

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MIRTIC

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MIRTIČ

**POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA LAMOTRIGINA
IN NJEGOVEGA GLUKURONIDA PRI BOLNIKIHZ
EPILEPSIJO**

POPULATION PHARMACOKINETICS OF LAMOTRIGINE
AND ITS GLUCURONIDE IN PATIENTS WITH EPILEPSY

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka mag farm.

ZAHVALA

- ★ *Tomažu Vovku, Iztoku Grabnarju in Danieli Milosheski za sodelovanje in pomoč*
- ★ *Staršem in prijateljem za podporo*

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka mag farm.

Ljubljana, julij 2015

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Obreza mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Jasna Omersel mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Epilepsija	1
1.1.1	Mehanizem epilepsije	3
1.1.2	Zdravljenje epilepsije in terapevtsko spremljanje zdravil	4
1.2	Protiepileptične učinkovine	5
1.2.1	Lamotrigin in njegove farmakokinetične lastnosti	6
1.3	Populacijska farmakokinetika	9
1.3.1	Meta-analiza	12
2	NAMEN DELA.....	13
3	MATERIALI IN METODE	14
3.1	Materiali.....	14
3.1.1	Osebe, vključene v študijo.....	14
3.1.2	Plazma	14
3.1.3	Standard in interni standard	15
3.1.4	Reagenti in topila.....	15
3.1.5	Naprave in pribor.....	15
3.2	Določanje koncentracije lamotrigina v vzorcih	16
3.2.1	Priprava standardnih raztopin	17
3.2.2	Priprava obogatenih standardnih in kontrolnih plazemskih vzorcev.....	18
3.2.3	Priprava mobilne faze	19
3.2.4	Pogoji metode	19
3.2.5	Umeritvena krivulja	19
3.2.6	Delna validacija metode	20
3.3	Meta-analiza.....	21
3.4	Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela.....	23
4	REZULTATI.....	25
4.1	Analizna metoda	25
4.1.1	Umeritvena krivulja in delna validacija.....	25
4.1.2	Plazemske koncentracije.....	27
4.2	Populacijska farmakokinetika	28
4.2.1	Meta-analiza	30
4.2.2	Osnovni farmakokinetični model za lamotrigin	32

4.2.3	Osnovni farmakokinetični model za lamotrigin-2 <i>N</i> -glukuronid	34
5	RAZPRAVA	38
5.1	Validacija metode	40
5.2	Populacijska farmakokinetika	41
5.2.1	Meta-analiza	41
5.2.2	Populacijski farmakokinetični model	41
6	SKLEP.....	43
7	VIRI.....	44

POVZETEK

Epilepsija je bolezen z nepredvidljivim pojavom epileptičnih napadov, ki lahko prizadenejo motorično, senzorično ali kognitivno funkcijo možganov. Zdravljenje prepreči pojav simptomov bolezni in poteka s protiepileptičnimi učinkovinami, med katerimi je tudi lamotrigin. Zanj velja, da ima veliko farmakokinetično variabilnost, zato bi bila smiselna uporaba terapevtskega spremljanja koncentracij (TDM). Optimalen odmerek lahko določimo tudi s pomočjo populacijske farmakokinetike, ki je nadgradnja TDM.

V ta namen smo v magistrski nalogi razvili osnovni populacijski farmakokinetični model za lamotrigin in njegov glukuronid. Stotim bolnikom z epilepsijo smo izmerili plazemske koncentracije lamotrigina in lamotrigin-2*N*-glukuronida z validirano analizo metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in UV detektorjem. Rezultate smo delno validirali po smernicah Evropske agencije za zdravila. Metoda je linearna v območju 0,25–20 µg/mL, točna (86–113,3 %) in ponovljiva (0,1–10,4 %).

S populacijskim farmakokinetičnim modeliranjem smo določili vrednosti parametrov, hitrostne konstante absorpcije, volumna porazdelitve in očistka, njihove interindividualne variabilnosti (IIV) ter rezidualno variabilnost. Da smo povečali moč podatkov, smo opravili meta-analizo 11 sorodnih študij populacijske farmakokinetike z lamotriginom. Iz literature smo zbrali vrednosti parametrov, s katerimi smo izračunali priorje oz. predhodno vedenje.

Za razvoj farmakokinetičnega modela smo združili rezultate osnovnega modela ter meta-analize. Podatke smo analizirali z metodo nelinearnega modela mešanih učinkov. Za strukturni del smo izbrali enoprostorski model, kjer potekata absorpcija in eliminacija 1. reda. Tipična vrednost hitrostne konstante absorpcije (IIV %) lamotrigina je $1,96 \text{ h}^{-1}$ (72,8), volumna porazdelitve 77,6 L (30,2), in očistka 2,32 L/h (41,4). Tipična vrednost očistka glukuronida je 3,05 L/h (54,1). Rezidualna napaka modela za lamotrigin znaša 19,8 % in 13,8 % za glukuronid. Osnovni populacijski farmakokinetični model je primeren za nadgradnjo v končni model, s katerim ugotovimo vpliv kovariat na farmakokinetiko lamotrigina.

Ključne besede: lamotrigin, epilepsija, HPLC, populacijska farmakokinetika, meta-analiza.

ABSTRACT

Epilepsy is a disease with its unpredicted occurrence of epileptic seizures, which can affect motoric, sensory and cognitive function of the brain. The treatment prevents the symptoms of the disease and takes antiepileptic drugs (AED), which include lamotrigine. Lamotrigine is characterised with pharmacokinetic variability, so therapeutic drug monitoring (TDM) is considered. Optimal dosage can be determined with population pharmacokinetics which is an upgrade of TDM.

Therefore the aim of the master thesis was to develop population pharmacokinetic model for lamotrigine and its glucuronide. Plasma levels from 100 patients were determined with validated analytical method using high performance liquid chromatography with UV detector. The results were partially validated according to the guidelines for bioanalytical methods of European medicines agency. Calibration curve was linear ranged 0,25–20 µg/mL, the method precision did not exceed 10,4 % and accuracy ranged from 86 – 113,3%.

Population pharmacokinetic modelling was used to determine the values of absorption rate constant, volume of distribution and clearance, their interindividual variability (IIV), and residual variability. To strengthen the evidence meta-analysis of 11 related studies with population pharmacokinetics of lamotrigine was performed. Values of parameters from the literature were collected and defined as priors.

For the development of pharmacokinetic model results of basic model and meta-analysis were united. The data were analysed using non-linear mixed-effect model. The structural model was a one-compartment model with first order absorption and elimination. The typical value of absorption rate constant (IIV %) for lamotrigine is 1,96 h⁻¹ (72,8), clearance 2,32 L/h (41,4) and volume of distribution 77,6 L (30,2). The typical value of clearance for glucuronide is 3,05 L/h (54,1). Residual variability for lamotrigine is 19,8 % and 13,8 % for glucuronide. Basic population pharmacokinetic model is appropriate for an upgrade to final model which is able to identify the effect of covariates on lamotrigine pharmacokinetics.

Key words: lamotrigine, epilepsy, HPLC, population pharmacokinetics, meta-analysis.

SEZNAM OKRAJŠAV

AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kislina
Cl	očistek
CV	koeficient variacije
DBS	posušeni krvni madeži (<i>dried blood spots</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EMA	Evropska agencija za zdravila (<i>European medicines agency</i>)
GABA	γ -aminobutanojska kislina
GABA _A	podtip A gabaergičnih receptorjev
GABA _B	podtip B gabaergičnih receptorjev
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IIV	interindividualna variabilnost
K _a	hitrostna konstanta absorpcije
LLOQ	spodnja meja določljivosti (<i>Lower limit of quantification</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NONMEM	nelinearni model mešanih učinkov (<i>nonlinear mixed effect model</i>)
OFV	vrednost objektivne funkcije (<i>objective function value</i>)
PFK	populacijska farmakokinetika
QC	kontrolni vzorec (<i>quality control</i>)
QC _L	kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
QC _M	kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
QC _H	kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji
RSE	relativna standardna napaka

PEU	protiepileptična učinkovina
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu (<i>solid-phase extraction</i>)
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracij
Vd	volumen porazdelitve
UGT-1A4	uridindifosfat glukuronil transferaza 1A4

1 UVOD

Epilepsija je ena najpogostejših nevroloških motenj, ki prizadene 0,5–1 % svetovne populacije (1, 2). Pojavi se lahko v kateremkoli starostnem obdobju, vendar pogosteje za epilepsijo zbolijo mladi (pri 75 % bolnikov se bolezen razvije pred 18. letom starosti in sicer najpogosteje v prvem letu starosti) ter starejši, zlasti po 65. letu starosti (2–4). Študije navajajo incidenco napadov po 65. letu prek 100/100.000 prebivalcev, kar pomeni v Sloveniji vsako leto okrog 2000 na novo odkritih starejših ljudi z epileptičnimi napadi (4). Je zelo raznolika, saj se lahko pojavi v več kot 15 različnih oblikah napadov in v več kot 30 različnih sindromih, pogosto pa so ji pridružene tudi druge bolezni kot na primer depresija in anksioznost (1). Epilepsija se kaže v obliki epileptičnega napada, zato je zelo pomembno, da napad opazujemo, saj nazoren opis zelo pripomore zdravniku pri ugotavljanju vrste napada, kar lahko olajša izbor protiepileptične učinkovine (PEU). Če predolgo odlašamo z zdravljenjem in nimamo nadzora nad napadi, to lahko vodi v moteno psihosocialno integracijo, kar se kaže v slabem akademskem razvoju, nizki samopodobi, nezadovoljstvu ter omejenem načinu življenja, kar vodi v slabo kvaliteto življenja (5).

1.1 EPILEPSIJA

Gre za bolezen z motnjo možganske funkcije, ki se kaže kot ponavljajoč in nepredvidljiv pojav epileptičnih napadov (2). Proces bolezni oz. epileptogeneza se začne še pred prvim napadom, kjer pride do strukturnih, molekularnih in biokemičnih sprememb nevronov v možganih (1, 2). Epileptični napad je prehodna sprememba vedenja zaradi nenormalnega, pretiranega, sinhronega proženja nevronov v centralno-živčnem sistemu brez znanega vzroka. Zaradi nenadne in nepravilne dejavnosti možganskih celic se pojavijo ponavljajoči epileptični napadi ter motnje živčnih funkcij, ki so lahko motorične, senzorične, vegetativne, emocionalne in kognitivne narave, vključno s prekinitvijo zavesti (6–8).

Za postavitev diagnoze epilepsije sta potrebna dva ali več spontanih epileptičnih napadov, kar pomeni, da en napad še ne pomeni epilepsijo (7, 8). Kljub temu kar 80 % bolnikov v roku treh let doživi ponoven napad (7). Klinični znaki napada in simptomi so odvisni od tega, katera funkcija možganov je prizadeta (2). Če je prizadet motoričen del možganske

skorje, nastanejo konvulzije. V primeru, da napad izvira iz hipotalamusa, nastanejo periferna avtonomna proženja, vključenost retikularne formacije možganskega debla pri epileptičnem napadu pa vodi v izgubo zavesti (6).

Klasifikacija epilepsije ni enostavna, saj diagnostični proces v klinični praksi zahteva dva pristopa, identificirati tip napada oz. simptoma in določiti vzroke zanj. Klasifikacija se je do sedaj v večji meri osredotočila na epileptične napade, vendar je etiologija pomembna determinanta v zdravljenju in prognozi te bolezni. Terminologija deli epilepsijo na idiopatsko (vzrok bolezni je genetska okvara, ki nima anatomskih ali patoloških nepravilnosti), strukturno/metabolno (druga bolezen ali stanje, ki lahko poveča verjetnost za nastanek epilepsije npr. tumor, poškodba, infekcija, kap, hipoglikemija, povišana telesna temperatura, zloraba prepovedanih substanc) in kriptogeno (napad je posledica neprepoznanih strukturnih in metabolnih procesov, ki še niso odkriti), vendar pa so te meje slabo ločene med sabo, kar kaže dejstvo, da je lahko strukturna možganska okvara prav tako posledica genetske okvare. Oblikovanje klasifikacije je oteženo zaradi večplastnosti epilepsije, saj se v večini primerov pojavi zaradi genskih predispozicij in izzvanih vzrokov. Kljub razvoju nevrofizioloških tehnik in znatnemu preučevanju delovanja možganov etiologija epilepsije ni natančno kategorizirana (9, 10).

Epileptične napade v splošnem delimo na parcialne (tudi lokalizirani, fokalni) napade, kjer se proženje nevronov začne v nekem specifičnem in omejenem predelu možganov, in na generalizirane, kjer sta udeleženi obe hemisferi možganov in je prisotna izguba zavesti. Parcialni napadi se nadalje delijo na enostavne (bolnik je zavesten) in kompleksne (prisotna je izguba zavesti). Če se nenormalni električni izbruh iz določenega predela možganske skorje nato razširi na celotno možgansko skorjo, govorimo o *sekundarno* generaliziranem napadu. Vrsta generaliziranega napada so absence, ki jih lahko opišemo kot 'sanjarjenje'. *Tipične (petit mal) absence* hitro nastopijo in hitro izzvenijo ter so pogostejše pri otrocih, ravno nasprotno pa so *atipične absence*, kjer napad nastopi in izzveni počasi, zato traja dalj časa (več minut). Bolniki se odsotnosti ne spomnijo in so med napadom neodzivni. *Mioklonični napadi* so nenadni, kratki in sunkoviti krči, ki lahko vključujejo celotno telo ali le del telesa, na primer obraz ali vrat. Značilni so za vse starostne skupine. *Tonični napad* se pojavi zaradi povečanega tonusa ekstenzorjev, pogosto so prisotni krik, apneja in utrujenost, saj pride do krčenja glasilk in zapore dihalne poti, obratno pa *atonični napad* pomeni nenadno zmanjšanje mišičnega tonusa, zato pride do nenadnih padcev bolnika, predvsem

otrok. Pri *kloničnem napadu*, ki je značilen za dojenčke in majhne otroke, gre za motnjo zavesti z mišičnimi krči ali z asimetričnim sunkovitim krčenjem mišic. Lahko gre za kombinacijo obeh in govorimo o *tonično-kloničnem napadu (grand mal)*. Bolniki zaznajo avro, poveča se njihova čutna zaznavnost (voh, vid, zvok), zato pogosto začutijo, da se bliža napad. Če napad traja več kot 5 minut oz. mu sledi več zaporednih napadov brez daljših vmesnih prekinitev, govorimo o *epileptičnem statusu (status epilepticus)*. Napad je življenjsko ogrožajoč in zahteva intravensko aplikacijo zdravila (8).

1.1.1 MEHANIZEM EPILEPSIJE

Nevrokemija epileptičnega napada je kompleksna in ne še popolnoma pojasnjena. Epilepsija je posledica plastičnih sprememb v možganih, ki prizadene sproščanje in transport neurotransmiterjev, lastnosti receptorjev in kanalčkov, regulacijo ekspresije genov, sinaptično reorganizacijo in aktivnost astrocitov (11). Vsem oblikam epileptičnih napadov je skupno nenadno prekomerno proženje nevronov. Pride do dolgotrajne depolarizacije membrane živčne celice, v kar so vpleteni napetostno odvisni ionski kanalčki. Odpiranje in zapiranje ionskih kanalčkov je povezano z inhibitornim neurotransmiterjem GABA (γ -aminobutanojska kislina) in ekscitatornim neurotransmiterjem glutamatom. Epilepsija je torej posledica neravnovesja med ekscitatorno in inhibitorno funkcijo (2, 7, 12).

