije vezane in nevezanega deleža pa so enake v plazmi in jetrih. Kar pomeni da je porazdeljevanje v jetra perfuzijsko omejeno, je brez difuzijskega zamika in ne upošteva aktivni transport. Model enači celotni krvi očistek z jetrnim pretokom, ker so jetra sposobna ekstrakcije učinkovine iz plazme in krvnih celic. Če ocenjujemo plazemski očistek, mora enačba upoštevati prosti delež v plazmi razmerje koncentracij v krvi in plazmi (25).

1.5 Farmakokinetični model

Model je predstavitev sistema. Uporabljamo ga namesto sistema, da bi pojasnili ali pridobili nekatere informacije o sistemu (26). Farmakokinetične modele lahko delimo na podatkovne (empirične) in na sistemske (mehanistične). Empirični modeli potrebujejo nekaj predpostavk o mehanizmih generiranja podatkov, kot je npr. alometrično skaliranje, za opredeljevanje plazemskega koncentracijskega profila. Uporabni so, ko ni veliko znanega o fizikalnih procesih, o katerih so zbrani podatki, a je še vedno potrebno pridobiti zaključke. Uporabni so za napovedi, a ne za ekstrapolacijo. Mehanistični modeli so osnovani na fizikalnih in fizioloških načelih, in vključujejo toliko značilnosti kot jih dovoljujejo podatki. Zapisani so v obliki diferencialnih in parcialnih diferencialnih enačb. Primer teh modelov je fiziološki farmakokinetični model. Modeli so tudi hibridna kombinacija mehanističnih in empiričnih. Mehanistične modele lahko opredelimo tudi kot deterministične ali stohastične; dinamične ali statične, linearne ali nelinearne, enotne ali razširjene (27).

1.5.1 Populacijska farmakokinetika

Populacijska farmakokinetika (PFK) je področje klinične farmakologije, ki si prizadeva za kvantitativno ocenjevanje farmakokinetičnih parametrov, interindividualne variabilnosti ter rezidualne variabilnosti v absorpciji, distribuciji, metabolizmu in eliminaciji učinkovine. Osrednjo vlogo pri neposredni oskrbi pacienta zaradi uporabnosti imajo populacijski FK modeli, ki so uporabni pri Bayesovih metodah ocenjevanja individualnih FK parametrov, pri spremljanju terapije z zdravili in v razvoju zdravila. Namen PFK pri bolnišnični oskrbi pacienta je priprava smernic za optimizacijo individualizacije odmerjanja učinkovine. S PFK modeli lahko na podlagi podatkov plazemskih koncentracij učinkovine ocenimo individualne FK parametre, ki so potrebni pri individualizaciji režima odmerjanja.

Pri tradicionalnem pristopu ocenjevanja farmakokinetike je glavni poudarek in cilj na pridobivanju povprečij za preučevano skupino oseb, npr. povprečni plazemski koncentracijski profil. Načrt take študije je tog, omejena ter izvedena je na čimbolj homogenih podatkih in je pogosto manj reprezentativna za namene rabe zdravila. Nasprotno pa je za populacijski pristop značilno naslednje:

- Pridobivanje relevantnih podatkov pri pacientih, ki so reprezentativni za ciljno populacijo zdravljenja z izbranim zdravilom.
- Prepoznavanje vire variabilnosti, kot so interindividualna, intraindividualna in časovna variabilnost,
- Pojasnjuje variabilnost glede na demografske, patofiziološke, okoljske in z učinkovino povezane vplive na farmakokinetiko učinkovine.

Kvantitativno ocenjuje velikost naključne variabilnosti v populaciji, kar je pomembno saj s povečanjem nepojasnjene variabilnosti učinkovitost in varnost učinkovine upade. Farmakokinetične informacije se uporabljajo za ekstrapolacijo varnosti in učinkovitosti novih zdravil na širšo populacijo. Tako je PFK sestaven del regulatornih vlog za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom, kjer so povzeti farmakokinetični podatki, pridobljeni v vseh fazah razvoja zdravila (27, 28).

1.5.2 Prednosti in slabosti PFK

Populacijski pristop ocenjevanja farmakokinetike pridobi podatke iz ciljne populacije in je zmožen uporabiti podatke iz pogostih vzorčenj, kot tudi skopih. Zato je izvedba študije možna, kjer je iz etičnih, moralnih ter medicinskih razlogov pridobivanje in vzorčenje na pacientih omejeno. Analiza na redkih podatkih je stroškovno učinkovitejša. Pridobi boljše ocene interindividualne variabilnosti kot tradicionalen pristop. Kombinacija točne in natančne ocene interindividualne variabilnosti in povprečja parametrov je uporabna za izbiro začetnega načrta odmerjanja zdravila, in omogoča povratne Bayesove analize za izvedbo individualizacije odmerjanja. PFK ocenjuje variabilnost in tudi identificira vire variabilnosti. Prepoznava podskupine v populaciji, s vključevanjem sočasnih spremenljivk pojasnjuje in identificira nove vire variabilnosti. Omogoča analizo heterogenih tipov podatkov, združenih iz različnih študij, v različnih ustanovah, z različnim načrtom študije. Združevanje različnih podatkov pogosto poveča moč prepoznave večprostornih ali nelinearnih modelov, vključitve dodatnih sočasnih spremenljivk in izboljša prileganje modela. Težava teh metod je, da so zahtevnejše za razumevanje, izvedbo in interpretacijo (28).

1.5.3 Populacijski farmakokinetični model

Farmakokinetični modeli se delijo tudi v individualne in populacijske. Za individualne FK modele je značilno ocenjevanje individualnih FK parametrov na podlagi eksperimentalnih podatkov, ki so pridobljeni pod kontroliranimi pogoji dajanja zdravila in pogostega odvzema vzorcev krvi. Populacijski FK modeli pa lahko preučujejo tudi opazovalni tip podatkov, ki so skopi, 1 - 6 vzorčenj na pacienta, in lahko variirajo med pacienti, saj je odmerjanje zdravil specifično za posameznika, in od tega je odvisno tudi zbiranje vzorcev. PFK model je kot zbirka individualnih modelov, skupna variabilnost v vzorcu posameznikov pa odraža napako merjenj in interindividualno variabilnost (31).

1.5.4 Model nelinearnih mešanih učinkov

Modeli mešanih učinkov opisujejo vplive stalnih in naključnih učinkov. Z uporabo nelinearnih mešanih učinkov se ocenjuje interindividualna farmakokinetična variabilnost ne da bi prezrli vse probleme, povezane s podatki pacientov. Vektor populacijskih parametrov je sestavljen z vseh vrednosti prvih dveh momentov distribucije parametrov, tj. srednjih

vrednosti, kot stalnih učinkov in elementov variančne-kovariančne matrike, ki opredeljuje naključne učinke (29). Stalni učinki so znane merjene lastnosti posameznika, zaradi katerih deskriptorji modela (kot so parametri modela) variirajo med posamezniki v populaciji. Stalen učinek ima teža na očistek, saj je očistek proporcionalen na težo in ga lahko zapišemo kot produkt skalarja s težo. Z naključnimi učinki opredeljujemo variabilnost, ki je ni moč napovedati (32).

Populacijski model sestavlja:

- Strukturni model
 - splošni model
 - model parametrov
- Statistični model ali model variance

1.5.4.1 Splošni model

Splošni model opisuje odziv za preučevano populacijo po enačbi 3.

$$y_{ij} = f_{ij}(\phi_j, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Enačba 3})$$

y_{ij} ; $i=1, \dots, n_j$ opazovani podatki j -tega osebk v časovnih točkah x_{ij} , $j=1, \dots, N$, N je število osebkov v vzorcu, f_{ij} je funkcija odvisne (ϕ_j) in neodvisne spremenljivke (x_{ij}), ϕ_j je vrednost individualnega farmakokinetičnega parametra, ε_{ij} je rezidualna napaka.

Pri tem za parametre zapišemo splošni model z enačbo 4.

$$\phi_j = g(\theta, z_j) + \eta_j \quad (\text{Enačba 4})$$

Funkcija g opisuje napovedno vrednost ϕ_j kot funkcijo znane individualne specifične kovariate z_j , in vektorja populacijskega parametra θ , in je strukturni model stalnih učinkov z_j in parametrov stalnih učinkov θ . η_j predstavlja naključno razliko vektorja individualnega parametra okoli populacijske napovedi, kar opredelimo kot interindividualna variabilnost (28).

Naključni učinki so tako dveh nivojev. Prvi je η_j , interindividualna napaka s povprečjem 0 in varianco ω^2 , ki pojasnjuje biološko variabilnost v populaciji. Drugi nivo je intraindividualna napaka, ε_{ij} , s povprečjem 0 in varianco σ^2 . Kovarianca parov η_j , je meritev statistične povezanosti med obema naključnima spremenljivkama, je povezana z njuno korelacijo. Kovariančna matrika, Ω , podaja vrednosti varianc in kovarianc vseh parov η_j (30).

1.5.4.2 Statistični model reziduala

Z njim opredelimo variabilnost. Pri variabilnosti ločimo variabilnosti stalnih učinkov in variabilnost naključnih učinkov. Stalni učinki so populacijska povprečja FK parametrov. Naključni učinki (interindividualna, časovna, intraindividualna in rezidualna variabilnost) opredeljujejo FK variabilnost, ki ni pojasnjena s stalnimi učinki. Viri variabilnosti, ki prispevajo k razlikam med pričakovano vrednostjo in izidom, so opredeljeni kot interindividualni vplivi ter rezidual. Rezidualna variabilnost vključuje intraindividualne vplive (naključni vplivi), časovno variabilnost, napako merjenja koncentracije in napako modela (28).

Rezidualni variančni model opredeljuje naključno nepojasnjeno variabilnost funkcije f . Najpogosteje se razliko opredeli z enačbami 5 - 8:

- Aditivna :

$$y_{ij} = f_{ij}(\phi_j, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Enačba 5})$$

- Proporcionalna

$$y_{ij} = f_{ij}(\phi_j, x_{ij}) * (1 + \varepsilon_{ij}) \quad (\text{Enačba 6})$$

- Eksponentna

$$y_{ij} = f_{ij}(\phi_j, x_{ij}) * e^{\varepsilon_{ij}} \quad (\text{Enačba 7})$$

- Kombinirana aditivna in proporcionalna

$$y_{ij} = f_{ij}(\phi_j, x_{ij}) * (1 + \varepsilon_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Enačba 8})$$

Podatki v populacijski farmakokinetiki so pogosto logaritemsko normalno porazdeljeni. Dokler je SD manjša kot 20%, obstaja le manjša razlika med proporcionalnim in eksponentnim modelom variabilnosti. Pri večjih vrednostih distribuciji divergirata, vrednost proporcionalnega modela postaja negativna za razliko od logaritemsko normalnega modela, ki je vedno pozitivna (32).

1.5.5 Razvoj in validacija modela

Pri ocenjevanju modelov nelinearnih mešanih učinkov se uporabljajo ocenjevalne procedure, največkrat uporabljena je metoda največjega verjetja (maximum likelihood).

Metoda največjega verjetja

Velja da se poišče take ocene parametrov, da je verjetje ujemanja meritev z oceno največje. Verjetje je največje, ko je verjetnost pojavitve vrednosti parametrov modela med izmerjenimi podatki največja.

Verjetnostna funkcija za N meritev v normalni porazdelitvi je podana z enačbo 9.

$$L = \prod_{i=1}^N \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_i^2}} e^{-\frac{1}{2\sigma_i^2}(y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (\text{Enačba 9})$$

$$-2 \log(L) = -n \log(2\pi) + \sum_{i=1}^n \left(\log(\sigma_i^2) + \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sigma_i^2} \right) \quad (\text{Enačba 10})$$

Pojasnjuje verjetnost, da se izmerjeni podatki nahajajo med naborom vrednosti ocen parametrov modela, ko je model pravilen. Če so meritve verjetne za model, potem ta dobro pojasnjuje podatke. Uspešnost modela ocenimo z OFV vrednostjo, kar je minimizacija $-2\log L$ (enačba 10) in predstavlja enak pristop kot je povečanje verjetja.

Primerjavo modelov podamo s testom razmerja verjetij. Med modeloma iste družine lahko testiramo značilnost parametra, za katerega sta modela različna. Test je osnovan na razmerju verjetij, kjer distribucija $-2\log(L1/L2)$ sledi χ^2 distribuciji in je razlika stopinj prostosti enaka razliki št. parametrov med modeloma. Pri verjetnosti 0,05 in 1 st. prostosti je vrednost χ^2 distribucije 3,84, in je parameter statistično značilen, ko razlika OFV vrednosti ($-2\log L$) preseže 3,84 ($p < 0,05$).

Zaradi težavnosti pri izračunu verjetja zaradi nelinearne povezanosti meritev z naključnimi vplivi η in ϵ so bile razvite ocenjevalne aproksimacijske metode. Izbira te je odvisna od več dejavnikov, kot je tip podatkov, porabe časa pri izračunu v povezavi s kompleksnostjo modela, stopnje nelinearnosti naključnih učinkov v modelu. V pristopu nelinearnih mešanih učinkov so uporabne aproksimacije s z razširitvijo Taylorjeve vrste prvega reda (FO) in njenimi izpeljankami (NLME, MIXLIN, SAS); pogojena ocenjevanja FOCE, FOCE-i, Laplaceova metoda; neparametrično in semineparametrično maksimalno verjetje (NPML, SNP). Med bolj uporabljeni metodami je FOCE-i, je metoda aproksimacije prvega reda Taylorjeve vrste z upoštevanjem interakcije med ϵ in η , ki med sabo nista neodvisna (27, 29, 32).

Interna in eksterna validacija

PFK modeli so lahko opisni ali napovedni. Za opisne je cilj prileganje podatkom, zanesljivost in stabilnost. Ustreznost prileganja modela preverjamo z diagnostičnimi diagrami. Nezanesljivost modela mora biti nizka, relativna st. napaka ne sme preseči 25%, za parametre naključnih učinkov pa 50%. Drugi pristopi določevanja zanesljivosti parametrov so metoda bootstrap, metoda pipca, metode profiliranja verjetja.

Vrednotenja modelov ločimo v eksterne in interne. Eksterne so strožje, kjer se končni model razvit na prvotnem vzorcu oceni na testni populaciji. Primeri internega vrednotenja pa so navzkrižna validacija, metoda bootstrap, ločitev podatkov, PPC. Interna validacija je primerna kadar iz populacije ni moč pridobiti testne vrednosti. Problem ločbe podatkov je v določitvi deleža podatkov, ki ga namenimo v zaključno testiranje napram ostalim vrednostnim. Prednost navzkrižne validacije in bootstrapa je, da uporabita celoten nabor podatkov, in niso naključno ločeni. Bootstrap je primeren za izbiro modela, preverjanja stabilnosti in določitve zanesljivosti ter vrednotenja (31).

Metoda bootstrap (tudi kljukčeva metoda) je metoda ponovnega vzorčenja, kjer iz osnovnega nabora s ponavljanjem postopka pridobimo naključne nove vzorce, enake velikosti kot osnoven nabor in se porazdeljujejo v isti porazdelitvi. Model prilagamo na te podatke in pridobimo bootstrap vrednosti ocen parametrov in statistik (pristranost, variance, intervali zaupanja). Da pridobimo zanesljive vrednosti varianc postopek ponovimo več kot 100-krat, za intervale zaupanja 1000-krat (27).

2 NAMEN

Razvoj nove farmacevtske oblike zahteva natančno opredelitev farmakokinetike učinkovine, zato v nalogi želimo opredeliti farmakokinetične parametre in njih variabilnost v populaciji. Ta je pomembna za načrtovanje učinkovitega in varnega odmerjanja, še posebej zaradi pojavljanja interkcij silibina z zdravili. V dosedanjih raziskavah farmakokinetike silibina je bila uporabljena neprostorska analiza. Opredeljene so bile vrednosti t_{\max} , C_{\max} , $t_{1/2}$ in biološke uporabnosti. Z vidika ocenjevanja farmakokinetike je silibin problematična učinkovina zaradi slabe topnosti in hitrega metabolizma in distribucije. Vrednosti FK parametrov kot sta očistek in volumen porazdelitve so slabo poznane. Za farmakokinetiko silibina je značilna tudi visoka variabilnost, ki je še nepojasnjena.

Za diastereoizomera silibina, silibin A in silibin B, bomo zato razvili populacijski farmakokinetični model, s katerim želimo potrditi in oceniti enterohepatično cirkulacijo, oceniti vrednosti FK parametrov in njihovo variabilnost v populaciji. Za namen razvoja modela bomo uporabili podatke klinične študije na 15 prostovoljcih.

Model bomo razvili z uporabo fizioloških in farmakokinetičnih predpostavk, ki so bile preučene predhodno in ga priredili za posamezen izomer silibina. Zaradi predvidevanj o enterohepatični cirkulaciji silibina bomo ocenili čase začetka ciklov, in delež snovi, ki zapade ponovni absorpciji v enterohepatičnem ciklu. Pri tem bomo uporabili programski paket za populacijsko farmakokinetično analizo NONMEM in metodo nelinearnega modeliranja mešanih učinkov. Variabilnost v populaciji bomo ocenili na interindividualnem nivoju (za posamezen FK parameter) in skupno intraindividualno variabilnost modela. Pridobili bomo statistike parametrov modela ter z metodami vrednotenja modela ocene o ustreznosti, zanesljivosti in stabilnosti modela. Model bomo razvili na posameznem izomeru, zato bomo uspešnost primerjali med izomeroma.

Cilj naloge je razviti populacijski farmakokinetičen model izvlečka silibina za zdravilni žvečilni gumi, ki za posamezen izomer dovolj dobro opisuje obseg enterohepatične cirkulacije in FK parametre očistkov in volumnov porazdelitve. Ocenjevali bomo tudi interindividualno variabilnost (IIV) teh parametrov in intraindividualno variabilnost modela na izbranem vzorcu oseb.

3 METODE

3.1 Podatki načrta preizkušanja medicinskega gumija na prostovoljcih

Klinični del raziskave in merjenje plazemskih koncentracij prostega in celokupnega silibina A in B so izvedli na Univerzi v Trstu na 15 prostovoljcih. Njihovi demografski podatki so v tabeli 2. Preizkušanci so zaužili dve formulaciji z izvlečkom pegastega badlja v obliki 3Tab[®] zdravilnega žvečilnega gumija. Prvi sistem je vseboval le očiščeni suhi izvleček (delež silibina je bil 91,7%), pri drugem pa je bil silimarin mehanokemično aktiviran z dodatkom premreženega natrijevega karmelozata. Vsebnost silibina A je znašala 67,2 mg in silibina B 44,8 mg. Preizkušanci so formulaciji žvečili predpisan čas 40 min in po štirih urah zaužili manjši obrok, vse z namenom, da se pospeši izločanje žolča in pojav enterohepatične cirkulacije.

Tabela 2: Demografski podatki preizkušancev

	Telesna masa (kg)	Starost (leta)	Spol
1.	77	50	M
2.	80	56	M
3.	86	32	M
4.	90	55	M
5.	76	60	M
6.	90	33	M
7.	86	49	M
8.	82	57	M
9.	80	50	M
10.	75	33	M
11.	89	44	M
12.	66	27	Ž
13.	65	47	Ž
14.	57	44	Ž
15.	63	53	Ž

Vzorci krvi so odvzeli v časih 0,5, 1, 2, 3, 4 in 5 ur po aplikaciji. Plazemske koncentracije so določili z metodo HPLC-MS. Po aplikaciji prve formulacije s suhim ekstraktom so bile plazemske koncentracije silibina A in B ves čas pod mejo detekcije. Nasprotno, pa so bile koncentracije silibina A in B pri aplikaciji druge formulacije nad mejo detekcije. AUC proste oblike silibina je bil 3-7-krat višji v primerjavi s peroralno formulacijo (kapsule), kar dokazuje povišanje biološke uporabnosti silibina v obliki 3Tab[®] medicinskega žvečilnega gumija (39). Izračunali smo razlike med prosto in celokupno koncentracijo posameznega diastereoizomera silibina, ki predstavljajo koncentracijo metabolitov (glukuronidov in sulfatov) v plazmi.

