

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

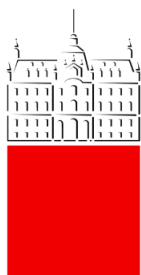
MATEJA PRETNAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI
PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MATEJA PRETNAR

**POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA MIDAZOLAMA
PRI OTROCIH Z BRONHIOLITISOM**

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

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Za vse strokovne usmeritve, pomoč in nasvete pri izvedbi in pisanju magistrske naloge se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Mojci Kerec Kos in izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju. Prav tako se za pomoč pri kliničnem delu raziskave zahvaljujem izr. prof. dr. Štefanu Grosku ter asist. mag. Mirjani Miksić.

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

Zahvaljujem se mami in sestri, da sta mi omogočili študij in me pri tem podpirali. Hvala tudi Juretu in ostalim prijateljem, ki so me spodbujali tekom študija in pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

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

Ljubljana, april 2016

Mateja Pretnar

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. SEDACIJA PRI OTROCIH	1
1.2. MIDAZOLAM	3
1.2.1. Farmakodinamika midazolama	3
1.2.2. Farmakokinetika midazolama	4
1.3. POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA	8
1.3.1. Populacijski farmakokinetični modeli za midazolam pri pediatrični populaciji	9
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. KLINIČNI DEL	17
3.2. PRIPRAVA BAZE PODATKOV ZA POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO ANALIZO	19
3.3. POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE	20
3.3.1. Razvoj osnovnega modela	21
3.3.2. Izbira osnovnega modela	23
3.3.3. Testiranje sočasnih spremenljivk	24
3.3.4. Testiranje vpliva zorenja	24
3.3.5. Testiranje vpliva genotipa ABCB1	25
3.4. VREDNOTENJE POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA	25
3.4.1. Diagnostični diagrami	25
3.4.2. Metoda ponovljenega vzorčenja (bootstrapping)	26
3.4.3. Vizualno vrednotenje napovedi modela	27
4. REZULTATI	29
4.1. KLINIČNI DEL	29
4.1.1. Podatki o otrocih	29
4.2. PRIPRAVA BAZE PODATKOV	31
4.3. POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE	32
4.3.1. Osnovni model	32
4.3.2. Vrednotenje osnovnega modela	34
4.3.3. Testiranje vpliva zorenja	36
4.3.4. Testiranje vpliva genotipa ABCB1	37
4.3.5. Končni model	38

4.4. VREDNOTENJE KONČNEGA POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNEGA MODELA.....	39
5. RAZPRAVA	41
6. SKLEP.....	46
7. LITERATURA.....	47

POVZETEK

Otroci z akutnim bronhiolitisom, so tekom hospitalizacije na intenzivni enoti podvrženi sedaciji in analgeziji, pogosto s kombinacijo dolgotrajne intravenske infuzije fentanila in midazolama. Ker so raziskave na otrocih skope, so režimi odmerjanja pogosto določeni z ekstrapolacijo podatkov pridobljenih na odraslih, kar ima lahko za posledico obremenitev otrok s previsokimi ali prenizkimi odmerki.

Namen naše magistrske naloge je bil razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela midazolama pri otrocih z bronhiolitisom, ki so bili na mehanskem predihavanju in so prejeli dolgotrajno intravensko infuzijo midazolama.

Zbrali smo klinične in demografske podatke 49 otrok, starih od 0 – 130 tednov. Podatke smo pridobili iz klinične raziskave »Odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«. Plazemske koncentracije midazolama in podatke o genotipu ABCB1 smo pridobili iz predhodnih raziskav.

Populacijski farmakokinetični model smo razvili s programskim paketom NONMEM. Najprej smo izdelali osnovni model za midazolam z vključenim vplivom telesne mase in na njem testirali vpliv funkcije zorenja metaboličnih encimov in genotipa ABCB1 na očistek. Končni model je dvoprostorni, z vključenim vplivom telesne mase preko alometričnega razmerja in vplivom funkcije zorenja na očistek. Ocene farmakokinetičnih parametrov, podane za povprečno osebo s telesno maso 70 kg so: očistek 8,52 L/h, volumen osrednjega prostora 5,71 L, volumen stranskega prostora 39,8 L in distribucijski očistek 25,5 L/h. Interindividualna variabilnost očistka znaša 72 %, volumna stranskega prostora pa 338 %.

Izdelan končni populacijski farmakokinetični model midazolama lahko pomembno doprinese k optimizaciji režima odmerjanja midazolama pri otrocih, saj zajema vpliv telesne mase in funkcije zorenja na očistek, informacija o očistku pa je ključna pri doseganju ciljne plazemske koncentracije midazolama v stacionarnem stanju.

ABSTRACT

Children with severe acute bronchiolitis receive a combination of sedative and analgesic drugs during intensive care therapy. Commonly used drugs are midazolam and fentanyl. Because research data on children are scarce, dosing schemes for children are often based on extrapolations from adult data, resulting in over- or subdosing of these children.

The aim of our work was to develop a population pharmacokinetic model of midazolam in children with bronchiolitis, that were subject to mechanical ventilation and received a long term intravenous infusion of midazolam.

We have collected clinical and demographic data of 49 children at the age of 0 – 130 weeks. All the data has been gained during a clinical trial entitled »Odnosi med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«. Plasma concentrations of midazolam and genotype data were attained from preliminary researches.

We have developed a population pharmacokinetic model, using NONMEM software. First we have created a basic model for midazolam with included effect of the body weight and used it to test the effect of metabolic enzyme maturation function and genotype ABCB1 on midazolam clearance. Our final model is a two-compartment model with allometrically included effect of body weight and the effect of maturation function on clearance. Pharmacokinetic parameter estimates for an average person with 70 kg are: clearance 8,52 L/h, volume of the central compartment 5,71 L, volume of the peripheral compartment 39,8 L and distribution clearance 25,5 L/h. Interindividual variability of clearance and volume of the peripheral compartment are 72 % and 338 %, respectively.

Our final population pharmacokinetic model can significantly contribute to the optimisation of the dosing regime of midazolam in children, as it includes the influence of body weight and maturation function on clearance, which is an important parameter for achieving the desired plasma concentrations of midazolam in steady state.

Ključne besede:

midazolam

populacijski farmakokinetični model

otroci

bronhiolitis

NONMEM

Keywords:

midazolam

population pharmacokinetic model

children

bronchiolitis

NONMEM

SEZNAM OKRAJŠAV

1-OHM	1-hidroksi-midazolam
1-OHMG	1-hidroksi-midazolam-glukuronid
AIC	Akaike informativni kriterij
AUC	površina pod plazemsko krivuljo
Cl	očistek
CV	koeficient variacije
CWRES	pogojni uteženi rezidual
CYP 3A	citokrom P450 3A
F	faktor telesne velikosti
FK	farmakokinetika
GA	gestacijska starost
GABA	γ -aminobutirna kislina
IIV	interindividualna variabilnost
IM	intramuskularno
IV	intravensko
IWRES	individualni uteženi rezidual
IZ	interval zaupanja
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
MF	funkcija zorenja (maturation function)
MR	stopnja metabolične pretvorbe (metabolic rate)
MV	mehansko predihavanje (mechanical ventilation)
NMDA	N-metil D-aspartat
NONMEM	nelinearno modeliranje mešanih učinkov
OFV	vrednost objektivne funkcije
PFK	populacijska farmakokinetika
Pgp	P-glikoprotein
PMA	pomentruacijska starost
PO	peroralno
pvc VPC	vizualno vrednotenje napovedi modela, kjer je vrednost odvisne spremenljivke korigirana glede na tipično napoved za populacijo in tipično variabilnost populacije (prediction and variability-corrected VPC)

Q	distribucijski očistek
RES	rezidual
RSE	relativna standardna napaka
SCM	postopno modeliranje sočasnih spremenljivk (stepwise covariate model)
SCR	serumski kreatinin
SE	standardna napaka
TM	telesna masa
TV	tipična vrednost
UGT	uridin difosfat-glukuronoziltransferaza
V_1	volumen osrednjega prostora
V_2	volumen stranskega prostora
V_d	volumen porazdelitve
VPC	vizualno vrednotenje napovedi modela (visual predictive check)
Wa	aditivna napaka
Wp	proporcionalna napaka
WRES	uteženi rezidual

1. UVOD

1.1. SEDACIJA PRI OTROCIH

Sedacija in analgezija sta v pediatričnih intenzivnih enotah zelo pomembni, saj so otroci, ki so tu hospitalizirani izpostavljeni mnogim dejavnikom, ki povzročajo nemir, strah in bolečino. Ti dejavniki so ločitev od staršev, prisotnost nepoznanih ljudi in aparatur, prekinitev običajnega ritma spanja in budnosti, invazivni postopki in mehansko predihavanje (1). Znano je, da izpostavljenost stresnim dogodkom in doživljanje travm, predvsem v obdobju, ko se možgani razvijajo, povzroča tako psihološke, kot tudi fiziološke motnje. Ponavljajoče se abnormalne smeri povezav, ki so jih živčne celice v takih situacijah prisiljene tvoriti, lahko v obdobjih, ko se vzpostavljajo in razvijajo povezave med možganskimi nevroni, privedejo do trajne abnormalne nevronske strukture in delovanja možganov. Čeprav so raziskave o posledicah stresnih pogojev na dojenčke in nedonošenčke skope, so ugotovili, da imajo ti otroci tekom terapije na intenzivnem oddelku značilne spremembe v stopnji oksigenacije in pretoku krvi skozi možgane. Posledice teh sprememb, predvsem v prvih dneh življenja, so lahko dolgoročno usodne. Otroci na intenzivnih oddelkih utrpijo tudi travmo. Posledica travme je nezmožnost teh otrok, da bi prilagodili odziv na stresno situacijo, zaradi česar so stalno podvrženi stresnim dejavnikom v telesu. Klinično se to kaže v impulzivnosti, razdražljivosti, motnjah koncentracije in razpoloženja, čustveni otopelosti, strahovih, motnjah spanja, agresivnih izbruhov, motnjah spomina in drugih. Prav tako lahko pride do posledic v nevroendokrinem in avtonomnem živčnem sistemu in s tem do nagnjenosti k razvoju bolezni, kot so astma, hipertenzija, srčne aritmije, endokrine motnje, prebavne motnje in mnoge druge (2). Glavni cilj sedacije je bolnika usmeriti v mirno, brezbolečinsko stanje, v katerem le-ta ne bo oteževal postopkov intenzivne nege. Pri mehanskem predihavanju se s sedacijo nadzira tudi podajnost stene prsnega koša, preprečuje kašelj, kot posledico endotrahealne intubacije in motnje v izmenjavi zraka. Prav tako se s sedacijo inducira spanje, zmanjša nemir in uravnava metabolične procese, saj pride pri bolnikih v stresnem stanju do povečane zahteve po kisiku in posledično do oksidativnih reakcij v organizmu (1).

Učinkovine za doseganje sedacije pri otrocih

Za doseganje sedacije pri otrocih se uporabljajo različne učinkovine. Izbor optimalne učinkovine je odvisen od otrokovega zdravstvenega stanja, narave posega, ki zahteva sedacijo, varnosti in učinkovitosti posamezne učinkovine in, v primeru, da to ni anesteziolog, tudi od osebja, ki sedacijo uvaja. Pregled nad glavnimi učinkovinami in načini aplikacije za sedacijo pri otrocih sta naredila Cravero in Blike (3) in je povzet v preglednici I. Inhalacijski anestetiki v pregled niso vključeni.

Preglednica I: Glavne učinkovine za doseganje sedacije pri otrocih (3).

Učinkovina	Vrsta aplikacije / odmerek	Uporaba	Mehanizem delovanja
Propofol	IV / $100-200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Neboleči diagnostični posegi	Podaljša čas odprtja GABA_A Blokira delovanje natrijevih kanalčkov
Pentobarbital	IV ali PO / $4-6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Radiologija	Poveča prepustnost GABA_A , s tem zmanjša vzdražnost celične membrane živčnih celic
Midazolam	PO / $0,5-0,75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ IV / $0,025-0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Najboljša učinkovina z vidika varnosti uporabe po IV poti	Poveča prepustnost GABA_A ob prisotnosti GABA
Kloral hidrat	PO / $50-100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Najpogostejši izbor za sedacijo v radiologiji	Podobno delovanje na GABA_A kot benzodiazepini in barbiturati
Etomidat	IV / $0,1-0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Sedacija kratkotrajnih, nebolečih posegov v nujni medicini	Modulacija GABA_A receptorja
Metoheksital	IV / $0,25-0,50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Učinkovita IV sedacija	Enak propofolu
¹ Propofol + ² fentanil	IV / fentanil $1-2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, propofol $50-150 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Najboljša kombinacija za globoko sedacijo / anestezijo	¹ Glej delovanje propofola, ² Vezava na μ opioidne receptorje, analgetično, sedativno delovanje
Midazolam + fentanil	IV / midazolam $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, fentanil $1-2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Najpogostejša kombinacija za boleče posege na oddelkih intenzivne nege	Glej posamezni učinkovini

Nadaljevanje preglednice I:

Učinkovina	Vrsta aplikacije / odmerek	Uporaba	Mehanizem delovanja
Ketamin	IM / 3-4 mg · kg ⁻¹ IV / 1-2 mg · kg ⁻¹	Učinkovita sedacija in analgezija za boleče posege. Pogosta kombinacija z midazolamom	Antagonist na NMDA receptorjih, prepreči vezavo glicina in glutamata, ionski kanalček se ne more odpreti in s tem je moten prenos ekscitatornega signala po živčnih celicah
Remifentanil	IV / 0,1 µg · kg ⁻¹ · min ⁻¹	Uveljavlja se kot sedativ pri otrocih	Vezava na µ opioidne receptorje, deluje kot ultra kratko delujoči opioidni analgetik, sedativ

IV...intravensko, IM...intramuskularno, PO...peroralno, GABA...γ-aminobutirna kislina, GABA_A...receptor, katerega naravni ligand je GABA, NMDA...N-metil D-aspartat

1.2. MIDAZOLAM

Midazolam je kratkodelujoči benzodiazepin s sedativnim, amnestičnim, anksiolitičnim, antikonvulzivnim in mišično relaksatornim delovanjem. V primerjavi z ostalimi benzodiazepini, ki se uporabljajo intravensko, je z vidika farmakokinetičnih lastnosti najbolj primerna in varna učinkovina za dolgotrajno sedacijo otrok na intenzivni negi. Je učinkovit, ima hiter nastop delovanja, njegov učinek pa hitro izzveni (4). Odmerjanje midazolama temelji, kot večina drugih učinkovin za otroke, na telesni masi in je največkrat pridobljeno z ekstrapolacijo rezultatov iz farmakokinetičnih študij na odraslih. Klinični podatki o učinkovinah se namreč prvotno pridobijo predvsem iz uporabe učinkovine na odraslih bolnikih in farmakokinetičnih študij izvedenih na odraslih. Šele potem se začne uporaba pri otrocih (5). Pred začetkom infuzije midazolama se pogosto aplicira bolus odmerek, ki omogoči, da hitreje dosežemo terapevtske koncentracije učinkovine v krvi. Navadno je odmerek bolusa 0,01 – 0,2 mg/kg apliciran v 2 – 3 minutah. Sledi mu infuzija s hitrostjo 0,001 – 0,002 mg/kg/min, ki jo prilagodimo do hitrosti, s katero lahko vzdržujemo sedacijo. Pri novorojenčkih aplikacija začetnega odmerka v obliki bolusa zaradi možne hipotenzije ni priporočljiva, namesto tega pa lahko začnemo infuzijo z višjo hitrostjo, ki jo potem uravnamo na hitrost, potrebno za vzdrževanje sedacije (4).