Pri nastanku akcijskega potenciala sodelujejo Na^+ in Ca^{2+} ioni, ki so v večjih koncentracijah zunajcelično, ter K^+ ioni, ki jih je več znotrajcelično. V fazi mirovanja je potencial -50 do -80 mV glede na zunanost celice. Hiperpolarizacija je faza, ko se ta potencial še bolj zniža (-90 mV), in ko se nevron ne more prožiti. V tej fazi se inhibitorni neurotransmiter GABA veže na GABA_A -receptor, ki je sklopljen s Cl^- kanalčki, kar povzroči odprtje kanalčka in vstop Cl^- ionov v celico, ter na GABA_B -receptor, ki sproži izločanje K^+ ionov, kar umiri hiperpolarizacijo in depolarizira sosednje nevrone. Neurotransmiter glutamat se veže na receptorje, na katere se kot agonisti vežejo N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kislina (AMPA) in kainat, ki so sklopljeni s Ca^{2+} kanalčki (2). Vstop Ca^{2+} ionov v celico odpre napetostno odvisne Na^+ kanalčke in Na^+ ioni lahko vstopijo v celico. Nastane faza depolarizacije in potencial se poveča (-40 mV), kar vodi v proženje nevronov (6, 12). Pri zdravih se po vsaki depolarizaciji Na^+ kanalčki vrnejo v neaktivno stanje in za določen čas ostanejo neodzivni za ponovno odprtje, pri epilepsiji pa

se odpornost na proženje zmanjša (2). Kakršna koli okvara ionskih kanalčkov se kaže kot nepopolna repolarizacija celic in nevron je bližje pragu akcijskega potenciala. Povečana ekscitacija nevrona vodi v proženje in nastanek epileptičnega napada (7).

1.1.2 ZDRAVLJENJE EPILEPSIJE IN TERAPEVTSKO SPREMLJANJE ZDRAVIL

V primeru dveh ali več epileptičnih napadov je potrebno farmakološko zdravljenje, izbor protiepileptične učinkovine (PEU) pa se določi glede na tip napada (7). Cilj zdravljenja je doseči mirna obdobja bolezni z eno samo PEU v enem ali dveh odmerkih, z ohranjeno kakovostjo življenja in brez neželenih učinkov (9, 13). Slednjim se je nujno potrebno izogniti, saj gre za dolgotrajno, pogosto doživljenjsko zdravljenje (13). 50 % bolnikov z na novo diagnosticirano boleznijo po uvedbi prvega PEU ne bo imelo več napadov. Če se napad ponovi ali pa bolnik zdravila ne prenaša dobro, je potrebno zdravilo zamenjati, prejšnje zdravilo pa postopoma ukiniti. V 13 % primerov se ob zamenjavi zdravila napadi odpravijo, v primeru tretje zamenjave zdravila pa le v 4 %. Če zdravljenje kljub temu ni uspešno, je potrebno uvesti dve PEU (7, 8, 13). Če po monoterapiji in racionalni duoterapiji, ki jih pacient dobro prenaša, epileptični napadi niso odpravljeni, govorimo o trdovratni epilepsiji (pojavi se v 36 % primerih), za katero moramo premisliti o kirurškem zdravljenju (13).

Načrtovanje zdravljenja in pregled profila neželenih učinkov in interakcij z drugimi zdravili je pomembno, zlasti pri starejših bolnikih, ki uporabljajo pogosto predpisovana lipidotopna zdravila (varfarin, antiaritmiki), pojavijo pa se tudi fiziološke spremembe (spremenjena želodčna sluznica, delovanje črevesja, jeter in ledvic), kar vpliva na presnovo PEU (4, 5, 13). Fiziološke spremembe doletijo tudi nosečnice, katerim se spremeni absorpcija, poveča volumen porazdelitve in zmanjša vezava na plazemske proteine, posledično pa koncentracija PEU ob istem odmerku ne odpravlja epileptičnih napadov (14). V takih primerih, ko se bolnikovo fiziološko stanje spremeni, je primerno terapevtsko spremljanje zdravil (TDM), s katerim potrdimo, ali raven PEU v krvi ostaja znotraj individualne terapevtske koncentracije (15). Prav tako se TDM uporablja pri učinkovinah, ki imajo ozko terapevtsko okno in kjer so možne interakcije z zdravili (16).

1.2 PROTIEPILEPTIČNE UČINKOVINE

Večina zdravil deluje prek več mehanizmov hkrati v različni intenziteti. Bolnikom, ki trpijo napade različnih tipov, ali pa je težko kontrolirati epilepsijo, je potrebno predpisati PEU, ki ima več farmakoloških lastnosti (5).

PEU ne preprečujejo razvoja epilepsije, ampak delujejo zgolj simptomatsko, torej zatrejo napade, ki bi se sicer pojavili. Poznamo dve generaciji PEU, ki sta ločeni z letnico načrtnega odkrivanja PEU (1989), v osnovi pa se razlikujejo v farmakokinetičnih lastnostih in mehanizmu delovanja, kar prikazuje preglednica I (2, 6, 11, 13, 17). Prednost novejših PEU je, da povzročajo manj neželenih učinkov in vstopajo v manj interakcij z drugimi zdravili (6). Od leta 2012 so na trgu tudi PEU 3. generacije, ki se od ostalih razlikujejo po novih mehanizmih delovanja (lakoamid, retigabin in perampanel) in farmakokinetičnih lastnostih (eslikarbazepin) (17).

Preglednica I: Seznam PEU 1. generacije (nad dvojno črto) in 2. generacije (pod dvojno črto)

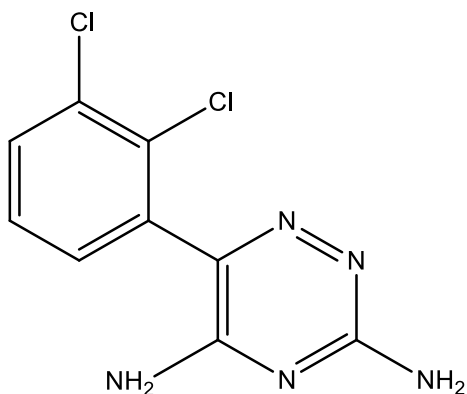
PEU	Mehanizem delovanja				Vezava na proteine [%]	Referenčno območje [mg/L]	Biološka razpolovna doba [h]	Mesto in delež [%] odstranitve
	Na	Ca	Inh	Eks				
etosukcimid		M			0	40–100	30–60	J (80), L (20)
fenitoin	M	Š			70–95	10–20	7–42	J, L
fenobarbital		Š	M ^a	Š ^d	45–60	10–40	75–120	J, L
karbamazepin	M	Š			80	4–12	5–26	J (99)
klobazam			M ^a		83	0,03–0,3	10–50	J
klonazepam			M ^a		86	0,02–0,07	20–80	J (99)
valproat	Š	Š	M	Š	90	50–100	4–12	J (96)
felbamat				M ^e	25	30–60	16–22	J
gabapentin	Š	Š	M		0	2–20	4–6	L (100)
levetiracetam		Š	Š	Š	0	12–46	6–8	J (66), H (34)
lamotrigin	M	Š		Š	55	2,5–15	15–30	J (90)
okskarbazepin	M	Š			40	3–35	4–9	J (70)
pregabalin		M			0	0,9–14,2	6,3	L (99)
tiagabin			M ^c		96	0,02–0,2	4–7	J (98)

PEU	Mehanizem delovanja				Vezava na proteine [%]	Referenčno območje [mg/L]	Biološka razpolovna doba [h]	Mesto in delež [%] odstranitve
	Na	Ca	Inh	Eks				
topiramata	M	M	M	M ^d	9–17	5–20	15–23	L (40-70)
vigabatrin			M ^b		0	0,8–36	4–7	L (95)
zonisamid	M	M			40–60	10–40	24–60	L (70)

M – poglavitni mehanizem, Š – dodatni mehanizem s šibkejšim delovanjem, J – jetra, L – ledvice, / - ni podatka; Na = zaviralci Na⁺ kanalčkov; Ca = zaviralci T-tipa Ca²⁺ kanalčkov; Inh (deluje na inhibitorne mehanizme): ^a = agonisti GABA_A, ^b = zaviralec GABA transaminaze, ^c = zaviralec ponovnega privzema GABA; Eks (deluje na ekscitatorne mehanizme): ^d = blokator AMPA receptorjev, ^e = blokator NMDA receptorjev

Idealna PEU naj bi imela popolno absorpcijo, linearno kinetiko in dolgo biološko razpolovno dobo, ki bi omogočala 1 do 2-kratno dnevno odmerjanje, zaželeno pa je tudi šibkejša vezava na serumske proteine in izločanje skozi ledvice, ker to omogoča lažje titriranje PEU in manj neželenih interakcij z drugimi zdravili. Novejše PEU so bolj ugodne za bolnika, ker se v manjši meri vežejo na proteine, njihova serumska raven pa ni pomembno odvisna od sočasnega jemanja drugih zdravil (13).

1.2.1 LAMOTRIGIN IN NJEGOVE FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI



Slika 1: Kemijska struktura lamotrigina

Lamotrigin (slika 1) je protiepileptična učinkovina 2. generacije in jo strukturno uvrščamo v razred triazinov (3). Njegovo ime po IUPAC nomenklaturi se glasi 3,5-diamino-6-(2,3-diklorofenil)-1,2,4-triazin (7).

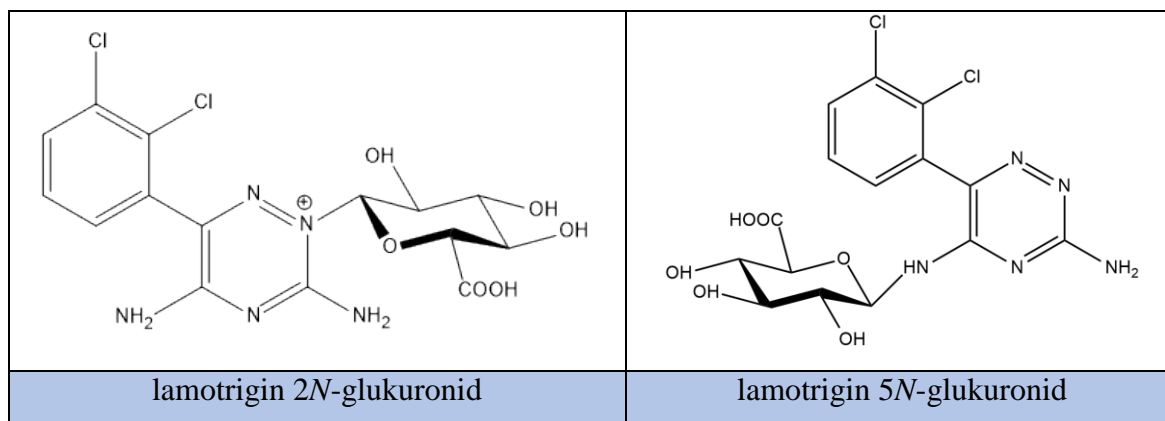
Pri odraslih in mladostnikih od 13. leta naprej je indiciran za zdravljenje epilepsije, natančneje za parcialne in generalizirane napade, vključno s tonično-kloničnimi napadi. Uporablja se kot monoterapija ali kot dodatno zdravilo pri zdravljenju epilepsije. Enako se uporablja tudi za zdravljenje Lennox-Gastautovega sindroma. Pri otrocih in mladostnikih od 2. do 12. leta se lamotrigin kot monoterapija uporablja tudi za zdravljenje tipičnih absenc, za odrasle od 18. leta dalje pa je indiciran še za preprečevanje depresivnih epizod pri bolnikih z bipolarno motnjo ter za akutno zdravljenje maničnih ali depresivnih epizod (18).

Lamotrigin izzove svoj prot epileptični učinek tako, da blokira napetostno odvisne Na⁺ kanalčke in Ca²⁺ kanalčke (1), ter v manjši meri tudi zavira sproščanje glutamata (7). Mehanizem zmanjšanja z glutamatom povzročene ekscitatorne transmisije je neznan (11).

Odmerjanje lamotrigina je odvisno od indikacije in starosti bolnika, v splošnem pa je potrebno ločiti odmerjanje glede na pridružene učinkovine. Pri uvajanju terapije z lamotriginom je potrebno odmerki titrirati, saj se s postopnim uvajanjem izognemo pojavu neželenih učinkov. Med pogoste neželene učinke lamotrigina, ki temeljijo na podatkih iz kontroliranih kliničnih študij, uvrščamo agresivnost in razdražljivost, zaspanost, omotico, tremor, nespečnost, slabost, bruhanje, drisko in utrujenost. Med zelo pogoste neželene učinke uvrščamo glavobol in kožni izpuščaj. Tveganje za izpuščaj je močno povezano z visokimi začetnimi odmerki lamotrigina in prekoračenjem priporočenega odmerka lamotrigina (18).

Lamotrigin je lipofilna šibka baza s pK_a vrednostjo 5.7, ki se po peroralni aplikaciji hitro in popolnoma absorbira z zanemarljivim metabolizmom prvega prehoda (biološka uporabnost lamotrigina je 98 %) (19, 20). Njegova farmakokinetika je linearna do odmerka 450 mg (21). Največjo plazemsko koncentracijo doseže v 1 do 3 urah po peroralni aplikaciji. Hrana v želodcu vpliva na podaljšan čas absorpcije, ne pa na njen obseg (18, 21). V krvi se 55 % absorbirane učinkovine veže na plazemske proteine (17). Pri odraslih je vrednost volumna porazdelitve približno 1,0-1,3 L/kg (21), vendar od študije do študije variira.

Metabolizem lamotrigina poteka v jetrih z N-glukuronidacijo prek uridindifosfat glukuronil transferaze 1A4 (UGT-1A4). Pri tem nastajata njegova dva poglavitna metabolita, 2N-glukuronid (71 % odmerka) in 5N-glukuronid (9 %), ki nista farmakološko aktivna (slika 2). 10 % lamotrigina se z urinom izloči v nespremenjeni obliki (21).



Slika 2: Glavna metabolita lamotrigina

Biološka razpolovna doba ($t_{1/2}$) je 23 do 36 ur. V prisotnosti PEU, ki inducirajo metabolične encime (karbamazepin in fenitoin), se čas izločanja lamotrigina zniža na 13 do 15 ur, prisotnost zaviralca (valproat) pa poveča njegov čas izločanja na 60 ur (21). Z lamotriginom tekmuje za glukuronidacijo (reakcija konjugacije). Ta interakcija zavira metabolizem lamotrigina in poveča njegov razpolovni čas. Višje koncentracije lamotrigina v plazmi lahko vodijo v pojav neželenih učinkov, predvsem kožnega izpuščaja. Zaradi tega se bolnikom, ki že jemljejo valproat, lamotrigin titrira počasneje z nižjim končnim odmerkom. Če pa se bolniku, ki že dolgo jemlje lamotrigin, uvaja valproat, tveganja za pojav kožnega izpuščaja ni (22). Lamotrigin izraža avtoindukcijo (v zmerni meri vzpodbudi svojo lastno presnovo), ki traja 14 dni in je povezana s 17-odstotnim zmanjšanjem plazemskih koncentracij lamotrigina (15, 21).