Podali smo plazemske koncentracijske profile posameznikov in skupnega povprečja za prosti obliki silibina A in B ter njune metabolite. Z uporabo neprostorske analize farmakokinetike smo izračunali vrednosti AUC ter razmerja med AUC in odmerkom (D) (navidezni peroralni očistek). AUC smo izračunali po trapezni metodi (enačba 11) za čas od odmerka ($t_0=0h$) do zadnjega vzorčenja pri 5h. Primerjali smo navidezna peroralna očistka obeh diastereoizomerov po enačbi 12.

$$AUC = \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{2} (c_i + c_{i+1})(t_{i+1} - t_i) \right) \quad (\text{Enačba 11})$$

$$\frac{cl}{F} = \frac{D}{AUC} \quad (\text{Enačba 12})$$

3.2 Korelacija med prosto in konjugirano obliko pri posameznem preizkušancu

Iz prikazov plazemskih koncentracijskih profilov uporabljene raziskave, ki jih predstavljamo na slikah 9 – 11, smo opazili veliko podobnost v obliki profila proste koncentracije silibina in metabolitov. Določili smo korelacijski koeficient plazemskih koncentracij za vsak izomer pri vsakem preizkušancu. S korelacijo smo poskusili ovreči hipotezo, da pri posameznikih ni povezave med plazemskima profiloma in tako tudi distribucija in eliminacija proste oblike in metabolitov silibina nista povezani.

Korelacija meri moč linearne povezanosti dveh spremenljivk, pridobimo jo po Pearsonovem koeficientu korelacije:

$$r = \frac{C_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu_x)^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \mu_y)^2}} \quad (\text{Enačba 13})$$

Mero statistično značilne povezanosti smo izračunali s t-testom Pearsonovega korelacijskega koeficienta enačba 13, pri določenih stopinjah prostosti (d.f.=N-2=4) in stopnjo značilnosti $\alpha=0,05$. Uporabili smo program Excel, za izračun r smo uporabili funkcijo CORREL in p-vrednosti funkcijo T.DIST.2T. Kriterij je, da je p-vrednost $< 0,05$

$$t = \frac{r \cdot \sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Enačba 14})$$

N= število vzorcev, N-2= število prostostnih stopenj, r= Pearsonov koeficient korelacije

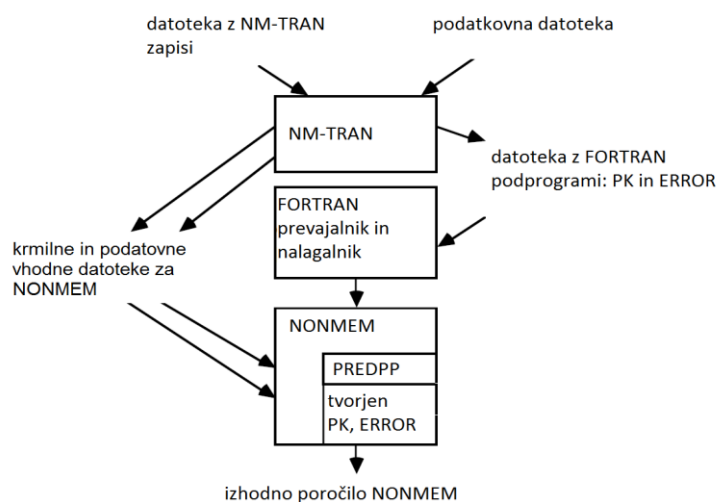
3.3 Programska orodja

Razvoj modela smo opravili po metodi nelinearnih mešanih učinkov s programskim paketom NONMEM 7 (ICON Development Solutions). Program je zapisan v jeziku FORTRAN 90/95 in je bil razvit v namene prilaganja splošnih statističnih nelinearnih regresijskih modelov v analizi populacijskih farmakokinetičnih podatkov. Je široko uporabljeno in dobro testirano orodje. Shema programa je na sliki 5.

Glavni program NONMEM, je orodje za nelinearno modeliranje mešanih učinkov. Omogoča prilaganje modela in napovedovanje vrednosti.

PREPP je zbirka podprogramov z zapisi FK modelov, ki ga izberemo glede na predpostavljen FK model. Del zbirke so stalni jedrni programi, PK in ERROR podprograma, ki rabita podporo uporabnika, ter ADVAN in TRANS, ki ju izberemo glede na vrsto PK modela.

NM-TRAN je predprocesor in omogoča prevajanje kontrolnega jezika, opredelitev modela preko zapisu FORTRAN podobnim kraticam, parcialno odvajanje in pred procesiranje podatkov.



Slika 5: Shema ponazarja odnose med programi. Prirejeno po Boeckmannu (30).

NONMEM deluje v dveh korakih. Sprva NM-TRAN prevede datoteko NM-TRAN stavkov in predprocesira podatkovno datoteko v vhodne krmilne in podatkovne datoteke. V

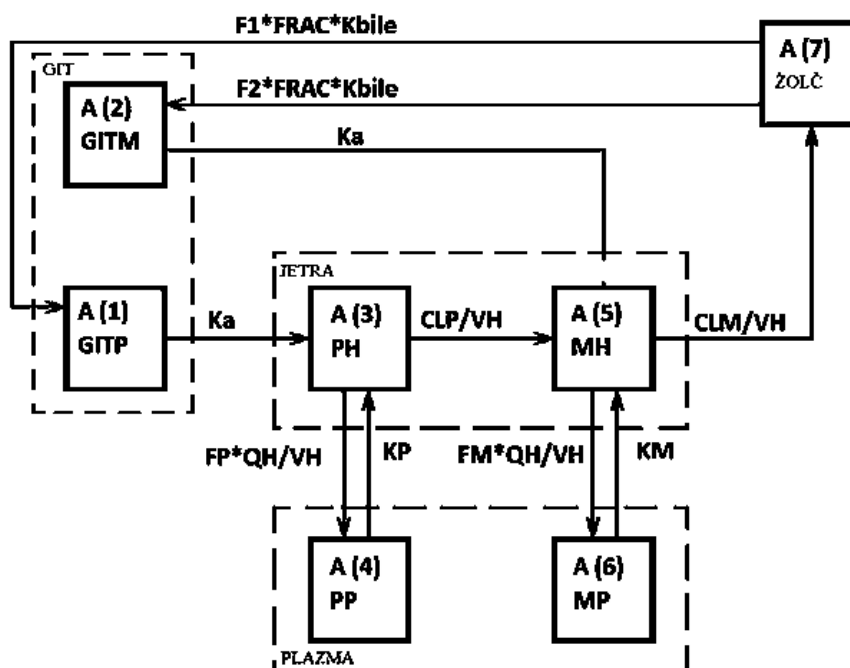
vmesnem koraku se s FORTRAN prevajalnikom prevedeta dela podprograma PK in ERROR. V drugem koraku NONMEM procesira z izvršilnim modulom NONMEM-PREDPP. Na koncu poda izhodno poročilo (30).

3.4 Razvoj osnovnega modela

Za namen preučitve časa pojavljanja enterohepatične cirkulacije smo razvili osnovna modela M_1 in M_2 ter ju predpostavili za oba diastereoizomera silibina. Modela se razlikujeta v matematični opredelitvi EHC. Podatke meritev plazemskih koncentracij smo podali v skladu z zahtevami NM-TRAN zapisa, ki je podan med prilogami (priloga A).

Razvoj modela smo izvedli s podprogramskim orodjem ADVAN6, ki je uporaben za zapis splošnih nelinearnih prostornih modelov. Aproksimacijska metoda je FOCE INTER, opredeljen je TOL=8, ki pri izračunu ocen upošteva število natančnih mest. Z blokom ukazov \$MODEL smo vnesli opredelitev vseh prostorov v modelu, blok ukazov \$PK podaja statistično opredelitev stalnih in naključnih učinkov vseh ocenjevanih parametrov, kjer je IIV parametra v eksponentni obliki. Blok ukazov \$DES vsebuje diferencialne enačbe modela, \$ERROR pa opredeli rezidualno, intraindividualno variabilnost. Podroben zapis NM-TRAN je podan v prilogi B.

Predpostavili smo večprostorni semifiziološki farmakokinetični model, ki predvideva enterohepatično in enterično kroženje silibina. Model je prikazan na sliki 6 in je sestavljen iz treh sklopov (GIT – prostora 1 in 2, jetra – prostora 3 in 5 ter plazme – prostora 4 in 6), ki vsebujejo po en prostor za prosto obliko (indeks P) in en prostor za metabolit (indeks M). Metabolit se izloča z žolčem (prostor 7) in potem deloma reabsorbira kot metabolit, deloma pa v prosti obliki. Zapis parcialnih diferencialnih enačb modela prilagamo v prilogi C.



Slika 6: Shema osnovnega modela EHC silibina.

Ka - hitrostna konstanta absorpcije;

FRAC – delež, ki zapade enterohepatični cirkulaciji

Vh - volumen jeter; **Qh** - pretok krvi v jetrih; **Kbile** - hitrostna konstanta izločanja žolča;

F1, F2 – delež proste oblike oz. metabolita, ki se absorbira v ciklu po izločanju z žolčem

Clp, Clm - očistek proste oblike, oz. metabolita;

Fp, Fm - razpoložljiv delež proste oblike (metabolita), ki se izogne hepatici ekstrakciji;

Kp, Km - hitrostna konstanta vstopa proste oblike (metabolita) iz sistemskega obtoka v jetra

Model za prehod med prostori predvideva kinetiko prvega reda. Absorpcija poteka iz prostora 1 oz. 2 v jetra (prostora 3 in 5). Zaradi poenostavitve in zmanjšanja števila spremenljivk smo predvideli, da je kinetika absorpcije glukuronida in proste oblike silibina enaka, zato upoštevamo isto vrednost konstante absorpcije K_a . Iz jeter se silibin izloča kot metabolit (prostor 5) ali preide v sistemski obtok (prostor 4). Metabolit nastaja v jetrih, oz. se absorbira iz GIT, izloča se v žolč ali v sistemski obtok. Iz sistemskega obtoka se privzema nazaj v jetra.

Očistka silibina in njegovega metabolita (Cl_p in Cl_m) ter deleža absorbiranega silibina, ki se pri prehodu skozi jetra izogne hepatici ekstrakciji (F_p in F_m) smo opredelili z modelom dobro premešanega prostora (enačbe 14 – 17).

$$Cl_P = \frac{Q_H * fu_P * Clint_P}{Q_H + fu_P * Clint_P} \quad (\text{Enačba 15})$$

$$Cl_M = \frac{Q_H * fu_M * Clint_M}{Q_H + fu_M * Clint_M} \quad (\text{Enačba 16})$$

$$F_P = \frac{Q_H}{Q_H + fu_P * Clint_P} \quad (\text{Enačba 17})$$

$$F_M = \frac{Q_H}{Q_H + fu_M * Clint_M} \quad (\text{Enačba 18})$$

S kombiniranjem modelov lahko pridobimo preko intrinzičnega očistka hkrati ocene populacijske variabilnosti očistka in deleža absorbiranega silibina, ki se izogne hepatici ekstrakciji. Hitrostni konstanti prehoda iz sistemkega obtoka v jetra sta odvisni od volumnov porazdelitve proste oblike (V_P) oz. metabolita (V_M) po enačbah 18 in 19.

$$K_P = Q_H / V_P \quad (\text{Enačba 19})$$

$$K_M = Q_H / V_M \quad (\text{Enačba 20})$$

Parametre V_h , Q_h , fu_P in fu_M smo določili glede na podatke predhodnih študij, in jih nismo ocenjevali. Parametru V_H smo pripisali vrednost 1,0 l, Q_H 44 l/h, fu_P 0,1 in fu_M 0,3. Vrednosti jetrnega plazemskega pretoka ($0,63 \text{ l h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) in volumna jeter smo povzeli po viru (39) in veljata kot populacijski oceni za osebo teže 70 kg. Za vrednost fu smo izbrali nizek delež tako za metabolit kot tudi prosto obliko, ker je predvidena visoka vezava silibina na plazemske proteine.

Parametre K_a , K_{GIT} , $Clint_P$, $Clint_M$, V_P , V_M , $FRAC$, Eh_1 , Eh_2 , ter proporcionalni napaki (W_{PP} , W_{PM}) smo ocenili s stalnimi učinki in njihovo IIV (η) z eksponentnim modelom (enačba 21).

$$K_a = \theta(1) * e^{\eta(1)} \quad (\text{Enačba 21})$$

Ker je opredeljena po eksponentni obliki, je natančnejša opredelitev CV za vrednosti variance nad 20 % podana z enačbo 22.

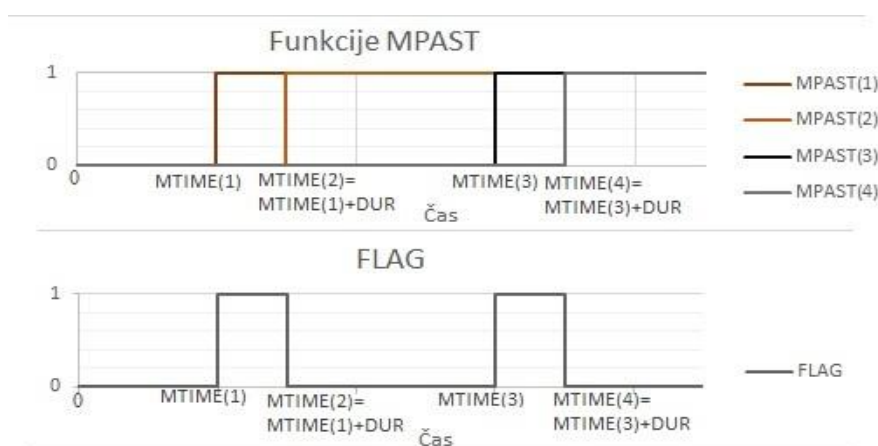
$$CV(\%) = \sqrt{e^{\omega^2} - 1} * 100\% \quad (\text{Enačba 22})$$

Enterohepatično kroženje opisujemo z izločanjem metabolita v žolč (prostor 7), od koder delež metabolita ($FRAC$) preide v GIT (prostora 1 in 2), se vzpostavi ravnotežje (enačba

30), in se ponovno absorbira. Vrednost K_{BILE} smo postavili na 20 h^{-1} , ker je izločanje žolča hipno (20, 21).

3.4.1 Matematična opredelitev enterohepatične cirkulacije:

Izhod iz prostora 7 (žolč) v zapisu NM-TRAN opredeljuje vrednost FLAG, ki je definirana preko funkcije MPAST. Ta zavzema vrednost 0 do časa dogodka MTIME. Takrat zavzame vrednost 1 in se vzpostavi povezava iz prostora 7 v prostor 1 oz. 2 (izločanje žolča v prebavni trakt). Trajanje prehoda je omejeno z zakasnitvijo DUR. Ker smo v koncentracijskih profilih opazili dva sekundarna vrhova smo ocenjevali dva časa prehodov, MTIME(1) in MTIME(3), (parametra E_{h1} in E_{h2}), ki predstavljata časovni zamik med časom aplikacije in začetkom dveh enterohepatičnih ciklov. V modelu smo uporabili funkcije, MTIME(n), MPAST(n) in FLAG, ki so opredeljene z enačbami 23 - 29. Shematično so prikazane na sliki 7. Za časovni opis enterohepatičnega kroženja smo tako uporabili dva parametra (Θ_i in Θ_{i+1}).



Slika 7: Prikaz časovnega poteka MPAST in FLAG

$$\text{MTIME}(1) = \Theta_i \quad (\text{Enačba 23})$$

$$\text{MTIME}(2) = \text{MTIME}(1) + \text{DUR} \quad (\text{Enačba 24})$$

$$\text{MTIME}(3) = \Theta_{i+1} \quad (\text{Enačba 25})$$

$$\text{MTIME}(4) = \text{MTIME}(3) + \text{DUR} \quad (\text{Enačba 26})$$

$$\text{FLAG} = \text{FLAG1} + \text{FLAG2} \quad (\text{Enačba 27})$$

$$\text{FLAG1} = \text{MPAST}(1) - \text{MPAST}(2) \quad (\text{Enačba 28})$$

$$\text{FLAG2} = \text{MPAST}(3) - \text{MPAST}(4) \quad (\text{Enačba 29})$$

MTIME(n): čas dogodka v modelu, ki ga opredelimo kot prehod iz prostora 7 v prostor GIT

MPAST(n): funkcija, ki ima v času pred MTIME(n) vrednosti 0, po MTIME(n) pa vrednost 1 (40).

FLAG: zavzema vrednost 1 za obdobje med MTIME(1) in MTIME(2), ter MTIME(3) in MTIME(4) drugače je vrednost 0.

DUR: trajanje prehoda iz žolča v GIT (0,1 h)

3.4.1.1 Opredelitev razmerja med koncentracijo metabolita in silibina v GIT

Kroženje znotraj črevesja opisuje razmerje K_{GIT} , ki je ravnotežno razmerje med silibinom in metabolitom v GIT. Prepostavljamo hipno vzpostavitev ravnotežja po peroralni aplikaciji ter med enteropatičnim ciklom. Vstop v prostor 1 oz. 2 je prirejen z F1 oz. F2 (enačbi 31 in 32), ki je v zvezi z razmerjem med koncentracijo metabolita in prostega silibina v GIT (enačba 30).

$$K_{GIT} = Git_M / Git_P \quad (\text{Enačba 30})$$

$$F1 = 1 / (1 + K_{GIT}) \quad (\text{Enačba 31})$$

$$F2 = K_{GIT} / (1 + K_{GIT}) \quad (\text{Enačba 32})$$

Model M_1 -Opredelitev razmerja K_{GIT}

Pri modelu M_1 smo za opredeljevanje ravnotežja silibina in metabolita ocenjevali dva parametra stalnih učinkov, K_{GIT} in K_{GIT1} . Parameter K_{GIT} ocenjuje ravnotežno razmerje v času takoj po zaužitju pred absorpcijo. Povezan je s parametroma F1 in F2, ki opredeljujeta deleža absorpcije prostega silibina in metabolita. V času izločanja žolča in ponovne absorpcije razmerje opredeljuje K_{GIT1} , ki ga definiramo v diferencialni enačbi za izhod iz prostora 7 v GIT.

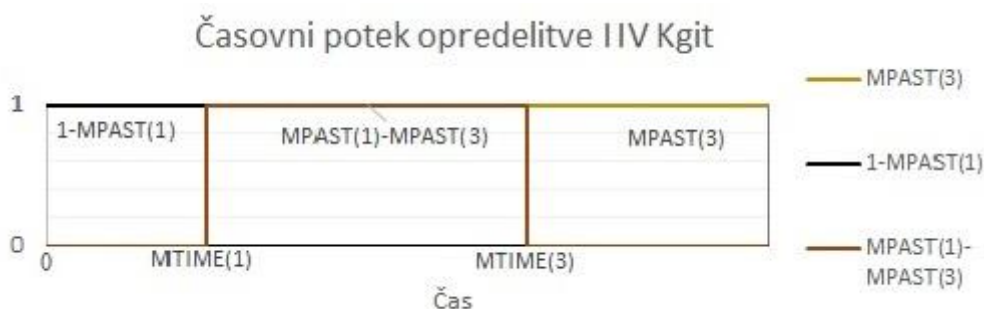
Model M_2 –Opredelitev IIV posameznih EHC

Zaradi intraindividualne variabilnosti se razmerje silibina in metabolita v gastrointestinalnem traktu med enterohepatičnima cikloma lahko razlikuje. Zato smo predpostavili v modelu M_2 le en parameter in ga v \$PK\$ bloku ukazov opredelili z enačbama 33 in 34.

$$K_{GIT1} = \theta(2) * e^{\eta(2)} \quad (\text{Enačba 33})$$

$$K_{GIT} = K_{GIT1} * [(1 - MPAST(1)) * e^{\eta(8)} + ((MPAST(1) - MPAST(3)) * e^{\eta(9)} + MPAST(3) * e^{\eta(10)})] \quad (\text{Enačba 34})$$

Pri ocenjevanju smo uporabili ukaz SAME, ki v posameznem enterohepatičnem ciklu vzorči η iz distribucije z isto standardno deviacijo. Obdobja ocenjevanja IIV za K_{GIT} smo razdelili z MPAST funkcijami (slika 8).