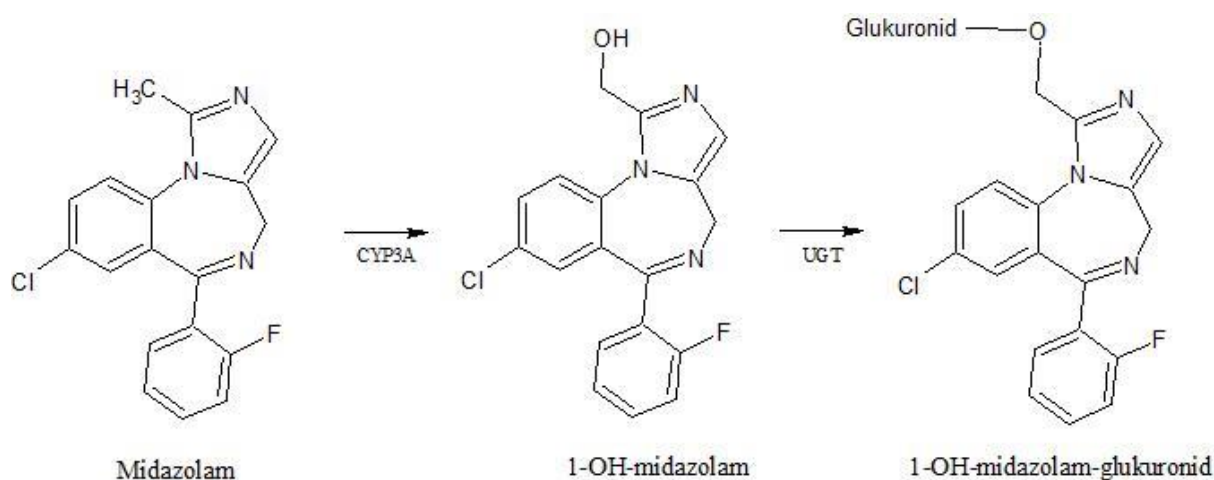
1.2.1. Farmakodinamika midazolama

Midazolam spada v skupino benzodiazepinov, ki izražajo svoj klinični učinek preko vezave na receptor GABA_A, katerega naravni ligand je γ-aminobutirna kislina (GABA), glavni

inhibitorni nevrottransmitor v centralnem živčnem sistemu. Ti receptorji so visoko afinitetna vezavna mesta, največ pa jih najdemo v olfaktornem bulbusu, možganski skorji, malih možganih, hipokampusu, substanci nigri in spodnjem koliklu (4). Receptor $GABA_A$ sestoji iz petih peptidnih podenot, 2 α_1 , 2 β_2 , 1 γ_2 , pri čemer se GABA veže na β_2 podenoto, benzodiazepini pa na γ_2 podenoto. Benzodiazepini povečajo učinek GABA s tem, da s svojo vezavo povečajo afiniteto receptorja $GABA_A$ za GABA. S tem je koncentracija GABA, potrebna za enak učinek, v prisotnosti benzodiazepinov nižja kot v njihovi odsotnosti. Ob vezavi GABA na kompleks benzodiazepina z $GABA_A$ receptorjem, se spremeni konformacija receptorja, kar poveča prepustnost centralne pore za kloridne ione. Vdor kloridnih ionov povzroči hiperpolarizacijo živčnih celic. Ker pri hiperpolariziranih živčnih celicah težje pride do depolarizacije z ekscitatornimi nevrottransmiterji, pride do splošnega inhibitornega učinka na aktivnost živčnih celic. Ta mehanizem je odgovoren za klinični sedativni in amnestični učinek benzodiazepinov (6).

1.2.2. Farmakokinetika midazolama

Midazolam lahko apliciramo parenteralno in sicer intravensko (IV) ali intramuskularno (IM), peroralno in redko intranazalno ali rektalno. Pri IM aplikaciji je obseg absorpcije midazolama višja od 90 %, pri peroralno apliciranem midazolamu pa je zaradi absorpcije preko prebavnega trakta in podvrženosti metabolizmu prvega prehoda v jetrih manjša in znaša pri otrocih le 27 %. Midazolam ima velik volumen porazdelitve (V_d) od 0,95 do 6,6 L/kg za odraslega človeka in je večji pri ženskah in ljudeh s prekomerno telesno maso. Vezava na proteine je približno 97 % (4). Metabolizem midazolama, ki ga prikazuje *slika 1*, je dvostopenjski in je v prvi stopnji podvržen obsežnemu metabolizmu z encimi iz skupine citokrom P450 3A (CYP 3A), natančneje CYP 3A4, CYP 3A5 in v manjšem obsegu CYP 3A7. Njegov glavni metabolit je 1-hidroksi-midazolam (1-OHM), ki je farmakološko aktiven. V drugi stopnji se glavni metabolit preko encima uridin difosfat-glukuronoziltransferaza (UGT) pretvori v 1-hidroksi-midazolam-glukuronid (1-OHMG), ki se izloča preko ledvic ali, v primeru odpovedi ledvic, ostaja v krvi in v visokih koncentracijah deluje sedativno (7).



Slika 1: Shema metabolizma midazolama do glavnega metabolita 1-OH-midazolama (1-OHM) in 1-OH-midazolam-glukuronida (1-OHMG) (8).

CYP 3A4 je najaktivnejša izoforma metaboličnih encimov v človeških jetrih in katalizira metabolizem kar 50 % učinkovin na tržišču. Znano je, da je aktivnost encima ob rojstvu nizka, se pa močno poveša v prvih nekaj mesecih življenja in v zgodnjem otroštvu lahko celo preseže aktivnost pri odraslem človeku (9).

Čeprav vpliv polimorfizma genov na farmakokinetiko (FK) midazolama še ni dobro raziskan, v literaturi najdemo povezave med očistkom (Cl) midazolama in polimorfizmom genskega zapisa za CYP 3A4, ostale encime soudeležene v metabolizmu in prenašalne proteine. Tako Wang in sodelavci (10), kot tudi Okubo in sodelavci (11) so ugotovili, da ima polimorfizem na intronskem delu alela CYP 3A4*22 značilen vpliv na znižanje stopnje izražanja proteina CYP 3A4, kar ima za posledico zmanjšano encimsko aktivnost *in vivo* in manjši Cl učinkovine. Na FK midazolama lahko vpliva tudi polimorfizem na genskem zapisu za P450 oksidoreduktazo (POR), od katere CYP 3A4 v reakciji oksidacije pridobiva elektrone. Agrawal in sodelavci (12) so ugotovili značilno znižanje stopnje metabolizma midazolama pri polimorfni različici POR A287P in A503V v primerjavi z divjim tipom in značilno povečanje metabolizma midazolama pri polimorfni različici POR Q153R v primerjavi z divjim tipom. Prav tako na FK midazolama vpliva polimorfizem v genu ABCB1, ki kodira membranski prenašalec P-glikoprotein (Pgp). Pgp je od ATP odvisen izločevalni prenašalec, udeležen pri absorpciji, porazdelitvi in izločanju mnogih učinkovin. Gen za Pgp je visoko polimorfen, posledica polimorfizma pa je 2- do 3-kratno zmanjšanje izražanja Pgp (13). Tolle-Sander in sodelavci (14) so preučevali interakcijo midazolama s Pgp preko reakcije z ATPazo in ugotovili, da je midazolam visoko permeabilen substrat Pgp.

Nasprotno temu, so Kim in sodelavci (15) preučevali katere učinkovine so substrati CYP 3A in Pgp in ugotovili, da midazolam ni substrat Pgp. V skladu s tem v literaturi najdemo raziskave, ki temeljijo na slednji predpostavki in sicer, da midazolam ni substrat Pgp je pa specifični substrat CYP 3A (16–18).

Poleg opisanih dejavnikov, vpliva na FK midazolama tudi starost in/ali telesna masa (TM) in telesna velikost, katerih vplivi so opisani v poglavju Populacijski farmakokinetični modeli za midazolam pri otrocih.

Farmakokinetika midazolama pri kritično bolnih otrocih

Otroci na intenzivni negi prejmejo midazolam apliciran IV v obliki bolusa in/ali infuzije. Ti otroci so v kritičnem stanju, ki močno vpliva na FK midazolama, kot tudi drugih učinkovin. Opažene so spremembe v V_d , kar je posledica spremembe koncentracije in sestave proteinov v krvi. Glavni transportni protein, na katerega se midazolam veže v veliki meri (97 %), je albumin, katerega koncentracija v krvi se pri kritičnih bolezenskih stanjih zmanjša. Spremembe v V_d so lahko tudi posledica vnetnih endotoksinov, ki vplivajo na žilne stene in povzročijo vazokonstrikcijo ali vazodilatacijo. Prav tako lahko pride do sprememb porazdelitve in metabolizma midazolama zaradi spremenjene prekrvavljenosti jeter, ki so glavni organ za metabolizem učinkovin. Za normalno delovanje jetra potrebujejo kisik, ki ga porabljajo v proizvodnji energije, potrebne za izvajanje metaboličnih reakcij, proizvodnjo encimov in reakcije oksidacije. Normalno dobijo 70 % krvi preko portalne vene, ki prinaša s kisikom osiromašeno kri in 30 % preko jetrne arterije, ki prinaša s kisikom bogato kri, kar povzroči razliko v prehranjenosti različnih delov jeter. Ta razlika se poveča, če zaradi travme in posledično šoka, pride do zmanjšane prekrvavljenosti jeter. Podoben učinek ima tudi stres, na katerega organizem odgovori s povečanim sproščanjem kateholaminov, ki zmanjšajo jetrni krvni pretok. Poleg hipoksije vpliva na metabolizem tudi sistemsko vnetje. Endotoksini v krvi povzročijo, da se organizem odzove s sproščanjem vnetnih mediatorjev, kot so interleukini, interferon in tumor nekrotizirajoči faktor, ki zmanjšajo delovanje encimov. Mehansko predihavanje lahko zmanjša srčni iztis in s tem zmanjša pretok krvi skozi organe, predvsem jetra in ledvice. Tudi znižana ali povišana telesna temperatura vpliva na kinetiko metaboličnih reakcij (19).

Da ima kritično bolezensko stanje značilen vpliv na FK midazolama, so dokazali Altamimi in sodelavci (5). Raziskovali so interindividualno variabilnost (IIV) Cl pri otrocih in mladostnikih do 18. leta, tako zdravih kot tistih v kritičnem stanju, ki so midazolam dobivali

intravensko. Ugotovili so, da je IIV Cl večja med otroci v kritičnem stanju v primerjavi z zdravimi. Preglednica II prikazuje vrednosti Cl otrok v kritičnem stanju in otrok, ki niso v kritičnem stanju, pri čemer so podatki zbrani iz različnih študij.

Preglednica II: Ocene očistka (Cl) midazolama otrok v kritičnem stanju in otrok, ki niso v kritičnem stanju. Variabilnost Cl je prikazana s koeficienti variacije (CV) (5).

Starostna skupina	Kritično/ne-kritično stanje	Cl (mL/kg/min)	CV (%)	Vir
Nedonošeni novorojenčki	Kritično stanje	1,7	106	(20)
		2,1	72	(21)
		1,8	NP	(22)
		1,7	81	(23)
		0,8	83	(17)
		1,2	78	(24)
Donošeni novorojenčki	Kritično stanje	2,5	30	(7)
		2,6	18	(25)
		1,4	73	(26)
>28 dni - 23 mesecev	Ne-kritično stanje	11,3	53	(27)
	Kritično stanje	6,0	130	(28)
		4,8	89	(7)
		16,7	31	(29)
		2,0	50	(30)
2 – 11 let	Ne-kritično stanje	13,3	41	(31)
		15,3	20	(32)
		3,2	54	(33)
		10,0	38	(27)
	Kritično stanje	1,1	NP	(34)
		6,0	72	(7)
		14,4	NP	(35)
		15,5	170	(28)
		12,0	55	(36)
		8,5	21	
		9,1	37	
12 – 18 let	Ne-kritično stanje	10,0	50	(37)
		9,3	40	(27)
	Kritično stanje	3,2	47	(7)
		5,0	150	(30)
2 dni - 17 let	Kritično stanje	5,0	78	(38)

Cl...očistek, CV...koeficient variacije, NP...ni podatka

Na metabolizem midazolama pogosto vplivajo druga zdravila, ki so del terapije otrok na intenzivni negi. Poznamo inhibitorje CYP 3A4, ki lahko močno povišajo plazemsko koncentracijo midazolama in induktorje CYP 3A4, ki le-to lahko zelo znižajo. Nihanja v plazemski koncentraciji povzročijo spremembe učinka, zato jih je potrebno upoštevati pri odmerjanju. Inhibicija CYP 3A4 je hitra reakcija, med tem ko je indukcija proces, ki za dosego svojega največjega učinka potrebuje nekaj dni in prav toliko časa tudi, da učinek preneha. Inhibitorji CYP 3A4, ki se uporabljajo na pediatričnih intenzivnih enotah so makrolidni antibiotiki (eritromicin, klaritromicin), ki podaljšajo razpolovno dobo midazolama za 1,5 do 1,8 krat (39). Višje koncentracije midazolama so možne tudi pri sočasni uporabi propofola, ki lahko inhibira metabolizem midazolama. Induktorji, ki se uporabljajo pri otrocih z bronhiolitisom so steroidi (deksametazon), fenitoin in barbiturati (fenobarbiton) (40).