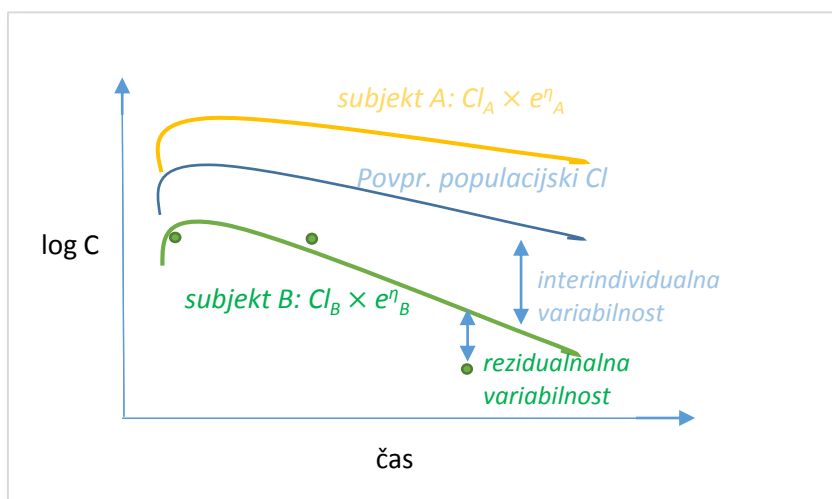
Lamotrigin naj bi povečal koncentracijo metabolita karbamazepina, epoksida, ki je nevrotoksičen, vendar ni dokazano. Kljub temu nastajajo farmakodinamske interakcije med lamotriginom in karbamazepinom, ki se kažejo kot nevrotoksični simptomi (glavobol, slabost, vrtoglavica, ataksija) (7, 22). Ti učinki po zmanjšanju odmerka karbamazepina po navadi izginejo (18).

Farmakokinetične lastnosti lamotrigina se lahko spremenijo, bodisi zaradi posameznikovih sprememb v absorpciji ali vpliva drugih učinkovin na njegov metabolizem. Njegov očistek se močno spremeni med nosečnostjo in v različnih starostnih skupinah. Prav tako ima lamotrigin prag nad katerim so pogosti neželeni učinki. Te lastnosti so razlog za klinično uporabo TDM pri lamotriginu (15, 16).

1.3 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Populacijska farmakokinetika (PFK) je veja klinične farmakologije, katere cilj je kvantitativno oceniti tipične farmakokinetične parametre (hitrostna konstanta absorpcije, volumen porazdelitve, očistek), interindividualno variabilnost v absorpciji, porazdelitvi, metabolizmu in izločanju učinkovine, rezidualno variabilnost v koncentraciji zdravilne učinkovine ter vpliv sočasnih spremenljivk na farmakokinetične parametre. PFK je nadgradnja TDM, uporabljajo jo pri razvoju učinkovine v fazi kliničnih raziskav, pri oblikovanju smernic odmerjanja zdravila in pri predstavitvi znanstvenih dokazov regulatornim organom o kliničnih študijah (23).

Variabilnost je pomemben del varnega in učinkovitega odmerjanja, saj lahko učinkovina z ozkim terapevtskim oknom in visoko variabilnostjo povzroči neželene učinke. PFK lahko prepozna in kvantitativno oceni obseg variabilnosti, hkrati pa poišče vzroke zanje (24). Variabilnosti, ki prispevajo k različnim izidom, se delijo na interindividualne in rezidualne (slika 3). Zaradi interindividualne variabilnosti bo vrednost parametra posameznika drugačna od populacijske vrednosti, saj se bolniki v svojih lastnostih in terapiji med seboj razlikujejo. Rezidualna variabilnost, katere vzroka ne poznamo, pa obsega intraindividualno variabilnost (naključne spremembe v vrednostih parametra bolnika skozi čas), napake v merjenju koncentracij in napake v specifikaciji modela. Slednje nastanejo pri določanju parametrov zaradi matematičnih izračunov, ki so poenostavitve realnosti (23).



Slika 3: Grafični prikaz variabilnosti

Variabilnost je karakterizirana s stalnimi in naključnimi učinki. Stalni učinki so tiste vrednosti parametrov, ki so značilne za celotno populacijo in povejo tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov te populacije. Naključni učinki se nanašajo na napake v merjenju koncentracij učinkovine (analitsko metodo) ali netočen vnos podatkov, mednje pa spadajo intraindividualna variabilnost, časovna variabilnost, interindividualna in rezidualna variabilnost (23, 24).

Do neželenih učinkov zdravila lahko pride zaradi fizioloških sprememb v telesu (npr. pri otrocih ob odraščanju, pri starostnikih zaradi upada fizioloških funkcij, pri nosečnicah), počasnejše presnove, pridruženih boleznih ali zdravljenja z integrirajočimi učinkovinami, ki spreminjajo plazemsko koncentracijo učinkovine. Izmerjena plazemska koncentracija posameznika znotraj referenčnih vrednosti še ne more izključiti toksičnosti ali terapevtskega učinka (25). Pri ugotavljanju optimalnega režima odmerjanja zdravila za individualnega bolnika nam je v pomoč TDM, vendar je zbiranje le-teh včasih oteženo in zamudno. Takrat se zdravnik odloči za odmerjanje glede na bolnikovo klinično sliko, laboratorijske teste in fizično preiskavo. Na podlagi teh podatkov lahko s pomočjo PFK modela določi ustrezen odmerek zdravila, ki ima za posameznega bolnika terapevtski učinek brez neželenih učinkov (23, 24, 26).

PFK se od tradicionalne farmakokinetike razlikuje v tem, da za svoje raziskovanje uporabi bolnike, ki se že zdravijo z učinkovino, medtem ko slednja za raziskavo potrebuje zdrave prostovoljce, katerih lastnosti so čimbolj homogene oz. enake. Zaradi tega se izogne variabilnostim, ki pa jih je potrebno upoštevati pri določitvi terapevtskega odmerka zdravila. Na variabilnosti vplivajo faktorji, ki so lahko demografske (spol, telesna masa, površina telesa, starost, rasa) ali okoljske narave (kajenje, dieta, izpostavljenost onesnaževanju), lahko pa vplivajo tudi genetski fenotip (izoforme citokromov P₄₅₀), interakcije z drugimi učinkovinami, fiziološki in patofiziološki dejavniki (nosečnost, ledvična ali jetrna okvara, druge bolezni), cirkadiani ritem, aderenza ali vpliv hrane. V primerjavi s tradicionalno farmakokinetiko PFK omogoča nižje stroške, saj so preiskovanci že hospitalizirani in jemljejo preiskovano zdravilo, s tem pa je izbor prostovoljcev kratkotrajen proces. Programi za obdelavo podatkov in operiranje z modelom zahteva izkušenega farmakokinetika in statistika, ki je sposoben implementirati matematične in statistične tehnike v oceno parametrov (23).

Populacijski pristop za raziskavo lahko operira tako z bogatimi in bolj informativnimi kot tudi s skopimi podatki ter omogoči raziskovanje posebnih populacij, npr. novorojenčkov, starostnikov, rakavih bolnikov in nosečnic. Količina vzorcev, potrebnih za raziskavo, je tu omejena zaradi etičnih in zdravstvenih razlogov. Ti podatki so precej heterogeni, nenadzorovani in neomejeni z zahtevami raziskav. PFK analiza je zasnovana tako, da združuje heterogene tipe podatkov, pridobljenih iz različnih virov npr. iz različnih študij, centrov, opazovalnih študij, z različno matrico vzorca, tako združevanje podatkov pa poveča moč za identifikacijo nelinearnih ali večprostornih modelov. Združitev rezultatov posameznikov s posebnimi matematičnimi operacijami da oceno populacijskih vrednosti parametrov, s čimer dosežemo upoštevanje vseh variabilnosti (23).

Populacijski farmakokinetični model je poenostavitev sistema v obliki matematičnih enačb in povezav, ki so integrirane v nek program, saj je le tako lahko uporaben. Tak model nam nudi osnovo za razumevanje časovno odvisne izpostavljenosti in odziva učinkovine po tem, ko jo apliciramo v različnih odmerkih in oblikah posameznikom, in zagotovi povprečja ocen parametrov, kot so očistek, volumen porazdelitve in hitrostna konstanta absorpcije. Primarni cilj oblikovanja modela je razviti matematično funkcijo, ki bo opisala časovni potek učinkovine v različnih odmerkih (24).

PFK za razvoj modela uporablja različne programe, med katerimi je nelinearni model mešanih učinkov (NONMEM) najpogostejši. Tak model uporabimo, ko je odvisna spremenljivka (npr. koncentracija) nelinearno povezana s parametri in neodvisno spremenljivko, mešani učinki pa se navezujejo na parametre, ki so isti za vsakega posameznika, torej celotno populacijo (stalni) in parametre, ki se od posameznika do posameznika razlikujejo (naključni) (26). Program NONMEM analizira podatke posameznikov hkrati, a upošteva strukture posameznikovih naključnih učinkov in neravnovesja, ki se pojavijo pri opazovanih podatkih. Vrednosti parametrov se oceni z metodo največjega verjetja, ki izrazi verjetnost, da z izračunom ocene parametrov dobimo dejanske izmerjene vrednosti. Verjetnost ujemanja izračunanih vrednosti z meritvami je izražena kot funkcija vseh definiranih parametrov v modelu, ocene parametrov pa so izbrane tako, da je verjetnost največja. Najboljša ocena populacijskih parametrov se izrazi kot najmanjša vrednost objektivne funkcije (OFV), ki je dvakratnik negativnega logaritma verjetja ($-2\log L$) in nam pove, kako blizu so si vrednosti ocene parametrov s podatki (26, 27).

V procesu razvoja PFK modela je prvi korak določitev osnovnega strukturnega modela, ki opisuje farmakokinetični profil učinkovine. Stohastični oz. statistični del PFK modela ocenjuje variabilnosti naključnih učinkov v opazovanih podatkih in loči med interindividualno in rezidualno variabilnostjo (24). Kovariatni model pa opisuje odvisnost sočasnih spremenljivk oz. kovariat (npr. spol, masa, starost, koterapija) in parametrov stalnih učinkov. Z identifikacijo kovariat lahko razložimo, zakaj pride do variabilnosti v vrednostih parametrov pri posamezniku (26).

1.3.1 META-ANALIZA

Meta-analiza je statistična metoda zbiranja rezultatov sorodnih študij z namenom, da se ugotovitve le teh integrirajo v neko celoto. Študije se po zasnovi in uporabi metod zelo razlikujejo, imajo različne omejitve in pogosto dajo neskladne rezultate, zaradi drugačnih velikosti in števila vzorcev ter bolnikov v populaciji pa ima vsaka študija drugačno meritveno napako. Če upoštevamo le eno študijo, je ta lahko premalo obsežna in preskopa, da bi lahko prišli do nedvoumnih in jasnih ugotovitev, z združevanjem rezultatov več študij hkrati pa dosežemo večjo moč takih rezultatov (28). S tem, ko združujemo bogate in skope podatke, stabiliziramo ocene parametrov (29).

2 NAMEN DELA

V terapiji epilepsije je individualizacija odmerka pomembna. Določitev optimalnega odmerka glede na klinično sliko je včasih otežena, ker se epileptični napadi pojavijo naključno in zaradi neodkrita laboratorijskega označevalca, ki bi napovedal klinično učinkovitost zdravljenja. Nekatere PEU imajo boljšo korelacijo med serumskimi koncentracijami in učinkom zdravila kot pa med odmerkom in učinkom, saj ima veliko bolnikov individualno terapevtsko koncentracijo izven terapevtskega območja učinkovine. Faktorji, kot so na primer starost, spol, jetrna in ledvična funkcija, pridružene bolezni in zdravila, lahko vplivajo na absorpcijo, porazdelitev, metabolizem in izločanje učinkovine.

PEU izražajo večjo intra- in interindividualno variabilnost v farmakokinetiki, zato je uporabnost TDM v takih primerih smiselna. Take lastnosti izkazuje tudi preiskovana učinkovina lamotrigin, še posebej v posebnih skupinah bolnikov, kot so starostniki in nosečnice. Populacijska farmakokinetika kot nadgradnja TDM preučuje vzroke za variabilnost koncentracije zdravila pri posamezniku znotraj ciljne skupine.

Cilj magistrske naloge je razvoj osnovnega populacijskega farmakokinetičnega modela, sestavljenega iz strukturnega in stohastičnega dela, s katerim bomo ugotovili vrednosti farmakokinetičnih parametrov (hitrostno konstanto absorpcije, očistek in volumen porazdelitve) in njihove interindividualne variabilnosti ter rezidualno variabilnost. V ta namen bomo 100 bolnikom z epilepsijo izmerili plazemske koncentracije lamotrigina in njegovega metabolita lamotrigin-2*N*-glukuronida. Pri tem bomo uporabili validirano analizo metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. V razvoj PFK modela in ocenjevanja parametrov bomo vključili rezultate predhodnih raziskav z lamotriginom. V ta namen bomo izvedli meta-analizo in izračunali priorje oz. predhodno vedenje. Izmerjene plazemske koncentracije in rezultate meta-analize bomo združili in z metodo nelinearnega modela mešanih učinkov (NONMEM) postavili osnovni populacijski farmakokinetični model. Ta lahko služi za razvoj končnega modela, ki vključuje vpliv sočasnih spremenljivk na variabilnost lamotrigina.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 OSEBE, VKLJUČENE V ŠTUDIJO

V študijo smo vključili 100 bolnikov, ki imajo diagnosticirano epilepsijo. Podatke bolnikov ter plazemske vzorce smo pridobili na Nevrološki kliniki na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, kjer je potekala klinična raziskava z naslovom »Napovedni dejavniki za variabilnost farmakokinetike lamotrigina pri bolnikih z epilepsijo«. Raziskava je bila odobrena s strani Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije (KME 25p/04/12).

Bolniki so morali izpolnjevati naslednje kriterije za vključitev ali izključitev iz študije:

vključitveni kriteriji:

- bolniki z epilepsijo,
- bolniki, ki se zdravijo z lamotriginom,
- bolniki obeh spolov,
- starejši od 18 let,
- potrjena epilepsija in tip epilepsije,
- bolniki, ki bodo svoj pristanek za sodelovanje in seznanjenost s potekom raziskave potrdili s podpisom informiranega pristanka;

izključitveni kriteriji:

- kronična jetrna obolenja (kronični hepatitis in jetrna ciroza),
- kronična ledvična obolenja ($GFR < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$).

3.1.2 PLAZMA

Bolniki so opravili en obisk, na katerem smo vsakemu odvzeli dva vzorca krvi: enega pred jutranjim odmerkom zdravila lamotrigina, enega pa 2-4 ure po prvem odvzemu krvi. Vzorce krvi smo odvzeli v epruvete z antikoagulantom kalijeve soli etilendiamintetraoacetne kisline

(EDTA). Vzorce bolnikov so predstavljale njihove plazme, ki smo jih shranjevali v zamrzovalniku pri -80°C .

Potrebovali smo tudi plazmo za standarde in kontrolne vzorce (QC-je), ki je morala biti odvzeta od zdravih darovalcev, ki niso prejeli nobenega zdravila. Priskrbel nam jo je Zavod za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

3.1.3 STANDARD IN INTERNI STANDARD

Lamotrigin, $\text{C}_9\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_5$; $M = 256.091 \text{ g/mol}$ (Sequoia research products Ltd, Pangbourne, Velika Britanija).

Lamotrigin-2*N*-glukuronid, $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_6$; $M = 432.22 \text{ g/mol}$ (Sussex Research, Ottawa, Kanada).