Slika 8: Časovni potek opredelitve IIV K_{GIT} s funkcijo MPAST

V ukaznem bloku \$ERROR smo za ocenjevanje rezidualne intraindividualne variabilnosti modela uporabili kombinirani način opredelitve napake (enačba 35).

$$Y = IPRED + PF * WPAR * EPS(1) + MF * WMET * EPS(2) \quad (\text{Enačba 35})$$

Da smo lahko pridobili vrednost IWRES, smo aditivno in proporcionalno napako opisali s stalnimi učinki, in EPS(1), EPS(2) v bloku \$SIGMA nastavili na 1,0.

$$WPAR = \sqrt{(W\alpha_p^2 + ((Wp_p * IPRED)^2)} \quad (\text{Enačba 36})$$

$$WMET = \sqrt{(W\alpha_m^2 + ((Wp_m * IPRED)^2)} \quad (\text{Enačba 37})$$

Ker ocene aditivne napake nismo pridobili, je končna oblika rezidualne napake izražena v proporcionalni obliki:

$$WPAR = Wp_p * IPRED \quad (\text{Enačba 38})$$

$$WMET = Wp_m * IPRED \quad (\text{Enačba 39})$$

Za izračun utežnih individualnih rezidualov smo uporabili:

$$IRES = IPRED - DV \quad (\text{Enačba 40})$$

$$IWRES = IRES / (WPAR * PF + WMET * MF), \text{ IF}(CMT.LT.3) IWRES = 0 \quad (\text{Enačba 41})$$

Izhodiščne vrednosti za ocenjevanje parametrov modela smo privzeli iz predhodne raziskave (37), prikazujemo jih v tabeli 3. Določene vrednosti parametrov smo postavili stalne tekom ocenjevanja modela z ukazom FIX.

Tabela 3: Začetne vrednosti parametrov farmakokinetike

K _a [h ⁻¹]	2	Eh ₁ [h]	2,30
K _{GIT} [h ⁻¹]	1	Eh ₂ [h]	3,94
Clint _P [l/h]	52,7	W _{ap}	-
Clint _M [l/h]	52,7	W _{pp}	0,619
V _P [l]	18	W _{am}	-
V _M [l]	18	W _{pm}	1,16
FRAC	0,8		

Vrednosti IIV opredeljuje blok ukazov \$OMEGA, kjer smo z ukazom BLOCK(i) za vsako η_i omejili izračun kovariance na diagonalo matrike, da poda le ocene η_i , brez ocenjevanja kovariance med njimi.

V \$ESTIMATION bloku smo za ocenjevanje uporabili ;

SIG=3; število značilnih mest

MAX= 9999 maksimalno število iteracij (ovrednotenj funkcije) preden NONMEM terminira

PRINT=5 pogostost izpisa povzetka iteracij

METHOD= 1 INTER: ker je uporabljena metoda FOCE z interakcijo;

POSTHOC: pridobi individualne ocene parametrov.

V \$COVARIANCE bloku smo z ukazom PRINT=E, MATRIX=S pridobili izračun kovariance po metodi izračuna z gradientom.

3.5 Vrednotenje modela

Kot glavne načine opredeljevanja uspešnosti modela smo za vrednotenje upoštevali uspešnost minimizacije, OFV vrednost, gradient parametrov, uspešnost izračuna kovariance, krčenje in vrednosti standardne napake ocen. Kot dodatne metode smo izvedli bootstrap, občutljivostno analizo in VPC.

3.5.1 Vrednotenje NONMEM izhodnega poročila

- ***Uspešnost minimizacije***

Če model kinetike ni minimiziral in niso bile podane ocene parametrov, ga pri nadaljnjem razvoju nismo upoštevali.

- ***OFV – vrednost objektivne funkcije***

Strmimo k najnižji vrednosti OFV in pri razvoju modela upoštevamo statistično značilno razliko $\Delta\text{OFV} > 3,84$ za en dodatni parameter pri tveganju 0,05.

- ***Gradient parametrov***

Pri postopku optimizacije se poda vektor gradienta parametrov, ki je parcialni odvod objektivne funkcije za določen parameter pri optimizaciji. Zahteva je, da gradient parametrov ni enak nič, in se giblje v območju $10^2 - 10^{-3}$ v zadnji iteraciji.

- ***Krčenje (Shrinkage)***

Vrednost krčenja znaša v mejah 0 do 1. Podamo ga za vrednosti η in ε po naslednjih enačbah:

$$\eta - \text{shrinkage} = 1 - \frac{SD(\eta)}{\sqrt{\omega^2}} \quad (\text{Enačba 42})$$

$$\varepsilon - \text{shrinkage} = 1 - SD(IWRES); IWRES = (DV - IPRED) / \sigma \quad (\text{Enačba 43})$$

Krčenje je posledica manj obširnih podatkov, pogosto zaradi skopega vzorčenja. Kadar so podatki manj informativni se vrednost krčenja bliža 1, Bayesove ocene se bližajo populacijski vrednosti. V nasprotju se pri obširnejših podatkih ocena parametra bliža pravi

vrednosti pri posamezniku, krčenje je takrat 0, model je ustrežnejši. Podobno je s krčenjem ϵ . Individualni rezidual se približuje 0, zato IWRES pada proti 0 in krčenje ϵ proti 1. Ko je krčenje večje od 20-30% so ocene neprimerne. (27, 41)

- **Število veljavnih mest**

Določili smo, da so rezultati podani na število veljavnih mest, ki mora biti vsaj 3 pri zadnji iteraciji.

- **Uspešnost izračuna kovariance**

Podajo se vrednosti v kovarančni matriki.

3.5.2 Metoda bootstrap

Napravili smo dve izvedbi metode bootstrap pri končnem modelu silibina A. V drugi za razliko od prve so upoštevani vsi neuspešni zagoni ocenjevanja kot tudi ocenjevanja kjer so ocene v mejah. Podali smo vrednosti pristranosti, RSE in neparametričnega 95 % intervala zaupanja, kjer podamo 2,50-ti centil in 97,50-ti centil vseh vrednosti. Rezultate metode bootstrap dobimo z naslednjimi enačbami, kjer je $f(x)$ ocena parametra iz prvotnega vzroca, $f(x_i^*)$ ocena parametra iz i -te ponovitve vzorčenja, B pa število ponovitev vzorčenja (27):

$$\text{Povprečje}(\bar{X}) = \frac{\sum_{i=1}^B f(x_i^*)}{B} \quad (\text{Enačba 44})$$

$$\text{Bias (pristranost)} = f(x) - \frac{\sum_{i=1}^B f(x_i^*)}{B} \quad (\text{Enačba 45})$$

$$\text{Standardna napaka (SE)} = \sqrt{\text{varianca}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^B \left[f(x_i^*) - \frac{\sum_{i=1}^B f(x_i^*)}{B} \right]^2}{B-1}} \quad (\text{Enačba 46})$$

$$\text{Relativna standardna napaka (RSE)} = \frac{SE}{\bar{X}} \quad (\text{Enačba 47})$$

3.5.3 Občutljivostna analiza

Končni model smo vrednotili s postopkom občutljivostne analize, kjer smo vrednosti, ki so stalne v celotnem sistemu, znižali za 50% in povišali za 100% in ponovno izvedli ocenjevanje posamezno ob spremenjeni vrednosti. Vrednosti so zapisane v tabeli 4. Za začetne vrednosti smo vzeli vrednosti končnega modela. S tem smo želeli preveriti stabilnost ocen parametrov modela.

Tabela 4: Spremembe vrednosti parametrov v občutljivostni analizi

	Qh [l/h]	Vh [l]	f _{UP} [%]	f _{UM} [%]
Začetna vrednost	44	1	10	30
Spodnja (-50%)	22	0,5	5	15
Zgornja (+100%)	88	2	20	60

3.5.4 Diagnostični diagrami

Obrazložitev uspešnosti modela podamo s prikazom diagramov ujemanja med izmerjenimi koncentracijami in z modelom napovedanimi koncentracijami. Pripravili smo jih s programskim paketom Xpose v statističnem okolju R:

- *Individualni diagrami prileganja populacijske (PRED) in individualne (IPRED) napovedi modela na podatke.*

Zahteva je, da se vrednosti individualnih napovedi odmikajo od populacijske, ki se čimbolj prilega meritvam.

- *PRED(DV)-populacijska napoved vrednosti koncentracij v odvisnosti od meritev koncentracij*

Sistemske odklone PRED(DV) predpostavljajo neustreznost napovedi in zahtevajo nadaljnji razvoj modela. Stopnja razpršenosti okoli premice enakosti je odvisna od velikosti variabilnosti parametrov in rezidualov.

- *IPRED(DV)- individualna napoved koncentracij v odvisnosti od meritev*

Stopnja razpršenosti okoli premice v diagramu IPRED(DV) odraža rezidualno variabilnost modela. Nujno je, da so podatki posameznikov dovolj informativni za diagnostiko neustreznosti modela, saj je na skupih podatkih pogosto precenjevanje modela, (takrat je krčenje pogosto preveliko.)

Diagrama ocenjujeta ustreznost napovedi kot mero centralne tendence podatkov. Ugotavlja se pristranost napovedi modela. Oba diagrama zahtevata da so vrednosti enakomerno razpršene okoli vrednosti premice $x=y$, kjer je ujemanje napovedi popolno.

DIAGRAMI REZIDUALOV

Diagrami rezidualov so namenjeni za ocenjevanje ustreznosti modela, kjer z zaznavo systemske napake identificiramo strukturno neustrezen model. Izbran je CWRES zaradi uporabe metode FOCE-I.

- *CWRES(IDV)- pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od časa.*

Prisotna je gladka krivulja, ki ne sme kazati trenda, vrednosti CWRES se morajo sipati enakomerno glede na čas.

- *CWRES (PRED)- pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od populacijske napovedi*

Zahteva po gladki krivulji krivulje uteženih rezidualov glede na populacijsko napoved, ki ne sme kazati trenda, z enakomernim sipanjem vrednosti okoli abscise.

- *|IWRES| (IPRED) – absolutna vrednost individualnega uteženega reziduala v odvisnosti od individualne napovedi*

Diagram prepoznava možne nepravilnosti v modelu reziduala, krivulja naj bo gladka, in horizontalna, če predpostavka o konstantnosti variance ni zavrnjena. Krivulja ne sme kazati trenda, vrednosti $|IWRES|$ morajo biti stalne glede na individualno napoved.

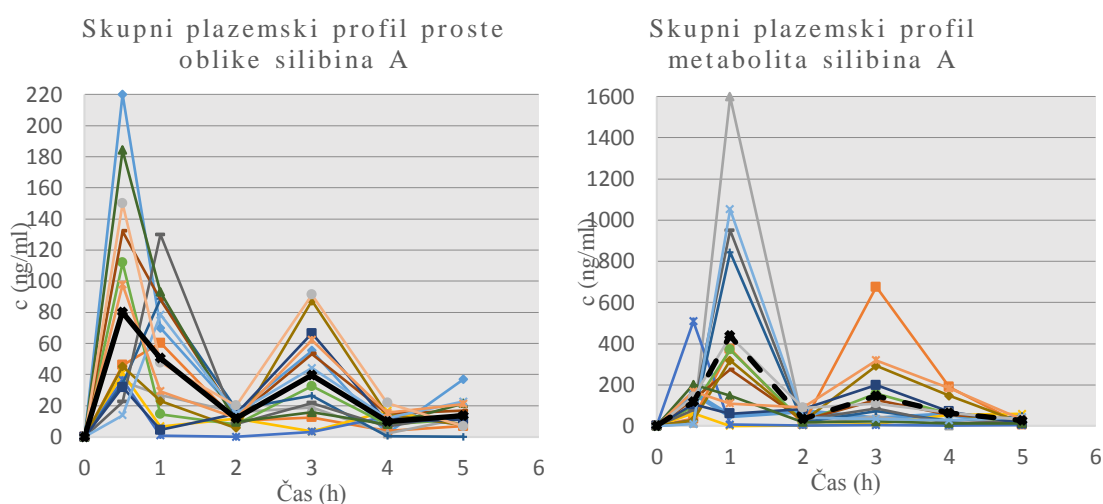
3.5.5 VPC (grafično vrednotenje napovedi)

Je metoda vrednotenja pravilnosti modela, ki prikaže ujemanje simuliranih vrednosti ocenjevanega modela s prvotnimi podatki. Za preučevani model se izvede n-simulacij in z njimi pridobi n-naborov podatkov. Pridobi se grafični prikaz ujemanja simuliranih vrednosti modela in merjenih podatkov v centralnem trendu in variabilnosti. Centile simuliranih podatkov primerjamo s pripadajočimi centili opazovanih podatkov. Lahko se izračunajo za posamezno vrednost neodvisne spremenljivke (v našem primeru je to čas) ali pa se razdelijo v skupine glede na vrednost neodvisne spremenljivke. Vrednosti simulacije se morajo kar najbolj ujemati z mediano in izbranim IZ meritev. V našem primeru smo izvedli 1000 simulacij, prikazali smo mediano in 5-ti ter 95-ti centil s pripadajočim 95% IZ. Vrednosti simulacije primerjamo z mediano in 5-ti ter 95-tim centilom meritev. VPC smo izvedli s Perl-speaks-NONMEM in izrisali s programskim paketom Xpose4 v statističnem okolju R (36).

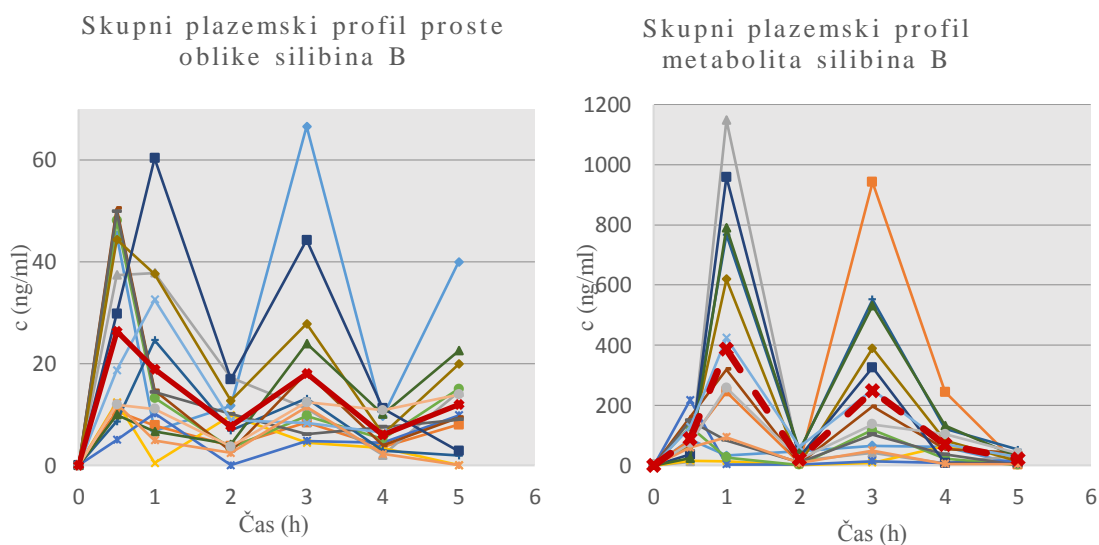
4 REZULTATI

5 PODATKI PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ PREIZKUŠANCEV

Podali smo diagrame koncentracije silibina in metabolita v odvisnosti od časa za posamezen izomer. Upoštevali smo vse meritve, ker zaradi majhnega števila ni smiselno izločanje osamelcev. Na slikah 9 in 10 so prikazane vrednosti vsakega posameznika (polna črta) in skupno povprečje koncentracij (odebeljeni polna in deljena črta)

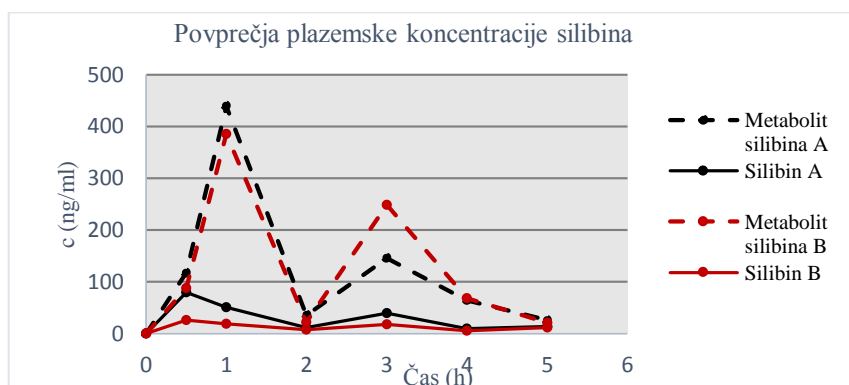


Slika 9: Prikaz plazemskih koncentracij silibina A



Slika 10: Prikaz plazemskih koncentracij silibina B

Na sliki 11 pa so prikazana povprečja plazemskih koncentracij proste oblike (polna črta) in metabolita (deljena črta) za silibin A (črna črta) in silibin B (rdeča črta).



Slika 11: Povprečni plazemski profil silibina A in silibina B

V tabeli 5 je primerjava izračuna navideznih očistkov AUC silibina in metabolita v časovnem obdobju do 5 h.

Tabela 5: Vrednosti AUC v času od 0 do 5 h po izračunu s trapezno metodo

silibin A		Navidezni očistek	silibin B		Navidezni očistek
D[mg]	AUC _{A(0-5H)} [mg*h/l]	D/ AUC _{A(0-5H)} [l/h]	D [mg]	AUC _{B(0-5H)} [mg*h/l]	D/AUC _{B(0-5H)} [l/h]
67,2			44,8		
Prosti	1,46E-04	4,60E+05	Prosti	6,49E-05	6,91E+05
Konjugirani	6,48E-04	1,04E+05	Konjugirani	6,83E-04	6,56E+04
Skupni	7,94E-04	8,47E+04	Skupni	7,47E-04	5,99E+04
Primerjava navideznih očistkov med izomeroma: (D/AUC _{A(0-5H)A})/ (D/AUC _{B(0-5H)})					
Prosti	0,665				
Konjugirani	1,58				
Skupni	1,41				

5.1 Opredelitev korelacije proste učinkovine z njenim glukuronidom

Vrednosti korelacijskih koeficientov v tabeli 6 potrjujejo močnejšo ($r > 0,7$), šibkejšo ($0,3 < r < 0,7$) linearno povezavo vrednosti plazemskih koncentracij proste oblike in metabolita posameznega izomera silibina pri preizkušancu, ali pa ta ne obstaja ($0 < r < 0,3$). Značilnost korelacije podajamo s p-vrednostjo.

Tabela 6: Korelacijski koeficienti prostega silibina in metabolita pri posameznih preizkušancih in t test posameznih pearsonovih korelacijskih koeficientov.

	Silibin A		Silibin B	
pacient	R[-1, 1]	p-vrednost	R [-1,1]	p-vrednost
1	0,831	0,040*	0,238	0,650
2	0,108	0,838	0,187	0,723
3	0,343	0,506	0,595	0,213
4	0,594	0,214	-0,359	0,484
5	0,935	0,006*	-0,066	0,901
6	-0,010	0,985	0,653	0,159
7	0,910	0,012*	0,915	0,010*
8	0,684	0,134	0,392	0,442
9	0,997	0,000*	0,714	0,111
10	0,518	0,292	0,478	0,337
11	0,920	0,009*	0,885	0,019*
12	0,974	0,001*	0,025	0,963
13	0,894	0,016*	0,766	0,076
14	0,496	0,317	0,598	0,209
15	0,155	0,769	0,307	0,554

*Značilna korelacija ($p < 0,05$) je označena s krepkim tekstom.

5.2 Populacijski model

Populacijski semifiziološki model enterohepatične cirkulacije, smo zasnovali na fizioloških predpostavkah in vrednostih farmakokinetičnih parametrov pridobljenih iz predhodnih študij. Predstavljamo dva modela opredelitve EHC. Predpostavili smo, da med prostori poteka kinetika prvega reda.