1.3. POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Populacijska farmakokinetika (PFK) je področje klinične farmakologije, s katerim kvantitativno ocenjujemo osnovne farmakokinetične parametre, variabilnost med posamezniki in rezidualno variabilnost v absorpciji, porazdeljevanju, presnovi in izločanju učinkovine. Cilj PFK je, da zagotovimo kvantitativne in semikvantitativne smernice za individualizirano in optimizirano odmerjanje. Populacijski pristop k ocenitvi farmakokinetike omogoča uporabo tako množičnih kot tudi zelo skopih podatkov. Zato lahko s PFK izvajamo raziskave tudi na posameznih specifičnih populacijah (npr. otroci, bolniki v kritičnem stanju), kjer je iz etičnega in zdravstvenega vidika onemogočeno zbiranje velike količine podatkov. Poleg identifikacije variabilnosti lahko s PFK ugotovimo razloge s katerimi je variabilnost povezana. Dodatna prednost je, da lahko za razvoj PFK modela uporabimo heterogene podatke, zbrane iz več različnih virov. Vsekakor pa zahteva izkušeno osebje na področju farmakokinetike in farmakometrike, katero zna uporabiti ustrezne matematične in statistične tehnike v pridobivanju PFK parametrov (41).

1.3.1. Populacijski farmakokinetični modeli za midazolam pri pediatrični populaciji

Prvi PFK model za midazolam pri otrocih so predstavili de Wildt in sodelavci (7). Spremljali so terapijo 21 bolnikov na pediatrični intenzivni negi starih od 0 do 18 let, ki so prejeli midazolam za sedacijo pri ohranjeni zavesti. Ugotovili so, da farmakokinetiko midazolama najbolje opiše dvoprostorni model. Ocenjeni FK parametri so prikazani v preglednici IV, kjer je narejen pregled PFK študij opisanih v nadaljevanju. Pri analizi sočasnih spremenljivk so de Wildt in sodelavci (7) ugotovili, da starost in telesna velikost nimata značilnega vpliva na FK parametre, kar pa ni v skladu z ostalimi študijami. Ko so iz nabora podatkov izključili tri bolnike z ledvično odpovedjo, jetrno odpovedjo in sočasno terapijo z eritromicinom, se je napoved modela močno izboljšala. Pri bolniku z ledvično odpovedjo je bila razpolovna doba eliminacije ($t_{1/2EL}$) podaljšana in V_d večji, Cl pa je bil znotraj populacijskih vrednosti. Koncentracije metabolitov midazolama v krvi so bile močno povečane. Pri bolniku z jetrno odpovedjo so opazili zelo dolgo $t_{1/2}$ in zelo majhen Cl , V_d pa je bil primerljiv s populacijsko vrednostjo. Opazili so zelo nizko koncentracijo metabolitov midazolama. Bolnik, ki je sočasno dobival eritromicin, inhibitor encima CYP 3A4, je imel podaljšan $t_{1/2}$ in manjši Cl . Iz teh ugotovitev so zaključili, da so ledvična odpoved, jetrna odpoved in sočasna terapija z inhibitorji encima CYP 3A pomembni kazalci spremenjene FK midazolama pri bolnikih na intenzivnih enotah in moramo v teh primerih razviti alternativne strategije odmerjanja (7).

Ince in sodelavci (9) so opazovali vpliv kritičnega bolezenskega stanja na Cl midazolama. Preučevali so IIV FK midazolama in njegovega metabolita pri otrocih od 1 meseca do 17 let starosti. FK midazolama so opisali z dvoprostornim modelom, FK 1-OHM in 1-OHMG pa z enoprostornima modeloma. Izhajali so iz predpostavke, da kritično bolezensko stanje povzroči represijo genov za CYP 3A4/5. Aktivnost CYP 3A4 se zaradi takega stanja zniža v 26 do 144 urah, CYP 3A5 pa v približno 36 urah. Uporabili so podatke treh že narejenih študij na bolnikih na intenzivni negi (subpopulacija 1), pediatričnih onkoloških bolnikih, ki potrebujejo sedacijo za invazivne posege (subpopulacija 2) in zdravih malčkah, po elektivni operaciji glave in/ali obraza (subpopulacija 3). Opazili so značilne razlike v aktivnosti encimov CYP 3A4/5 med subpopulacijo 1, ki je dlje časa podvržena kritičnemu bolezenskemu stanju in subpopulacijama 2 in 3, ki sta v kritičnem stanju le med operacijo in do okoli 16 ur po njej, ko pa še ne pride do represije genov. Ker so se podatki subpopulacije 1 močno razlikovali od ostalih dveh, so v model vključili vpliv subpopulacije tako, da so Cl otrok subpopulacije 1 izrazili kot delež Cl subpopulacij 2 in 3. Vključitev tega

vpliva je značilno izboljšala napoved modela. Pri vseh treh subpopulacijah so ugotovili tudi linearno povezavo volumna osrednjega prostora (V_1) s telesno maso.

Kasneje so naredili novo študijo (42), pri kateri so del variabilnosti v Cl razložili z vplivom kritičnega bolezenskega stanja, ugotovljenim v prejšnji študiji, preostali del variabilnosti pa so želeli razložiti z vplivom zorenja encima CYP 3A. V raziskavo so vključili 136 posameznikov, razporejenih po starosti na nedonošenčke, dojenčke, malčke, otroke, mladostnike in odrasle. Ugotovili so, da je funkcija zorenja (MF) CYP 3A, ovrednotena preko Cl midazolama, nelinearna in jo najboljše opisuje alometrična funkcija z eksponentom, ki se spreminja s telesno maso in ima najvišjo vrednost 0,84 pri nedonošenčkih in najnižjo 0,44 pri odraslih. Največje spremembe v Cl midazolama se zgodijo v 1. letu življenja, ko se vrednosti telesne mase gibljejo od 0,5 do 4 kg in sicer je opazen razpon 2,6 – 21,8 % vrednosti Cl odraslega človeka. To potrjujejo *in vitro* in *in vivo* raziskave (43), pri katerih so v prvih nekaj tednih življenja ugotovili količino CYP 3A4 mRNA, ki ustreza 10 % in med 1. – 3. mesecem življenja 30 – 40 % količine mRNA pri odraslem človeku. Alometrične funkcije z ocenjenim ali fiksnim eksponentom so se izkazale za neprimerne preko celotnega intervala telesne mase populacije, saj so predvsem pri nižjih starostnih skupinah dajale previsoke ocene Cl. Preko FK parametrov modela in ciljnih terapevtskih koncentracij za sedacijo otrok pri ohranjeni zavesti (0,25 – 0,37 µg/mL) so simulirali plazemske koncentracije midazolama in napovedali ustrezen režim odmerjanja midazolama. Nato so simulirali režim odmerjanja, ki se uporablja v klinični praksi, t.i. tradicionalni režim odmerjanja, kot tudi z modelom določen režim odmerjanja in opazili, da je pri tradicionalnem režimu odmerjanja prišlo do velikih odstopanj plazemskih koncentracij učinkovine pri posameznikih, saj so ti odmerki premo sorazmerni s telesno maso, medtem ko zveza Cl s telesno maso ni linearna.

Preglednica III preko 24 urnega intervala primerja tradicionalni režim odmerjanja, kjer so odmerki linearno povezani s telesno maso in z modelom določen režim odmerjanja, kjer so odmerki eksponentno povezani s telesno maso. Eksponent telesne teže, ki ga preglednica zaradi lažje primerjave ne prikazuje, je znašal 0,85 za nedonošene novorojenčke in 0,65 za otroke na intenzivni negi. Obema režimoma odmerjanja je skupna aplikacija začetnega bolus odmerka 0,05 mg/kg za nedonošene novorojenčke in 0,1 mg/kg za otroke na intenzivni enoti.

Preglednica III: Primerjava tradicionalnega režima odmerjanja za nedonošene novorojenčke in otroke na intenzivni negi in režima odmerjanja postavljenega na podlagi PFK modela (42)

Populacija	Masa otroka (kg)	Trajanje infuzije (h)	Tradicionalno odmerjanje (mg/h)	Odmerjanje na podlagi modela (mg/h)
Nedonošeni novorojenčki	0,75	0 - 7	0,045	0,047
		7 - 24		0,023
	1,00	0 - 7	0,060	0,060
		7 - 24		0,030
	2,00	0 - 7	0,120	0,110
		7 - 24		0,054
	3,00	0 - 7	0,060	0,150
		7 - 24		0,076
Otroci na intenzivni negi	5,00	0 - 3	0,500	0,500
		3 - 24		0,140
	10,00	0 - 3	1,000	1,000
		3 - 24		0,220
	20,00	0 - 3	2,000	2,000
		3 - 24		0,350
	45,00	0 - 3	4,500	4,500
		3 - 24		0,590
	60,00	0 - 3	6,000	6,000
		3 - 24		0,720

Tudi Anderson in Larsson (44) sta raziskovala spreminjanje Cl midazolama v odvisnosti od telesne velikosti in zorenja. Vključila sta podatke o Cl iz 16 študij na otrocih na intenzivni negi, ki so midazolam prejeli IV kot sedativno predmedikacijo, po operaciji, ob malariji, operaciji srca, srčnoplučnem obvodu, cirkulatornem zastoju, uvajanju anestezije, ezofagoduodenoskopiji, mehanskem predihavanju in 7 študij na zdravih odraslih ali odraslih po operaciji prsi, grla ali kolka. Faktor telesne velikosti (F) so izračunali po enačbi 1 in je služil za vključitev vpliva velikosti telesa posameznika, vpliv zorenja pa so vključili preko Hillovega modela z enačbo 2.

$$F = \left(\frac{TM}{70}\right)^{3/4}$$

Enačba 1

F...faktor telesne velikosti, TM...telesna masa posameznika

$$MF = \frac{PMA^{Hill}}{PMA_{50}^{Hill} + PMA^{Hill}}$$

Enačba 2

MF...funkcija zorenja, PMA...pomentruacijsko starost izraženo v tednih (čas med prvim dnevom zadnjega menstrualnega cikla in rojstvom, ki mu prištejemo dejansko, kronološko starost), PMA₅₀...razpolovna doba zorenja, Hill...Hillov koeficient (naklon profila zorenja).

MF je sigmoidna funkcija, ki opisuje hitrost zorenja metaboličnih encimov. S podatkom o PMA otroka lahko v vsaki točki napovemo stopnjo Cl otroka kot delež Cl odraslega človeka, dokler Cl otroka ne doseže vrednosti Cl odraslega človeka. Hill-ov koeficient predstavlja naklon MF in daje informacijo o hitrosti procesa zorenja metaboličnih encimov. Napovedane ocene Cl so primerljive z ocenami Cl PFK modelov drugih študij in sovpadajo z zorenjem CYP 3A4. Ugotovili so, da je najtežje napovedati Cl otrok s TM 10 - 18kg oz. starostjo 1 - 4 let, saj je Cl v tem območju višji, kot ga napovedujejo modeli. Prav tako opažajo, da primanjkuje podatkov o ocenah FK parametrov midazolama pri otrocih s PMA 44 do 80 tednov (44).

Bienert in sodelavci (45) so postavili PFK model za midazolam in njegov glavni metabolit 1-OHM pri mehansko predihavanih otrocih na intenzivnem oddelku, starih od 0 do 18 let, ki so midazolam prejeli za sedacijo pri ohranjeni zavesti. Zanimal jih je vpliv cirkadianega ritma na sedacijo z midazolamom. FK midazolama so opisali z dvoprostornim modelom, 1-OHM pa z enoprostornim modelom. Kljub primerni izbiri modelov so opazili veliko variabilnost V_d obeh opazovanih spojin, katere velik del so pojasnili z vključitvijo vpliva telesne mase z alometričnim skaliranjem. Za značilno se je izkazala le korelacija med količino γ -globulina in Cl 1-OHM, za katero pa avtorji niso našli fiziološke razlage. Razložila je 12 % variabilnosti Cl. Izkazalo se je, da cirkadiani ritem ni imel značilnega vpliva na FK parametre, prav tako niso dokazali korelacije FK parametrov s starostjo. Po primerjavi Cl z vrednostmi drugih študij predvidevajo, da mehansko predihavanje vpliva na njegovo vrednost, saj je $le-ta$ pri mehansko predihavanih otrocih 3x manjši kot pri nepredihavanih otrocih (45).

PFK model za midazolam pri otrocih so postavili tudi Johnson in sodelavci (46), ki so ugotavljali farmakološko aktivnost glavnega metabolita midazolama, 1-OHM, in njegov prispevek k sedativnemu učinku. V raziskavo so vključili 45 otrok, ki so midazolam prejeli peroralno za sedacijo pri rutinskih operacijah. Po aplikaciji midazolama in 1-OHM so preučevali FK preko krvnih vzorcev, farmakodinamiko pa z vrednotenjem sedacije, ki je bila

ovrednotena z 1 pri budnih otrocih in z 2 pri omotičnih/spečih otrocih. Časovni potek midazolama v plazmi je najbolje opisal eno-prostorni model, FK 1-OHM pa so opisali z dvostopenjskim povezovalnim modelom za učinkovino in njen metabolit. Ta model upošteva nastanek metabolita v predsistemskem in sistemskem metabolizmu. Ugotovili so, da ima značilen vpliv na Cl midazolama TM, ki so jo vključili v model in stopnja metabolične pretvorbe midazolama ($MR = [1-OHM]/[midazolam]$), ki je pojasnila 84 % variabilnosti Cl midazolama. Ker ostale študije FK midazolama opisujejo z dvoprostornim modelom, avtorji pojasnjujejo, da je to lahko posledica peroralne aplikacije, kjer lahko fazo porazdelitve midazolama prekriva faza absorpcije. Njihovi rezultati kažejo na to, da pri enaki plazemski koncentraciji 1-OHM prispeva k sedativnemu učinku 1,9-krat bolj kot midazolam, kljub temu pa znaša relativna aktivnost metabolita v primerjavi z učinkovino 0,5, saj je količina nevezane frakcije metabolita v plazmi štirikrat višja od nevezane frakcije midazolama.