Kloramfenikol, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; $M = 323.132 \text{ g/mol}$ (Sequoia research products Ltd, Pangbourne, Velika Britanija).

3.1.4 REAGENTI IN TOPILA

Metanol, CH_3OH , $M = 32.04 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

85-odstotna fosforjeva(V) kislina, H_3PO_4 ; $M = 98 \text{ g/mol}$ (Panreac Quimica, Barcelona, Španija).

Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10 (Millipore Corp., Billerica, MA); specifična upornost $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$, total organic carbon (TOC) 5.

Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 ; $M = 136,09 \text{ g/mol}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija).

3.1.5 NAPRAVE IN PRIBOR

HPLC sistem Agilent technologies 1100 series z UV (Agilent technologies, Santa clara, Kalifornija, Združene države Amerike).

HPLC kolona: Zorbax Eclipse XDB-C8, $4,6 \times 150$ (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike).

HPLC predkolona: Gemini C18 5 μ m (Phenomenex, Torrance, kalifornija, Združene države Amerike).

Hladilnik in zamrzovalnik -20°C (Gorenje, Velenje, Slovenija).

Zamrzovalnik -80°C (Gorenje, Velenje, Slovenija).

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica).

Tehtnica H 54 AR (Mettler, Greifensee, Švica).

pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija).

Elektromagnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska).

Mešalnik Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Ultrazvočna kadička (Bandelin Sonorex, Berlin, Nemčija).

Polavtomatske pipete 2-20 μ l, 20-200 μ l in 200-1000 μ l (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija).

Plastične epruvetke oziroma mikrocentrifugirke (Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim, Nemčija).

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala, presesalna buča, lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M.

3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LAMOTRIGINA V VZORCIH

Koncentracije lamotrigina in lamotrigin-2*N*-glukuronida v plazmi bolnikov smo določali po metodi, ki jo je v magistrski nalogi razvil Boštjan Piltaver (30). Uporabili smo analitsko metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), analite pa smo detektirali z UV detektorjem.

3.2.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Pri analitski metodi potrebujemo tri *primarne osnovne raztopine* (preglednica II): osnovno raztopino lamotrigina (OR_{lamo}), osnovno raztopino lamotrigin-2*N*-glukuronida (OR_{l-glu}) ter osnovno raztopino internega standarda kloramfenikola (OR_{IS}).

Preglednica II: Prikaz priprav primarnih osnovnih raztopin

	OR_{lamo}	OR_{l-glu}	OR_{IS}
m [mg]	1,00	1,05	1,00
V_{MeOH} [mL]	1	1,05	1
c [mg/mL]	1,00	1,00	1,00

Za OR_{lamo} smo v centrifugirko točno natehtali približno 1 mg učinkovine in jo raztopili v ustreznem volumnu metanola do končne koncentracije 1,00 mg/mL. Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4°C. OR_{l-glu} s koncentracijo 1,00 mg/mL smo imeli že pripravljeno po Piltaverju, ki jo je pripravil v zmesi metanola in vode v razmerju 60:40. Raztopino smo hranili v zamrzovalniku pri -80°C. OR_{IS} smo pripravili tako, da smo natehtali približno natančno 1 mg kloramfenikola ter ga raztopili v zmesi metanola in vode v razmerju 60:40 do koncentracije 1,00 mg/mL. Tudi to raztopino smo hranili v hladilniku pri 4°C. Vse raztopine smo raztopili tako, da smo jih 30 sekund mešali na mešalu na ekscenter.

Za pripravo *sekundarnih raztopin* lamotrigina (R_{1-lamo} in R_{2-lamo}), metabolita ($R_{1-l-glu}$ in $R_{2-l-glu}$) in internega standarda (R_{IS}) je bilo potrebno pripraviti z redčenjem primarnih osnovnih raztopin. Postopek prikazuje preglednica III. Vse redčitve smo 30 sekund mešali na mešalu na ekscenter.

Preglednica III: Prikaz priprav sekundarnih raztopin

	R_{1-lamo}	$R_{1-l-glu}$	R_{2-lamo}	$R_{2-l-glu}$	R_{IS}
V_{OR} [μ L]	72,6	72,6	20 R_{1-lamo}	20 $R_{1-l-glu}$	110
V_{MF} [μ L]	37,4	37,4	244	244	990
c [μ g/mL]	660	660	50	50	100

Iz sekundarnih raztopin smo pripravili *delovne standardne raztopine* lamotrigina in metabolita, ki smo jih uporabili za pripravo obogatenih standardnih in kontrolnih plazemskih vzorcev. Njihove koncentracije in postopek priprave prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Prikaz priprave standardnih in kontrolnih raztopin lamotrigina in glukuronida

<i>Delovna standardna raztopina</i>	<i>Uporabljena redčitev</i>	<i>C_{teoretična} [μg/mL]</i>	<i>Volumen R_{lamo} [μL]</i>	<i>Volumen R_{l-glu} [μL]</i>	<i>Volumen MF [μL]</i>
0	/	0	0	0	
1	R ₂	0,25	20	20	404,4
2	R ₂	0,5	20	20	182,2
3	R ₂	1	20	20	71,1
4	st 7	2,5	20 st 7	20	100
5	st 7	5	20 st 7	20	40,0
6	st 8	10	20 st 8	20	20,0
7	R ₁	15	25	25	72,2
8	R ₁	20	20	20	33,3
QC _L	st 3	0,3	20 st 3	20	46,7
QC _M	st 7	5	20 st 7	20	40
QC _H	R ₁	18	20	20	41,5

3.2.2 PRIPRAVA OBOGATENIH STANDARDNIH IN KONTROLNIH PLAZEMSKIH VZORCEV

Plazmo smo najprej pustili na sobni temperaturi toliko, da je odmrznila, nato pa jo 15 sekund mešali na mešalu na ekscenter. Standardne plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 180 μL plazmi dodali 20 μL delovne standardne raztopine lamotrigina in glukuronida ter 20 μL sekundarne raztopine internega standarda (R_{IS}). Celokupni volumen je 220 μL. Raztopine smo mešali 15 sekund na mešalu na ekscenter. Nato smo vsaki raztopini dodali 660 μL ohlajenega metanola ter 1 minuto mešali na mešalu na ekscenter. Vzorce smo nato 10 minut centrifugirali pri 16000 obratih/min na temperaturi 5°C. Nato smo odvzeli 600 μL supernatanta ter ga posušili v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Postopno sušenje je potekalo pri temperaturi termostata 40°C. Suhi ostanek smo nato raztopili v 100 μL mobilne faze ter 20 sekund mešali na mešalu na ekscenter. Zaradi motnosti raztopin smo vzorce še enkrat 10 minut centrifugirali pri 16000 obratih/min na temperaturi 5°C. 70 μL supernatanta smo prenesli v inserte in jih vstavili v vialo. *Kontrolne plazemske vzorce* smo na enak način pripravili pri nizki (QC_L; 0,3 μg/mL), srednji (QC_M; 5 μg/mL) in visoki koncentraciji (QC_H; 18 μg/mL). Analizirali smo tudi *slepi vzorec*, sestavljen iz 180 μL plazme, 20 μL mobilne faze in 20 μL internega standarda, s katerim smo preverjali, da ni prišlo do prenosa med

vzorci ali onečiščenja ter potrdili odsotnost motečih interferenc iz ozadja. Vzorce bolnikov smo pripravili na enak način, le da smo namesto 20 μL standardne raztopine dodali mobilno fazo.

3.2.3 PRIPRAVA MOBILNE FAZE

Za vodni del mobilne faze smo uporabili fosfatni pufer z močjo 25 mM. Ustrezno maso kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) smo raztopili v ustreznem volumnu prečiščene vode. Puftru smo med stalnim mešanjem s fosforjevo(V) kislino uravnali pH na 2,5. Pripravljeno pufersko raztopino smo prefiltrirali, da smo odstranili vse nečistote, nato pa za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko, da smo se znebili plinov in mehurčkov v raztopini. Kot organski del mobilne faze smo uporabili metanol. Razmerje organske in vodne faze je bil 20:80.

3.2.4 POGOJI METODE

Ustrezno ločbo analitov smo dosegli s kolono Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150) in izokratsko mobilno fazo, ki je bila 80 % sestavljena iz 25 mM fosfatnega pufra s pH 2,5 in 20 % iz metanola. Kot interni standard smo uporabili kloramfenikol. Z UV detektorjem smo izmerili najvišje odzive pri valovni dolžini 220 nm. Pretok mobilne faze je bil konstanten pri 1,6 mL/min, temperaturo kolone smo termostatirali na 50°C, v HPLC sistem pa smo injicirali 10 μL vzorca.

3.2.5 UMERITVENA KRIVULJA

Za izračun koncentracije lamotrigina in lamotrigin-2*N*-glukuronida v vzorcih bolnikov smo potrebovali umeritveno krivuljo, ki poda neposredno odvisnost odziva detektorja od koncentracije analita v vzorcu. Umeritveno krivuljo za lamotrigin in lamotrigin-2*N*-glukuronid smo določili dnevno. Za določitev umeritvene krivulje smo uporabili 8 vzorcev z naraščajočimi koncentracijami lamotrigina in lamotrigin-2*N*-glukuronida ter slepi vzorec (standard 0). Pri izračunu parametrov umeritvene krivulje slepega vzorca ne upoštevamo.

Podatke smo analizirali v programu Microsoft Excel s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice. Plazemske koncentracije lamotrigina in metabolita smo izračunali iz dnevnih umeritvenih krivulj.

3.2.6 DELNA VALIDACIJA METODE

Vsaka analizna metoda, ki za svojo kvantitativno določitev učinkovine in/ali metabolitov uporablja biološke vzorce, mora biti validirana. To pomeni, da mora ustrezati določenim kriterijem, ki zagotavljajo, da je metoda zanesljiva in ustrezna ter daje točne in ponovljive rezultate. Evropska agencija za zdravila (EMA) v svojih smernicah navaja naslednje parametre (31, 32): selektivnost, spodnja meja določljivosti (LLOQ), območje in linearnost umeritvene krivulje, točnost, natančnost, vpliv redčitve, vpliv matrice in stabilnost. Ker je metoda za določevanje lamotrigina in njegovega metabolita že validirana, smo izvedli delno validacijo, za katero smo izpolnili sledeče parametre:

- **Točnost:** pove ujemanje izmerjene vrednosti s pravo oz. nominalno vrednostjo. Izrazimo jo z relativno napako, podano v % (enačba 1). Merimo jo s kontrolnim vzorcem (QC) v vsaj treh različnih koncentracijah, ki obsegajo območje umeritvene krivulje, za katere je dovoljena relativna napaka 15 %, razen za spodnjo mejo določljivosti, kjer je dovoljeno odstopanje za 20 %. Določili smo točnost med različnimi dnevi oz. umeritvenimi krivuljami.

$$\text{točnost} = \frac{C_{\text{izmerjena}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100 \quad \text{Enačba 1}$$

- **Natančnost oz. ponovljivost:** pove stopnjo ujemanja dobljenih meritev z nominalno vrednostjo med serijami analiz. Izrazimo jo z relativno standardno deviacijo oz. absolutnim koeficientom variacije v odstotkih (enačba 2). Merimo jo s QC vzorcem, za katere koeficient variacije (CV %) ne sme preseči 15 %, razen za spodnjo mejo določljivosti, kjer je dovoljeno odstopanje za 20 %.

$$CV [\%] = \frac{SD}{C_{\text{povprečna}}} \times 100 \quad \text{Enačba 2}$$

- **Območje in linearnost:** linearnost je sposobnost postopka, da daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita v vzorcu. Zapišemo ga v obliki matematičnega zapisa, ki čim boljše opisuje razmerje med koncentracijo analita in odzivom. Umeritvena (kalibracijska) krivulja mora vsebovati slepi vzorec (plazma), standard 0 (plazma z IS) ter vsaj 6 standardov, ki pokrijejo kalibracijsko območje. 75 % standardov mora ustrezati točnosti in natančnosti. Standard 0 v kriterij ne sme biti vključen.
- **Spodnja meja določljivosti (LLOQ):** je najmanjša koncentracija analita, ki jo z analizno metodo še lahko kvantitativno ovrednotimo in je definirana z ustrezno točnostjo in natančnostjo. Odziv analita pri tej meji mora biti vsaj 5-krat večji od odziva slepega vzorca. Točnost in natančnost sta za LLOQ definirani kot 80-120% od nominalne vrednosti (31, 32).

3.3 META-ANALIZA

Bolnikom smo odvzemali le dva vzorca, enega pred aplikacijo zdravila, drugega pa 2-4 ure po aplikaciji zdravila. Ti podatki niso dovolj informativni, da bi lahko natančno ocenili hitrostno konstanto absorpcije in volumen porazdelitve. Pri PFK bi lahko uporabili podatke (izmerjene plazemske koncentracije) drugih študij, vendar bi bil proces za pridobitev le teh preveč zamuden, zato smo uporabili objavljene rezultate in izvedli meta-analizo.

V bazi znanstvenih člankov in revij *Medline* smo poiskali vse predhodne študije populacijske farmakokinetike lamotrigina. Iskanje smo izvedli s ključnimi besedami »*population pharmacokinetics*« in »*lamotrigine*«. V literaturi smo poiskali tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov K_a , V_d in Cl z njihovimi standardnimi napakami (SE), ki smo jih nato združili z modelom naključnih učinkov, ki upošteva variabilnosti med raziskavami. Označili smo jih z grško črko *theta* θ . Za izračun intervala zaupanja smo uporabili enačbo 3:

$$95\% \text{ IZ} = \theta \pm 1,96 \times SE \quad \text{Enačba 3}$$

V zgornji enačbi IZ pomeni interval zaupanja, θ je ocena parametra v populaciji, SE pa pomeni standardno napako. Pri tipičnih vrednostih parametrov smo izračunali še nezanesljivost oz. natančnost (*uncertainty*) s SE^2 . Enako smo naredili za vrednosti

interindividualne variabilnosti, ki smo jih označili z grško črko *omega* ω . Za te smo računali prostostne stopnje (DF – »degrees of freedom«) po enačbi 4:

$$DF = 2 \left(\frac{\omega}{SE} \right)^2 + 1 \quad \text{Enačba 4}$$

Določili smo tudi utež, ki pove, koliko posamezna študija prispeva k skupnemu rezultatu in je podana v obliki histograma.

Iz združenih podatkov smo z DerSimonian-Laird statističnim modelom naključnih učinkov določili priorje oz. predhodno vedenje (28, 29). Najprej je potrebna obtežitev posamezne raziskave glede na variabilnost rezultatov (izida) raziskave (enačba 5 in 6).

$$w_i = 1/SE^2 \quad \text{Enačba 5}$$

$$D = \frac{\sum (w_i \times \theta)}{\sum w_i} \quad \text{Enačba 6}$$

kjer je D celokupni učinek, w_i utež posamezne raziskave, θ pa učinek posamezne raziskave (oz. vrednost parametra). Kadar obstaja velika variabilnost med rezultati raziskav, je meta-analiza lahko napačna, zato delamo test homogenosti (enačba 7):

$$Q = \sum (w_i (\theta_i - D)^2) \quad \text{Enačba 7}$$

Najprej izračunamo srednjo vrednost in variacijo uteži posameznih raziskav, nato pa še variabilnost med študijami po enačbi 8:

$$\tau^2 = \frac{(Q - (n-1))}{(n-1)(w^\circ - \frac{varW}{n-w^\circ})} \quad \text{Enačba 8}$$

kjer w° predstavlja srednjo vrednost, n pa število raziskav v meta-analizi. Utež (w_i^*) nato izračunamo po enačbi 9:

$$w_i^* = 1 / \left(\tau^2 + \frac{1}{w_i} \right) \quad \text{Enačba 9}$$

Vrednost predhodnega vedenja, ki je naš končni rezultat, dobimo iz vsote produkta uteži in vrednosti parametra iz študije z enačbo 10:

$$prior = \frac{\sum (w_i^* \times \theta)}{\sum w_i^*} \quad \text{Enačba 10}$$

3.4 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

Cilji PFK analize in tip podatkov določajo metodo, izbrano za analizo. Ker smo imeli zbrane podatke bolnikov z različnimi režimi odmerjanja, politerapijo, različnimi laboratorijskimi izvidi, in ker želimo ugotoviti oceno interindividualne variabilnosti in rezidualno variabilnost, je primeren nelinearni model mešanih učinkov (NONMEM).