5.2.1 Osnovni model M_1

Model smo ocenili na podatkih silibina A, ki predpostavlja en cikel. Po korakih smo v ocenjevanje dodajali vrednosti IIV parametrov podane v tabeli, vsak korak je bil uspešen in ΔOFV je bila značilna. Na koncu smo pridobili ocene IIV K_a , K_{GIT} in Cl_{intM} . Vrednosti teh parametrov so podane v tabeli 7:

Tabela 7: Vrednosti parametrov silibina A pri razvoju modela M₁

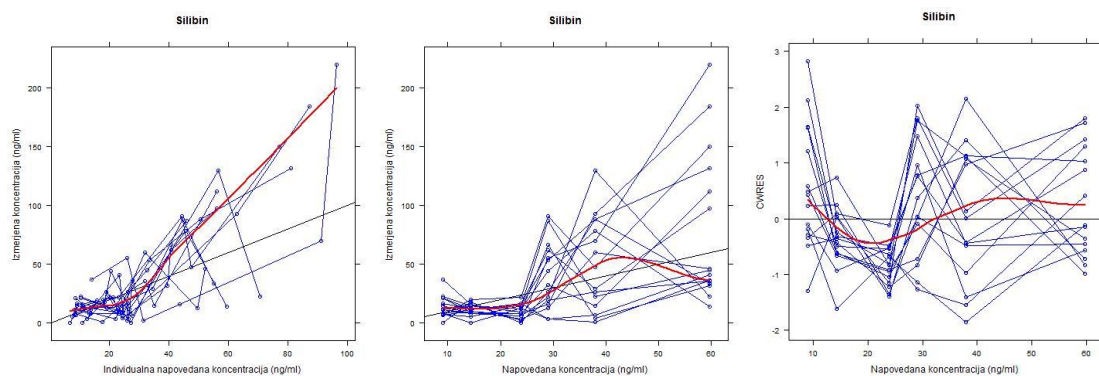
Model M ₁				Končni model	
Korak	1	2 ΔOFV=-19,3	3 ΔOFV=-19,8	4 ΔOFV=-20,0	SE
K _a [h ⁻¹]	4,64	5,34	5,67	7,98	17,0
K _{GIT}	2,05	2,65	3,18	3,37	55,3
K _{GIT1}	0,451	0,917	1,17	1,02	23,8
Clint _p [L/h]	787	636	606	577	7255
Clint _M [L/h]	1155	1415	1428	1389	2277
V _P [L]	33,0	34,7	42,6	35,8	121
V _M [L]	16,6	21,1	23,8	20,7	18,7
FRAC	0,390	0,385	0,365	0,333	0,0997
Eh ₁ [h]	2,79	2,78	2,69	2,86	0,122
Intraindividualna variabilnost					
W _{pp}	0,787	0,790	0,720	0,691	0,230
W _{pM}	1,09	0,951	0,949	0,903	1,71
Interindividualna variabilnost					
η _{Cl_M} [CV (%)]				145	
η _{FRAC} [CV (%)]			69,5	68,9	
η _{K_{GIT}} [CV (%)]		44,4	45,8	44,2	

Vrednosti parametrov se med posameznim korakom spreminjajo, najstabilnejše so ocene FRAC in Eh₁. Proporcionalni napaki modela se znižata. Vrednosti SE ki nam jih poda NONMEM, so velike za vse parametre, razen FRAC in Eh₁. Krčenje parametrov je prikazano v tabeli 8.

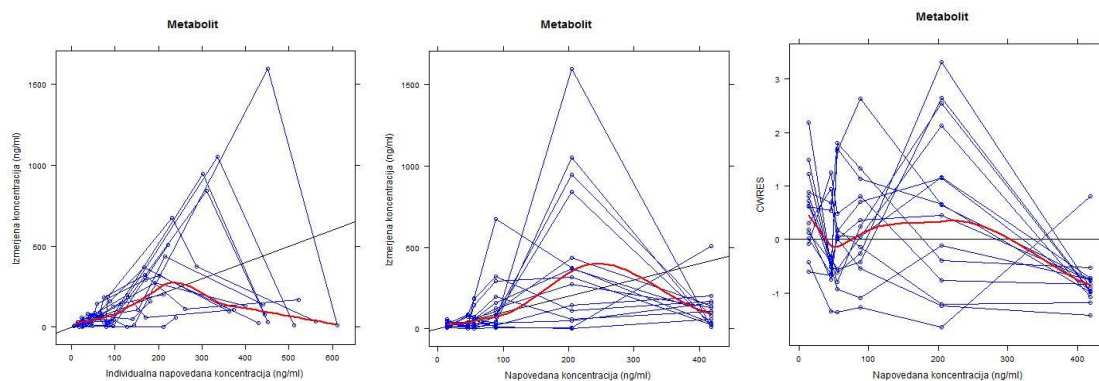
Tabela 8: Vrednost krčenja posamezne IIV

Krčenje (%)	
η _{Cl_M} [CV (%)]	16,2
η _{FRAC} [CV (%)]	11,8
η _{K_{GIT}} [CV (%)]	6,73

Ujemanje meritev z individualnimi, kot tudi populacijskimi napovedmi ni idealno, saj se na slikah 12 in 13 glajena krivulja LOESS odmika od premice enakosti (x=y). Uteženi reziduali se neenakomerno porazdeljujejo okoli 0. Viden je naklon glajene krivulje (LOESS), ki ni stalen, predvsem pri diagramih metabolita. Ta model nismo izbrali za naš končni model.



Slika 12: Diagrami individualne napovedi (levo), populacijske napovedi (sredina) v odvisnosti od meritev in uteženih rezidualov v odvisnosti od napovedi za silibin.



Slika 13: Diagrami individualne napovedi (levo), populacijske napovedi (sredina) v odvisnosti od meritev in uteženih rezidualov v odvisnosti od napovedi za metabolit.

5.2.2 Osnovni model M_2

Po več korakih in uspešni minimizaciji smo pridobili model s primerno ocenjenimi parametri in časi pojava enterohepatične cirkulacije silibina A in silibina B. Za oba modela smo izvedli vrednotenje z metodo bootstrap, diagnostičnimi diagrami in VPC.

5.2.2.1 SILIBIN A

Minimizacija modela M_{2A} za silibin A na začetnih podatkih večkrat ni bila uspešna, vrednosti parametrov V_P in V_M so bile nefiziološke, SE je bila prevelika, gradienti so bili nični tudi ko smo postavili kot stalno vrednost FRAC na 50 %, ali po spremembah začetnih vrednosti določenih parametrov. Težava je v prekomerni parametrizaciji modela, zato smo omejili vrednosti aditivne napake na 0, kot začetne vrednosti časov E_{h1} in E_{h2} privzeli oceni

teh iz osnovnega modela M_2 silibina B, jih določili na stalno vrednost z ukazom FIX ter ponovno pričeli z ocenjevanjem iz nabora začetnih vrednosti. V tabeli 9 je prikazan razvoj po korakih, kjer smo končne vrednosti uspešnega modela privzeli kot začetne v naslednjem koraku. Za vsak korak smo upoštevali, da je bila uspešna minimizacija, izračun kovariance, gradienti parametrov niso bili nični in vrednost značilnih mest je bila nad 3.

Tabela 9: Primerjava vrednosti pri postopnem razvoju modela silibina A, vrednosti E_{h1} in E_{h2} sta določeni. Podane so končne vrednosti modela, in so upoštevane kot začetne v naslednjem modelu.

Model M_2 A				Končni model
Korak	1	2	3	4
K_a [h^{-1}]	2,17	1,83	1,81	1,46
K_{GIT}	2,45	2,31	2,21	1,07
$Clint_p$ [l/h]	730	767	784	984
$Clint_M$ [L/h]	783	1047	1074	1614
V_P [l]	14,6	12,1	11,9	2,10
V_M [l]	1,63	1,37	1,60	9,56
FRAC	0,264	0,278	0,273	0,393
E_{h1} fiksna [h]	2,30	2,30	2,300	2,56
E_{h2} fiksna [h]	3,91	3,91	3,910	4,91
Intraindividualna variabilnost				
W_{aP} Stalna	0	-	-	-
W_{pP}	0,629	0,624	0,608	0,578
W_{aM} Stalna	0	-	-	-
W_{pM}	1,084	0,915	0,905	0,937
Interindividualna variabilnost				
η_{ChM} [CV (%)]		53,8	54,3	50,7
η_{FRAC} [CV (%)]			25,2	24,1
ωK_{GIT} [CV (%)]	43,8	47,6	44,9	86,3

V koraku 1 smo dodali v ocenjevanje ωK_{GIT} . Vrednost OFV po prvem koraku je 1643,93. V koraku 2 dodamo oceno vrednost η_{ChM} , OFV vrednost se zmanjša za 25,5 enote. V koraku 3 dodamo v ocenjevanje η_{FRAC} , OFV se zmanjša za 3,4. Vrednosti preostalih parametrov, ki se značilneje spremenijo v prvih 3 korakih so K_a , ki upade za $0,38 h^{-1}$, $Clint_M$ naraste za 291 l/h, vrednosti proporcionalne napake za silibin in metabolit se znižata ($\Delta W_{pp} = -1,1\%$, $\Delta W_{pm} = -25,5\%$).

V zadnjem koraku smo vrednosti E_{h1} in E_{h2} sprostili v ocenjevanje, ΔOFV znaša -105,3. Parametri FRAC, E_{h1} in E_{h2} se spremenijo in njihove vrednosti SE v izračunu kovariance po NONMEM so manjše (tabela 10)

Tabela 10: Vrednosti 95% IZ po določitvi SE v NONMEM

parameter	95% IZ
FRAC	(0,076-0,701)
E_{h1} [h]	(1,42-3,70)
E_{h2} [h]	(4,80-5,02)

Končna vrednost parametrov intrinzičnih očiščkov ter volumnov porazdelitve se močno razlikuje od predvidenih začetnih vrednosti. Proporcionalni napaki se znižata, a ostajata visoki, za silibin 57,8% in metabolit 93,7%. To je bil naš končni model.

METODA BOOTSTRAP

Statistike bootstrap ocen uspešnih minimizacij so podane v tabeli 11. Od 1000 upoštevamo le 284 povsem uspešnih zagonov. Ostale smo izločili zaradi neuspešne minimizacije in ocen v mejah. To lahko vpliva na zanesljivost ocene 95% neparametričnega IZ metode bootstrap. Parametri FRAC, E_{h1} in E_{h2} so se izkazali za stabilne, pristranost in RSE teh ocen je najnižja, intervali zaupanja so ozki (označene s krepkim tiskom). RSE je nizka tudi pri parametrih K_a , Cl_{intM} in V_M , a jih moramo povzeti s previdnostjo. Ocena uteženih proporcionalnih napak modela za silibin in metabolit je stabilna saj je RSE napak 10,4% oz. 10,9 %, a sta vrednosti W_{pp} in W_{pm} 58,2% oz. 92,6%.

Ocene IIV smo pridobili le za tri parametre, $\eta_{Cl_{intM}}$, η_{FRAC} in medciklično variabilnost $\eta_{K_{GIT}}$. Ostale nismo ocenili, saj po vključitvi dodatnih η_i v ocenjevanje minimizacija ni uspela.

Tabela 11: Primerjava ocenjevanja in bootstrap analize s pripadajočimi statistikami za parametre silibina A

M ₂ A Ofv=1513,21		Bootstrap * uspešni=284			95% neparametrični IZ
	Ocena	Povprečje	Pristranost	RSE*[%]	2,50% - 97,50%
K _a [h ⁻¹]	1,46	1,604	0,145	22,3	1,32 - 2,86
K _{GIT}	1,07	2,51	1,44	167,3	0,037 - 12,26
Clint _P [l/h]	984	902	-82,6	47,1	171 - 1655
Clint _M [l/h]	1614	1699	85,0	15,6	1249 - 2293
V _P [l]	2,10	3,72	1,62	114,7	0,11 - 16,60
V _M [l]	9,56	10,6	1,07	26,3	5,43 - 15,88
FRAC []	0,393	0,433	0,041	34,3	0,221 - 0,810
Eh ₁ [h]	2,56	2,55	-0,015	7,25	2,08 - 2,83
Eh ₂ [h]	4,91	4,90	-0,011	1,44	4,82 - 4,97
Intraindividualna variabilnost					
W _{PP}	0,578	0,582	0,004	10,9	0,452 - 0,693
W _{PM}	0,937	0,926	-0,011	10,4	0,749 - 1,123
Intraindividualna variabilnost					
η _{Cl_M} [CV(%)]	50,7	49,8	-8,58		24,3 - 76,3
η _{FRAC} [CV(%)]	24,1	34,8	14,4		0,3 - 84,3
wK _{GIT} [CV(%)]	86,3	138,1	81,6		21,2 - 5901,3

Med vrednostmi krčenja (tabela 12) za ocenjevane IIV je ustrežnejša vrednost krčenja IIV η_{Cl_M}, dočim je krčenje η_{FRAC} preveliko, vrednost presega 20%. Krčenje rezidualov je primerno, manjše od 20%.

Tabela 12: Krčenje η, ε

Krčenje			
η _{Cl_M} [%]		6,88	ε1 [%] 6,13
η _{FRAC} [%]		46,99	ε2 [%] 2,88
ωK _{GIT} [%]	1. obdobje	15,60	
	2. obdobje	21,70	
	3. obdobje	46,84	

Zaradi majhnega števila uspešnih minimizacij bootstrap postopka, smo izvedli primerjavo bootstrap ocenjevanja, kjer se upošteva vseh 1000 ponovitev (tabela 13). Vrednosti Eh₁ in Eh₂ se ne spremenita, kot tudi Clint_M in V_M. Vrednost FRAC se poveča za 0,035 in tudi RSE FRAC za 11,7%. Bistveno različen je parameter Ka, (iz 1,60 h⁻¹ na 3,05h⁻¹), kar pripisujemo osamelcem iz ocenjevanja ponovljenega vzorčenja, ki vplivajo na spremenjeno povprečno

vrednost, saj je neparametrični 95 % IZ celo ožji. Neparametrični intervali zaupanja IIV so veliki, razen η_{ClM} .

Tabela 13: Primerjava rezultatov bootstrap analize za končni model silibina A na osnovi 284 uspešnih minimizacij in vseh 1000 minimizacij.

Model M ₂ A	Bootstrap (284 minimizacij)			95% neparametrični IZ	Bootstrap 1000			95% neparametrični IZ
	μ	BIAS	RSE [%]		μ	BIAS	RSE [%]	
				2,50 % - 97,50 %				2,50% -97,50%
K _a [h ⁻¹]	1,60	0,145	22,3	1,32 - 2,86	3,053	1,60	1504	1,32-2,28
K _{GIT}	2,51	1,44	167	0,037 - 12,26	5,44	4,37	371	0,01-38,8
Clint _P [L/h]	902	-82,6	47,1	171 - 1655	1038	53,5	58,3	55-2143
Clint _M [L/h]	1699	85,0	15,6	1249 - 2293	1686	72,2	17,2	1180-2318
V _P [l]	3,72	1,62	114	0,11 - 16,60	3,68	1,58	121	0,02-15,36
V _M [l]	10,6	1,07	26,3	5,43 - 15,88	11,18	1,62	28,2	5,85-17,84
FRAC []	0,433	0,041	34,3	0,221 - 0,810	0,478	0,086	46,0	0,199-0,994
Eh ₁ [h]	2,55	-0,02	7,25	2,08 - 2,83	2,49	-0,07	9,18	1,99-2,81
Eh ₂ [h]	4,90	-0,01	1,44	4,82 - 4,97	4,90	-0,02	2,06	4,73-4,98
Intraindividualna variabilnost								
W _{PP}	0,582	0,004	10,9	0,452 - 0,693	0,578	0,000	11,6	0,442-0,701
W _{PM}	0,926	-0,01	10,4	0,749 - 1,123	0,917	-0,02	11,1	0,727-1,123
Interindividualna variabilnost								
η_{ClM} [CV(%)]	49,8	-8.58		24,3 - 76,3	48,5	-13,4		22,9-47,5
η_{FRAC} [CV(%)]	34,8	24,4		0,3 - 84,3	35,3	25,1		0,238-64,7
wK _{GIT} [CV(%)]	138,1	81.6		21,2 - 5901,3	105,2	45,6		0,746-618,1

OBČUTLJIVOSTNA ANALIZA

Občutljivostna analiza (priloga D) ne poda značilne spremembe OFV, spremembe pretoka plazme jeter in volumna jeter pa vplivajo na očistke in volumne porazdelitve. Zmanjšanje jetrnega pretoka plazme za 50% zmanjša ocene volumnov porazdelitve V_P in V_M za 40% oz. 43,4%, povečanje pretoka za 100% (kar je enako jetrnemu pretoku krvi) pa poveča za 63,8% V_P oz. 58,9% V_M. Clint_P se poveča za 16,2% in zmanjša za 10,6%, med tem ko vpliv na Clint_M ni velik. Zmanjšanje V_H za 50% (povečanje za 100%) vpliva na parametre proste

oblike silibina, $Clint_P$ se zmanjša za 43,6% (poveča za 19,3%), V_P se zmanjša za 26,7% (poveča za 22,9%). Parameter K_{GIT} se pri spremembi pretoka zmanjša za 22,4% (poveča za 19,6%), pri spremembi volumna jeter pa zmanjša za 26,3% oz. poveča za 141% in ima najmanj stabilno oceno. Pri oceni IIV najbolj niha ωK_{GIT} . Ob spremembi deleža f_u so najmanj stabilne ocene intrizičnih očiščkov. Zato smo preverili spremembo vrednosti produkta $f_u * Clint$ pri občutljivostni analizi. Ta se ne razlikuje od vrednosti pri končnem modelu. Relativna napaka je manjša kot 1% (priloga E). Najbolj stabilne so ocene parametrov K_a , $Clint_M$, FRAC in časi EHC, vrednosti proporcionalne napake, ter IIV $Clint_M$ in FRAC, katerih spremembe so manjše od 5%.

Delež silibina A, ki se izogne ekstrakciji v jetrih in očišček

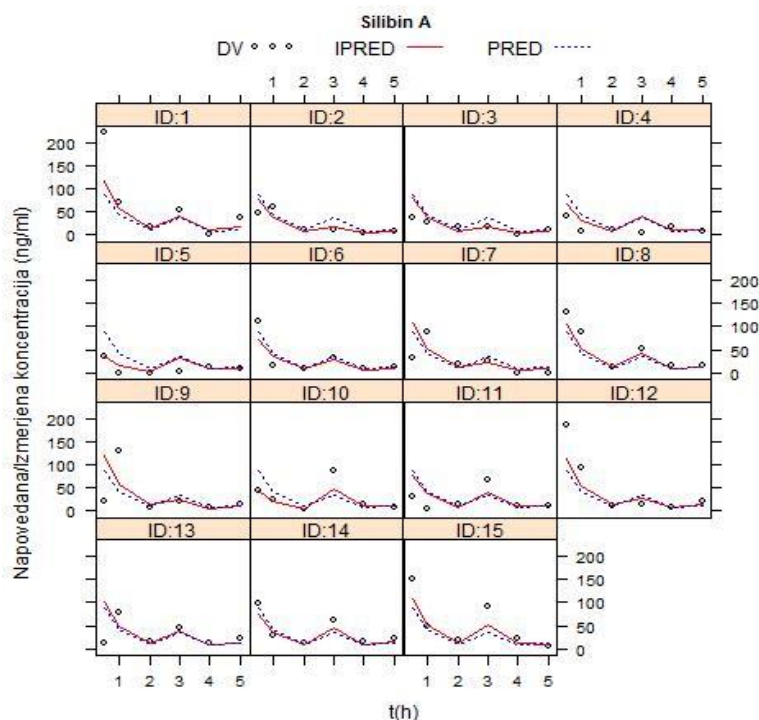
Iz rezultatov intrinzičnega očiščka smo izračunali deleže silibina, ki se izognejo hepatici ekstrakciji ter očiščka silibina in metabolita. Za prosto obliko silibina A je vrednost F_P enaka 0,140 za metabolit silibina A je enaka 0,206. Vrednosti očiščkov sta 37,8 l/h pri prosti obliki in 34,9 l/h za metabolit (priloga F). Za oceno obsega EHC F_o silibina A v tabeli 14 upoštevamo vrednost absorpcije (F_a) 20-50% iz literature (5) in ocenjeno FRAC.

Tabela 14: Obseg EHC silibina A

Silibin A	Delež (%)	RSE
F_a	20 - 50	-
FRAC	43,3	34,3
$F_o = F_a * FRAC$	8,7- 21,7	

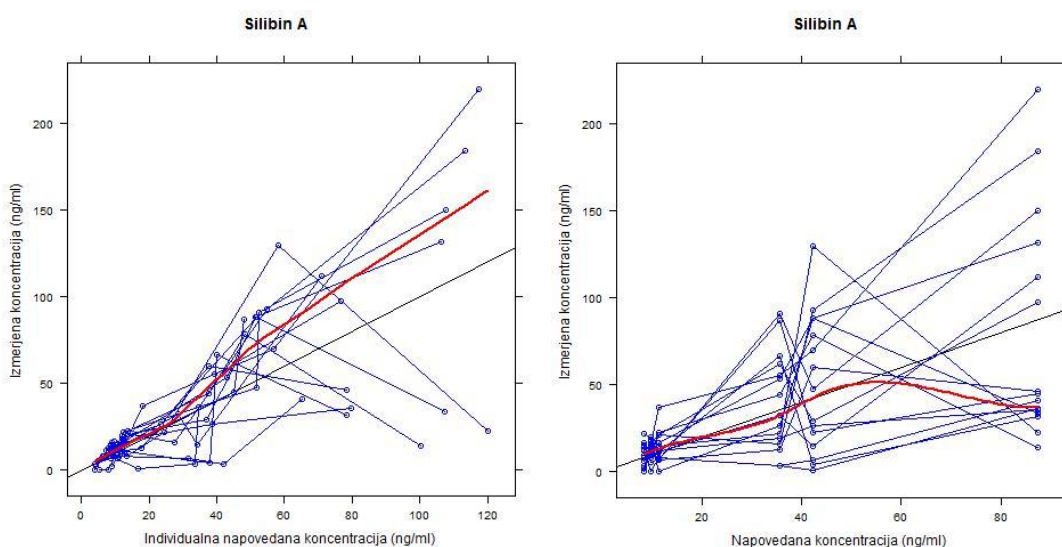
DIAGNOSTIČNI DIAGRAMI

Prileganje individualnih napovedi na sliki 14 (rdeča črta) ni primerno predvsem v časih 0,5 in 1,0 uro po odmerku pri večini posameznikov. Model se ustrezno prilega meritvam pri posameznikih (ID) 2, 3, 7, 10, 14. v času po drugi uri pa pri ID 2, 3, 7, 9, 13. Razlike populacijskih glede na individualne napovedi koncentracij so izraziteje ocenjene pri ID 2 in 10.