Cella in sodelavci (47) so ugotavljali kako učinkovite so napovedi izpostavljenosti midazolamu za določeno pediatrično populacijo, ki jih izvedemo z uporabo FK parametrov alometričnega modela midazolama druge pediatrične populacije. Postavili so dva modela za midazolam in sicer model 1 za opis FK midazolama pri dojenčkih, malčkih in odraslih (populacija 1) in model 2 za opis FK midazolama za otroke in mladostnike (populacija 2). Populacija 1 je vključevala 34 zdravih odraslih in 23 dojenčkov in malčkov na intenzivni negi, starih med 3 meseci in 2 leti, populacija 2 pa 18 onkoloških bolnikov starih med 3 in 17 let (otroci in mladostniki). Za model 1 so uporabili dvoprostorni model z ocenjeno IIV za Cl in volumen stranskega prostora (V_2) ter proporcionalno napako (Wp). Ugotovili so značilen vpliv TM na Cl, ki so ga opisali z alometrično funkcijo s fiksnim eksponentom 0,75. Za model 2 so uporabili dvoprostorni model z ocenjeno IIV za Cl in V_1 in Wp. Za razliko od prvega je drugi model vključeval linearno zvezo V_2 s starostjo. Preko FK parametrov, ki so jih pridobili z modelom 1, so simulirali koncentracije za populacijo 2 in izračunali površine pod plazemsko krivuljo (AUC) za vsakega posameznika, kot merilo sistemske izpostavljenosti učinkovini. Za primerjavo so za vsakega posameznika izračunali AUC preko FK parametrov modela 2. Oba modela sta dobro napovedala izpostavljenost učinkovini v populaciji za katero sta bila postavljena, medtem ko je bila z modelom 1 napovedana izpostavljenost midazolamu za populacijo 2 prenizka in se je zniževala z naraščajočo telesno maso. Pri intra- in ekstrapolaciji se torej ne moremo zanašati na

sklepanje, da so FK parametri enako porazdeljeni, niti, da je interakcija parameter-sočasna spremenljivka konstantna v različnih populacijah (47).

Burtin in sodelavci (48) so izdelali PFK model za midazolam pri novorojenčkih. Spremljali so 187 novorojenčkov na pediatrični intenzivni enoti, ki so midazolam prejemali za sedacijo ob mehanskem predihavanju. FK so najboljše opisali z dvoprostornim modelom in ugotovili, da je Cl novorojenčkov, v primerjavi s starejšimi dojenčki, značilno znižan. Poleg tega je bila variabilnost FK parametrov velika in je ni bilo mogoče popolnoma razložiti. Na Cl in V_1 je imela značilen vpliv TM ob rojstvu, ki je sicer močno korelirala z gestacijsko starostjo (GA). Gestacijska starost (GA) je čas od prvega dne zadnjega normalnega menstrualnega cikla do rojstva in jo navadno izražamo v tednih. Avtorji so v model vključili vpliv TM, ki je lažje in bolj specifično merljiv. Ugotovili so značilno 30 % zmanjšanje Cl midazolama pri sočasni terapiji s simpatomimetičnimi amini (npr. dopamin, dobutamin), sicer ne zaradi interakcije med učinkovinama, temveč zaradi posledično zmanjšanega pretoka krvi skozi jetra, kar zakasni izločanje ter potencira delovanje midazolama.

Sledi preglednica IV, kjer je prikazan pregled zgoraj opisanih PFK modelov za midazolam pri otrocih in vključuje predstavitev glavnih FK parametrov in sočasnih spremenljivk, ki značilno vplivajo na FK parametre.

Preglednica IV: Pregled PFK modelov za midazolam pri otrocih - predstavitev glavnih FK parametrov in sočasnih spremenljivk, ki značilno vplivajo na FK parametre.

Populacija	Starost	Št. MV bolnikov/celot no št. bolnikov	Model	V _d	Cl	Spremenljivka z značilnim vplivom → FK parameter	Vir
Bolniki pediatrične intenzivne nege	2 dneva – 17 let	0/18	2-prostorni	V _d =1,7 L/kg	5,0 ml/kg/min	/	(7)
¹ bolniki intenzivne nege ² bolniki, ki niso na intenzivni negi	1 mesec – 17 let	12/54	2-prostorni	V _{1(11kg)} =3,1 L V ₂ =14,1 L	¹ Cl= 11,2 ml/min ² Cl=160,0 ml/min	Specifična subpopulacija→Cl TM → V ₁ MV → Cl _{1-OHM} TM ^{0,81} → Cl _{1-OHM}	(9)
Bolniki na intenzivni negi, po operaciji, invazivnih postopkih in zdravi odrasli (podatki iz 6 študij)	0 – 31 let	54/136	2-prostorni	V _{1,13kg} =2,7 L V ₂ =6,4 L	Cl _{13kg} = 170,0 ml/ min	Kritično bolezensko stanje → Cl TM → Cl TM → V ₁ TM → V ₂	(42)
Pediatrična populacija (podatki iz 16 študij)	¹ novorojenčki, ² 6 mesecev, ³ 1 leto, ⁴ 2 leti, ⁵ 5 let, ⁶ 10 let, ⁷ 15 let	304/620	/	/	Cl ¹ =2,3 ml/min/kg Cl ² =5,5 ml/min/kg Cl ³ =8,1 ml/min/kg Cl ⁴ =10,3 ml/min/kg Cl ⁵ =10,1 ml/min/kg Cl ⁶ =9,2 ml/min/kg Cl ⁷ =8,0 ml/min/kg	F → Cl MF → Cl	(44)
Bolniki intenzivne nege	0 – 18 let	27/27	2-prostorni	V ₁ =0,7 L/kg V ₂ =1,1 L/kg	4,9 mL/min/kg	količina γ-globulina → Cl _{1-OHM}	(45)
¹ dojenčki, malčki in odrasli, ² otroci in mladostniki	¹ 3,2 mesecev -29,7 let ² 3 leta – 17 let	¹ 0/57 ² 0/18	2-prostorni	V ₁ ¹ =0,3 L V ₁ ² =2,0 L V ₂ ¹ =16,5 L	¹ 0,2 L/min/kg ^{0,75} ² 0,2 L/min	/	(47)
Bolniki pred operativnim posegom (peroralno)	9 mesecev – 12 let	0/45	1-prostorni	V ₁ =2,2 L/kg	2,6 L/kg/h	TM → Cl MR → Cl	(46)
Novorojenčki na intenzivni negi	0 – 10 dni (26 – 42 tednov GA)	187/187	2- prostorni	V ₁ =0,6 L/kg V ₂ =0,4 L	Cl=1,2 ml/min/kg	rojstna TM (GA) → Cl rojstna TM (GA) → V ₁	(48)

Cl...očistek, MV...mehansko predihavanje, V_d...volumen porazdelitve, V₁...volumen osrednjega prostora, V₂...volumen stranskega prostora, TM...telesna masa, F...faktor telesne velikosti, MF...funkcija zorenja, 1-OHM...1-hidroksimidazolam, PO...peroralna aplikacija, MR...stopnja metabolične pretvorbe midazolama (1-OHM/midazolam), GA...gestacijska starost (čas od prvega dne zadnjega normalnega menstrualnega cikla do rojstva)

2. NAMEN DELA

Otroci z bronhiolitisom na intenzivni negi dobivajo midazolam za sedacijo ob mehanskem predihavanju. S sedacijo usmerimo bolnika v mirno, brezbolečinsko stanje, nadziramo podajnost stene prsnega koša in s tem omogočimo mehansko predihavanje, ter zmanjšamo psihični nemir in njegove posledice. Metabolizem midazolama je pri otrocih na intenzivni negi odvisen od mnogih dejavnikov, kot so starost, TM, telesna velikost, genski zapis za encime udeležene v metabolizmu, kritično bolezensko stanje, sočasna terapija idr. Za pridobitev teh informacij so potrebne klinične študije midazolama na otrocih, ki so iz etičnega vidika problematične in zato redkejše, kot pri odraslih, kljub temu pa edini način za optimizacijo režima odmerjanja. Posledica režimov odmerjanja, ki temeljijo na ekstrapolaciji iz raziskav na odraslih je, da otroci na intenzivni negi pogosto prejemajo previsoke ali prenizke odmerke.

Namen magistrske naloge je izdelati PFK model, ki bo pripomogel k optimizaciji režima odmerjanja intravenske infuzije midazolama pri otrocih z bronhiolitisom. Osnova za PFK modeliranje so podatki iz raziskave »Odnosi med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«, v kateri je sodelovalo 49 otrok. Tekom dolgotrajne IV infuzije fentanila in midazolama je bilo vsakemu otroku odvzetih 5 vzorcev venske krvi za določitev plazemske koncentracije midazolama. Poleg plazemskih koncentracij midazolama bomo za razvoj PFK modela uporabili demografske in druge klinične podatke. PFK model bomo izdelali s pomočjo programskega paketa NONMEM. Stremeli bomo k čim boljši optimizaciji modela z vključevanjem vpliva sočasnih spremenljivk in ga na koncu tudi ovrednotili.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. KLINIČNI DEL

Klinične podatke smo pridobili iz raziskave »Odnosi med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«, katere del je naša magistrska naloga in se je izvajala na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo (KOOKIT, Kirurška klinika, UKC Ljubljana) in Kliniki za pediatrijo, UKC Maribor. Odgovorna oseba za klinični del raziskave je izr. prof. dr. Štefan Grosek, dr. med., specialist pediatrije in intenzivne medicine. Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko in Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke.

V raziskavo je bilo vključenih 49 otrok z bronhiolitisom, ki so zaradi potrebe po analgeziji in sedaciji prejeli dolgotrajno intravensko infuzijo fentanila in midazolama. Na KOOKIT Ljubljana in Kliniki za pediatrijo, UKC Maribor uporabljajo midazolam v zdravilu Dormicum (1 mg/ml raztopina za injiciranje) proizvajalca ROCHE d.o.o.. Za sodelovanje otrok v raziskavi so bili postavljeni naslednji vključitveni in izključitveni kriteriji:

V raziskavo so bili vključeni otroci:

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

Iz raziskave so bili izključeni otroci:

- s telesno maso manj kot 3 kg,
- starejši od dveh let,
- ki so bili na terapiji z drugimi opioidi,
- z možganskimi poškodbami.

Plazemske koncentracije midazolama

Tekom terapije so beležili časovni potek in hitrosti infuzije in bolusov midazolama. Vsakemu otroku je bilo odvzetih 5 vzorcev venske krvi (po 1,5 ml) v časovnem zaporedju 5, 15 in 60 minut po začetku infuzije fentanila, en vzorec v časovnem intervalu od 8 do 24 ur po začetku infuzije in zadnji ob prekinitvi infuzije fentanila (49). IV infuziji fentanila in midazolama sta bili večinoma aplicirani sočasno, kljub temu pa smo v nadaljevanju za potrebe PFK modeliranja preračunali čase odvzema plazemskih vzorcev glede na začetek infuzije midazolama. Vzorci venske krvi so bili analizirani v okviru magistrskega dela »Populacijska farmakokinetika fentanila pri otrocih z bronhiolitisom« Mojce Nastran (Možina) (50). Metoda za analizo plazemskih vzorcev midazolama je bila razvita v raziskovalni nalogi »Razvoj in validacija LC-MS/MS metode za sočasno določanje fentanila in midazolama v plazemskih vzorcih« Eve Rožman in Sanje Vrbek (51). Gre za visoko selektivno metodo tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (LC-MS/MS), ki omogoča sočasno določanje fentanila in midazolama v plazemskih vzorcih, kar je v primeru raziskav pri otrocih velika prednost, saj razpolagamo z majhnim volumnom plazme. Za vsakega otroka smo določili tudi dejavnike, ki bi lahko potencialno vplivali na plazemske koncentracije midazolama. Ti so:

- spol,
- TM,
- starost (GA, kronološka, PMA),
- vrednost serumskega kreatinina (SCR),
- vrednost serumskega albumina,
- vrednost serumskega bilirubina,
- vrednost celokupnih serumskih proteinov,
- sočasna zdravila,
- genotip P-glikoproteina (Pgp).

Kronološka starost je čas, ki je pretekel od rojstva in jo izražamo v dnevih, tednih, mesecih in/ali letih. Izračunali smo tudi pomenstrualno starost (PMA), ki je seštevek GA in kronološke starosti, izražen v tednih. PMA najpogosteje uporabljamo za podajanje starosti v perinatalnem obdobju. Podatke o genotipu Pgp smo pridobili iz magistrske naloge »Vpliv izbranih polimorfizmov v genih OPRM1, ABCB1 in COMT na varnost in učinkovitost terapije s fentanilom pri otrocih« Špele Mlakar (13), kjer so izvedli izolacijo DNA iz

celičnega dela krvi otrok, ki so sodelovali v raziskavi in genotipizacijo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in alelne diskriminacije s hidrolizirajočimi sondami.

3.2. PRIPRAVA BAZE PODATKOV ZA POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO ANALIZO

Ko smo zbrali vse podatke iz klinične raziskave, smo se lotili strukturiranja in priprave podatkov v obliko, ki omogoča PFK analizo. Vsakemu posamezniku v populaciji smo dodelili identifikacijsko številko (ID) in v časovnem zaporedju s šifranti ali številčnimi vrednostmi opisali potek dogodkov ter vrednosti merjenih odvisnih, neodvisnih in sočasnih spremenljivk. Polja, kjer podatka ni bilo (npr. ob dogodku začetek infuzije nismo imeli podatka o koncentraciji midazolama) smo označili z znakom ».«, s čimer smo se izognili naši napaki, da bi podatek pozabili vpisati. Oznake parametrov in spremenljivk, njihovi opisi in opis uporabljenih šifrantov so zbrani v preglednici V.