Za strukturni model lamotrigina smo izbrali enoprostorni model s prvim redom absorpcije in eliminacije, definiran z naslednjimi farmakokinetičnimi parametri: hitrostno konstanto absorpcije (K_a), očistkom (Cl) in volumnom porazdelitve (V_d). Model za lamotigin-2*N*-glukuronid je izpeljan iz modela lamotrigina, zato smo poleg starševskih parametrov (*parent*) lamotrigina ocenjevali še volumen porazdelitve in očistek metabolita.

Za izračun interindividualne variabilnosti smo uporabili enačbe 11–13, kjer je npr. K_{a_i} individualna vrednost parametra in η slučajna razlika ocene parametra pri posamezniku od tipične vrednosti parametra v populaciji (θ). Ker sta V_d in Cl logaritemsko normalno porazdeljena s konstantnim koeficientom variacije ter so njihove vrednosti pozitivne, smo za opis IIV hitrostne konstante absorpcije, očistka in volumna porazdelitve izbrali eksponencialni model.

$$K_{a_i} = \theta_{K_a} \times e^{\eta_{K_a}} \quad \eta_{i,j} = N(0, \omega^2) \quad (\text{Enačba 11})$$

$$Cl_i = \theta_{Cl} \times e^{\eta_{Cl}} \quad \eta_{i,j} = N(0, \omega^2) \quad (\text{Enačba 12})$$

$$V_{d_i} = \theta_{V_d} \times e^{\eta_{V_d}} \quad \eta_{i,j} = N(0, \omega^2) \quad (\text{Enačba 13})$$

Za oceno rezidualne variabilnosti (ε) smo uporabili proporcionalni model (enačba 14). Rezidualne variabilnosti so med seboj neodvisne, pri čemer je njihova porazdelitev normalna s srednjo vrednostjo 0 in konstanto variacije σ^2 .

$$C_{izmerjena\ i,j} = \hat{C}_{napovedana\ i,j} \times (1 + \varepsilon_{Cl}) \quad \varepsilon_{i,j} = N(0, \sigma^2) \quad (\text{Enačba 14})$$

Kot aproksimacijsko metodo smo izbrali metodo FOCE INTER. Predpostavili smo, da so parametri v populaciji porazdeljeni logaritemsko normalno, zato smo morali izračun ocene

variacije (ω^2), ki nam ga je podal program NONMEM, pretvoriti v koeficient variacije (CV). Za izračun variabilnosti, podan s koeficientom variacije v odstotkih, smo uporabili enačbo 15.

$$CV (\%) = \sqrt{e^{\omega^2} - 1} \times 100 \% \quad (\text{Enačba 15})$$

Farmakokinetični model je rezultat združenih ocen parametrov meta-analize (predhodnega vedenja) in ocen parametrov naših podatkov.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZNA METODA

4.1.1 UMERITVENA KRIVULJA IN DELNA VALIDACIJA

Koncentracijo lamotrigina in njegovega metabolita v vzorcih bolnikov smo izračunali s pomočjo umeritvenih krivulj, ki smo jih pripravili dnevno. Točnosti (%) smo izračunali iz razmerja odzivov lamotrigina oz. glukuronida in internega standarda. Rezultate treh dni priprav umeritvenih krivulj z enačbami premic, ki so v obliki $odziv = kx + n$, in linearnost prikazujejo preglednice V-VII.

Preglednica V: Točnost razmerja odzivov (A) standardnih raztopin lamotrigina in njegovega metabolita z enačbami premic za 1. dan

c [$\mu\text{g/ml}$]	$A_{\text{glu}}/A_{\text{IS}}$	$A_{\text{lamo}}/A_{\text{IS}}$	Točnost _{glu}	Točnost _{lamo}
0,25	0,09	0,11	107,2	89,0
0,5	0,20	0,19	118,2	79,7
1	0,34	0,44	100,8	99,9
2,5	0,94	1,14	110,7	106,5
5	1,64	2,21	97,3	103,6
10	3,13	4,07	92,7	95,9
15	5,21	6,44	103,1	101,4
20	6,74	8,45	100,1	99,9
$Y_{\text{glukuronid}} = 0,3367x + 0,0037 \quad R^2 = 0,9978$ $Y_{\text{lamotrigin}} = 0,4221x + 0,0201 \quad R^2 = 0,9993$				

Preglednica VI: Točnost razmerja odzivov (A) standardnih raztopin lamotrigina in njegovega metabolita z enačbami premic za 2. dan

c [$\mu\text{g/ml}$]	$A_{\text{glu}}/A_{\text{IS}}$	$A_{\text{lamo}}/A_{\text{IS}}$	Točnost _{glu}	Točnost _{lamo}
0,25	0,10	0,10	109,2	120,2
0,5	0,19	0,22	108,4	109,3
1	0,40	0,47	114,5	107,6
2,5	0,89	1,16	103,0	101,0
5	1,67	2,24	96,4	95,5
10	3,31	4,69	95,8	98,9
15	5,29	7,20	102,1	100,9
20	/	/	/	/
$Y_{\text{glukuronid}} = 0,3455x + 0,0026 \quad R^2 = 0,9982$ $Y_{\text{lamotrigin}} = 0,4787x - 0,046 \quad R^2 = 0,9995$				

Preglednica VII: Točnost razmerja odzivov (A) standardnih raztopin lamotrigina in njegovega metabolita z enačbami premic za 3. dan

<i>c</i> [µg/ml]	A_{glu}/A_{IS}	A_{lamo}/A_{IS}	Točnost _{glu}	Točnost _{lamo}
0,25	0,07	0,11	87,7	85,9
0,5	0,16	0,24	94,9	96,0
1	0,32	0,50	97,8	98,7
2,5	/	1,28	/	102,5
5	1,63	2,47	100,2	98,7
10	3,32	5,06	101,9	101,4
15	4,85	7,48	99,3	99,8
20	6,51	9,97	99,9	99,8
$Y_{glukuronid} = 0,326x + 0,0241$ $R^2 = 0,9998$ $Y_{lamotrigin} = 0,4994x + 0,0026$ $R^2 = 0,9999$				

Za spodnjo mejo kvantifikacije (LLOQ) smo določili najnižjo točko umeritvene premice, ki zadošča kriterijem (0,25 µg/mL). Rezultate točnosti, dnevne in meddnevne ponovljivosti prikazujeta preglednici VIII in IX.

Preglednica VIII: Točnost, dnevna in meddnevna ponovljivost metode za lamotrigin

	Točnost [%]			Dnevna ponovljivost - CV [%]			Meddnevna ponovljivost - CV [%]
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	
QCI	86,0	112,3	95,0	9,1	4,5	0,2	11,5
QCm	110,4	98,3	98,5	6,6	8,3	0,5	3,4
QCh	105,3	104,2	106,2	4,5	5,7	0,2	8,7

Preglednica IX: Točnost, dnevna in meddnevna ponovljivost metode za lamotrigin-2N-glukuronid

	Točnost [%]			Dnevna ponovljivost - CV [%]			Meddnevna ponovljivost - CV [%]
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	
QCI	113,0	113,3	99,0	3,8	10,4	8,0	10,3
QCm	109,0	102,1	100,0	4,0	8,4	0,1	6,1
QCh	96,8	101,1	100,9	3,3	4,4	0,2	3,8

4.1.2 PLAZEMSKÉ KONCENTRACIJE

Izmerjene koncentracije z delno validirano HPLC metodo smo zbrali v preglednico X. Te podatke smo uporabili za izračun ocen parametrov v populacijskem farmakokinetičnem modelu. Manjkajoči vzorci so 2. odvzemi bolnikov s števkami 1, 2, 5, 62 in 96. Najmanjši izmerjeni koncentraciji lamotrigina (0,70 µg/mL) in lamotrigin-2N-glukuronida (0,32 µg/mL) v vzorcih bolnikov sta veliko večji od LLOQ (0,25 µg/mL).

Preglednica X: Izmerjene plazemske koncentracije lamotrigina in lamotrigin-2N-glukuronida

Št. bolnika	Prvi odvzem		Drugi odvzem		Št. bolnika	Prvi odvzem		Drugi odvzem	
	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]		C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]
1	2,70	0,96	/	/	51	9,16	4,66	11,64	5,35
2	1,91	0,70	/	/	52	1,51	0,51	1,83	0,63
3	3,69	0,48	4,28	0,49	53	4,22	2,53	5,85	2,57
4	1,74	0,52	2,23	0,88	54	10,65	5,61	12,36	5,41
5	8,37	3,85	/	/	55	3,32	8,52	6,14	8,14
6	1,42	0,41	0,91	0,50	56	2,29	2,24	4,18	2,29
7	3,00	1,77	3,99	1,50	57	3,80	5,36	6,39	5,76
8	0,93	0,43	1,47	0,53	58	1,58	1,51	2,86	1,48
9	5,79	3,62	8,50	3,55	59	3,37	2,69	8,65	4,04
10	4,91	3,05	8,34	3,24	60	1,34	0,80	2,44	0,80
11	1,23	0,32	2,82	0,37	61	5,23	2,06	7,17	3,32
12	1,27	1,99	2,50	1,83	62	23,18	5,22	/	/
13	7,70	0,91	10,25	1,15	63	9,97	4,76	11,49	4,23
14	2,66	2,21	3,83	2,07	64	3,97	2,21	4,65	2,08
15	4,80	3,49	6,29	3,58	65	7,13	3,32	9,50	3,47
16	2,16	1,78	2,99	1,84	66	3,24	3,19	5,03	3,25
17	4,58	0,56	4,61	0,68	67	2,26	2,92	5,83	2,81
18	2,40	1,19	3,99	1,30	68	1,08	1,02	10,30	1,08
19	3,12	1,28	3,88	1,09	69	29,49	2,33	12,50	1,46
20	4,83	0,91	6,06	1,05	70	7,23	3,03	4,49	2,00
21	9,21	2,28	8,74	2,32	71	7,31	1,50	8,25	1,41
22	3,08	0,58	3,77	0,64	72	1,41	1,48	1,96	1,42
23	2,53	1,35	2,70	1,63	73	1,94	6,03	3,69	5,75
24	2,21	1,72	4,23	2,17	74	0,89	0,93	2,20	1,58
25	2,04	1,86	4,27	2,29	75	2,78	1,13	2,26	1,17
26	0,70	1,01	1,56	0,95	76	6,71	2,59	9,04	3,17
27	3,23	2,73	5,44	2,67	77	3,23	2,98	4,32	2,36
28	1,34	0,84	1,90	0,84	78	7,25	4,86	9,00	4,78
29	7,17	3,78	9,47	3,57	79	3,83	2,39	5,48	2,44
30	4,59	4,71	6,27	4,36	80	5,11	3,41	6,18	2,20
31	1,66	1,11	2,44	1,09	81	1,66	0,67	2,39	0,83
32	2,63	0,92	2,83	0,56	82	3,86	1,91	4,89	1,78
33	8,44	5,34	11,50	4,52	83	4,39	0,53	4,91	0,53
34	10,14	2,16	6,84	1,62	84	2,70	1,85	4,44	1,85
35	6,75	13,71	10,78	5,78	85	5,68	1,89	6,85	1,83

Št. bolnika	Prvi odvzem		Drugi odvzem	
	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]
36	4,45	0,46	4,92	0,51
37	2,96	1,89	4,53	2,37
38	10,46	6,53	13,55	5,67
39	2,89	0,42	3,28	0,38
40	8,12	1,54	12,41	2,19
41	2,84	1,95	3,88	2,35
42	2,19	0,73	3,71	0,97
43	5,00	1,12	5,14	0,85
44	7,90	2,18	10,62	2,71
45	3,97	4,11	6,83	4,00
46	5,19	2,40	8,26	2,68
47	3,33	2,47	5,68	2,63
48	5,25	2,82	6,71	2,84
49	9,97	2,62	9,53	2,79
50	4,65	0,73	4,99	0,74

Št. bolnika	Prvi odvzem		Drugi odvzem	
	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]	C _{lamo} [µg/ml]	C _{glu} [µg/ml]
86	3,53	3,28	5,47	3,29
87	1,70	0,93	2,64	0,96
88	5,70	2,81	8,41	2,74
89	1,86	0,56	2,35	0,61
90	3,33	1,72	5,27	1,82
91	9,72	5,16	12,97	5,68
92	1,71	0,96	2,41	0,87
93	4,94	3,07	8,78	5,04
94	0,84	0,33	1,29	0,33
95	11,05	3,40	15,75	3,72
96	9,89	5,81	/	/
97	1,66	0,49	2,82	0,45
98	2,77	2,10	4,73	1,78
99	1,20	3,05	2,73	3,66
100	4,26	2,11	5,91	2,17

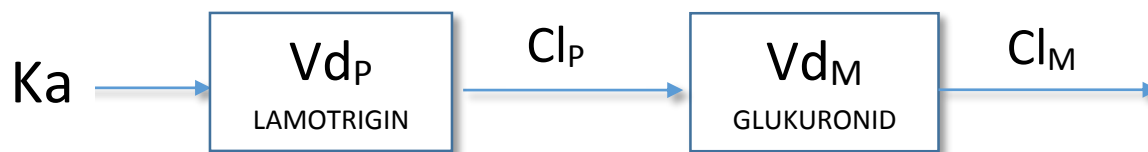
4.2 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Za strukturni model lamotrigina smo izbrali enoprostorni model, kjer osrednji prostor predstavlja plazma (plazemske koncentracije C_p) in opisuje obnašanje lamotrigina v telesu v nekem časovnem obdobju, kjer potekata absorpcija in eliminacija 1. reda. Takšen model predstavlja ADVAN2/TRANS2, kjer ADVAN2 pomeni model s peroralno aplikacijo zdravila, s centralnim prostorom in eliminacijo, TRANS2 pa parametre K_a , V_d in Cl , ki model definirajo (slika 4).



Slika 4: Enoprostorni model za lamotrigin

10 % lamotrigina se izloči v nespremenjeni obliki (17), zato smo predpostavili, da se ves glukuronidira. Tako smo za lamotrigin 2*N*-glukuronid izbrali enoprostorni model, ki je izpeljava iz modela lamotrigina (slika 5). Matematični model smo zapisali z rutino ADVAN6. Poleg parametrov lamotrigina, ki jih imenujemo starševski oz. *parent* parametri (Cl_p , V_{d_p} , K_a), smo ocenjevali parametre lamotrigin-2*N*-glukuronida, Cl_M in V_{d_M} .