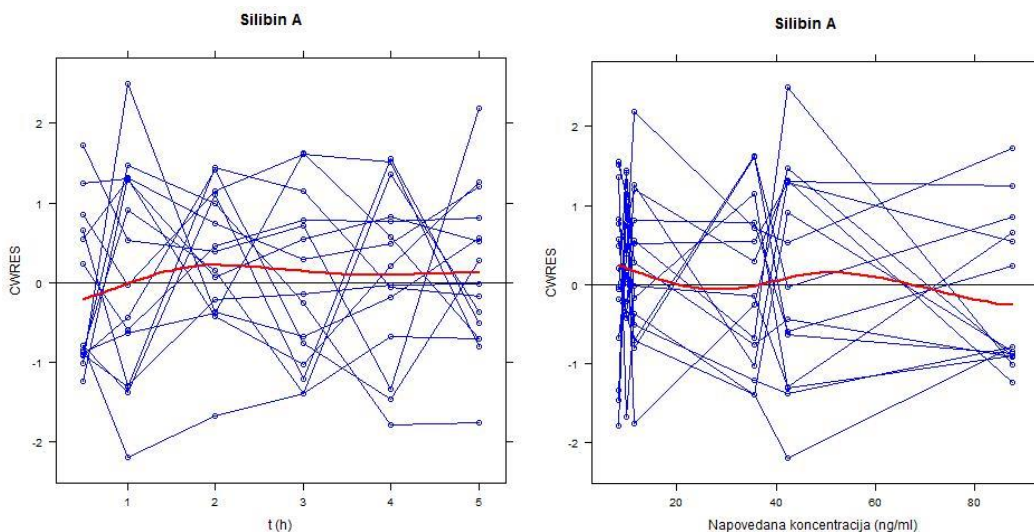
Slika 14: Individualni diagrami prileganja populacijske (PRED) in individualnih napovedi (IPRED) izmerjenim koncentracijam silibina A.

Glajena krivulja (LOESS) individualnih napovedi v odvisnosti od meritev (slika 15) ima trend, ki se odmika od premice enakosti $x=y$, pri nizkih vrednostih, kjer so vrednosti zgoščene. Krivulja populacijske napovedi in meritev odstopa pri visokih vrednosti, odklik nakazuje nepravilnosti v strukturi modela.



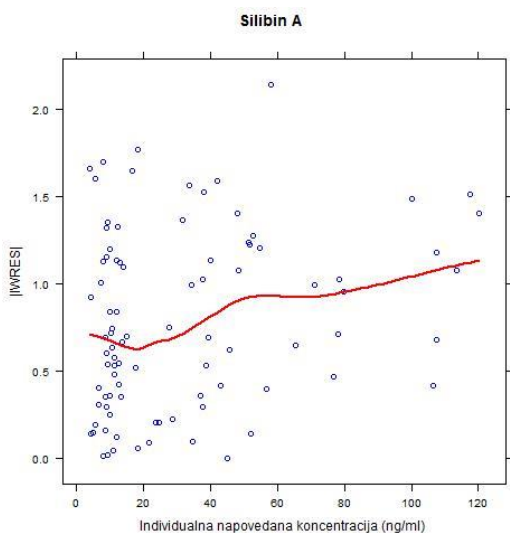
Slika 15: Individualne (levo) in populacijske (desno) napovedi v odvisnosti od meritev

V diagramu pogojnih uteženih rezidualov (CWRES) v odvisnosti od časa oz. napovedi na sliki 16 je sipanje CWRES okoli abscise enakomerno, le nekatere presegajo ± 2 , zgoščene so vrednosti rezidualov pri nižjih koncentracijah. Krivulja ima neenakomeren naklon.



Slika 16: Pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od časa (levo) in populacijske napovedi (desno)

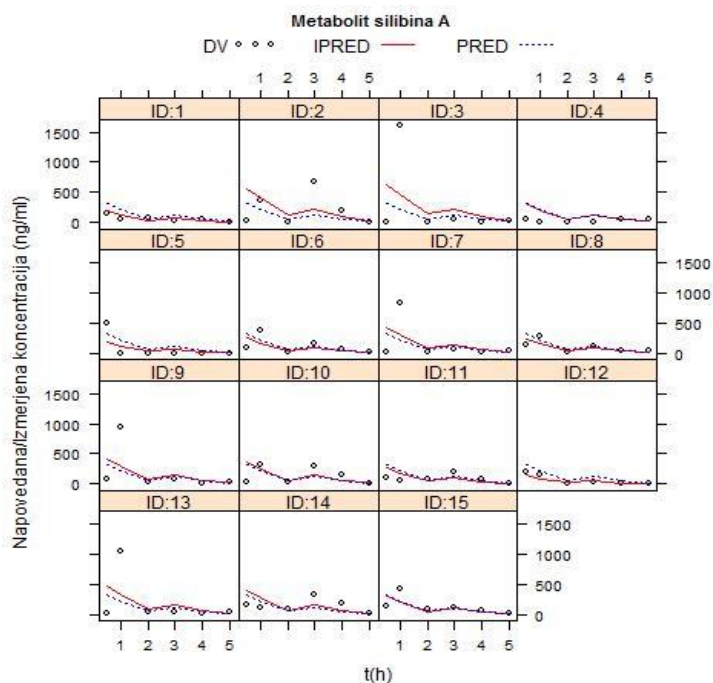
Krivulja slike 17 ima pozitiven trend, ki ni povsem enakomeren, reziduali so večji pri visokih vrednosti individualnih napovedi koncentracij.



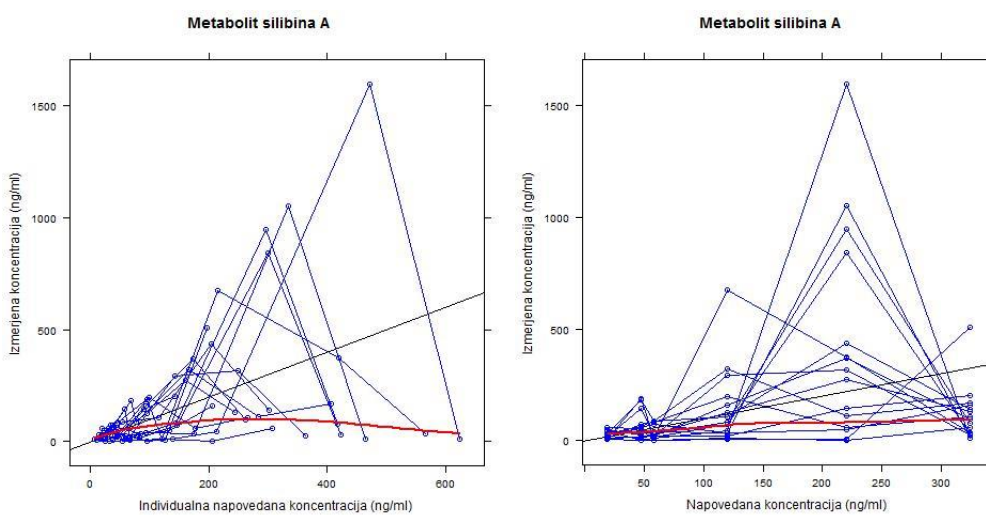
Slika 17: Absolutni individualni uteženi reziduali v odvisnosti od napovedi

Diagnostični diagrami za metabolit

Prileganje individualne napovedi modela na sliki 18 v času 0,5 in 1 ure ni ustrezno za vse posameznike. Najboljše se napovedi prilegajo pri ID 1, 5, 8, 12. Na sliki 19 sta diagrama napovedi v odvisnosti meritev. Prileganje modela za posameznika je manj uspešno kot tudi populacijska napoved, kjer je odklon krivulje LOESS močan.



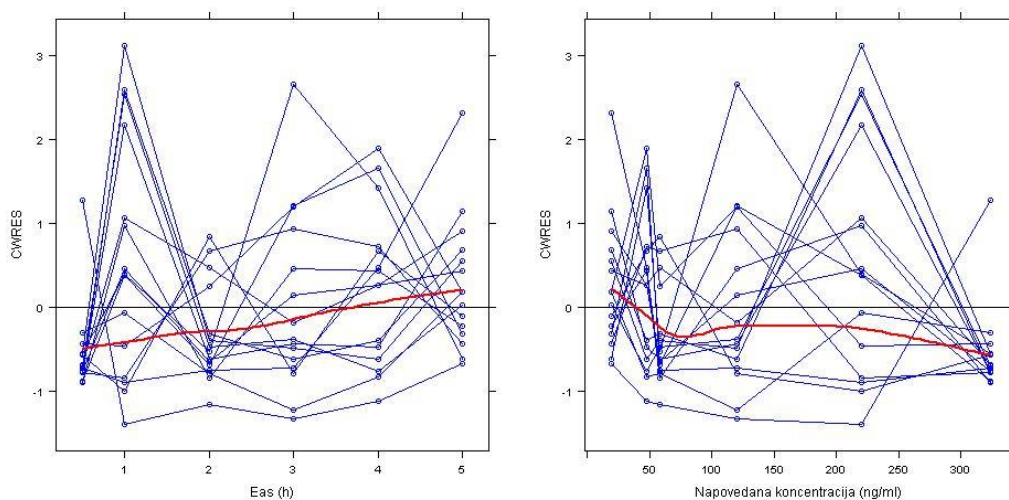
Slika 18: Individualni diagrami prileganja populacijske in individualnih napovedi na podatke metabolita silibina A



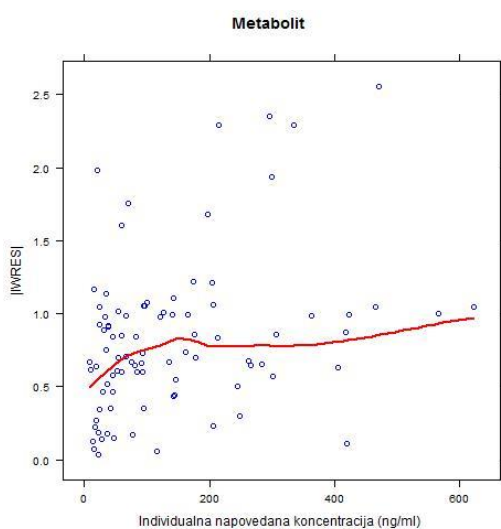
Slika 19: Individualne (levo) in populacijske (desno) napovedi v odvisnosti od meritev

Točke so zgoščene pri nizkih koncentracijah, vrednost krivulje se pri individualni napovedih močno odmika pri visokih vrednostih. Populacijska napoved se ne sklada z vrednostjo premice enakosti, odklon je velik.

Diagrama uteženih rezidualov slike 20 nakazujeta neenakomerno sipanje CWRES glede na čas (neodvisna spremenljivka modela) oz. napovedi modela, kjer več vrednosti presega ± 2 . Absolutne vrednosti IWRES (slika 21) so močnejše razpršene, krivulja ima naklon.



Slika 20: Pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od časa (levo) in populacijske napovedi(desno)



Slika 21: Absolutni individualni uteženi rezidual v odvisnosti od napovedi.

5.2.2.2 SILIBIN B:

Model M₂B smo uporabili na podatkih silibina B. V korakih prikazani v tabeli 14 smo pri uspešni minimizaciji in izračunu kovariance v ocenjevanje dodajali IIV posameznega parametra. V prvem kraku smo uvedli $\omega_{K_{GIT}}$, OFV znaša 1552,8, v drugem dodali η_{ClintM} , $\Delta OFV = -58,1$, v tretjem smo dodali η_{ClintP} in OFV upade na končno vrednost 1367,211. Tekom postopka vrednosti parametrov K_{GIT} , $ClintP$ in $ClintM$ največ nihajo. Oceni časov Eh_1 in Eh_2 ostajata stabilni, zato smo ju uporabili tudi pri modelu silibina A. Proporcionalna intraindividualna napaka se uspe zmanjšati za silibin $\Delta W_{PP} = -8,1\%$, za metabolit $\Delta W_{PM} = -27,0\%$. Vrednosti CV(%) IIV smo pridobili le za intrinzične očistke in med ciklično variabilnost K_{GIT} .

Tabela 15: Primerjava vrednosti pri postopnem razvoju modela silibina B, vrednosti aditivnih napak W_{AP} in W_{AM} nismo ocenjevali, zato so enake 0. Podane so končne vrednosti modela, ki so upoštewane kot začetne v naslednjem koraku.

Model M ₂ B			Končni model
Korak	1	3	3
K _a [h ⁻¹]	3,32	2,43	2,41
K _{GIT}	144	74,1	2,98
Clint _P [l/h]	23,3	51,9	1038
Clint _M [l/h]	834	1237	1326
V _P [l]	4,66	7,64	27,4
V _M [l]	8,88	6,93	6,71
FRAC []	0,398	0,495	0,538
Eh ₁ [h]	2,47	2,33	2,30
Eh ₂ [h]	3,91	3,91	3,91
Intraindividualna variabilnost			
W _{AP} (stalna 0)	-	-	-
W _{PP}	0,516	0,507	0,523
W _{AM} (stalna 0)	-	-	-
W _{PM}	1,13	0,871	0,896
Interiindividualna variabilnost			
$\eta_{ClintP} CV(\%)$	-	-	37,9
$\eta_{ClintM} CV(\%)$	-	81,5	87,5
$\omega_{K_{GIT}} CV(\%)$	91,5	77,4	87,2

METODA BOOTSTRAP:

Statistike bootstrap ocen 592 uspešnih minimizacij so podane v tabeli 16. Vrednosti parametrov K_a , FRAC, Eh_1 in Eh_2 so se izkazali za stabilne, pristranost in RSE teh ocen najnižja, intervali zaupanja so ozki. RSE je nizka tudi pri parametrih očistkov in volumnov porazdelitve. Ocenjevanje K_{GIT} je kot v modelu M_2A neustrezno, saj je pristranost velika in RSE 305%. Ocena uteženih proporcionalnih napak modela za silibin in metabolit je stabilna, RSE proporcionalnih napak je 10,1% oz. 9,10 %, a sta vrednosti W_{PP} in W_{PM} 52,5% oz. 88,8%. Ocene IIV smo pridobili le za tri parametre, η_{ClintP} , η_{ClintM} , in ωK_{GIT} . Vključitev preostalih IIV ni prinesla uspešne minimizacije.

Tabela 16: Primerjava ocenjevanja in bootstrap analize s pripadajočimi statistikami za parametre silibina B

Model M_2B OFV=1367,211	Bootstrap* 592 uspešnih minimizacij				95% neparametrični IZ
	ocena	Povprečje	Pripranost	RSE [%]	2,50%-97,5%
K_a [h^{-1}]	2,41	2,38	-0,03	15,4	1,69 - 3,10
K_{GIT}	2,98	9,61	6,64	305,2	0,87 - 125,8
$Clint_P$ [l/h]	1038	1203	165	48,7	34 - 2341
$Clint_M$ [l/h]	1326	1433	107	23,5	887 - 2237
V_P [l]	27,4	26,1	-1,3	29,3	4,44 - 39,6
V_M [l]	6,71	6,67	-0,04	33,2	0,293 - 12,95
FRAC []	0,538	0,568	0,030	12,6	0,424 - 0,715
Eh_1 [h]	2,30	2,28	-0,02	4,3	2,083 - 2,476
Eh_2 [h]	3,91	3,91	0,00	0,4	3,877 - 3,956
Intraindividualna variabilnost					
W_{PP}	0,523	0,525	0,002	10,1	0,417 - 0,632
W_{PM}	0,896	0,888	-0,008	9,1	0,736 - 1,057
Interindividualna variabilnost					
$\eta_{ClintP}CV(\%)$	37,9	42,3	17,4		7,6 - 63,0
$\eta_{ClintM}CV(\%)$	87,5	85,5	-14,3		54,5 - 113,5
$\omega K_{GIT}CV(\%)$	87,2	86,4	-8,8		42,1 - 134,4

*metoda ima 64 neuspešnih minimizacij in 342 ocen v mejah, te pri določanju statistik nismo upoštevali.

Krčenje parametrov je v Tabela 1717. Krčenje η_{Clint} je ustrezno, ostale presegajo 20%. Krčenje intraindividuane variabilnosti je majhno.

Tabela 17: Krčenje η , ε v modelu M2B

Krčenje				
$\eta_{ClintP}CV(\%)$		26,0	ε_1 [%]	11,0
$\eta_{ClintM}CV(\%)$		0,142	ε_2 [%]	3,30
$\omega K_{GIT}CV(\%)$	1. obdobje	24,1		
	2. obdobje	35,0		
	3. obdobje	27,3		

OBČUTLJIVOSTNA ANALIZA

Ocena K_{GIT} je nestabilna. Ob zmanjšanju pretoka za 50% oz. povečanju za 100% se K_{GIT} poveča za 52,7% oz. zmanjša za 37%. Zmanjšanje pretoka vpliva na $Clint_P$, ki se zmanjša za 27,5% oz. poveča za 37,8%. Vpliv spreminjanja pretoka je razviden tudi v spremembi volumnov porazdelitve in očiščkov proste oblike, K_{GIT} najbolj variira. Ostale ocene so stabilne, OFV se ne spremeni. Vrednost produkta fu in Clint pri občutljivostni analizi se bistveno ne razlikuje od vrednosti produkta končnega modela. Relativna napaka je manjša kot 1%. Zato ju ne moremo oceniti (priloga D in E).

Delež silibina B, ki se izogne ekstrakciji v jetrih in očišček

Za prosto obliko silibina B je F_P enaka 0,109, za metabolit je F_M 0,235. Vrednosti očiščkov sta 39,2 l/h za prosto obliko in 33,7 l/h za metabolit (izračun v prilogi F). Za izračun obsega EHC (F_o) v tabeli 18 upoštevamo ocene FRAC in podatek absorpcije silibina F_a 20-50% (5).