Preglednica V: Prikaz oznak parametrov in spremenljivk, s katerimi smo opisali klinične in demografske podatke otrok, njihov opis in opis šifrantov

Oznaka parametra/ spremenljivke	Opis oznake in šifrantov
ID	identifikacijska številka posameznika
EVID	identifikacijska številka dogodka; 1/0
	1=aplikacija odmerka
	0=meritev koncentracije
DAT1	datum dogodka
TIME	čas dogodka
MDV	odsotnost odvisne spremenljivke (koncentracija midazolama v plazmi): 1/0
	1=koncentracija ni izmerjena
	0=koncentracija je izmerjena
AMT	odmerek midazolama (mg)
RATE	hitrost infuzije (mg/h)
DV	vrednost odvisne spremenljivke (koncentracija midazolama v plazmi)
AGE	kronološka starost (tedni)
WEIGHT	TM (kg)
SCR	serumski kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)
ALB	serumska koncentracija albumina (g/L)
BIL	serumska koncentracija bilirubina ($\mu\text{mol/L}$)
PROT	serumska koncentracija celokupnih proteinov (g/L)

Nadaljevanje preglednice V:

Oznaka parametra/ spremenljivke	Opis oznake in šifrantov
SPOL	spol; 1/0
	1=ženski spol
	0=moški spol
GA	gestacijska starost (tedni)
PMA	pomenstruacijska starost (tedni)
ABCB1	genotip na zapisu za Pgp; 0/1/2
	0=homozigot divjega tipa
	1=heterozigot
	2=polimorfni homozigot
TINF	začetek infuzije; 1/0
	1=začetek infuzije
	0=ni začetka infuzije

3.3. POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE

PFK modeliranje smo izvajali s programskim paketom za nelinearno modeliranje mešanih učinkov (NONMEM). NONMEM je računalniški program s katerim izvajamo prileganje splošnih statističnih nelinearnih regresijskih modelov populacijskim FK podatkom, ki jih pridobimo v kliničnih študijah. NONMEM omogoča modeliranje mešanih učinkov, kjer govorimo o:

- stalnih učinkih, ki predstavljajo tipične vrednosti FK parametrov v populaciji oseb in parametre, ki opisujejo povezavo med tipičnimi vrednostmi FK parametrov in sočasnimi spremenljivkami in
- slučajnih učinkih, ki predstavljajo inter- in intraindividualne učinke.

Tovrsten način modeliranja je posebej uporaben v primerih, ko razpolagamo z majhnim številom meritev FK podatkov na posameznika v populaciji ali ko se načini pridobivanja istovrstnih FK podatkov med posamezniki močno razlikujejo. Vez med podatki pridobljenimi v FK študiji in NONMEM-om je NM-TRAN – prevajalnik kontrolnih ukazov in podatkovni predprocesor. V podprogramu PREDPP najdemo zbirko različnih podprogramov (npr. ADVAN), od katerih je vsak predprogramiran za specifični FK model (52).

3.3.1. Razvoj osnovnega modela

Najprej smo FK midazolama opisali z enoprostornim modelom. Uporabili smo podprogram ADVAN1 in izbrali postopek TRANS2. TRANS so postopki, ki mikrokonstante, ki jih izračuna PREDP iz podatkov, poda s FK parametri, s katerimi lažje opisujemo model (52). V primeru enoprostornega modela TRANS2 omogoči opis FK s FK parametroma:

- očistek (Cl) in
- volumen porazdelitve (V).

V naslednjem koraku smo FK midazolama opisali z dvoprostornim modelom, s pomočjo podprograma ADVAN3 in izbrali postopek TRANS2, ki omogoči opis FK s FK parametri:

- očistek (Cl),
- volumen osrednjega prostora (V_1),
- volumen stranskega prostora (V_2) in
- distribucijski očistek (Q).

V oba modela smo vključili vpliv telesne mase preko alometrične funkcije s fiksnim eksponentom 0,75 za parametra Cl in Q (enačbi 3 in 4) in 1 za parametra V_1 in V_2 (enačbi 5 in 6).

$$Cl_i(L/h) = Cl_{70} \times \left(\frac{TM}{70}\right)^{0,75} \quad \text{Enačba 3}$$

$$Q_i(L/h) = Q_{70} \times \left(\frac{TM}{70}\right)^{0,75} \quad \text{Enačba 4}$$

$$V_{1,i}(L) = V_{1,70} \times \left(\frac{TM}{70}\right) \quad \text{Enačba 5}$$

$$V_{2,i}(L) = V_{2,70} \times \left(\frac{TM}{70}\right) \quad \text{Enačba 6}$$

Cl_i...vrednost očistka osebe i, Cl₇₀...vrednost očistka standardne osebe s TM 70 kg, TM...telesna masa, 0,75...alometrični eksponent, Q_i...vrednost distribucijskega očistka osebe i, Q₇₀...vrednost distribucijskega očistka standardne osebe s TM 70 kg, V_{1,i}...vrednost volumna centralnega prostora osebe i, V_{1,70}...vrednost volumna centralnega prostora standardne osebe s TM 70 kg, V_{2,i}...vrednost volumna stranskega prostora osebe i, V_{2,70}...vrednost volumna stranskega prostora standardne osebe s TM 70 kg

Eksponent 0,75 je eksperimentalno določena alometrična vrednost in predstavlja enega od načinov s katerim izničimo vpliv telesne mase na Cl in Q (53).

Slučajni učinki vključujejo IIV in intraindividualno oziroma rezidualno variabilnost. Individualne vrednosti parametrov smo vključili v model po enačbi 7, s katero smo upoštevali logaritemsko normalno porazdelitev FK parametrov. V programu NONMEM so slučajni IIV učinki označeni z η , slučajni rezidualni učinki pa z ε .

$$P_i = \theta_p \times e^{\eta_p} \quad \text{Enačba 7}$$

P_i ...individualna vrednost posameznega parametra, θ_p ...ocena posameznega parametra v populaciji, η_p ...slučajna spremenljivka parametra, ki predstavlja IIV parametra in je vzeta iz normalne porazdelitve z aritmetično sredino 0 in varianco ω^2

IIV smo podali kot koeficient variacije (CV) po enačbi 8, ki prav tako upošteva logaritemsko normalno porazdelitev FK parametrov.

$$CV (\%) = (\sqrt{e^{\sigma^2} - 1}) \times 100 \quad \text{Enačba 8}$$

σ^2 ...varianca parametra, ki jo NONMEM poda kot IIV

Natančnost ocen parametrov smo podali z relativno standardno napako (RSE) in 95 % intervalom zaupanja (IZ), ki smo ju izračunali po enačbah 9 in 10.

$$RSE (\%) = \frac{se}{\theta_p} \times 100 \% \quad \text{Enačba 9}$$

RSE ...relativna standardna napaka, θ_p ...ocena posameznega parametra v populaciji, se ...standardna napaka ocene parametra, ki jo izračuna NONMEM

$$95 \% IZ = \theta_p \pm (1,96 \times se) \quad \text{Enačba 10}$$

IZ ...interval zaupanja, θ_p ...ocena posameznega parametra v populaciji, 1,96...kritična vrednost »z« za 95 % IZ

Za vključitev rezidualne variabilnosti smo izbrali kombinirani model, ki za opis izmerjenih koncentracij midazolama vključuje aditivno napako (W_a) in W_p . Zveza je prikazana z enačbo 11.

$$c_{p,izm} = c_{p,nap} \times (1 + \varepsilon_p) + \varepsilon_a \quad \text{Enačba 11}$$

$c_{p,izm}$...izmerjena plazemska koncentracija midazolama, $c_{p,nap}$...z modelom napovedana plazemska koncentracija midazolama, ε_p ...proporcionalna napaka, ε_a ...aditivna napaka

3.3.2. Izbira osnovnega modela

Tekom razvijanja osnovnega modela smo testirali vpliv slučajnih in stalnih učinkov na FK parametre preko različnih kombinacij. Pri tem smo vključevali in/ali izključevali vpliv IIV in rezidualne variabilnosti na posameznih parametrih in kovarianco med parametri. Uspešnost posameznega modela smo opredeljevali z naslednjimi merili:

- uspešnost minimizacije,
- vrednost objektivne funkcije (OFV),
- gradient parametrov,
- krčenje in
- vrednost standardne napake ocen (RSE).

Uspešnost minimizacije nam program NONMEM poda, ko zaključi posamezen proces. Minimizacija je lahko uspešna ali neuspešna. Brez uspešne minimizacije modela nismo mogli razvijati naprej.

OFV je definirana kot negativni dvakratnik logaritma verjetja. Verjetje je največje, ko je verjetnost, da so napovedane koncentracije enaki izmerjenim, največja. Manjša kot je OFV, boljše je prileganje napovedanih parametrov njihovim dejanskim vrednostim. OFV nam služi za primerjavo med modeli. Razlika OFV dveh modelov je porazdeljena χ^2 , prostostne stopinje pa so enake razliki v številu parametrov med modeloma. Tako lahko pri izbrani stopnji tveganja ugotovimo statistično značilnost znižanja OFV. Pri našem delu smo izbrali stopnjo tveganja 0,05 (54).

Gradient parametra je parcialni odvod OFV po parametru. Absolutne vrednosti gradienta parametrov ne smejo biti enake 0 in se morajo gibati med 10^{-3} in 10^2 . V primeru, da je vrednost gradienta parametra enaka 0, za ta parameter ne moremo določiti variabilnosti in ga fiksiramo na ocenjeno vrednost.

Krčenje nam pove, kako dobro z ocenami parametrov napovemo dejansko vrednost parametrov. Vrednosti krčenja so podane v odstotkih za vsako η . Nižja je vrednost krčenja, bližje je ocena parametra njegovi pravi vrednosti. Vrednost krčenja 0 % pomeni, da so vrednosti parametrov napovedane z modelom enake dejanskim vrednostim opazovane populacije, vrednost 100 % pa, da z modelom ne moremo napovedati dejanskih vrednosti populacije. Vrednost krčenja 30 % smo določili kot mejo, nad katero smo posamezen model določili za neuspešen (55).

Kljub svoji uporabnosti pri razvijanju osnovnega modela, pa OFV ni primerna za primerjavo potencialnih modelov, ki so kompleksni in med seboj slabo primerljivi. Tako smo za izbor osnovnega modela iz nabora potencialnih, uporabili Akaike informativni kriterij (AIC), ki smo ga izračunali po enačbi 12. Razlike AIC različnih modelov ne moremo statistično interpretirati, v praksi pa velja pravilo, da je padec v AIC za 2 pokazatelj izboljšanja modela.

$$AIC = OFV + 2 \times n_{par} \quad \text{Enačba 12}$$

n_{par} ...število parametrov, vključenih v model

Za osnovni model smo na podlagi AIC izbrali dvoprostorni model z vključenim vplivom telesne mase. Določali smo Cl, V_1 , V_2 in Q. Ocenjevali smo IIV za Cl in V_2 , ter rezidualno variabilnost preko Wp, med tem ko smo Wa fiksirali na vrednost 0,001.

3.3.3. Testiranje sočasnih spremenljivk

Najprej smo z metodo postopnega modeliranja sočasnih spremenljivk (SCM), testirali vpliv vseh sočasnih spremenljivk na vse parametre. Te sočasne spremenljivke so bile: spol, TM, starost (GA, kronološka, PMA), serumske vrednosti kreatinina (SCR), albumina, bilirubina in celokupnih proteinov, sočasna zdravila in genotip P-glikoproteina (Pgp).

Metoda SCM poteka tako, da program modelu postopno dodaja sočasne spremenljivke in pri tem spremlja spremembo OFV pri stopnji tveganja 0,05 ob dodatku vsake posamezne spremenljivke. Pri padcu OFV za več kot 3,84 se sočasna spremenljivka vključi v model. Ko so vse sočasne spremenljivke, ki so povzročile statistično pomemben padec v OFV vključene v model, začne program le-te postopno odstranjevati iz modela in pri tem spremlja zvišanje OFV, tokrat pri stopnji tveganja 0,01. Če odstranitev sočasne spremenljivke iz modela povzroči povečanje OFV za vsaj 6,63, spremenljivka ostane v modelu. Ker v našem primeru metoda SCM zaradi velike variabilnosti podatkov ni bila uspešna, smo testirali le vpliv zorenja in genotipa.

3.3.4. Testiranje vpliva zorenja

Vpliv zorenja na Cl smo testirali preko zveze, ki jo prikazuje enačba 13.

$$TVCl = \theta_1 \times \left(\frac{TM}{70}\right)^{0,75} \times MF \quad \text{Enačba 13}$$

TVCl...tipična vrednost očistka v populaciji otrok zajetih v raziskavi, θ_1 ...ocena očistka v populaciji, TM...telesna masa, MF...funkcija zorenja

Ker se zorenje začne že pred rojstvom, uporabljamo za opis biološke starosti PMA. Za opis MF, smo uporabili Hill-ov model, ki ga prikazuje enačba 14.

$$MF = \frac{PMA^{Hill}}{PMA_{50}^{Hill} + PMA^{Hill}} \quad \text{Enačba 14}$$

MF...funkcija zorenja, PMA...pomenstruacijska starost, PMA₅₀...pomenstruacijska starost pri kateri je Cl enak 50 % Cl odraslega človeka, Hill...Hillov koeficient

MF je sigmoidna krivulja. Hillov koeficient predstavlja njen naklon, v točki preloma pa lahko odčitamo vrednost PMA₅₀. V programu NONMEM smo MF izrazili z enačbo 15, kjer smo PMA₅₀ in Hillov koeficient, zapisali kot parametra θ_7 in θ_8 .

$$MF = \frac{PMA^{\theta_8}}{\theta_7^{\theta_8} + PMA^{\theta_8}} \quad \text{Enačba 15}$$

θ_7 ...PMA₅₀, θ_8 ...Hillov koeficient

Model z vključeno MF smo primerjali z osnovnim modelom. Merilo za izboljšanje modela je bil značilen padec OFV, pri stopnji tveganja $p < 0,05$.

3.3.5. Testiranje vpliva genotipa ABCB1

Testirali smo tudi vpliv genotipa ABCB1 na Cl midazolama (enačba 16). Polimorfizem na genu, ki nosi zapis za Pgp je kategorična spremenljivka, ki lahko zavzame vrednost 0 (homozigoti divjega tipa), 1 (heterozigoti) ali 2 (polimorfni homozigoti). Zanimala nas je sprememba Cl pri heterozigotih v primerjavi s homozigoti divjega tipa in pri polimorfnih homozigotih v primerjavi s homozigoti divjega tipa.

$$TVCl = \theta_1 \times \left(\frac{TM}{70}\right)^{0,75} \times (1 + \theta_9 \times ABCB11) \times (1 + \theta_{10} \times ABCB12) \quad \text{Enačba 16}$$

TVCl...tipična vrednost Cl, θ_1 ...ocena očiščka v populaciji, TM...telesna masa, θ_9 ...pove koliko se razlikuje očišček homozigotov divjega tipa in heterozigotov, ABCB11...zavzame vrednost 1, če je pacient heterozigot za ta alel, sicer zavzame vrednost 0, θ_{10} ...pove koliko se razlikuje očišček homozigotov divjega tipa in polimorfnih homozigotov, ABCB12...zavzame vrednost 1, če sta polimorfna oba alela, sicer zavzame vrednost 0.