Slika 5: Enoprostorni model za lamotrigin-2N-glukuronid

4.2.1 META-ANALIZA

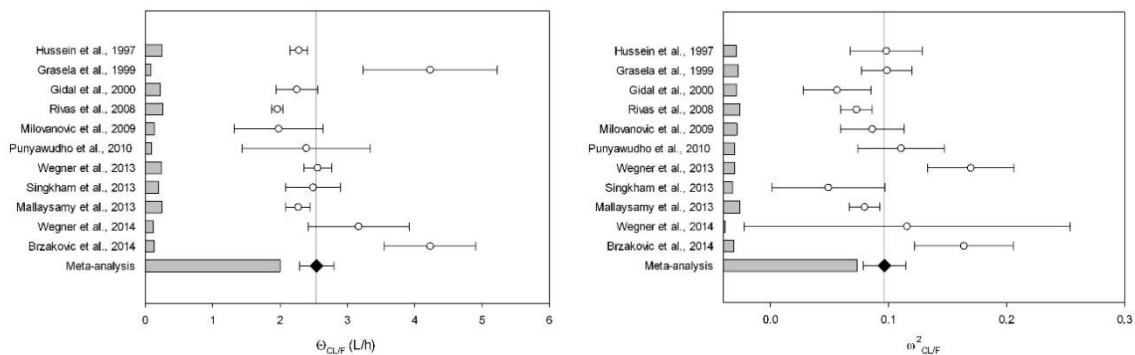
Da smo pri pripravi farmakokinetičnega modela povečali moč naših podatkov, smo jih združili s podatki meta-analize, ki smo jo pripravili iz 11 referenčnih študij (33–43). Iskali smo podatke za tipične vrednosti parametrov (CL, Vd, Ka) ter njihove interindividualne variabilnosti (IIV). Rezultati študij, ki preučujejo populacijsko farmakokinetiko lamotrigina, so zbrani v preglednici XI.

Preglednica XI: Farmakokinetični parametri (RSE) iz referenčnih študij

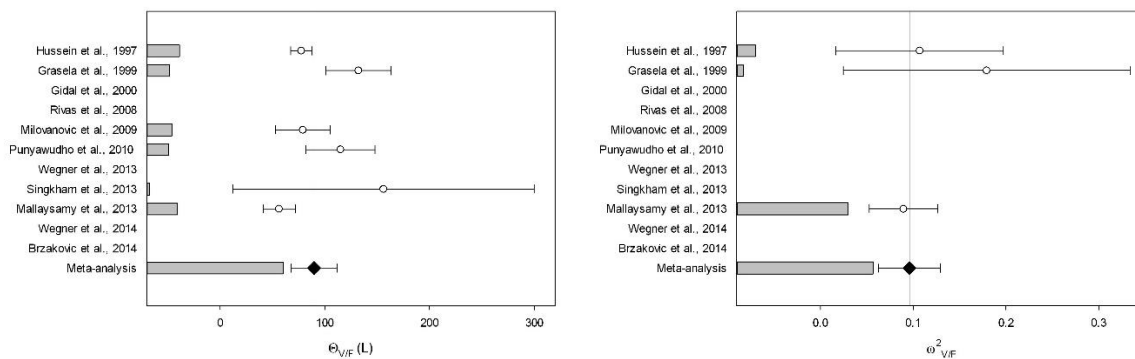
Vir	Število bolnikov	Tipične vrednosti			Interindividualna variabilnost		
		CL (L/h)	Vd (L)	Ka (h ⁻¹)	IIV (CL)	IIV (Vd)	IIV (Ka)
Brzakovic et al., 2014	53	4.23 (8.2)	84 ^a	3.5 ^a	42.2 (13)	/	/
Wegner et al., 2014	23	3.17 (12)	132 ^b	1.3 ^b	35 (61)	/	/
Mallaysamy et al., 2013	95	2.27 (4.1)	56.3 (14)	0.379 (17)	28.8 (8.4)	30.6 (21)	/
Singham et al., 2013	75	2.49 (8.4)	156 (47)	1.3 ^b	22.4 (50)	/	/
Wegner et al., 2013	809	2.56 (4.2)	105 ^b	1.3 ^b	43 (11)	/	/
Punyawudho et al., 2010	148	2.39 (20)	115 (15)	3.5 ^a	34.2 (17)	/	/
Milovanovic et al., 2009c	38	1.98 (17)	78.9 (17)	/	30 (16)	/	/
Rivas et al., 2008	600	1.96 (2.1)	105 ^b	1.3 ^b	27.5 (9.4)	/	/
Gidal et al., 2000d	62	2.25 (7.0)	/	/	24.1 (26)	/	/
Grasela et al., 1999	527	4.23 (12)	132 (12)	1.30 (17)	32.2 (11)	44.3 (44)	77.5 (137)
Hussein et al., 1997	163	2.28 (2.9)	77.4 (6.6)	3.18 (14)	32.1 (16)	33.6 (43)	/
Meta-analiza	/	2.55 (5.1)	89.78 (12.4)	1.54 (40.4)	31.85 (9.5)	31.76 (17.7)	77.5 (137.0)

a- parameter ni ocenjen, izvzet iz literature (Chan et al., 2001), b- parameter ni ocenjen, izvzet iz literature (Grasella et al., 1999), c- uporaba enoprostornega modela z eliminacijo 1. reda in brez absorpcije (Milovanovic et al., 2009), d- uporaba farmakokinetičnega modela za kontinuirano i.v. infuzijo (Gidal et al., 2000), /- ni ocenjeno

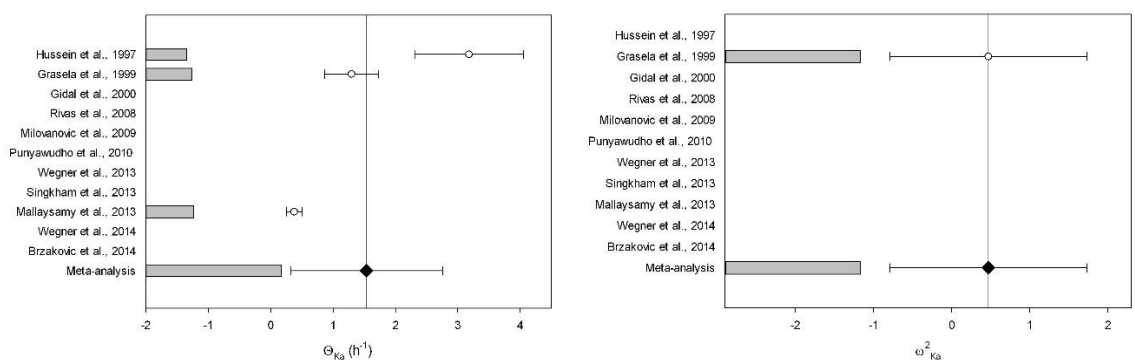
Na grafičnem prikazu tipičnih vrednosti parametrov (θ) in njihovih interindividualnih variabilnosti (ω^2) lahko s histogramom uteži vidimo, koliko posamezna študija prispeva k skupnemu rezultatu meta-analize (slike 6–8).



Slika 6: Grafični prikaz vrednosti očistka in njegove IIV referenčnih študij s 95-odstotnim intervalom zaupanja



Slika 7: Grafični prikaz vrednosti volumna porazdelitve in njegove IIV referenčnih študij s 95-odstotnim intervalom zaupanja



Slika 8: Grafični prikaz vrednosti hitrostne konstante absorpcije in njene IIV referenčnih študij s 95-odstotnim intervalom zaupanja

Za združitev vrednosti parametrov teh študij smo uporabili enačbe 4–9. Rezultate prikazuje preglednica XII.

Preglednica XII: Predhodno vedenje meta-analize

	Tipične vrednosti parametrov (θ)	Standardna napaka (SE)	Natančnost (SE^2)
Cl [L/h]	2,55	0,130	0,0169
Vd [L]	89,8	11,1	123,9
Ka [h^{-1}]	1,54	0,622	0,387
	Interindividualna variabilnost (ω^2)	Standardna napaka (SE)	Število prostostnih stopenj (DF)
Cl [L/h]	0,0966	0,0092	222
Vd [L]	0,0961	0,0169	65
Ka [h^{-1}]	0,470	0,644	2
	CV (%)		
Cl [L/h]	31,8		
Vd [L]	31,8		
Ka [h^{-1}]	77,5		

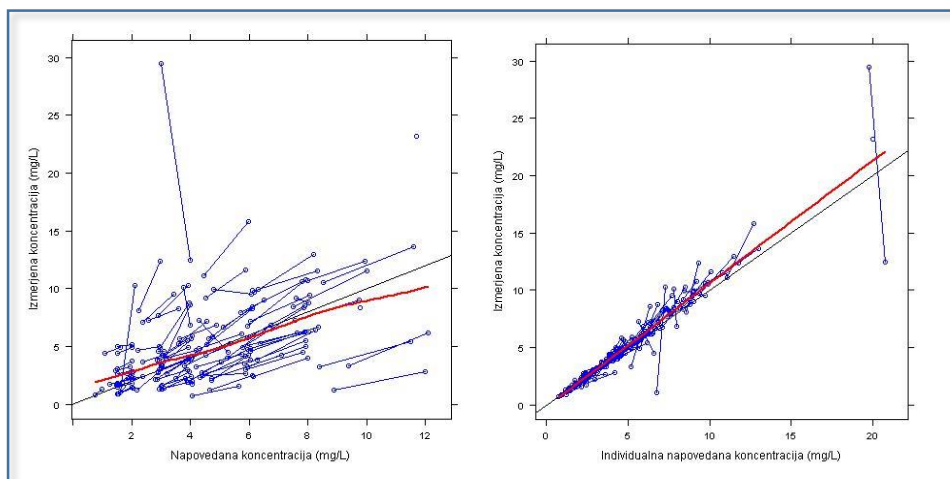
4.2.2 OSNOVNI FARMAKOKINETIČNI MODEL ZA LAMOTRIGIN

Tipične vrednosti parametrov PFK modela za lamotrigin, sestavljenega iz združenih ocen parametrov meta-analize in ocen parametrov naših podatkov, so zbrani v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Rezultati farmakokinetičnega modela za lamotrigin

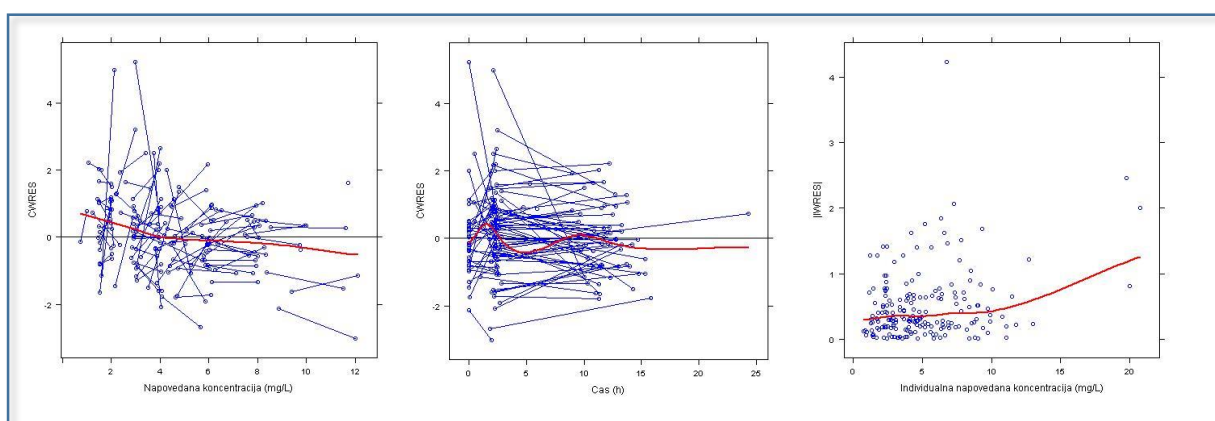
		Tipične vrednosti	95-odstotni interval zaupanja
Geometrijska srednja vrednost (RSE [%])	Ka [h^{-1}]	1,96 (6,42)	1,72;2,21
	Cl [L/h]	2,32 (3,75)	2,15;2,49
	Vd [L]	77,6 (5,43)	69,4;85,9
Interindividualna variabilnost, podana kot CV [%] (RSE [%])	Ka	72,8 (10,7)	63,1;82,0
	Cl	41,4 (9,64)	37,0;45,5
	Vd	30,2 (1,63)	29,7;30,7
Rezidualna variabilnost [%]	Wp	19,8 (17,7)	12,9;26,7

Z analizo diagramov smo primerjali meritve s populacijskimi napovedanimi in individualnimi napovedanimi vrednostmi. S tem ugotovljamo, kako dobro se izmerjene koncentracije prilegajo napovedanim oz. pričakovanim vrednostim. Točke, ki predstavljajo vsako meritev, se morajo čim bolj prilegati črni premici, ki predstavlja točke, ko je izmerjena koncentracija enaka napovedani ($y=x$).



Slika 9: Populacijske napovedane in individualne napovedane vrednosti osnovnega modela lamotrigina

Slika 9 prikazuje odvisnost izmerjenih koncentracij bolnikov od populacijskih napovedanih koncentracij (levi diagram), in od individualnih napovedanih koncentracij (desni diagram). Rdeča črta, ki predstavlja trend podatkov, se dobro prilega črni črti, zato lahko rečemo, da model ustreza.



Slika 10: Utežni reziduali v odvisnosti od napovedane koncentracije

Na diagramu utežnih rezidualov v odvisnosti od populacijske napovedane koncentracije (slika 10 – levi diagram), časa od zadnjega odmerka (sredinski diagram) in od individualne

napovedane koncentracije (desni diagram) se rezultati bolj ali manj prilegajo okoli abscisne osi, kar pomeni, da so strukturni model ter modela za interindividualno in rezidualno napako ustrezni.