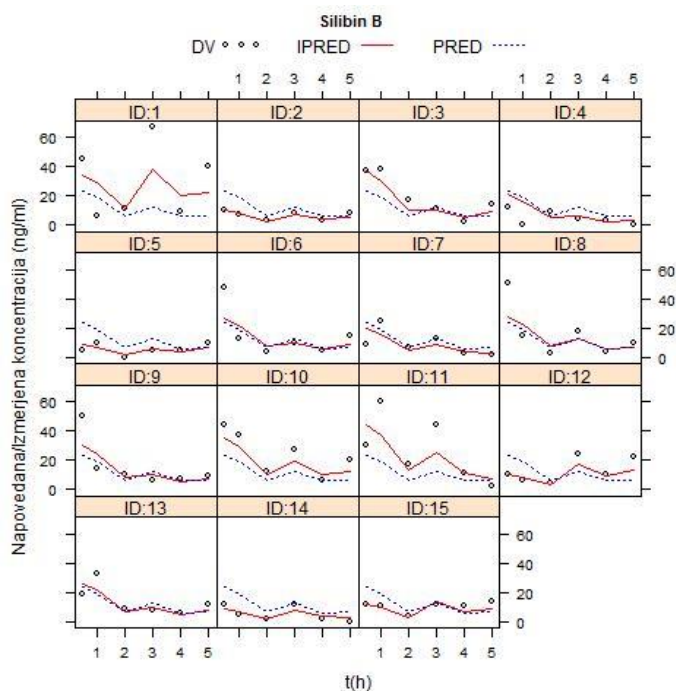
Tabela 18: Obseg EHC silibina B

	Delež [%]	RSE[%]
F_a	20 – 50	-
FRAC	56,8	12,6
$F_o = F_a * FRAC$	11,4 – 28,4	

Diagnostični diagrami proste oblike silibina B

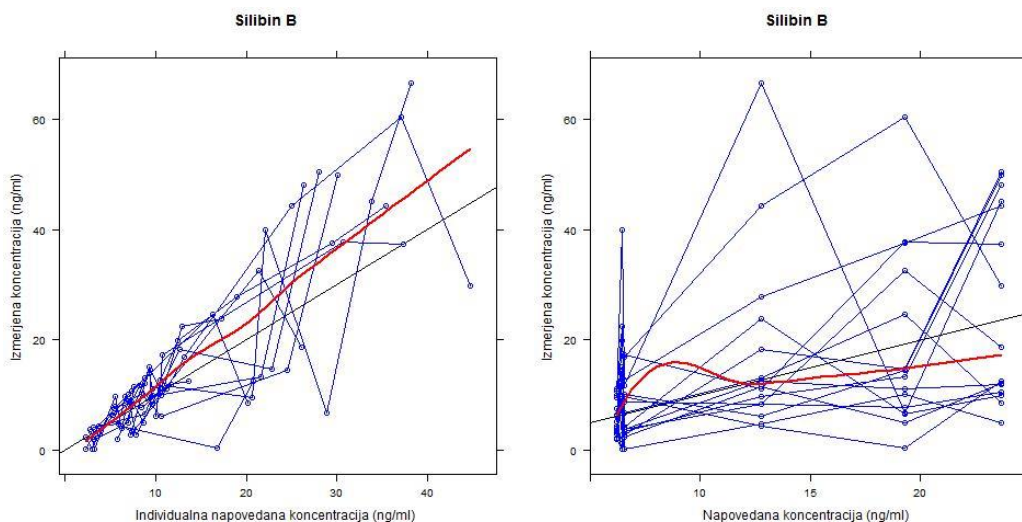
Prileganje individualnih napovedi modela za podatke proste oblike na sliki 22 je dobro pri ID 2, 5, 6, 14, vendar se v časih 0,5 h napovedi ne ujema. Vrednosti meritev koncentracij

so zelo variabilne, a individualne napovedi še ne dosežejo prileganja kot v primeru ID 1 in 11.



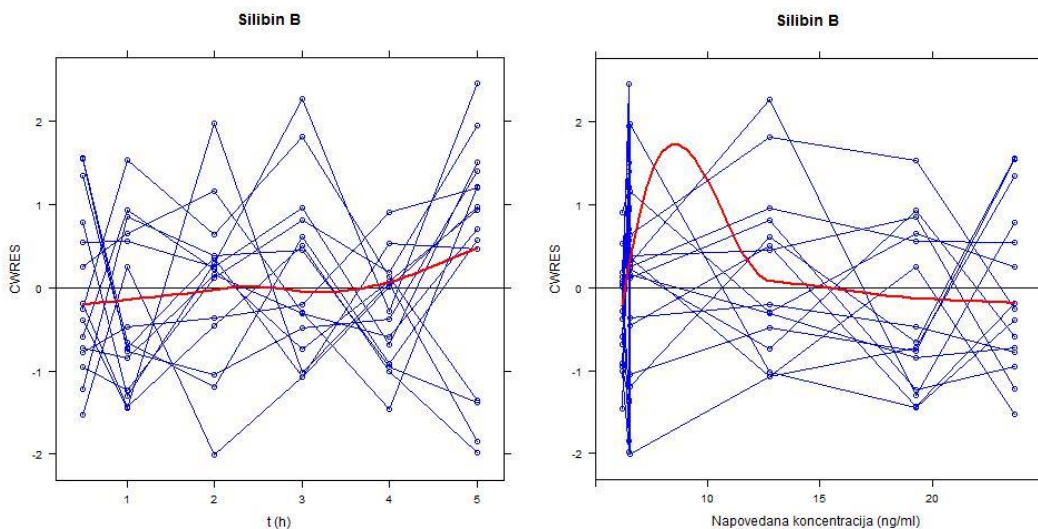
Slika 22: Individualni diagrami prileganja populacijske in individualnih napovedi na podatke za prosto obliko silibina B

Slika 23 prikazuje, da so individualne napovedi razpršene so okoli enakosti $x=y$, ter primerne. Krivulja LOESS se približuje premici, pri populacijske napovedi se odklanja od nje.

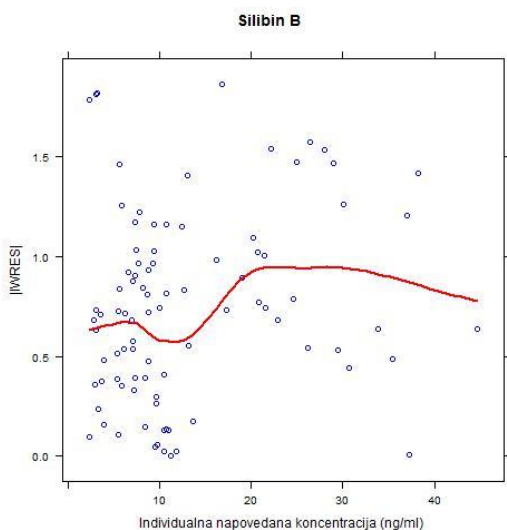


Slika 23: Individualne (levo) in populacijske (desno) napovedi v odvisnosti od meritev proste oblike silibina B

Diagram uteženih rezidualov (slika 24) prikazuje enakomerno razpršenost glede na čas oz. napoved, odkloni niso večji od ± 2 , LOESS pa ima rahel trend. LOESS absolutnih uteženih rezidualov na sliki 25 niha zaradi neenakomerne porazdeljenosti.



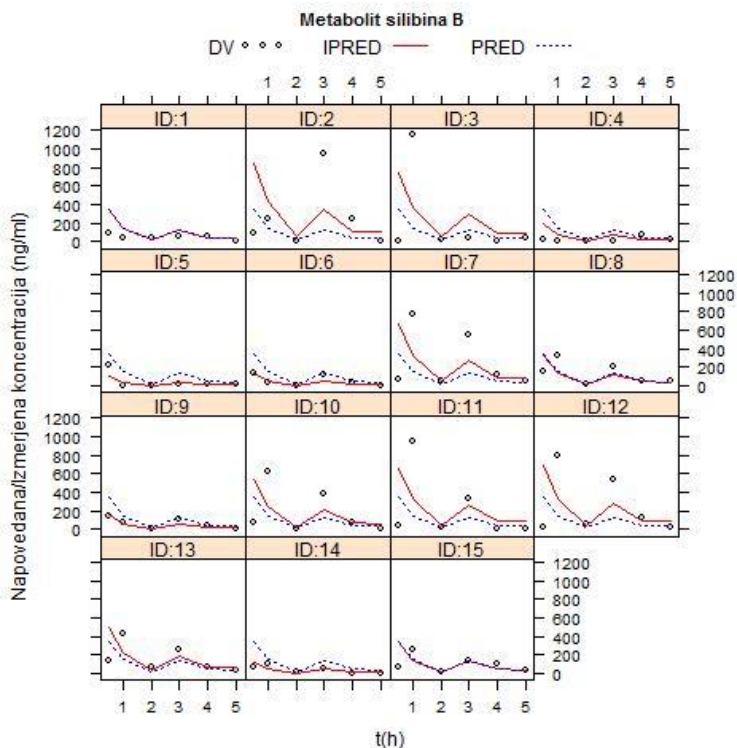
Slika 24: Pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od časa(levo) in populacijske napovedi(desno) za prosto obliko silibina B



Slika 25: Absolutni individualni uteženi rezidual v odvisnosti od napovedi za prosto obliko silibina B

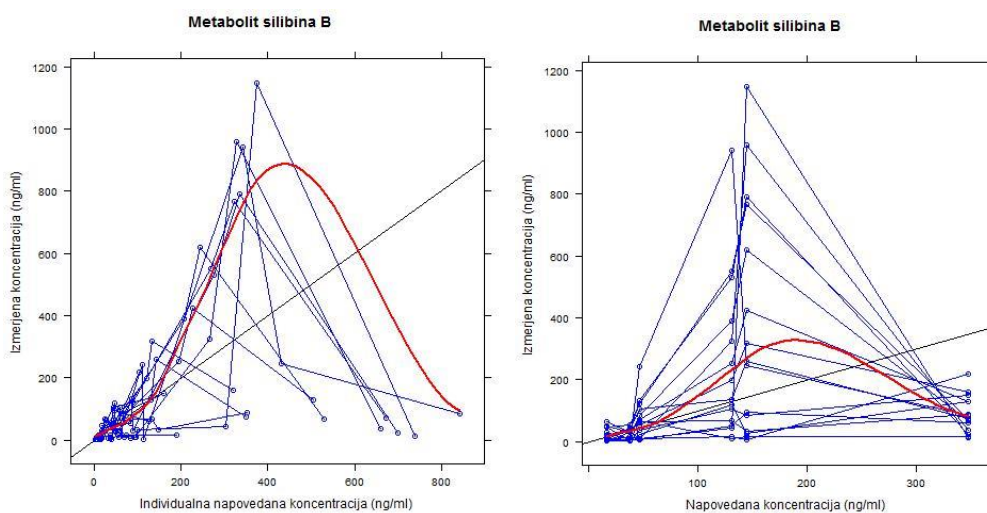
Dianostični diagrami metabolita silibina B

Prileganje modela na sliki 26 je zopet neustrezno pri času 0,5 ure, primerno pri ID 5, 9, 14, individualna napoved pa se ne odmika od populacijske pri ID 1, 8, 15. Napoved modela pri drugih posameznikih se ne prilega meritvam.

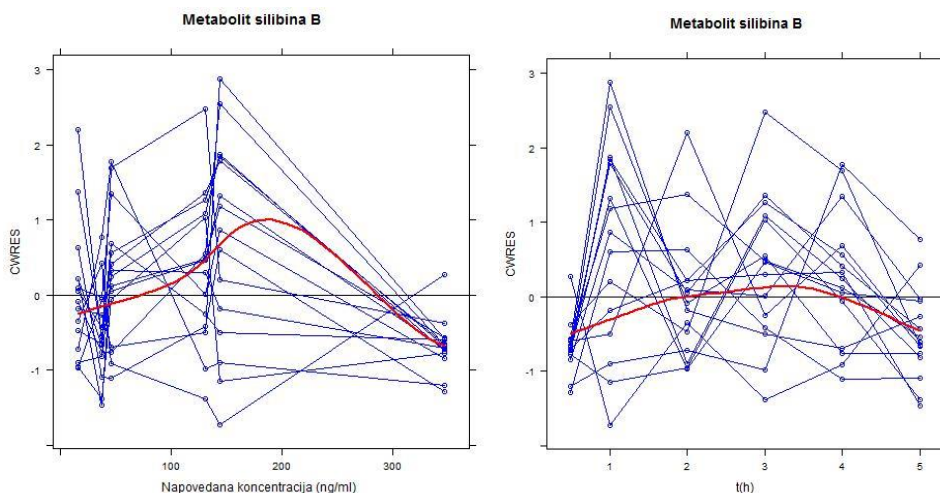


Slika 26: Individualni diagrami prilaganja populacijske in individualnih napovedi na podatke metabolita silibina B

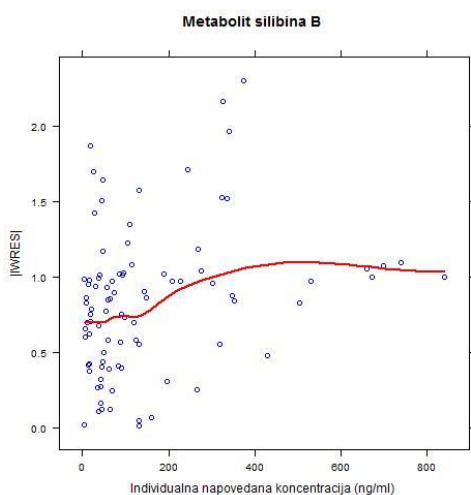
Diagram individualne napovedi ima neenakomerno razpršenost vrednosti, spreminjajo naklon glajene krivulje, populacijske napovedi imajo odklon v desni strani (slika 27). Vrednosti uteženih rezidulov glede na napovedi (28) imajo negativen naklon in neenakomerno sipanje glede na $y=0$.



Slika 27: Individualne (levo) in populacijske (desno) napovedi v odvisnosti od meritev metabolita silibina B



Slika 28: Pogojni uteženi rezidual v odvisnosti od časa (levo) in populacijske napovedi (desno) metabolita silibina B

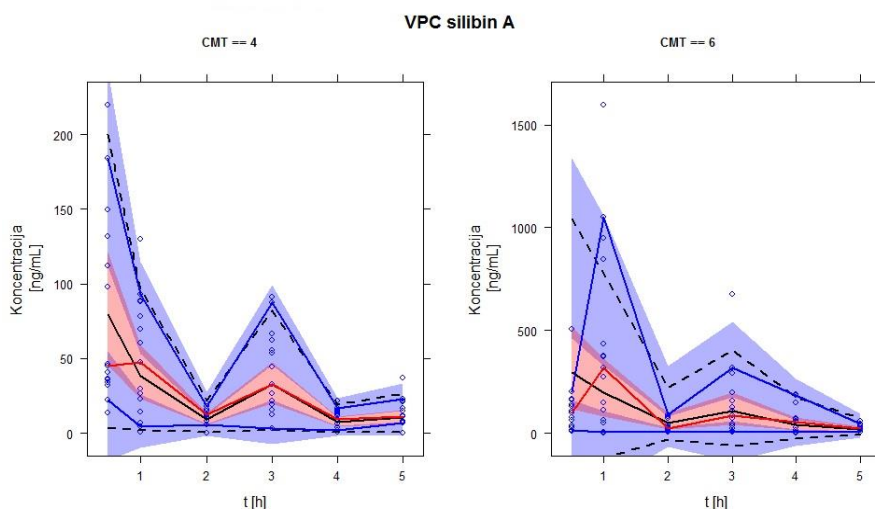


Slika 29: Absolutni individualni uteženi rezidual v odvisnosti od napovedi za metabolit silibina B

5.2.3 VPC

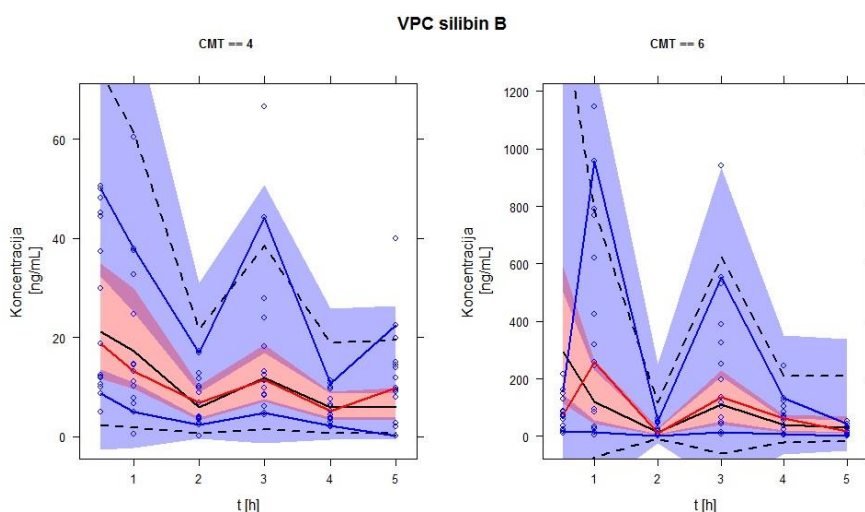
Rezultati VPC analize končnih modelov M₂A in M₂B za oba izomera silibina so prikazani v slikah 30 in 31. Krogi predstavljajo meritve koncentracij vseh posameznikov, rdeča črta je mediana meritev ter modri črti 5-ta in 95-ta centil meritev. S prekinjeno črno črto so podani 5-ti in 95-ti centili napovedi s pripadajočimi 95% IZ (polja), s polno črno črto je prikazana mediana napovedi s pripadajočim 95% IZ (rdeče polje).

Vrednosti mediane napovedi se ujemajo z mediano meritev silibina A, a v časovnem intervalu do prve ure po aplikaciji mediana meritev ne sovпада z mediano napovedi in pripadajočim 95 % IZ na sliki 30.



Slika 30: VPC vrednotenje modela za silibin A. *CMT: oznaka prostora v modelu, 4 predstavlja silibin, 6 pa metabolit v plazmi.

Na sliki 31 sta opazna širok 95% IZ 5-tega in 95-tega centila simulacije, prav tako pri mediani. Ta interval ne sovпада z mediano meritev pri prosti obliki v času 5 ure ter pri metabolitu v času do 2 ure po aplikaciji.



Slika 31: VPC vrednotenje modela za silibin B *CMT: oznaka prostora v modelu, 4 predstavlja silibin, 6 pa metabolit v plazmi.

6 RAZPRAVA

Z namenom pridobitve ocen FK parametrov silibina in časov enterohepatične cirkulacije smo razvili populacijski model nelinearnih mešanih učinkov z uporabo programskega orodja NONMEM. Za razvoj modela smo uporabili podatke raziskave, ki so jo izvedli z sodelovanjem Univerze v Trstu, v katero bilo vključenih 15 posameznikov. Ti so preizkušali farmacevtsko obliko medicinskega žvečilnega gumija, 3Tab[®] z določeno vsebnostjo silibina A in silibina B. Dosedanje raziskave so farmakokinetiko silibina opredeljevale z neprostorsko analizo, na majhnih vzorcih. Zaradi slabe topnosti silibina, je biološka uporabnost nizka, 2-3%, absorpcija znaša od 20% do 50%, delež vezave na plazemske proteine je visok, vrednosti volumnov porazdelitve niso znane, variabilnost očistkov je velika.

V povprečnem plazemskem koncentracijskega profila silibina in metabolita posameznega izomera je t_{max} 0,5 ure za prosto in 1 ura za metabolit, kar je primerljivo z dosedanjimi raziskavami. Povprečne vrednosti koncentracije metabolita so ves čas nad povprečjem proste oblike in že v času prve meritve (0,5 ure) je koncentracija metabolita večja v primerjavi s prosto obliko. Zato sklepamo o hitri absorpciji in metabolizmu. Navidezni očistek proste oblike izomera B je večji v primerjavi z izomerom A, celokupni navidezni očistek silibina B pa manjši. Iz te primerjave v tabeli 5 je razvidno, da se prosta oblika silibina B hitreje izloča domnevno zaradi hitrejšega metabolizma. Nastane večja količina konjugata silibina B, AUC konjugata silibina B je večji, zato je ta navidezni očistek manjši. To se sklada s predvidevanjem stereoselektivnosti metabolizma silibina, ki jo omenjajo Wen in sod. (13) ter Han in sod. (15), ki potrjujejo hitrejši metabolizem izomera B v primerjavi z izomerom A.

Pri obeh izomerih se pojavlja dodaten vrh koncentracije v plazmi v času tretje ure, tako za metabolit kot silibin. Vrednosti koncentracije proste oblike se povečajo še v času zadnjega odvzema vzorca pri 5 uri. Davies in sod. (1) ter Godfrey in sod. (42) predpostavljajo mehanizme, zaradi katerih se pojavljajo dodatni vrhovi v plazemskem koncentracijskem profilu: zadrževanje v želodcu, variabilnost v absorpciji skozi celoten prebavni trakt in enterohepatično cirkulacijo. Glede na predvidevanja o enterohepatični cirkulaciji, smo v populacijskem modelu nelinearnih mešanih učinkov ovrednotili časa pričetka ciklov.

Zaradi primerljive kinetike metabolita in silibina, in podobnosti v plazemskih koncentracijskih profilih pri določenih posameznikih, smo izračunali korelacijo koncentracij za isto časovno obdobje (tabela 6). Zavrnilo smo hipotezo o nepovezanosti koncentracij pri vrednosti p manjši od 0,05. Za silibin A je vrednost p značilna pri sedmih osebah, za silibin B pa le pri dveh od 15 sodelujočih.