3.4. VREDNOTENJE POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

3.4.1. Diagnostični diagrami

Izdelali smo diagnostične diagrame za osnovni in končni model.

Diagrami odvisnosti izmerjenih koncentracij od koncentracij napovedanih z modelom

Osnovna diagnostična diagrama sta diagrama odvisnosti izmerjenih koncentracij od [1] populacijsko in [2] individualno napovedanih koncentracij. Ravna črna črta z naklonom 1 je črta enakosti ($x = y$), s točkami pa so prikazane izmerjene koncentracije, katerih porazdelitev okoli črte enakosti opazujemo. Rdeča črta je lokalna gladilka, ki prikazuje trend izmerjenih koncentracij. Napoved modela je tem boljša, čim boljše je prileganje lokalne gladilke črti enakosti. Prednost diagrama [2] pred diagramom [1] je, da nam omogoča razlikovanje med različnimi viri variabilnosti (55).

Diagrami rezidualov

Metoda rezidualov je osnova modeliranja. Rezidual (RES) je razlika med izmerjeno vrednostjo in vrednostjo napovedano z modelom. Vpliv posameznega RES je odvisen od velikosti podatkov, zato vsak RES utežimo, kar pomeni, da mu pripišemo dejanski vpliv, ki ga ima ne glede na svojo velikost. Računanje uteženih rezidualov (WRES) je kompleksno, pomembni pa so zaradi svoje informativne vloge pri ocenjevanju ustreznosti modela. Ko se vrednosti ocen parametrov približujejo pravim vrednostim, se porazdelitev WRES približa normalni porazdelitvi z aritmetično sredino 0 in enotami variance (55). Zato je pričakovano, da so WRES normalno porazdeljeni okoli 0 in ne odstopajo za več kot 2 oz. -2 enoti. Naredili smo diagram pogojno uteženih rezidualov (CWRES) v odvisnosti od populacijske napovedi, kjer enakomerna porazdelitev CWRES okoli vrednosti 0 pomeni ustreznost modela. Krivulja diagrama absolutne vrednosti individualnega uteženega reziduala ($|IWRES|$) v odvisnosti od individualne napovedi mora biti horizontalna, kar pomeni, da so vrednosti $|IWRES|$ konstantne preko individualne napovedi. Naredili smo tudi diagram CWRES v odvisnosti od časa. Ustreznost modela potrjujejo časovno enakomerno porazdeljene vrednosti CWRES.

3.4.2. Metoda ponovljenega vzorčenja (bootstrapping)

Z metodo ponovljenega vzorčenja smo preverili točnost in natančnost FK parametrov, ki smo jih določili s končnim modelom. Natančnost parametrov običajno izrazimo kot standardno napako (SE) in/ali IZ, kar je primerno ob predvidevanju normalne porazdelitve parametrov. V našem primeru, ko imamo opraviti z manjšo populacijo, bi bilo tovrstno predvidevanje lahko napačno in IZ, ki temeljijo na SE ocen parametrov, nezanesljivi. Z metodo ponovljenega vzorčenja se izognemo parametričnim predpostavkam pri računanju IZ (54). Temelj metode je predpostavka, da je vzorčna populacija reprezentativna za

populacijo, iz katere je vzeta. Kot tako jo lahko obravnavamo enako kot populacijo in z naključnim ponavljajočim vzorčenjem posameznikov iz vzorčne populacije izdelamo nove podatkovne sete. Vsak posameznik iz vzorčne populacije je lahko večkrat vključen v nov set podatkov ali pa sploh ni vključen. Porazdelitev parametrov, ki jih program NONMEM izračuna za novo generirane podatkovne sete, predstavlja porazdelitev parametrov preiskovane populacije (56). V našem primeru smo ustvarili 1000 novih podatkovnih setov, ki so vključevali po 49 posameznikov.

3.4.3. Vizualno vrednotenje napovedi modela

Za končni model smo naredili tudi vizualno vrednotenje napovedi modela (VPC). Osnova metode je grafično oceniti, če s simulacijo s končnim modelom lahko ponovimo trend in variabilnost izmerjenih podatkov v odvisnosti od časa. VPC temelji na multiplih simulacijah s postavljenim modelom in na strukturi izmerjenih podatkov. Mediano in izbrane centile simuliranih podatkov primerjamo s pripadajočimi centili izmerjenih podatkov. Izmerjeni podatki so prikazani kot točke, mediana, 5. in 95. centil pa kot črte. Iz multiplih simulacij dobimo nove vrednosti, za vsako od njih pa VPC izračuna mediano in neparametrični 95 % IZ. Simulirane podatke VPC prikaže kot siva področja, ki predstavljajo 95 % IZ v območju mediane in izbranih centilov. Pri modelu, ki dobro opisuje izmerjene podatke, ležijo črte znotraj sivin. Najpogosteje predstavljamo poleg mediane še 2,5. in 97,5. centil, če razpolagamo z manjšo količino izmerjenih podatkov pa 5. in 95. centil. Razpon med predstavljenimi centili imenujemo napovedni interval in je v primeru predstavitve 5. in 95. centila 90 %. VPC v modelu mešanih učinkov omogoča vrednotenje stalnih in naključnih učinkov, vrednotenje pa je lahko oteženo in tudi zavajajoče, če vrednosti odvisne spremenljivke zaradi močnega vpliva neodvisnih spremenljivk zelo variirajo. V teh primerih uporabljamo izboljšavo osnovne metode VPC, ki jo imenujemo prediction–corrected VPC (pcVPC), katere prednost je, da posamezne izmerjene in simulirane vrednosti odvisne spremenljivke pred izvedbo statističnih izračunov (mediane in 90 % CI za vsako vrednost) korigira na osnovi tipične napovedane vrednosti parametra za populacijo. Korekcijo lahko izvedemo tudi na osnovi tipične variabilnosti populacije, ki prispeva k razlikam v pričakovani variabilnosti med osebki. Metoda, ki pri korekciji upošteva tako tipično napovedano vrednost parametra za populacijo kot tudi tipično variabilnost populacije, se imenuje prediction and variability – corrected VPC (pvcVPC) (57). Ker smo imeli zelo različne otroke z različnimi režimi odmerjanja, smo izvedli pvcVPC. Terapija naših otrok ni

potekala sočasno, zato smo pred obdelavo naših izmerjenih podatkov v tabeli s podatki opredelili začetek infuzije midazolama pri vsakem otroku kot časovno izhodišče in s tem poenotili časovni potek dogodkov pri vseh otrocih.

4. REZULTATI

4.1. KLINIČNI DEL

4.1.1. Podatki o otrocih

V raziskavi je sodelovalo 49 otrok, ki so bili zaradi kroničnega bronhiolitisa hospitalizirani v UKC Ljubljana ali UKC Maribor v letih 2010 do 2013 in so ustrezali vključitvenim kriterijem. Med njimi je bilo 33 dečkov in 16 deklic. 36 otrok je bilo normalno donošenih, 13 je bilo nedonošenčkov. V preglednici VI so zbrani podatki o sočasnih spremenljivkah, ki smo jih spremljali tekom terapije.

Preglednica VI: Aritmetične sredina, standardna deviacija, mediana, minimalna in maksimalna vrednost sočasnih spremenljivk otrok (n = 49)

	Aritmetična sredina	SD	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
Kronološka starost (tedni)	26,3	35,2	9,7	0,1	130,0
Telesna masa (kg)	6,15	2,77	5,30	2,80	13,50
Serumski kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	24,29	5,80	23,00	16,00	44,00
Serumski albumini (g/L)	35,4	4,5	35,0	25,0	44,0
Serumski bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	16,0	26,3	6,0	2,0	136,0
Celokupni serumski proteini (g/L)	54,98	6,12	54,00	44,00	70,00
GA (tedni)	38,37	3,30	40,00	25,00	40,00
PMA (tedni)	64,67	34,64	48,50	34,00	170,00

SD...standardna deviacija, GA...gestacijska starost, PMA...pomenstruacijska starost

Koncentracije midazolama v krvi otrok smo dobili iz magistrske naloge »Populacijska farmakokinetika fentanila pri otrocih z bronhiolitisom« Mojce Nastran (Možina) in so prikazane v preglednici VII.

Preglednica VII: Prikaz izmerjenih plazemskih koncentracij midazolama ($\mu\text{g/L}$). Otroci so razporejeni po dodeljenih identifikacijskih številkah (ID), plazemske koncentracije midazolama pa so razporejene po časih, v katerih so bili odvzeti plazemski vzorci glede na začetek infuzije fentanila.

ID otroka	5 min	15 min	60 min	720 min	konec infuzije
1	558,9	658,0	4109,2	2170,9	198,3
2	375,5	296,5	335,9	575,6	2257,1
3	298,0	258,3	535,2	2237,1	159,9
4	322,2	327,0	506,4	959,9	455,7
5	121,8	158,7	171,3	198,0	112,0
6	428,1	529,3	956,0	718,6	481,8
7	207,0	150,8	150,0	675,0	184,7
8	491,5	494,6	921,3	1582,4	124,2
9	342,5	370,5	561,6	771,5	2877,6
10	72,4	145,7	336,7	361,2	427,7
11	252,9	292,1	243,5	529,3	101,6
12	234,1	270,4	435,6	764,1	202,8
13	867,4	677,2	130,2	3023,5	91,1
14	349,1	297,6	699,7	464,5	148,4
15	835,5	1006,4	1063,8	1357,2	3098,3
16	460,9	423,7	644,1	1616,3	396,4
18	795,1	644,4	603,1	1872,7	128,3
19	261,7	277,2	323,3	978,8	250,5
20	522,9	481,2	684,4	1273,0	0,0
27	434,9	478,4	453,7	2032,4	4874,4
31	428,2	300,2	309,8	649,2	494,5
32	618,3	1069,2	1600,4	2073,1	3676,6
33	283,1	1745,4	333,6	199,2	1794,2
34	242,6	209,5	242,1	365,3	1281,3
35	209,7	200,5	256,0	920,4	486,9
36	73,6	886,7	957,2	1299,6	1552,6
37	59,5	225,5	74,9	810,5	331,4
38	547,6	1150,1	1058,3	2175,0	451,8
39	27,5	26,3	98,7	353,9	352,4
40	126,7	121,8	355,2	3746,9	461,7
41	689,3	1270,5	899,5	501,2	1494,8
42	657,7	983,1	1108,5	1728,6	532,6
43	1114,2	1149,1	1746,5	2328,5	1816,7
44	57,8	71,1	147,2	214,5	381,5
45	120,7	131,1	205,5	641,5	1797,1

Nadaljevanje preglednice VII:

ID otroka	5 min	15 min	60 min	720 min	konec infuzije
46	713,9	579,2	.	399,4	30,4
47	634,3	449,5	469,7	418,2	59,0
48	412,8	415,5	348,5	256,4	249,1
49	760,8	645,4	2112,1	591,9	39,7
50	220,8	185,7	191,4	534,3	103,0
51	378,8	403,2	481,9	1554,6	243,1
55	261,7	245,7	292,1	647,8	608,7
61	79,1	70,2	1010,6	137,6	3712,5
62	499,5	1157,2	821,1	1008,0	1827,2
25	404,7	334,8	301,4	1279,9	1507,1
26	396,7	291,5	511,8	2247,9	3380,1
28	604,0	604,4	652,3	1544,6	144,4
29	85,8	.	67,1	104,0	1594,6
63	787,0	2356,7	3656,3	983,8	170,8

ID...identifikacijska številka,ni podatka.

Odvzetih je bilo skupno 243 vzorcev krvi, ki smo jih časovno razvrstili glede na začetek infuzije midazolama. Nekateri krvni vzorci niso bili odvzeti ob predvidenih časih, saj je imela zdravstvena oskrba otrok prednost pred jemanjem vzorca krvi za potrebe naše raziskave. Pri vsakem vzorcu je bil zabeležen dejanski čas njegovega odvzema in ta čas smo upoštevali v modelu.

4.2. PRIPRAVA BAZE PODATKOV

V bazo podatkov, ki smo jo uporabili kot vir podatkov za PFK modeliranje, smo podatke za vse vključene otroke uredili kot je prikazano v preglednici VIII za primer otroka z identifikacijsko številko (ID) 1. Pomen oznak je podan v poglavju **Metode**, preglednica V.

Preglednica VIII: Primer baze podatkov za farmakokinetično analizo za otroka z identifikacijsko številko 1

ID	EVID	DAT1	TIME	MDV	AMT	RATE	DV	AGE	WEIGHT	SCR	ALB	BIL	PROT	SPOL	GA	PMA	ABCB1	TINF
1	1	27.11. 2010	16:01	1	1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	27.11. 2010	16:23	1	1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	27.11. 2010	17:00	1	1,5	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	27.11. 2010	17:53	1	3,17	1,21	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	1
1	0	27.11. 2010	17:58	0	.	.	559	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	0	27.11. 2010	18:08	0	.	.	658	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	0	27.11. 2010	18:53	0	.	.	4109	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0

Nadaljevanje preglednice VIII:

ID	EVID	DAT1	TIME	MDV	AMT	RATE	DV	AGE	WEIGHT	SCR	ALB	BIL	PROT	SPOL	GA	PMA	ABCB1	TINF
1	1	27.11.2010	20:30	1	304	1,98	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	27.11.2010	20:30	1	1,98	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	28.11.2010	3:30	1	0,79	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	28.11.2010	4:30	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	0	28.11.2010	5:53	0	.	.	2171	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	28.11.2010	10:40	1	0,99	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	29.11.2010	10:10	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	29.11.2010	11:45	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	29.11.2010	13:00	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	1.12.2010	17:00	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	0	4.12.2010	5:15	0	.	.	198	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	4.12.2010	6:00	1	2,97	0,99	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	4.12.2010	8:00	1	1,1	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	4.12.2010	23:00	1	0,99	0,99	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	5.12.2010	0:00	1	113	1,98	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0
1	1	9.12.2010	0:00	1	0,6	0	.	77	11	37	43	3	70	1	40	117	1	0

4.3. POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE

4.3.1. Osnovni model

Testirali smo enoprostorni in dvoprostorni model. Oba sta bila linearna. Testirali smo vplive korelacij, med tem ko smo v vse modele že na začetku vključili vpliv telesne mase. V preglednici IX so prikazani vsi modeli s pripadajočimi OFV in AIC vrednostmi ter ocenjevanimi parametri, korelacijami in variabilnostjo.