4.2.3 OSNOVNI FARMAKOKINETIČNI MODEL ZA LAMOTRIGIN-2N-GLUKURONID

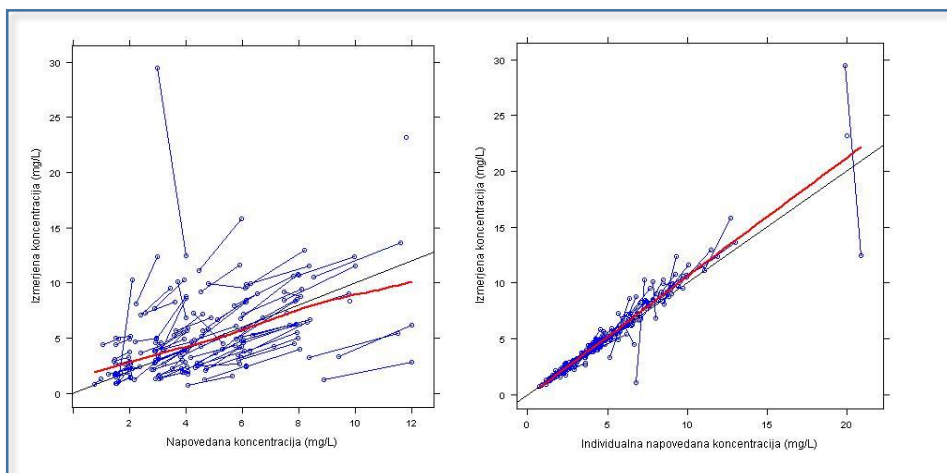
Tipične vrednosti parametrov PFK modela za lamotrigin-2N-glukuronid so prikazane v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati farmakokinetičnega modela za lamotrigin-2N-glukuronid

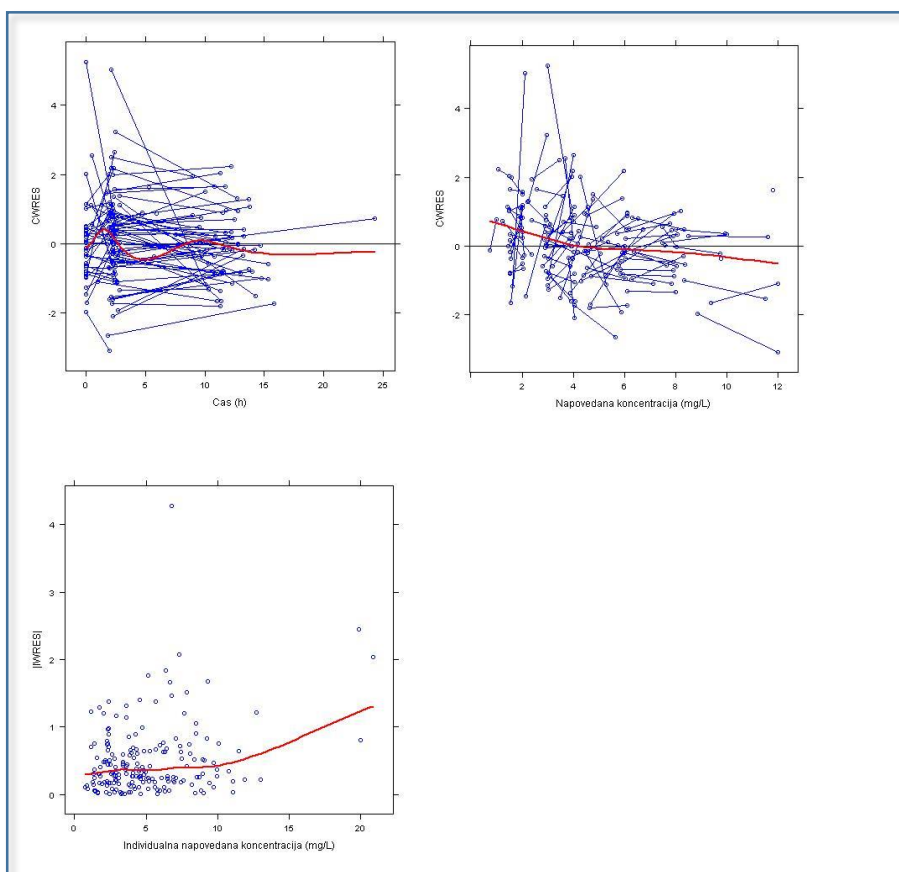
		Tipične vrednosti	95-odstotni interval zaupanja
Geometrijska srednja vrednost (RSE [%])	Ka_p [h^{-1}]	1,71 (12,9)	1,28;2,15
	Cl_p [L/h]	2,32 (3,75)	2,15;2,49
	Vd_p [L]	76,2 (5,81)	67,5;84,9
	Cl_m [L/h]	3,05 (5,24)	2,74;3,36
	Vd_m [L]	71,7 (37,0)	19,7;123,8
Interindividualna variabilnost, podana kot CV [%] (RSE [%])	Ka_p	84,6 (41,8)	32,1;129,3
	Cl_p	41,5 (9,78)	37,0;45,7
	Vd_p	30,2 (1,64)	29,7;30,7
	Cl_m	54,1 (25,1)	37,3;68,4
	Vd_m	/	/
Rezidualna variabilnost [%]	Wp_p	19,6 (16,8)	13,2;26,1
	Wp_m	13,8 (10,5)	11,0;16,7

indeks p pomeni učinkovino in se nanaša na lamotrigin; indeks m pomeni metabolit in se nanaša na lamotrigin-2N-glukuronid

Model za lamotrigin-2N-glukuronid je izpeljan iz modela lamotrigina, zato morajo biti rezultati vrednosti *parent* parametrov (tj. vrednosti parametrov lamotrigina v modelu za glukuronid) enaki vrednostim iz modela za lamotrigin. To dokazujejo diagrami (sliki 11 in 12), ki so enaki diagramom modela za lamotrigin (slika 9 in 10).



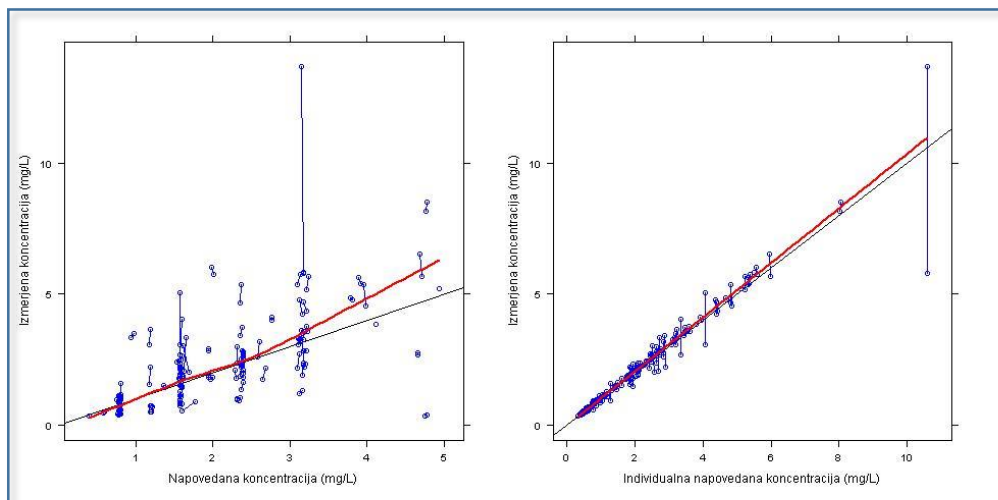
Slika 11: Populacijske napovedane in individualne napovedane vrednosti osnovnega modela (vrednosti *parent-ov*)



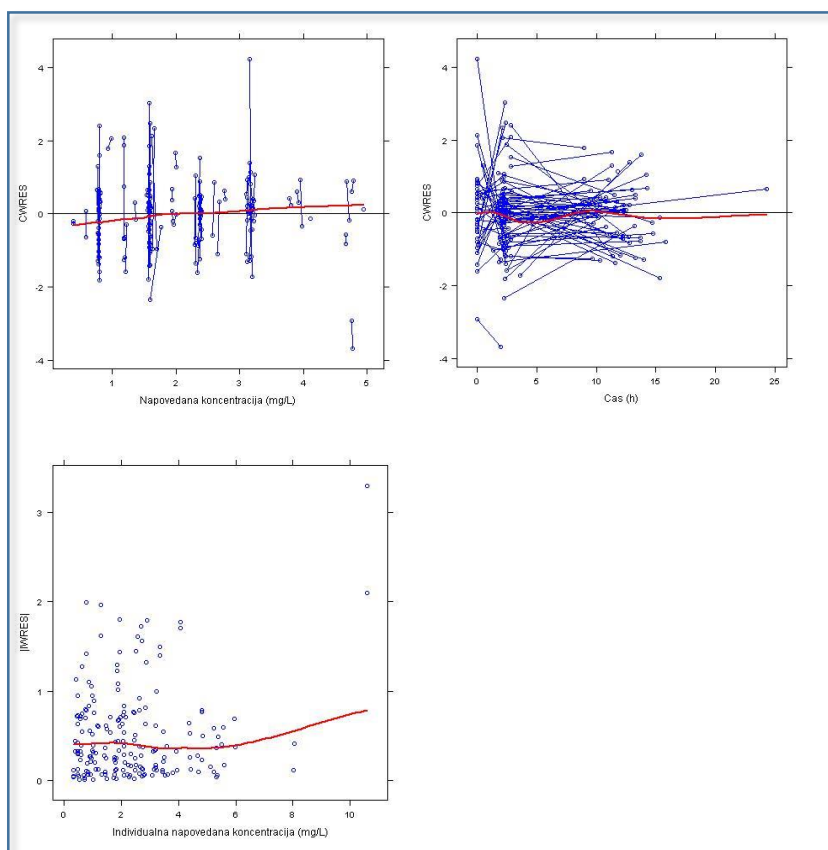
Slika 12: Utežni reziduali v odvisnosti od napovedane koncentracije lamotrigina (vrednosti *parent-ov*)

Slika 13 prikazuje odvisnost izmerjenih koncentracij bolnikov od populacijskih napovedanih koncentracij (levi diagram), in od individualnih napovedanih koncentracij (desni diagram).

Tudi tu se podatki dobro prilegajo napovedanim vrednostim, zato je model za lamotrigin-2*N*-glukurnid ustrezen.



Slika 13: Populacijske napovedane in individualne napovedane vrednosti osnovnega modela za lamotrigin-2*N*-glukuronid



Slika 14: Utežni reziduali v odvisnosti od napovedane koncentracije lamotrigin-2*N*-glukuronida

Na diagramih utežnih rezidualov za glukuronid vidimo, da se rezultati bolj ali manj prilegajo okoli abscisne osi (slika 14), kar pomeni, da je model za lamotrigin-2*N*-glukuronid ustrezen.

5 RAZPRAVA

Lamotrigin je protiepileptična učinkovina (PEU) in se klinično uporablja za zdravljenje parcialne in generalizirane epilepsije. Med bolniki dosega visoko variabilnost v terapevtskem odmerku in ima različno farmakokinetiko, še posebej pri bolnikih, ki poleg lamotrigina jemljejo druge PEU, ki vplivajo na njegov metabolizem (44).

Pri bolnikih, npr. nosečnicah in starostnikih s pridruženimi boleznimi, ki se jim spremenijo fiziološke značilnosti, kot so spremenjena prepustnost membrane v prebavnem traktu, sočasna terapija z induktorji ali zaviralci jetrnih encimov, jetrne in ledvične okvare, se plazemske koncentracije PEU lahko spremenijo. Govorimo o razlikah v farmakokinetiki PEU, ki izražajo močnejše intra- in interindividualne variabilnosti, med katerimi je tudi lamotrigin. Tako nihanje v koncentracijah PEU je pri bolezni, kot je epilepsija, problematično, saj lahko povzročijo pojav epileptičnih napadov ali neželenih učinkov. Prilagajanje odmerka zgolj na osnovi klinične slike je težko in nezanesljivo. V teh primerih bi bilo smiselno uporabiti terapevtsko spremljanje koncentracij (TDM), saj bi le to lahko pomagalo zdravniku ugotoviti ali se je pri bolniku koncentracija spremenila in bi bilo potrebno odmerek prilagoditi. Prav tako je za PEU značilno, da klinični učinek bolje korelira s koncentracijo učinkovine v plazmi kot pa z odmerkom. Kljub poznanim referenčnim območjem PEU nekateri bolniki za najboljši klinični odziv potrebujejo koncentracije PEU, ki niso nujno v območju referenčnih vrednosti. Terapevtska učinkovitost PEU je odvisna od dosežene individualne terapevtske plazemske koncentracije, ki jo lahko določimo s TDM.

TDM je pomembno orodje za optimizacijo terapije. Racionalna uporaba TDM v vsakdanji klinični praksi pa velikokrat ni možna, ker je draga, zamudna in invazivna za bolnike. Hkrati želimo ugotoviti katere sočasne spremenljivke vplivajo na spremembe plazemskih koncentracij zdravila. V tem primeru je potrebna nadgradnja TDM s populacijsko farmakokinetiko (PFK).

PFK omogoča razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela, s katerim lahko vnaprej napovemo, kaj vpliva na absorpcijo, metabolizem in izločanje PEU pri posamezniku ter v kolikšni meri. Ocenimo lahko vrednosti farmakokinetičnih parametrov (očistek, hitrostno konstanto absorpcije in volumen porazdelitve), s katerimi lahko prilagodimo odmerek na osnovi individualne terapevtske koncentracije.

Za TDM je smiselna uporaba analiznih metod, ki so hitre, specifične in sposobne analizirati več PEU hkrati (45). Manj invazivni odvzemi z bolnikom bolj prijaznimi tehnikami in manjši volumni vzorcev bolnikov so bolj zaželeni. Razvoj analiznih metod gre v smeri uporabe drugih bioloških vzorcev, npr. sline (46) ali posušenih krvnih madežev (DBS) na papirčkih, za katere so potrebni majhni volumni vzorca, ki jih lahko pripravijo bolniki sami (17).

Najpogosteje uporabljen postopek za pripravo vzorcev je obarjanje, ki smo ga za pripravo vzorcev uporabili tudi v magistrski nalogi. Z dodatkom ohlajenega metanola plazmi smo denaturirali proteine, s tem spremenili njihovo strukturo ter vezavno mesto za lamotrigin, zato se je le ta lahko sprostil. Številne metode zahtevajo daljše ekstrakcijske postopke in kompleksne kromatografske pogoje, kar je lahko časovno potratno. Za pripravo vzorcev se uporablja tudi ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE – »*solid-phase extraction*«), ki da večji izkoristek in zmanjša ekstrakcijo motečih spojin biološke matrice (45), vendar je postopek bolj zamuden kakor obarjanje proteinov z metanolom. Zamudnost postopka povzročijo številne faze v katerih aktiviramo, ekvilibriramo trdno fazo, nato naneseemo vzorec, trdno fazo čistimo s topili in nazadnje še speremo naš analit iz trdnega nosilca. Vzorce je, enako kot v našem postopku, potrebno posušiti v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku in vzorce raztopili v mobilni fazi (45, 47).

Za določanje lamotrigina se najpogosteje uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), za detekcijo pa se uporablja UV detektor (44–46). Kombinirane metode tekočinske kromatografije z zaporedno vezanim masnim spektrometrom omogočajo večjo občutljivost in selektivnost, za uporabo v kliničnem laboratoriju pa jo omejuje visoka cena instrumenta in tehnološke zahteve (30).

V magistrski nalogi sta priprava vzorcev in čas analize v primerjavi s SPE hitrejša, vendar za rutinsko izvedbo TDM v kliničnem laboratoriju še vedno predolga. Obstajajo metode (44), ki potrebujejo krajši postopek priprave vzorcev in hitrejšo analizo lamotrigina, hkrati pa omogočajo detekcijo večih PEU hkrati. Kljub temu metoda, uporabljena v magistrski nalogi, ponuja številne prednosti: priprava vzorca je kljub temu enostavna in cenejša v primerjavi s SPE ter še vedno dovolj občutljiva in specifična za merjenje plazemskih koncentracij lamotrigina in njegovega metabolita. Metoda omogoča določevanje metabolita, kar je prednost pred drugimi, saj nam informacije o koncentraciji metabolita omogočajo

določitev hitrosti in obsega procesa, ki je v številnih fizioloških in patoloških stanjih spremenjen.

5.1 VALIDACIJA METODE

Za analizno metodo smo izvedli delno validacijo, ker smo postopek analize izvedli po validirani analizni metodi, ki jo je v diplomski nalogi razvil Boštjan Piltaver. Metodo smo delno validirali po smernicah EMA in je obsegala določitev linearnosti, točnosti, ponovljivosti in LLOQ. Z validacijo smo potrdili zanesljivost in ustreznost metode.

Metoda je linearna v območju 0,25–20 µg/mL in pokriva celotno terapevtsko referenčno območje za lamotrigin (2,5 – 15 µg/mL). Vrednosti determinacijskih koeficientov (R^2) so bile vse dni višje od 0,997 za lamotrigin in lamotrigin-2*N*-glukuronid, zato lahko potrdimo, da je metoda linearna.