Farmakokinetični model smo razvili na podlagi poznanih fizioloških vrednosti in predvidevanj absorpcije, porazdeljevanja, eliminacije in enterohepatične cirkulacije silibina. Povprečna vrednost koncentracije metabolita je ves čas višja od proste oblike in ker je dokazano lokalno entero-enteralno kroženje flavonoidov, smo predvidevali takojšen metabolizem in porazdeljevanje ob vstopu snovi v absorpcijski prostor v času pred potekom absorpcije. Zato smo uvedli oceno ravnotežnega razmerja K_{GIT} v absorpcijskem prostoru. Centralnemu prostoru (jetra) za prosto obliko in metabolit smo dodali stranska prostora, in ju opredelili po modelu dobro premešanega prostora. Na ta način smo v modelu lahko vključili upoštevanje deleža nevezane učinkovine v plazmi. Za silibin je znan visok delež vezave, zato smo za prosto obliko predpostavili 10% nevezani delež v plazmi, za metabolit pa 30%, ker za glukuronide ocenjujemo nižjo vezavo. Z oceno intrinzičnega očistka smo posredno pridobili oceno Cl in F ter njuno IIV. Ob razvoju modela smo zanemarili delež izločanja z urinom, ki po podatkih Hawke-a in sod. (18) znaša le 3%. Uvedli smo opredelitev EHC z uporabo depo prostora žolčnika. Sproščanje žolča je časovno omejeno z uporabo $MTIME$ in $MPAST$ funkcij.

Prvotni model M1, kjer smo predvideli časovno ločena K_{GIT} ter K_{GIT1} razmerja v času enterohepatične cirkulacije, kljub zmanjšanju OFV ob uvedbi ocen IIV nima zadovoljivih rezultatov vrednotenja. SE ocen parametrov so velike, diagnostični diagrami napovedi in meritev prikazujejo neenakomerno razpršenost vrednosti okoli premice enakosti ter velik odmik glajene krivulje trenda LOESS tako pri individualnih kot populacijski napovedi. Uteženi reziduali so nehomogeni glede na napovedi, posebej pri diagramih za metabolit. Trend je izrazito odklonjen od abscise, kar odraža slabo napoved in slabo strukturo modela. Na osnovi navedenih dejstev in začetnih problemov iteracij, kjer so bile vrednosti gradienta neustrezne, smo zaključili, da model ne podaja primernih ocen.

Model M2 smo uporabili na podatkih obeh izomerov. Z njim smo priredili ocenjevanje IIV K_{GIT} posameznega cikla iz enake distribucije iste variance. Z metodo bootstrap smo ocenili zanesljivost ocen. Zaradi široke razpršenosti podatkov smo za ocenjevanje IIV uporabili eksponentno obliko napake. Za oceno intraindividualne napake bi bil ustrežnejši kombinirani tip napake, vendar zaradi tveganja prevelike parametrizacija modela nismo povečevali števila ocenjevanih parametrov in ocenili le proporcionalno napako.

Vrednost OFV se značilno zniža ob posameznem koraku, kjer smo v ocenjevanje dodali IIV posameznega parametra, več kot tri ocene IIV modela za silibin A nismo pridobili. Z omejitvijo parametrov na stalno vrednost smo vplivali na uspešnejšo minimizacijo.

V primerjavi NONMEM poročila z bootstrap analizo za silibin A (tabela 11) so bile natančnejše ocene K_a ($1,60 \text{ h}^{-1}$), Cl_{intM} (1699 lh^{-1}) in V_M ($10,6 \text{ l}$), z RSE, ki je nižja od 30%. Pridobljeni farmakokinetični parametri potrjujejo dosedanja predvidevanja neprostroskih analiz o hitrem metabolizmu ter distribuciji. Ocena FRAC ($0,434$) silibina A ni natančna, neparametrični interval zaupanja je širok ($0,221-0,810$), a kljub temu predvideva velik delež metabolita, ki vstopa v EHC, kjer se silibin po izločanju z žolčem ponovno absorbira. Model natančneje ocenjuje čase enterohepatične cirkulacije, E_{h1} in E_{h2} , saj je RSE manjša od 10%.

IIV smo ocenili za parametre Cl_{intM} , FRAC in K_{GIT} pri silibinu A, ob upoštevanju vrednosti krčenja je ustrezna vrednost le CV $\eta_{Cl_{intM}}$ ($49,8\%$), krčenje rezidualne napake je majhno. Kar nam pove da ni precenjevanja modela. Vrednost interindividualne variabilnosti je na majhnem vzorcu oseb velika. Z ocenjevanjem IIV se pričakovano zmanjša intraindividualna napaka, vendar razlika ni velika. Končni oceni proporcionalnih napak sta $57,8\%$ in $93,7\%$. Občutljivostna analiza ne poda sprememb v vrednosti OFV, a dokazuje nestabilnost določenih parametrov (K_{GIT} , Cl_{intP} , V_P).

Diagrami proste oblike silibina A (slike 14-17) prikazujejo ustrežnejše prileganje modela, CWRES v odvisnosti od časa oz. napovedi so homogeno porazdeljeni okoli $y=0$ in med -2 in 2 , kar kaže na ustreznost modela silibina A. Iz diagrama populacijske napovedi v odvisnosti od meritev odklon LOESS ocenjuje pomanjkljivost ocene IIV. Nestalnost in rahel trend $|IWRES|$ v odvisnosti od IPRED odraža nepravilnost v rezidualni napaki modela. Pri metabolitu ni prileganja (slike 18-21), odkloni LOESS v individualnih oz. populacijskih

napovedi glede na meritve so veliki, CWRES so nehomogeno porazdeljeni, z izrazitim trendom, zato model strukturno ni ustrezen.

Model silibina B (tabela 16) ima zanesljivejše ocene parametrov K_a ($2,41 \text{ h}^{-1}$), $Clint_M$ (1326 h^{-1}) ter oceni volumnov porazdelitve, a sta ob upoštevanju 95% neparametričnega IZ sta manj natančni. Ocena parametra FRAC je visoka (0,568; 95% neparametrični IZ 0,424-0,715). Ta vrednost je višja kot pri silibinu A, to lahko pojasnjuje izrazitost sekundarnega vrha povprečja plazemske koncentracije v času tretje ure po odmerku v primerjavi s silibinom A.

Interindividualno napako ocenimo za parametre $Clint_P$, $Clint_M$ in K_{GIT} a je krčenje je ustrezno le za η_{Clim} (87,5%). Visoko variabilnost očistka metabolita v populaciji. Ocena intraindividualne napake se zmanjšuje ob uvedbi ocen IIV, za prosto obliko je 52,3% ter 89,6% za metabolit.

Diagnostični diagrami (na slikah 22-25) proste oblike silibina B prikazujejo strukturno pomanjkljivost v modelu, kar prikazuje odklon LOESS v diagramu populacijske napovedi v odvisnosti od meritev, diagram CWRES ima trend, nihanje $|IWRES|$ glede na napoved pa opisuje nepravilnosti v rezidualni napaki modela. Model metabolita je neustrezen, prileganja ni, in opaziti je izrazit trend CWRES v odvisnosti od napovedi.

Farmakokinetični parametri modela silibina so podobni, in glede na visoko oceno intrinzičnih očistkov proste oblike dokazujemo hiter metabolizem, distribucijo in izločanje. Dosedanje raziskave so ocenile le navidezne očistke, a so vrednosti močno variabilne, tudi zaradi različnih formulacij silibina in zato tega ne primerjamo. Ocene volumnov porazdelitve so ob upoštevanju visoke vezave na plazemske proteine manjše od pričakovanih. Razlike so bolj očitne pri določitvi FRAC, kjer je za silibin A 43,4%, za silibin B pa 56,8%, kar je tudi razumljivo glede na manjši navidezni očistek metabolita silibina B. Prileganje modela je ugodneje za prosti obliki kot metabolita. To velja za oba izomera.

Z načinom razvoja modela, kjer predpostavljamo model dobro premešanega prostora, smo ocenili deleža absorbiranega silibina oziroma metabolita (F_P in F_M), ki se izogne hepatični ekstrakciji in preide v sistemski krvni obtok. Vrednosti sta nizki pri obeh izomerih, za prosto obliko silibina A 14,0 % in metabolit 20,6%, za prosto obliko silibina B 10,9% in 23,5 % za

njegov metabolit. Zaradi slabe ocene intrinzičnih očistkov je ocena F_p manj natančna. Če pa upoštevamo deleža absorpcije (F_a) iz literaturnih virov (20% - 50%) (5), je produkt $F_a \cdot F_p$, ki v našem modelu predstavlja delež prehoda v sistemski obtok, za prosto obliko silibina A 2,8% - 7,0% in silibina B 2,2% - 5,5%. Ob upoštevanju absorpcije sta oceni obsega EHC (F_o) za silibin A 8,6% - 21,7% in silibina B 11,4% - 28,4%. Če upoštevamo še 3-7-krat višjo biološko uporabnost 3Tab[®] v primerjavi s kapsulami, so te vrednosti primerljive z dosedanjimi ugotovitvami obsega EHC silibina, ki po znanih podatkih znaša 10% odmerka.

Pri obeh diastereoizomerih model predvideva dva enterohepatična cikla, pri tem se ocena časa drugega cikla med diastereoizomeroma razlikuje za eno uro. Oceno drugega enterohepatičnega cikla 3,91 ure oz. 4,91 ure sovpada z obrokom, ki je bil načrtovan 4 ure po dajanju odmerka. Razlog za čas E_{h1} 2,56 ure Silibina A in 2,30 silibina B ni poznan, lahko pa k temu prispevajo različni stimulusi izločanja žolča. Preizkušanci so žvečili formulacijo predpisan čas 40 min, da se pospeši EHC. S tem se aktivira parasimpatik, ki oživčuje prebavni trakt, acetilholin iz živčnih končičev vagusa in enteričnega živčevja pa proži krčenje gladkih mišic žolčnika. Močnejši stimulus za krčenje žolčnika je holecistokinin, ki izloča ob prisotnosti maščobnih kislin v dvanajstniku.

V občutljivostni analizi smo preučevali vplive spremenjenh vrednosti jetrnega plazemskega pretoka, volumna jeter in nevezanega deleža silibina na zanesljivost ocen. Ugotovimo, da se OFV vredost ne spreminja, spremenijo se ocene parametrov. S povečanjem pretoka plazme v jetrih na 88l/h, kar je približek jetrnega pretoka krvi, se občutno povečata volumna porazdelitve proste oblike in metabolita. Ob zmanjšanju pretoka se volumna porazdelitve zmanjšata. Zmanjšanje volumna jeter zmanjša Cl_{int} in V_p proste oblike, na druge parametre pa ne vpliva. S spreminjanjem nevezanega deleža tako proste oblike kot metabolita se parameter Cl_{int} sorazmerno spremeni. Tako je produkt $f_u \cdot Cl_{int}$ ob vsaki spremembi f_u enak. S kombinacijo modela dobro premešanega prostora v več prostornem modelu ni mogoče oceniti ali vezava na plazemske proteine lahko vpliva na zanesljivost ocene intrinzičnega očistka.

Populacijsko modeliranje EHC cirkulacije se lahko izvede na več načinov. Modeliranje EHC mikofenolne kisline opredeljuje deleže ponovne absorpcije, vendar za razliko od našega pristopa, čase pričetka cikla enačijo s časom obroka in ga ne ocenjujejo. V našem primeru

je takšna opredelitev neprimerna, ker je iz povprečnih plazemskih koncentracijskih profilov razviden sekundarni vrh ob tretji uri, torej pred časom obroka.

Čase enterohepatične cirkulacije učinkovin so do sedaj poskušali oceniti s periodično funkcijo ($X(t)=(\sin(2\pi \cdot \text{čas}/\text{frekvenca}))$) (43), z opredelitvijo zakasnitve absorpcije ALAG (44) in z uporabo MTIME, MPAST funkcij. Primer te je model EHC nevirapina, kjer so Ibarra in sod. (45) kroženje opredelili z dvema stranskima prostoroma (absorpcijski in depo) in kinetiko absorpcije oz. izločanja iz stranskih v centralni prostor. Z MTIME in MPAST definirajo pogoja A in B, ki kinetiko absorpcije in izločanja stranskima prostoroma izmenjujeta v časih enterohepatičnih ciklov. Končni model ima čase ponovne absorpcije (MTIME 1 do 4) ocenjene z nizko RSE. Podobno uspešna je tudi ocena RSE časov EHC za našo opredelitev, zato ocenjujemo, da je opredelitev EHC z uporabo MTIME zanesljiva.

Ocenitev razmerja K_{GIT} , njena velika RSE in velik interval zaupanja, ter nezanesljivost vrednosti med občutljivostno analizo je značilna tako za silibin A kot silibin B. IIV tega parametra je sicer velika, a zaradi prej omenjene nezanesljivosti ni natančno ocenjena. S končnim modelom tako nismo uspeli oceniti deleža intestinalnega metabolizma, oz. razmerja metabolita in proste oblike, s katerim bi lahko ocenili tudi delež odmerka, ki pri prvem prehodu preide v jetra.

V model zaradi kompleksnosti nismo uvedli sočasnih spremenljivk, kar pa bi bilo smiselno, saj je pri občutljivostni analizi spreminjanje začetne vrednosti jetrnega pretoka vplivalo na očistke in volumne porazdelitve, jetrni pretok in volumen pa sta odvisna od teže posameznika.

Strukturna nepravilnost modela se izkaže tudi z oceno VPC, kjer meritve niso znotraj 95% IZ mediane v obdobju od časa jemanja ($t=0$ h) do 1h. Razlog temu pripisujemo predpostavki o hipnem porazdeljevanju v absorpcijskem prostoru in hipni absorpciji v času 0 in so zato vrednosti simulacije v 0,5 ure velikega razpona. To povezujemo z neuspešno oceno K_{GIT} . Model dobro opisuje potek plazemske koncentracije po drugi uri. Ker je v modelu ocena parametrov variabilna in nenatančna je tudi 95 % IZ za 5-ti, 50-ti in 95-ti centil simulacije velik, tako da je vrednost 5-tega centila simulacije pri metabolitu negativna. 90 % IZ med 5-tim in 95-tim centilom meritev povzame skoraj vse podatke meritev koncentracije, osamelce ni bilo mogoče določiti, sicer pa tudi zaradi manjšega števila podatkov te nismo izločali.

Težave v opredeljevanju populacijskega modela izvirajo iz velikega števila parametrov, ki jih ocenjujemo na relativno majhnem naboru podatkov. Model v času od dajanja odmerka do 1 ure napačno ocenjuje farmakokinetiko silibina. Razloge pripisujemo strukturni nepravilnosti modela in neocenjenemu metabolizmu v črevesju. Točen potek absorpcije silibina v primeru uporabljene farmacevtske oblike ni poznan, saj po sproščanju iz zdravilnega žvečilnega gumija 3Tab[®] absorpcija poteka preko ustne sluznice (bukalna in sublingvalna absorpcija), delež pa lahko preide v GIT. Naš model tega ne predvideva, podatkov plazemske koncentracije v času 0 do 0,5 h, tudi ne poznamo. Opaziti je večjo koncentracijo metabolita kot proste oblike v času prvega vzorčenja, zato menimo, da bi bilo smotrno dodatno enkratno vzorčenje v času do 0,5 h, s čimer bi v tem obdobju lahko ocenili nivo metabolizma. Razlogi variabilnosti v modelu so lahko tudi zaradi načina žvečenja formulacije pri posamezniku. Ta lahko vpliva na proces sproščanja in absorpcije silbina, kljub temu da so s 40 minutnim intervalom zagotovili popolno sproščanje iz formulacije.

Model zahteva nadaljnji razvoj, predlagamo spremembe v strukturi modela za obdobje 0 do 1 h, spremembo strukture modela za metabolit, dodajanje teže oseb kot sočasne spremenljivke, in dodajanje ocene aditivne napake v modelu intraindividualne napake, s čimer bi izboljšali prilaganje modela.

7 SKLEP

Razvili smo populacijski semifiziološki farmakokinetični model silibina, ki opisuje enterohepatično kroženje.

Hitrosti absorpcije in jetrnih intrinzičnih očistkov proste oblike in metabolita silibina so visoki za oba diastereoizomera. Intrinzični očistek proste oblike opredeljuje hiter metabolizem, intrinzični očistek metabolita pa hitro izločanje iz jeter z žolčem. Interindividualna variabilnost očistka metabolita je ocenjena na 50,7 % oz. 87,5 %.

V obdobju 5-ih ur po odmerku potečeta dva enterohepatična cikla pri silibinu A in silibinu B. Čas prvega cikla silibina A je 2,56 ure in drugega 4,91 ure, ter 2,30 ure in 3,91 ure za diastereoizomer B. Sklepamo, da je razlog za pojav drugega cikla v zaužitju obroka 4 ure po zaužitju pripravka s silibinom. Pojav prvega cikla povezujemo z aktivacijo parasimpatičnega oživčenja prebavil zaradi 40 minutnega žvečenja.

Model ne ocenjuje intestinalnega metabolizma, niti deleža absorpcije. Vpliv nevezanega deleža silibina ostaja neznan. Vplive jetrnega pretoka in volumna bi bilo smiselno opredeliti s sočasno spremenljivko teže oseb.

Sklepamo, da je delež metabolita, ki preide v EHC, za silibin B (56,8 %) večji kot za silibin A (43,4%). Višji obseg EHC ter hitrejši metabolizem doprinese k nižji vrednosti navideznega očistka silibina B.

Vrednost proporcionalne intraindividualne napake modela za napoved proste oblike in metabolita sta primerljivi med izomeroma, a visoki in je zato smotrna poprava strukture modela in intraindividualne napake modela. Visoka interindividualna variabilnost je lahko posledica načina absorpcije silibina.

Predvidevanje farmakokinetike silibina je zahtevno zaradi lastnosti, kot so slaba topnost, majhna biološka uporabnost in hiter metabolizem, končni model ni primeren za vse oblike silibina, ustrezno pa opredeli čase in obseg EHC.

8 VIRI

1. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease, *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 139-143
2. Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin—New effects and applications. *Biomed Paper* 2005; 149(1): 29–41
3. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24: 1423-1432
4. *European Pharmacopoeia 7ed*, Council of Europe, Strassbourg, 2011, 1186-1189
5. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin, *Clin Drug Invest* 2002; 22(1):51-65,
6. Köck K, Xie Y, Hawke R L, Oberlies N H, Brouwer K. Interaction of Silymarin Flavonolignans with Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Drug Metab Dispos* 2013; 41(5): 958–965
7. Doehmer J, Tewes B, Klein KU, Gritzsko, Muschick H, Mengs U. Assessment of drug-drug interaction for silymarin. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(3):610-7
8. Wu JW, Lin LC, Tsai TH. Drug–drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 185–193
9. Voinovich D, Perissutti B, Magarotto L, Ceschia D, Guiotto P, Bilia AR. Solid state mechanochemical simultaneous activation of the constituents of the *Silybum marianum* phytocomplex with crosslinked polymers. *J Pharm Sci* 2009; 98(1): 215-28
10. Pade DS. Use of in silico predictors, solubility and permeability to select bioavailability and bioequivalence markers in herbal supplements. University of Texas at Austin 2007, Thesis. Dostopno na www.lib.utexas.edu/etd/d/2007/paded87825/paded87825.pdf
11. Wu, JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45: 635–641.
12. Calani L, Brighenti F, Bruni R, Del Rio D. Absorption and metabolism of milk thistle flavonolignans in humans. *Phytomedicine*. 2012; 20: 40-46
13. Wen Z, Dumas TE, Schrieber SJ, Hawke RL, Fried MW, Smith PC. Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metab Dispos* 2008; 36(1):65-72
14. Miranda SR, Lee JK, Brouwer K, Wen Z, Smith PC, Hawke RL. Hepatic Metabolism and Biliary Excretion of Silymarin Flavonolignans in Isolated Perfused Rat Livers: Role of Mrp2 (Abcc2). *Drug Metab Dispos* 2008; 36(11): 2219–2226.
15. Han YH, Lou HX, Ren DM, Sun LR, Ma B, Ji M: Stereoselective metabolism of silybin diastereoisomers in the glucuronidation process. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 1071–1078
16. Hoh C, Boocock D, Marczylo T, Singh R, Berry DP, Dennison, AR, Hemingway D, Miller A, West K, Euden S, Garcea G, Farmer PB, Steward WP, Gescher AJ. Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2944–2950.