Preglednica IX: Primerjava preizkušenih modelov preko OFV in AIC, opis prostornega modela in parametrov ter uspešnost minimizacije. Krepko in ležeče je označen izbrani osnovni model.

MODEL	OFV	n_{θ}	n_{η}	AIC	OPIS MODELA	MIN
1	3232,7	4	2	3244,7	1-prostorni (θ_{CL} , θ_{V1} , θ_{Wa} , θ_{Wp})	U
100	3294,9	6	1	3308,9	2-prostorni (θ_{CL} , θ_{V1} , θ_{V2} , θ_Q , θ_{Wa} , θ_{Wp} , η_{CL})	U
101	3229,6	6	2	3245,6	2-prostorni (θ_{CL} , θ_{V1} , θ_{V2} , θ_Q , θ_{Wa} , θ_{Wp} , η_{CL} , η_{V1})	U

Nadaljevanje preglednice IX:

MODEL	OFV	n_{θ}	n_{η}	AIC	OPIS MODELA	MIN
102	3229,4	6	4	3249,4	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q$)	U
103	3229,5	6	3	3247,5	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \rho_{CL-V1}$)	U
104	3229,4	6	5	3251,4	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}$)	U
105	3223,3	6	6	3247,3	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{Q-V2}$)	N
106	3226,1	6	10	3258,1	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CELOTNA}$)	N
107	3229,9	6	6	3253,9	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \rho_{CL-V1}, \rho_{CL-V2}, \rho_{V1-V2}$)	N
108	3225,0	6	7	3251,0	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{CL-V2}, \rho_{V1-V2}$)	N
109	3214,9	6	5	3236,9	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V2}$)	N
110	3225,8	7	3	3245,8	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \delta_{CL-V2}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q$)	U
111	3225,8	7	6	3251,8	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \delta_{CL-V2}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{CL-Q}, \rho_{V1-Q}$)	N
120	3223,2	7	3	3243,2	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \delta_{V2-Q}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q$)	N
121	3220,7	7	6	3246,7	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \delta_{V2-Q}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{CL-V2}, \rho_{V1-V2}$)	N
130	3224,7	6	2	3240,7	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wa}, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V2}$)	N
1011	3229,5	5	2	3243,5	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}$)	U
1041	3229,4	5	5	3249,4	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}$)	U
1051	3229,4	5	6	3251,4	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{Q-V2}$)	U
1061	3225,4	5	10	3255,4	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CELOTNA}$)	N
1091	3218,6	5	5	3238,6	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_{V2}, \eta_Q, \rho_{CL-V2}$)	N
1201	3224,2	6	3	3242,1	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \delta_{V2-Q}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q$)	U
1211	3225,0	6	6	3249,0	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \delta_{V2-Q}, \eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q, \rho_{CL-V1}, \rho_{CL-V2}, \rho_{V1-V2}$)	N
1301	3224,1	5	2	3238,1	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V2}$)	U
1311	3223,7	5	3	3239,7	2-prostorni ($\theta_{CL}, \theta_{V1}, \theta_{V2}, \theta_Q, \theta_{Wp}, \eta_{CL}, \eta_{V2}, \rho_{CL-V2}$)	U

OFV...vrednost objektivne funkcije, n_{θ} ...število parametrov θ , n_{η} ...število slučajnih spremenljivk, AIC...Accaice informativni kriterij, MIN...minimizacija, U...uspešna minimizacija, N...neuspešna minimizacija, ρ ...korelacija med dvema parametroma, $\rho_{CELOTNA}$...celotna korelacijska matrika (korelacije vseh parov parametrov med seboj), δ ...popolna korelacija med dvema parametroma.

Osnovni model smo izbrali na podlagi AIC in sicer je bil to dvoprostorni model, ki je v preglednici IX označen s številom 1301. Model uporablja slednje parametre: CL, volumen osrednjega prostora (V_1), volumen stranskega prostora (V_2) in distribucijski očistek (Q). Ocenjevali smo IIV CL in V_2 in rezidualno variabilnost preko Wp, medtem, ko smo Wa fiksirali na zelo majhno vrednost. Parametru določimo konstantno vrednost, če njegove variabilnosti v populaciji ne moremo določiti. Parametri osnovnega modela so prikazani v preglednici X.

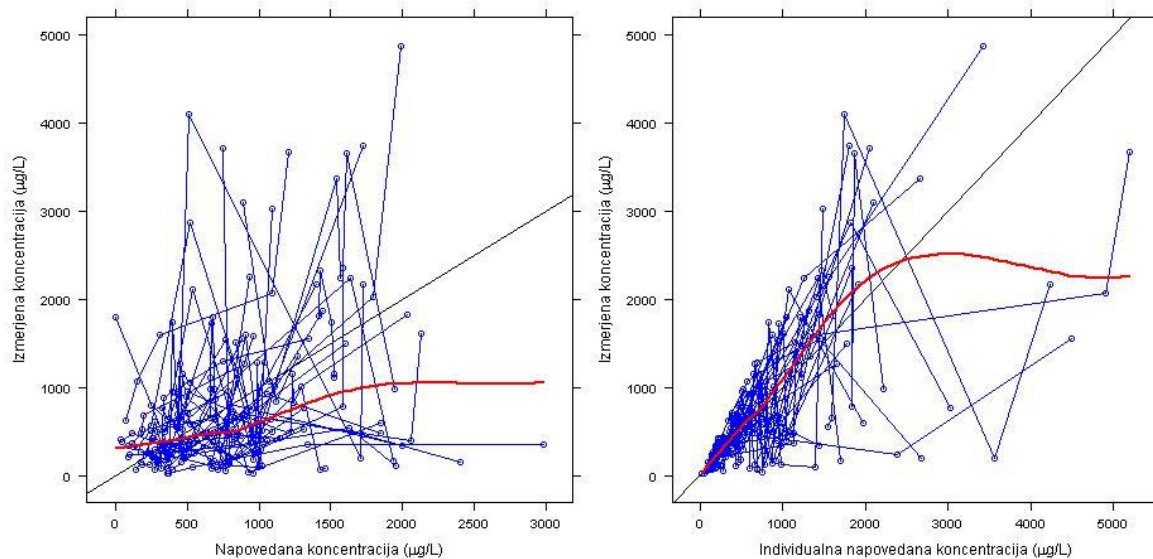
Preglednica X: Ocene FK parametrov osnovnega modela

Parameter	Ocena	RSE %	95 % IZ
CL (L/h)	4,7	9,7	3,8 - 5,5
V2 (L)	40,4	32,7	14,5 - 66,2
V1 (L)	3,8	87,3	0,0 - 10,3
Q (L/h)	127,0	69,1	0,0 - 298,0
IIVCL (CV %)	106,0	24,3	69,4 - 142,2
IIVV2 (CV %)	305,0	41,2	75,2 - 817,3
Rezidualna variabilnost			
Wa ($\mu\text{g/L}$)	0,001	Fiksirana vrednost	
Wp (%)	55,9	6,6	43,0 - 68,7

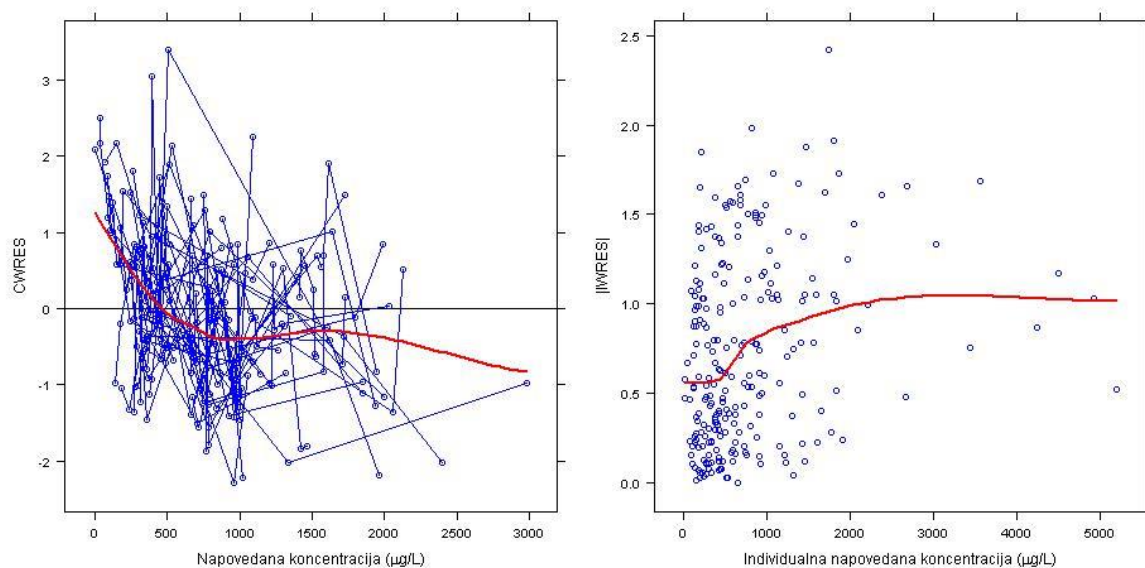
RSE...relativna standardna napaka, IZ...interval zaupanja, CV...koeficient variacije, CL...očistek, V₂...volumen stranskega prostora, V₁...volumen osrednjega prostora, Q...distribucijski očistek, Wa...aditivna napaka, Wp...proporcionalna napaka.

4.3.2. Vrednotenje osnovnega modela

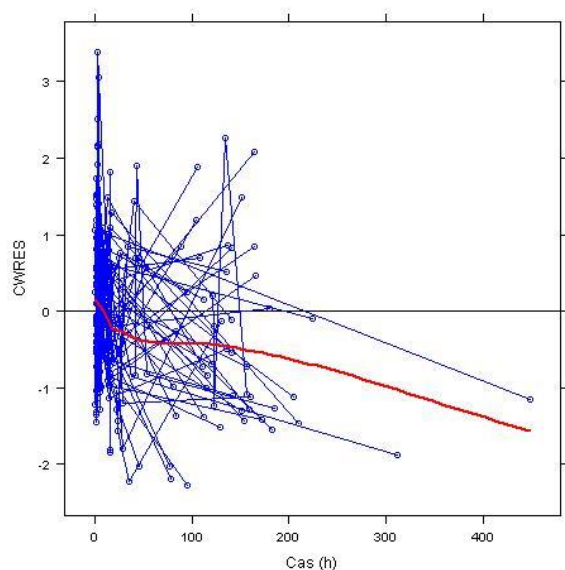
Osnovni model smo vizualno ovrednotili z diagnostičnimi diagrami (slike 2, 3, 4). Slika 2 prikazuje odvisnost izmerjenih koncentracij midazolama od populacijsko in individualno napovedanih koncentracij. Slika 3 prikazuje odvisnost CWRES od populacijsko napovedanih koncentracij in odvisnost IWRES od individualno napovedanih koncentracij. Slika 4 prikazuje CWRES v odvisnosti od časa.



Slika 2: Odvisnost izmerjenih koncentracij midazolama od populacijsko napovedanih koncentracij (levo) in od individualno napovedanih koncentracij (desno) za osnovni model. Črna črta prikazuje linijo enakosti ($x = y$), rdeča črta prikazuje lokalno gladilko.



Slika 3: Odvisnost pogojno uteženih rezidualov (CWRES) od napovedanih koncentracij (levo) in odvisnost individualno uteženih rezidualov (IWRES) od individualno napovedanih koncentracij (desno) za osnovni model.



Slika 4: Odvisnost pogojno uteženih rezidualov (CWRES) od časa za osnovni model.

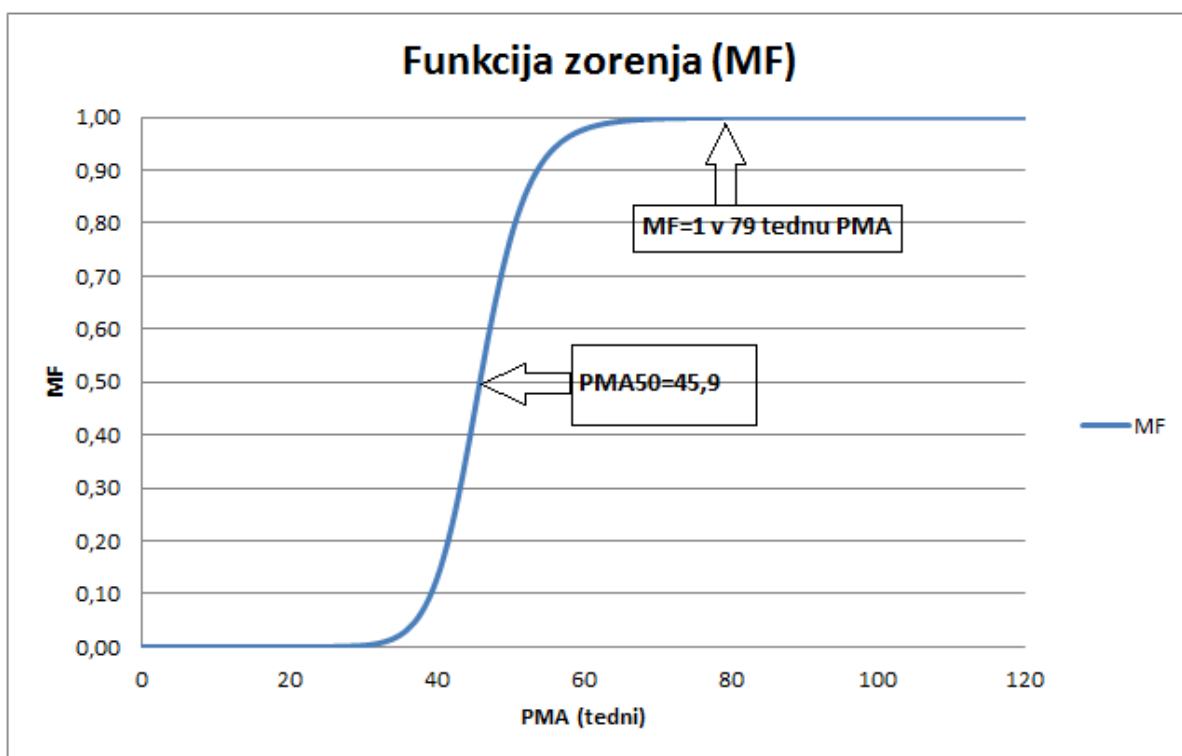
4.3.3. Testiranje vpliva zorenja

Izračun Cl v modelu z vključenim vplivom zorenja opisuje enačba 17.

$$TVCL(L/h) = 4,65 \times \left(\frac{TM}{70}\right)^{0,75} \times \frac{PMA^{14}}{45,9^{14} + PMA^{14}} \quad \text{Enačba 17}$$

4,65...z osnovnim modelom ocenjena vrednost Cl za osebo s TM 70 kg, TM...telesna masa, PMA...pomenstruacijska starost, 45,9...PMA₅₀, 14...ocena Hillov-ega koeficienta.