Točnost metode je za vse tri dni validacijskega postopka ob upoštevanju internega standarda ustrežna za obe spojini in ne odstopa za več kot 15 %. Pri izračunu točnosti smo upoštevali odzive internega standarda, saj le ta zmanjša vpliv napak inštrumenta ali napak, ki jih naredimo med pripravo vzorca. Točnost lamotrigina v vseh treh dneh ne odstopa za več kot 10 %, razen QC_L , ki prvi dan odstopa za 14 %, kar pa je še vedno znotraj validacijskih zahtev. Razlog temu lahko pripisujemo koncentraciji QC_L , ki je blizu LLOQ, za katere pa smernice dovoljujejo večje odstopanje. Točnost za lamotrigin-2*N*-glukuronid ne odstopa za več kot 9 %, razen za QC_L , ki prvi dan odstopa za 13 %, kar še vedno ustreza smernicam.

Določili smo dnevno in meddnevno ponovljivost, ki smo jih izrazili s koeficientom variacije (%). Najvišje vrednosti ponovljivosti imajo QC_L (0,3 µg/mL), ki pa so blizu vrednosti LLOQ, za katere je dovoljeno večje odstopanje. Kljub temu dnevna ponovljivost ustreza smernicam validacijske metode in ne odstopa za več kot 15 %, saj je največji CV 9,1 % za lamotrigin in 10,4 % za glukuronid. Najvišja vrednost meddnevne ponovljivosti za lamotrigin je 11,5 % in za glukuronid 10,3 %.

Spodnjo mejo določljivosti (LLOQ) smo za lamotrigin in lamotrigin-2*N*-glukuronid določili koncentracijo 0,25 µg/mL. Ta meja je omogočala kvantitativno ovrednotenje in je ustrezala točnosti in natančnosti.

5.2 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

5.2.1 META-ANALIZA

Da smo povečali moč naših podatkov, smo izvedli meta-analizo iz 11 sorodnih populacijskih farmakokinetičnih študij za lamotrigin in zbrali podatke o vrednostih parametrov (K_a , Cl , V_d), interindividualne variabilnosti in točnosti (RSE). Vse študije so ocenjevale tipično vrednost očistka (θ_{Cl}) in njegovo IIV (ω_{Cl}). Tipična vrednost V_d je bila ocenjena le v 6 študijah, medtem ko so v ostalih študijah uporabili vrednost izvzeto iz literature. Vrednost K_a je bila ocenjena v treh študijah, v ostalih pa izvzeta iz literature. V študiji, ki so jo izvedli Milovanovic idr. (37), so uporabili enoprostorni model s 1. redom eliminacije brez absorpcije, v študiji, ki so jo izvedli Gidal idr. (35), pa farmakokinetični model z i.v. infuzijo.

S pomočjo Der-Simonian-Laird statistične metode smo izračunali tipične vrednosti parametrov (SE) oz. predhodno vedenje, ki za hitrostno konstanto absorpcije znaša $1,54 \text{ h}^{-1}$ (0,622), za očistek $2,55 \text{ L/h}$ (0,13) in za volumen porazdelitve $89,8 \text{ L}$ (11,1). Njihove IIV so za očistek 31,8 %, za volumen porazdelitve 31,8 % in za hitrostno konstanto absorpcije 77,5 %. Vrednost IIV za K_a ima zelo majhno vrednost prostostnih stopenj, kar nam pove, da njena ocena ni zanesljiva, saj je zgolj ena študija ocenjevala IIV za parameter K_a .

5.2.2 POPULACIJSKI FARMAKOKINETIČNI MODEL

Za razvoj modela smo uporabili metodo nelinearnega modela mešanih učinkov. Za osnovni strukturni model smo izbrali enoprostorni model z absorpcijo in eliminacijo 1. reda za lamotrigin in lamotrigin-2*N*-glukuronid. V razvoju osnovnega modela smo ocenjevali vrednosti parametrov očistka, volumna porazdelitve in hitrostno konstanto absorpcije, njihove interindividualne variabilnosti ter rezidualno variabilnost.

V modelu za lamotrigin je srednja vrednost (RSE) hitrostne konstante absorpcije $1,96 \text{ h}^{-1}$ (6,42), očistka $2,32 \text{ L/h}$ (3,75) in volumna porazdelitve $77,6 \text{ L}$ (5,43). Ocena interindividualne variabilnosti (RSE) za očistek je 41,4 % (9,64), za hitrostno konstanto absorpcije 72,8 % (10,7) in za volumen porazdelitve 30,2 % (1,63). Ocena rezidualne napake je zmerna (19,8 %), kar pomeni, da so napake v analizi metodi in v postavitvi modela minimalne.

V modelu za lamotrigin-2*N*-glukuronid so vrednosti parametrov in IIV *parenta* podobne vrednostim v modelu za lamotrigin. Ocena rezidualne napake je majhna (13,8 %), tako da postavitev modela ustreza. Srednja vrednost (RSE) očistka glukuronida je 3,05 L/h (5,24), njegova IIV pa 54,1 % (25,1). Srednja vrednost volumna porazdelitve glukuronida je 71,7 L (37,0). Vrednosti IIV za Vd metabolita zaradi premalo informativnih podatkov nismo mogli oceniti. Z ocenjevanjem parametrov metabolita smo želeli ugotoviti, ali vpliva na ocene parametrov lamotrigina. Vrednosti očistka in volumna distribucije se nista bistveno spremenili. Ka se je spremenila, vendar ob upoštevanju njene RSE razlika ni velika.

Osnovni model, ki smo ga razvili, lahko služi za nadaljnji razvoj v končni model, s katerim lahko ugotovimo, kateri dejavniki oz. sočasne spremenljivke vplivajo na variabilnost v farmakokinetiki lamotrigina. S pomočjo farmakokinetičnega modeliranja lahko v primeru fizioloških sprememb bolnika predvidimo farmakokinetiko lamotrigina in lažje prilagodimo oz. določimo odmere, ki je zanj varen in učinkovit.

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo postavili osnovni populacijski farmakokinetični model, ki nam je lahko v pomoč pri prilagajanju odmerka na osnovi izmerjenih ocen farmakokinetičnih parametrov in individualne terapevtske koncentracije.

Plazemske koncentracije lamotrigina v plazemskih vzorcih bolnikov smo izmerili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), detekcijo pa izvedli z UV detektorjem. Pripravo plazemskih vzorcev smo izvedli z obarjanjem z ohlajenim metanolom. Analizno metodo smo delno validirali po smernicah Evropske agencije za zdravila. Metoda je linearna v območju 0,25–20 µg/mL, točna (86–113,3 %) in ponovljiva s koeficientom variacije (0,1–10,4 %).

Moč naših podatkov smo okrepili z meta-analizo. S pomočjo Der-Simonian-Laird statističnimi enačbami smo iz podatkov izračunali predhodno vedenje oz. priorje: za hitrostno konstanto absorpcije 1,54 h⁻¹, za očistek 2,55 L/h in za volumen porazdelitve 89,8 L.

S pomočjo izmerjenih plazemskih koncentracij in predhodnega vedenja smo s pomočjo programa NONMEM razvili osnovni populacijski farmakokinetični model, s katerim smo ocenili tipične vrednosti parametrov, njihove interindividualne variabilnosti (IIV) ter rezidualno variabilnost. Tipične vrednosti farmakokinetičnih parametrov za lamotrigin so: hitrostna konstanta absorpcije 1,96 h⁻¹ z 72,8 % IIV, volumen porazdelitve 77,6 L z 30,2 % IIV, in očistek 2,32 L/h z 41,4 % IIV. Rezidualna napaka modela za lamotrigin znaša 19,8 %. Srednja vrednost očistka glukuronida je 3,05 L/h z IIV 54,1 %. Srednja vrednost volumna porazdelitve za glukuronid je 71,7 L, njegove IIV pa zaradi premalo podatkov ni bilo možno oceniti. Rezidualna variabilnost za glukuronid znaša 13,8 %.

Osnovni populacijski farmakokinetični model je primeren je za nadgradnjo v končni model s postopnim vključevanjem sočasnih spremenljivk, s katerim ugotovimo vpliv kovariat na farmakokinetiko lamotrigina.

7 VIRI

1. Löscher W, Klitgaard H, Twyman R, Schmidt D: New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature Reviews* 2013; 12: 757–76.
2. Rahman A, Md F, Akhtar AJ, Mateen SA: Current therapeutic approaches to epilepsy. *International Journal of Pharmacy & Life Science* 2013; 4 (1): 2282–7.
3. Perucca E: Clinical Pharmacokinetics of New-Generation Antiepileptic Drugs at the Extremes of Age: An Update. *Clinical Pharmacokinetics* 2013; 52: 627–45.
4. Čebular B, Zgonc V: Posebnosti zdravljenja epilepsije pri starejših. *Zdravstveni vestnik* 2007; 76: 473–9.
5. Brodie MJ, Kwan P: Staged approach to epilepsy management. *Neurology* 2002; 58 (5): S2–S8.
6. Rang HP, Dale MM: Rang and Dale's Pharmacology, 7th Edition, Edinburgh, Elsevier/Churchill Livingstone, 2011: 540–52.
7. Walker MC, Patsalos PN: Clinical Pharmacokinetics of New Antiepileptic Drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 1995; 67 (3): 351–84.
8. Waller DG, Renwick AG, Hillier K: Medical Pharmacology & therapeutics, 2nd Edition, Elsevier Saunders, Edinburgh, 2005: 305–17.
9. Berg AT, Scheffer IE: New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia* 2011; 52(6): 1058–62.
10. Shorvon SD: The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52(6): 1052–7.
11. Kr Shashi P, Jangra MK, Yadav AK: Herbal and synthetic approaches for the treatment of epilepsy. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 2014; 4(1): 43–52.
12. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 384-407.
13. Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75: 379–88.
14. Battino D, Tomson T: Management of epilepsy during pregnancy. *Drugs* 2007; 67 (18): 2727–46.

15. Krasowski MD: Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 1909–35.
16. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois B, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008; 49(7): 1239–76.
17. Milosheška D, Grabnar I, Vovk T: Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015.
18. GSK: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Lamictal. Dostopno prek: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7FC511F826398772C12579C2003F5CCF/\\$file/s-015068.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7FC511F826398772C12579C2003F5CCF/$file/s-015068.pdf) (april 2015).
19. Cheng CL, Chou CH, Hu O: Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 2005; 817: 199–206.
20. Matar KM, Nicholls PJ, Bawazir SA, Al-Hassan MI, Tekle A: A rapid liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 17: 525–31.
21. Patsalos PN: Properties of Antiepileptic Drugs in the Treatment of Idiopathic Generalized Epilepsies. *Epilepsia* 2005; 46(9): 140–8.
22. Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, M. van Rijn C: The Importance of Drug Interactions in Epilepsy Therapy. *Epilepsia* 2002; 43(4): 365–85.
23. Ette EI, Williams PJ: Population Pharmacokinetics I: Background, Concepts, and Models. *The Annals of Pharmacotherapy* 2004; 38: 1702–6.
24. Mould DR, Upton RN: Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2012; 1(6):
25. Petre M, Strah A: Spremljanje plazemskih koncentracij antiepileptikov. *Farmacevtski vestnik* 2015; 66(1): 35–41.
26. Mould DR, Upton RN: Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development – Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 2013; 2(38):

27. Ette EI, Williams PJ: Population Pharmacokinetics II: Estimation Methods. *The Annals of Pharmacotherapy* 2004; 38: 1907–15.
28. DerSimonian R, Laird N: Meta-Analysis in Clinical Trials. *Controlled Clinical Trials*, 1986; 7(3): 177–88.
29. Gislekog PO, Karlsson MO, Beal SL: Use of Prior Information to Stabilize a Population Data Analysis. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2002; 29(5/6): 473–505.
30. Piltaver B: Določanje plazemskih koncentracij lamotrigina in njegovih metabolitov z validirano metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2012.
31. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicine Agency – Comitee for Medicinal Products for Human Use, London, 2012.
32. González O, Blanco ME, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui MI, Alonso RM: Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with special focus on the non-well defined parameters limit quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A* 2014; 1353: 10–27.
33. Hussein Z, Posner J: Population pharmacokinetics of lamotrigine monotherapy in patients with epilepsy: retrospective analysis of routine monitoring data. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 43: 457–65.
34. Grasela TH, Fiedler-Kelly J, Cox E, Womble GP, Risner ME, Chen C: Population pharmacokinetics of lamotrigine in adjunctive therapy in adults with epilepsy. *Journal of Clinical Pharmacology* 1999; 39: 373–84.
35. Gidal BE, Gail DA, Rutecki PR, Shaw R, Lanning A: Lack of an effect of valproate concentration on lamotrigine pharmacokinetics in developmentally disabled patients with epilepsy. *Epilepsy Research* 2000; 42: 23–31.
36. Rivas N, Santos Bupelga D, Elger CE, Santos-Borbujo J, Otero MJ, Domínguez-Gil A, Garcia MJ: Population Pharmacokinetics of Lamotrigine with Data from Therapeutic Drug Monitoring in German and Spanish Patients with Epilepsy. *Therapeutic Drug Monitoring* 2008; 30(4): 483–9.
37. Milovanovic JR, Jankovic SM: Population pharmacokinetics of lamotrigine in patients with epilepsy. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2009; 47(12): 752–60.

38. Punyawudho B, Ramsay RE, Macias FM, Rowan J, Collins JF, Brundage RC, Birnbaum AG: Population Pharmacokinetics of Lamotrigine in Elderly Patients. *Journal of Clinical Pharmacology* 2008 48: 455–63.
39. Wegner I, Wilhelm AJ, Sander JW, Lindhout D: The impact of age on lamotrigine and oxcarbazepine kinetics: A historical cohort study. *Epilepsy & Behavior* 2013; 29: 217–21.
40. Singkham N, Towanabut S, Lertkachatarn S, Punyawudho B: Influence of the UGT2B7-161C>T polymorphism on the population pharmacokinetics of lamotrigine in Thai patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2013; 69: 1285–91.
41. Mallaysamy S, Johnson MG, Rao PGM, Rajakannan T, Bathala L, Arumugam K, Hasselt JGC, Ramakrishna D: Population pharmacokinetics of lamotrigine in Indian epileptic patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2013; 69: 43–52.
42. Wegner I, Wilhelm AJ, Lambrechts DAJE, Sander JW, Lindhout D: Effect of oral contraceptives on lamotrigine levels depends on comedication. *Acta Neurologica Scandinavica* 2014; 129: 393–8.
43. Brzaković B, Vučićević K, Vežar Kovačević S, Miljković B, Prostran M, Martinović Ž, Pokrajac M: Pharmacokinetics of lamotrigine in paediatric and young adult epileptic patients – nonlinear mixed effects modelling approach. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2014; 70: 179–85.
44. Angelis-Stoforidis P, Morgan DJ, O'Brien TJ, Vajda F: Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1999; 727: 113–118.
45. Franceschi L, Furlanut M: A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacological Research* 2005; 51: 297–302.
46. Incecayir T, agabeyoglu I: Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma and saliva. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science* 2010; 7(3): 213–224.
47. Guštin B: Razvoj analiznih metod za terapevtsko spremljanje koncentracij lamotrigina in njegovega metabolita 2-N-glukuronida v plazmi in krvnih madežih. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2014.