17. Wang Y, Zhang D, Liu Z, Liu G, Duan C, Jia L, Feng F, Zhang X, Shi Y, Zhang Q. In vitro and in vivo evaluation of silybin nanosuspensions for oral and intravenous deliver, *Nanotechnology* 2010; 21(15)
18. Hawke RL, Schrieber SJ, Soule TA, Wen Z, Smith PC. Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharmacol* 2010, 50: 434–449
19. Davies NM, Takemoto JK, Brocks DR, Yáñez JA. Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition, *Clin Pharmacokinet* 2010; 49(6): 351-7
20. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic circulation: Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokin* 2002; 41: 751–790
21. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics-biliary and intestinal clearance and enterohepatic circulation. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 535–542
22. Xia B, Zhou Q, Zheng Z, Ye L, Hu M, Liu Z. A Novel Local Recycling Mechanism That Enhances Enteric Bioavailability of Flavonoids and Prolongs Their Residence Time in the Gut. *Mol Pharm* 2012; 9(11): 3246–3258
23. Jacobsen J, Christrup LL, Jensen NH. Medicated Chewing Gum. *Am J Drug Deliv* 2004; 2 (2):75-88
24. Pagare PK, Satpute CS, Jadhav VM, Kadam VJ. Medicated Chewing Gum: A Novel Drug Delivery System. *JAPS* 2012; 2 (06): 40-54
25. Yang J, Jamei M, Yeo KR, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 501–502
26. Atanasijević-Kunc M, Drinovec J, Mrhar A. Modeliranje in simulacija ter njuna uporaba v medicini in farmaciji. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 57–71
27. Bonate PL. *Pharmokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*, Springer science+Business Media, New York, 2006, 1-56, 205-307
28. Ette EI, Williams PJ. *Population Pharmacokinetics I: Background, Concepts, and Models*. *Ann Pharmacother* 2004; 38(10): 1702–6.
29. Ette EI, Williams PJ. *Population Pharmacokinetics II: Estimation Methods*. *Ann Pharmacother* 2004; 38(11): 1907–15.
30. Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL. *NONMEM Users Guide - Part V* Introductory guide, 2011. Dostopen na <ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/v.pdf>
31. Ette EI, Williams PJ, Lane JR. *Population Pharmacokinetics III: Design, Analysis, and Application of Population Pharmacokinetic Studies*. *Ann Pharmacother* 2004; 38(12): 2136-2144
32. Fisher D, Shafer S. *NONMEM workshop - Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis with NONMEM: Basic Concepts* [Internet]. Het Pand, Ghent, Belgium; 2007 [cited 2012 Feb 10]. Dostopen na: <http://www.rpdpublications.eu/SIVAUK/PreviousMeetings/Cambridge/Shafer%20NONMEM.pdf>
33. European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, *Guideline on reporting the results of populationa pharmacokinetic analyses*. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003067.pdf
34. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82: 17–20

35. Hooker AC, Staatz CE, Karlsson MO. Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method. *Pharm Res* 2007; 24: 2187–2197
36. Bergstrand M, Hooker Ac, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 2011; 13: 143–151
37. Grabnar I, Pišlar M, Maggi L, Hasa D, Voinovich D. Enterohepatic Recirculation of Free and Conjugated Silybin Following Administration of a Chewing Gum with Milk Thistle Extract. PAGE Twenty-First Meeting 2012 Abstr 2593, Venice, Italy [<http://www.page-meeting.org/?abstract=2593>]
38. Voinovich D, Perissutti B, Hasa D, Maggi L, Conte U, Salini A, Grabnar I. A new chewing gum device suitable for children with enhanced bioavailability of herbal drug's active components In: *3rd Annual Conference on the European Pediatric Formulation Initiative (EUPFI)*, 21-22 September, 2011, Strasbourg, France.
39. Gordi T, Xie R, Huong NV, Huong DX, Karlsson MO, Ashton M. A semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 59(2): 189–198
40. Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL. NONMEM Users Guide - Part V Introductory guide. 2011. Dostopen na <ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/viii.pdf>
41. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical Bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J* 2009; 11:558–69.
42. Godfrey KR, Arundel PA, Dong Z, Bryant R. Modelling the Double Peak Phenomenon in pharmacokinetics. *Comput Methods Programs Biomed* 2011; 104: 62–69
43. Huntjens DR, Strougo A, Chain A, Metcalf A, Summerfield S, Spalding DJ, Danhof M, Della Pasqua O: Population pharmacokinetic modelling of the enterohepatic recirculation of diclofenac and rofecoxib in rats. *Br J Pharmacol* 2008; 153(5):1072-84
44. Sherwin CM, Fukuda T, Brunner HI, Goebel J, Vinks AA. The Evolution of Population Pharmacokinetic Models to Describe the Enterohepatic Recycling Of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation And Autoimmune Disease. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50 (1): 1-24
45. Ibarra M, Vázquez M, Fagiolino P. Population pharmacokinetic model to analyze nevirapine multiple-peaks profile after a single oral dose. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2014;41(4): 363-73

PRILOGA A

Tabela 19: Primer tabele s podatki za razvoj končnega PFK modela

#ID	TIME	MDV	EVID	AMT	DV	MET	CMT
1	0	1	1	67.2	.		0
1	0	1	1	67.2	.		1
1	0.5	0	0	0	220.00		0
1	0.5	0	0	0	160.80		1
1	1	0	0	0	69.80		0
1	1	0	0	0	49.80		1
1	2	0	0	0	15.90		0
1	2	0	0	0	71.10		1
1	3	0	0	0	55.20		0
1	3	0	0	0	37.20		1
1	4	0	0	0	2.00		0
1	4	0	0	0	57.30		1
1	5	0	0	0	36.80		0
1	5	0	0	0	14.60		1
2	0	1	1	67.2	.		0
2	0	1	1	67.2	.		1
2	0.5	0	0	0	46.00		0
2	0.5	0	0	0	35.40		1
2	1	0	0	0	60.20		0
2	1	0	0	0	375.20		1
2	2	0	0	0	10.30		0
2	2	0	0	0	10.10		1
2	3	0	0	0	12.40		0
2	3	0	0	0	675.00		1
2	4	0	0	0	3.80		0
2	4	0	0	0	189.60		1
2	5	0	0	0	6.80		0
2	5	0	0	0	5.60		1

Pojasnilo okrajšav:

ID	št. posameznika
TIME	čas odzema vzorca
MDV	
EVID	
AMT	odmerek
DV	izmerjena koncentracija
MET	prosta oblika MET=0, metabolit MET=1
CMT	prostor v modelu, 4 za prosto obliko, 6 za metabolit

PRILOGA B

Končni populacijski farmakokinetični model:

```
$PROBLEM Silybin A
$INPUT ID TIME MDV EVID AMT DV MET CMT
$DATA C:\Data\Diplom\Sylimarin_Janko\A_1new\Data\SilibinA_LOQ2mod15.csv
IGNORE=#
$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=8
;-----
$MODEL
COMP = (GITP) ; 1
COMP = (GITM) ; 2
COMP = (PH) ; 3
COMP = (PP) ; 4
COMP = (MH) ; 5
COMP = (MP) ; 6
COMP = (BILE) ; 7

$PK
KA = THETA(1)*EXP(ETA(1)) ; units[1/h]
KGIT1 = THETA(2)*EXP(ETA(2)) ; units[1/h]
KGIT = KGIT1*((1-MPAST(1))*EXP(ETA(8))+(MPAST(1)-MPAST(3))*EXP(ETA(9))+MPAST(3)*EXP(ETA(10)))
CLIP = THETA(3)*EXP(ETA(3)) ; units[L/h]
CLIM = THETA(4)*EXP(ETA(4)) ; units[L/h]
VP = THETA(5)*EXP(ETA(5)) ; units[L]
VM = THETA(6)*EXP(ETA(6)) ; units[L]
LFRAC = LOG(THETA(7)/(1-THETA(7)))+ETA(7)
FRAC = EXP(LFRAC)/(1+EXP(LFRAC)) ; fraction excreted into the bile and then reabsorbed

KBILE = 20 ; K for release from gall bladder to GIT
QH = 44 ; Hepatic blood plasma flow (L/h) 0.63 * WT
VH = 1 ; Hepatic volume (L)
FUP = 0.3 ; fraction unbound parent in plasma
FUM = 0.1 ; fraction unbound metabolite in plasma

KP = QH / VP ; units[1/h]
KM = QH / VM ; units[1/h]

DUR = 0.1 ; Trajanje EH cikla
MTIME(1) = THETA(8)
MTIME(2) = MTIME(1) + DUR
MTIME(3) = THETA(9)
MTIME(4) = MTIME(3) + DUR

FP = 1 - CLIP*FUP/(QH+CLIP*FUP)
FM = 1 - CLIM*FUM/(QH+CLIM*FUM)
CLP = QH * CLIP*FUP/(QH+CLIP*FUP)
CLM = QH * CLIM*FUM/(QH+CLIM*FUM)

F1=1/(1+KGIT)
F2=KGIT/(1+KGIT)

S4 = VP/1000 ;conc[ng/mL],dose[mg] and volume[L]
S6 = VM/1000 ;conc[ng/mL],dose[mg] and volume[L]

K13 = KA
K25 = KA
K34 = QH*FP/VH
K43 = KP
K35 = CLP/VH
K56 = QH*FM/VH
K65 = KM
K57 = CLM/VH
K72 = FRAC*KBILE
```

K71 = FRAC*KBILE

\$DES

FLAG1 = MPAST(1)-MPAST(2)

FLAG2 = MPAST(3)-MPAST(4)

FLAG = FLAG1 + FLAG2

DADT(1) = -K13*A(1) + FLAG*K71*A(7) * 1/(1+KGIT)

DADT(2) = -K25*A(2) + FLAG*K72*A(7) * KGIT/(1+KGIT)

DADT(3) = K13*A(1) - (K34 + K35)*A(3) + K43*A(4)

DADT(4) = K34*A(3) - K43*A(4)

DADT(5) = K35*A(3) + K25*A(2) - (K56 + K57)*A(5) + K65*A(6)

DADT(6) = K56*A(5) - K65*A(6)

DADT(7) = K57*A(5) - FLAG*K72/FRAC*A(7)

\$ERROR

IPRED = F

PF = 0

MF = 0

WPAR = SQRT(THETA(10)**2+(THETA(11)*IPRED)**2)

WMET = SQRT(THETA(12)**2+(THETA(13)*IPRED)**2)

IF(CMT .EQ. 4)PF=1

IF(CMT .EQ. 6)MF=1

IRES = IPRED-DV

IWRES = IRES/(WPAR*PF+WMET*MF)

IF(CMT.LT.3)IWRES=0

Y = IPRED + PF*WPAR * EPS(1) + MF*WMET * EPS(2)

\$THETA

(0,2.21781) ; KA ; TH1

(0,7.41254) ; KGIT ; TH2

(0,263.73) ; CLIP ; TH3

(0,1692.58) ; CLIM ; TH4

(0,11.1694) ; VP ; TH5

(0,12.1126) ; VM ; TH6

(0,0.393363,1) ; FRAC ; TH7

(0,2.30) ; EH1 ; TH8

(0,3.91) ; EH2 ; TH9

0.000000 FIX ; WaP ; TH10

(0,0.597939) ; WpP ; TH11

0.000000 FIX ; WaM ; TH12

(0,0.985796) ; WpM ; TH13

\$OMEGA BLOCK(1) FIX 0.000000 ; eKA ; ETA1

\$OMEGA BLOCK(1) FIX 0.000000 ; eKGIT ; ETA2

\$OMEGA BLOCK(1) FIX 0.000000 ; eCLIP ; ETA3

\$OMEGA BLOCK(1) 0.241801 ; eCLIM ; ETA4

\$OMEGA BLOCK(1) FIX 0.000000 ; eVP ; ETA5

\$OMEGA BLOCK(1) FIX 0.000000 ; eVM ; ETA6

\$OMEGA BLOCK(1) 0.0802432 ; eFRAC ; ETA7

\$OMEGA BLOCK(1) 0.166056 ; wKGIT

\$OMEGA BLOCK(1) SAME

\$OMEGA BLOCK(1) SAME

\$SIGMA 1.000000 FIX 1.000000 FIX

\$EST SIGDIGITS=3 MAXEVALS=9999 METHOD=1 INTERACTION NOABORT POSTHOC PRINT=5

\$COV PRINT=E, MATRIX=S

\$TABLE ID TIME EVID MDV CMT IPRED IWRES CPRED CRES CWRES CPREDI CRESI CWRESI ONEHEADER NOPRINT FILE = sdtabAfinalunfix

\$TABLE ID TIME EVID MDV CMT KA KGIT CLIP CLIM VP VM FRAC ONEHEADER NOPRINT FILE = patabAfinalunfix

PRILOGA C

Diferencialne enačbe končnega populacijskega modela silibina

$$\frac{dA(1)}{dt} = -k_a * A(1) + \frac{1}{1 + K_{GIT}} * FLAG * FRAC * K_{bile} * A(7)$$

$$\frac{dA(2)}{dt} = -k_a * A(2) + \frac{K_{GIT}}{1 + K_{GIT}} * FLAG * FRAC * K_{bile} * A(7)$$

$$\frac{dA(3)}{dt} = k_a * A(1) - \frac{Cl_P}{V_H} * A(3) - F_P * \frac{Q_H}{V_H} * A(3) + \frac{Q_H}{V_P} * A(4)$$

$$\frac{dA(4)}{dt} = F_P * \frac{Q_H}{V_H} * A(3) - \frac{Q_H}{V_P} * A(4)$$

$$\frac{dA(5)}{dt} = k_a * A(2) + \frac{Cl_P}{V_H} * A(3) - \frac{Cl_M}{V_H} * A(5) - F_M * \frac{Q_H}{V_H} * A(5) + \frac{Q_H}{V_M} * A(6)$$

$$\frac{dA(6)}{dt} = F_M * \frac{Q_H}{V_H} * A(5) - \frac{Q_H}{V_M} * A(6)$$

$$\frac{dA(7)}{dt} = \frac{Cl_M}{V_H} * A(5) - FLAG * K_{bile} * A(7)$$

PRILOGA D

Tabela 20: Relativni odkloni vrednosti parametrov pri občutljivostni analizi končnega modela silibina A.

Stalni vpliv		Q _H		V _H		f _{UP}		f _{UM}	
Začetna vrednost		44		1		0,3		0,1	
Sprememba		22	88	0,5	2	0,15	0,6	0,05	0,2
Relativni odklon [%]									
Ka [h ⁻¹]	1,46	0,68	-0,68	-0,68	1,37	0,00	0,00	0,00	0,00
K _{GIT}	1,07	-22,4	19,6	141	-26,2	1,87	1,87	1,87	1,87
Clint _P [l/h]	984	16,2	-10,6	-43,6	19,3	98,3	-50,0	-0,81	-0,81
Clint _M [l/h]	1614	3,35	-1,30	-2,29	4,21	0,00	0,00	99,9	-50,0
V _P [l]	2,10	-40,0	63,8	-26,7	22,9	-2,38	-2,38	-2,38	-2,38
V _M [l]	9,56	-43,4	58,9	1,99	-4,08	0,00	0,00	0,00	0,00
FRAC []	0,393	3,56	0,00	-2,29	4,58	0,25	0,25	0,25	0,25
Eh ₁ [h]	2,56	-0,78	0,00	0,39	-1,17	0,00	0,00	0,00	0,00
Eh ₂ [h]	4,91	-0,20	0,41	0,41	-0,41	0,20	0,20	0,20	0,20
Intraindividuana variabilnost									
W _{PP}	0,578	-0,35	0,17	2,25	-0,35	0,00	0,00	0,00	0,00
W _{PM}	0,937	-0,75	0,64	0,11	0,32	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11
Interindividualna variabilnost									
η _{ClM} [CV (%)]	50,7	0,39	-1,78	0,20	-0,59	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20
η _{FRAC} [CV (%)]	24,1	5,81	-3,32	-4,56	7,05	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41
η _{K_{GIT}} [CV (%)]	86,3	19,1	-11,2	-3,2	24,3	-1,16	-1,04	-1,04	-1,04

Tabela 21: Relativni odkloni vrednosti parametrov pri občutljivostni analizi končnega modela silibina B

Stalni vpliv		Q _H		V _H		f _{UP}		f _{UM}	
Začetna vrednost		44		1		0,3		0,1	
Sprememba		22	88	0,5	2*	0,15	0,6	0,05	0,2
Relativni odklon [%]									
Ka [h ⁻¹]	2,41	4,1	-1,2	-0,4	-51,5	0,0	0,0	0,00	0,0
K _{GIT}	2,98	52,7	-36,9	-4,0	-99,3	0,0	0,0	0,00	0,0
Clint _P [l/h]	1038	-27,6	37,9	1,6	197	99,9	-50,0	0,00	0,0
Clint _M [l/h]	1326	3,7	-1,6	-1,4	10,3	0,0	0,0	100	-50,0
V _P [l]	27,4	-47,1	87,9	1,4	-97,6	0,0	0,0	-0,04	0,0
V _M [l]	6,71	-33,8	38,0	4,0	8,9	0,0	0,0	0,00	0,0
FRAC []	0,538	-1,5	2,8	-1,1	85,1	0,0	0,0	0,00	0,0
Eh ₁ [h]	2,30	0,4	0,0	0,4	-13,9	0,0	0,0	0,00	0,0
Eh ₂ [h]	3,91	-0,5	0,5	0,3	26,6	0,0	0,0	0,00	0,0
Intraindividuana variabilnost									
W _{PP}	0,523	0,25	0,36	0,05	-2,45	0,09	0,09	0,09	0,09
W _{PM}	0,896	-0,69	0,74	0,04	-0,59	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
Interindividualna variabilnost									
η _{ClM} [CV (%)]	37,9	-3,12	5,00	1,03	33,2	0,12	0,13	0,13	0,13
η _{ClP} [CV (%)]	87,5	1,45	-2,01	0,25	-7,48	0,02	0,02	0,02	0,02

PRILOGA E

Tabela 22: Sprememba produkta $f_u \cdot Cl_{int}$ pri končnem modelu silibina A

Končni model M ₂ A									
F _{up}	Cl _{intP} [l/h]	Zmnožek F _{up} *Cl _{intP} [l/h]			F _{uM} [l/h]	Cl _{intM} [l/h]	Zmnožek F _{uM} *Cl _{intM} [l/h]		
0,3	984	295,2			0,1	1614	161,4		
Občutljivostna analiza									
F _{up}	Cl _{intP} [l/h]	Zmnožek F _{up} *Cl _{intP} [L/h]	Δ	RE [%]	F _{uM} [l/h]	Cl _{intM} [l/h]	Zmožek F _{uM} *Cl _{intM} [l/h]	Δ	RE[%]
0,15	1951,5	292,7	-2,48	-0,84	0,1	1613,7	161,4	-0,03	-0,02
0,6	488,0	292,8	-2,39	-0,81	0,1	1613,7	161,4	-0,03	-0,02
0,3	976,0	292,8	-2,48	-0,84	0,05	3227,3	161,4	-0,03	-0,02
0,3	976,0	292,8	-2,39	-0,81	0,2	806,8	161,4	-0,03	-0,02

Tabela 23: Sprememba produkta $f_u \cdot Cl_{int}$ pri končnem modelu silibina B

Končni model M ₂ B									
F _{up}	Cl _{intP} [l/h]	Zmnožek F _{up} *Cl _{intP} [l/h]			F _{uM} [l/h]	Cl _{intM} [l/h]	Zmnožek F _{uM} *Cl _{intM} [l/h]		
0,3	1038	311,4			0,10	1326	132,6		
Občutljivostna analiza									
F _{up}	Cl _{intP} [l/h]	Zmnožek F _{up} *Cl _{intP} [L/h]	Δ	RE [%]	F _{uM} [l/h]	Cl _{intM} [l/h]	Zmnožek F _{uM} *Cl _{intM} [l/h]	Δ	RE[%]
0,15	2075	311,2	-0,2	-0,05	0,10	1326	132,6	0,0	-0,02
0,6	519	311,3	-0,1	-0,02	0,10	1326	132,6	0,0	-0,02
0,3	1038	311,3	-0,1	-0,04	0,05	2652	132,6	0,0	-0,02
0,3	1038	311,3	-0,1	-0,04	0,20	663	132,6	0,0	-0,02

PRILOGA F

Tabela 24: Očistki in deleži prehoda v sistemski obtok

Končni model		Q _H [l/h]	44	Intrinzični očistek		F=Q _H /(Q _H +f _u *Cl _{int})		Cl=(Q _H *f _u Cl _{int})/(Q _H +f _u *Cl _{int})	
Silibi n A	prosti	f _{up}	0,3	Cl _{intP} [l/h]	902	F _P	0,140	Cl _P [l/h]	37,8
	metabolit	f _{uM}	0,1	Cl _{intM} [l/h]	1699	F _M	0,206	Cl _M [l/h]	34,9
Silibi n B	prosti	f _{up}	0,3	Cl _{intP} [l/h]	1203	F _P	0,109	Cl _P [l/h]	39,2
	metabolit	f _{uM}	0,1	Cl _{intM} [l/h]	1433	F _M	0,234	Cl _M [l/h]	33,7