Normalno donošen otrok doseže 50 % vrednosti Cl midazolama odraslega človeka pri PMA 45,9 tednov, kar je 6. teden po rojstvu (PMA₅₀). Pri PMA 79, kar je 39. teden po rojstvu, normalno donošen otrok doseže vrednost Cl enako kot pri odraslem človeku. MF je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Grafični prikaz spreminjanja funkcije zorenja, z označeno PMA_{50} in maksimalno vrednost $MF = 1$.

Vključitev vpliva zorenja je povzročila statistično značilen padec OFV (več kot 3,84; stopnja tveganja $p < 0,05$), kar prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Sprememba OFV vrednosti ob vključitvi vpliva zorenja v preučevani model.

Model	OFV	Razlika v OFV vrednosti
Brez vključenega vpliva zorenja	3224,12	23,27
Z vključenim vplivom zorenja	3200,85	

4.3.4. Testiranje vpliva genotipa ABCB1

Testirali smo tudi vpliv genotipa ABCB1 na Cl, ki pa ni povzročil statistično značilnega znižanja OFV vrednosti modela. V preglednici XII je prikazana sprememba OFV vrednosti ob vključitvi vpliva genotipa ABCB1 v model z vključenim vplivom telesne mase in MF.

Preglednica XII: Sprememba OFV vrednosti ob vključitvi vpliva genotipa ABCB1 v model.

Model	OFV	Razlika v OFV vrednosti
Brez vpliva genotipa ABCB1	3200,85	2,96
Z vplivom genotipa ABCB1	3197,89	

4.3.5. Končni model

Za naš končni model smo izbrali model z vključenim vplivom telesne mase in zorenja. Nato smo izvedli metodo ponovljenega vzorčenja, s katero smo ponovno ocenili naše parametre in meje 95 % IZ. Rezultati končnega modela in rezultati metode ponovljenega vzorčenja so prikazani v preglednici XIII.

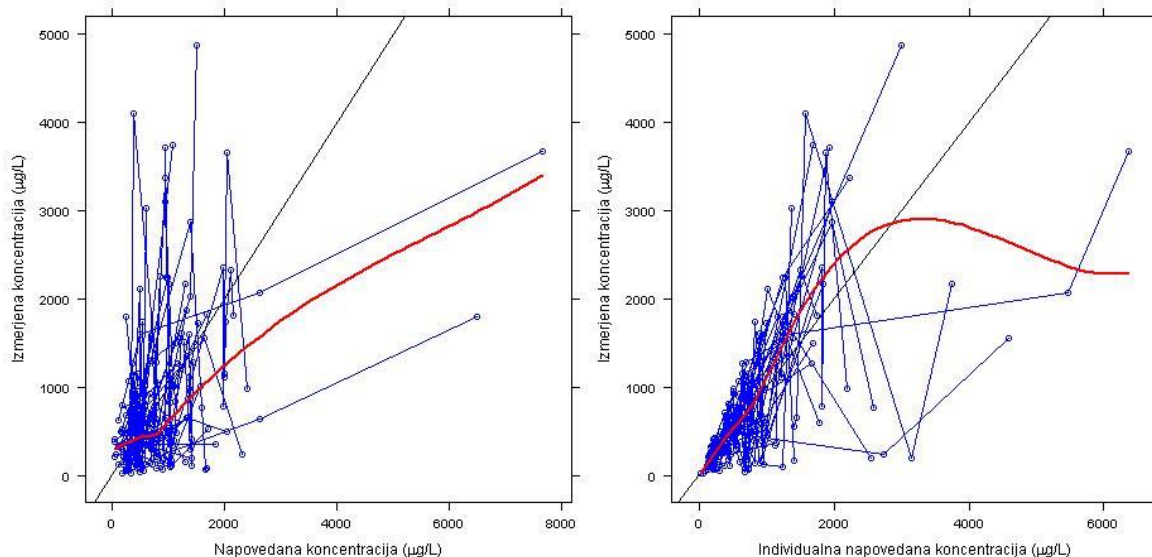
Preglednica XIII: Ocene parametrov končnega modela z vključenim vplivom telesne mase in funkcije zorenja ter rezultati metode ponovljenega vzorčenja

			Metoda ponovljenega vzorčenja	
Parameter	Ocena	95 % IZ	Mediana	95 % IZ
CL (L/h)	8,5	5,4 - 11,7	8,1	4,3 - 13,9
V2 (L)	39,8	18,7 - 60,8	42,8	18,5 - 80,0
V1 (L)	5,7	0,7 - 10,8	4,3	0,4 - 13,1
Q (L/h)	25,5	6,0 - 45,1	26,4	12,1 - 819,0
PMA50 (tedni)	45,9	42,3 - 49,4	45,6	41,8 - 52,2
Hill	14,0	6,7 - 21,2	14,5	6,3 - 72,6
IIVCL (CV %)	72,0	51,5 - 91,4	65,0	15,7 - 88,8
IIVV2 (CV %)	338,0	142,0 - 919,0	349,0	184,0 - 2528,0
Rezidualna variabilnost				
Wa (µg/L)	0,001	Fiksirana vrednost	0,001	Fiksirana vrednost
Wp (%)	57,3	50,5 - 64,1	56,3	49,1 - 63,9

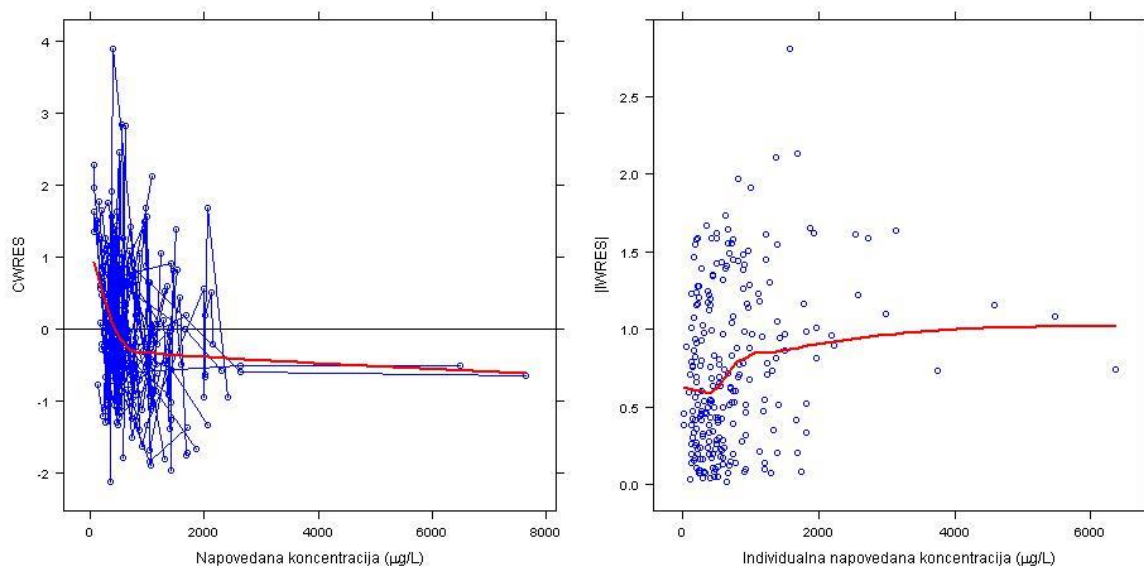
IZ...interval zaupanja, CV...koeficient variacije CL...očistek, V2...volumen stranskega prostora, V1...volumen osrednjega prostora, Q...distribucijski očistek, PMA50...vrednost PMA, pri kateri je MF 0,5, Hill...naklon funkcije zorenja, IIVCL...interindividualna variabilnost CL, IIVV2...interindividualna variabilnost V2, Wa...aditivna napaka, Wp...proporcionalna napaka

4.4. VREDNOTENJE KONČNEGA POPULACIJSKO FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

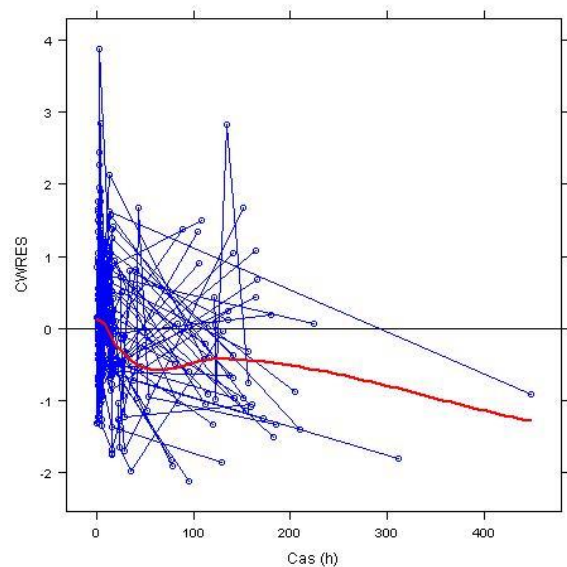
Končni model smo vizualno ovrednotili z diagnostičnimi diagrami (slika 6 – 8) in izvedli vizualno vrednotenje napovedi modela (VPC) (slika 9).



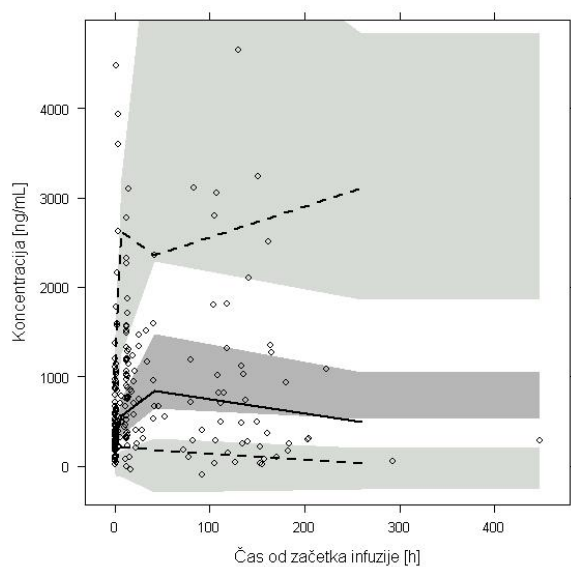
Slika 6: Odvisnost izmerjenih koncentracij od populacijsko napovedanih koncentracij midazolama (levo) in od individualno napovedanih koncentracij (desno). Črna črta prikazuje linijo enakosti ($x = y$), rdeča črta prikazuje lokalno gladilko.



Slika 7: Odvisnost pogojno uteženih rezidualov (CWRES) od napovedanih koncentracij (levo) in odvisnost individualno uteženih rezidualov (IWRES) od individualno napovedanih koncentracij (desno) za končni model.



Slika 8: Odvisnost pogojno uteženih rezidualov (CWRES) od časa za končni model.



Slika 9: Rezultati VPC za končni model. Točke predstavljajo naše meritve koncentracije, polna črta predstavlja mediano, prekinjeni črti pa 5. in 95. centil izmerjenih koncentracij. Siva področja prikazujejo 95 % intervale zaupanja napovedanih vrednosti.

5. RAZPRAVA

Režimi odmerjanja so za otroke pogosto preračunani iz režimov odmerjanja za odrasle na podlagi ekstrapolacije preko telesne mase. Takšen pristop je pri nekaterih učinkovinah neprimeren in otroci so posledično izpostavljeni previsokim ali prenizkim odmerkom učinkovin. Zato so FK študije pri otrocih zelo pomembne, saj lahko bistveno pripomorejo k optimizaciji režimov odmerjanja. V ta namen je bila izvedena klinična študija »Odnosi med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih«, ki se je izvajala na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo (Kirurška klinika, UKC Ljubljana) in Kliniki za pediatrijo, UKC Maribor. Vključevala je 49 otrok z bronhiolitisom, ki so bili mehansko predihavani in so za potrebe analgezije in sedacije prejeli fentanil in midazolam v obliki dolgotrajne intravenske infuzije. S sedacijo otroku omogočimo mirno, brezbolečinsko stanje, v katerem ne utrpí psihičnega stresa in njegovih posledic. Poleg tega nam sedacija omogoči nadzor nad podajnostjo prsnega koša tekom mehanskega predihavanja in prepreči kašelj kot posledico endotrahealne intubacije ter motnje v izmenjavi zraka (1).

Namen naše naloge je bil preučiti FK midazolama pri otrocih z bronhiolitisom, ki so bili mehansko predihavani. FK midazolama je namreč pri otrocih na intenzivni negi močno variabilna, saj je odvisna od različnih dejavnikov. V kliničnem delu smo zbrali podatke o odmerjanju infuzije in bolus odmerkov midazolama, podatke o izmerjenih plazemskih koncentracijah midazolama, podatke o spolu, TM, GA in kronološki starosti ter serumskih vrednostih kreatinina, albumina, bilirubina in celokupnih proteinov. Jemanje krvnih vzorcev je bilo časovno orientirano na infuzijo fentanila, ki je večinoma potekala vzporedno z infuzijo midazolama. Vsakemu otroku je bilo odvzetih 5 vzorcev venske krvi v časovnem zaporedju 5, 15 in 60 minut po začetku infuzije fentanila, med 8 in 24 ur po začetku infuzije in ob prekinitvi infuzije fentanila. Plazemske koncentracije midazolama so analizirali tekom dela magistrske naloge »Populacijska farmakokinetika fentanila pri otrocih z bronhiolitisom«, Mojce Nastran (Možina) (50).

Podatke, ki smo jih pridobili v klinični raziskavi smo uporabili za nadaljnjo PFK analizo s statističnim programom NONMEM. Testirali smo enoprostorni in dvoprostorni model. Pri izbiri ustreznega modela smo si pomagali z uspešnostjo minimizacije, OFV, gradientom parametrov, krčenjem in RSE. Kot osnovni model smo na podlagi AIC izbrali dvoprostorni

model, ki je definiran s FK parametri: Cl , V_1 , V_2 in Q . AIC je numerični kriterij, ki ob upoštevanju kompleksnosti omogoča izbiro najbolj optimalnega modela.

Znano je, da TM vpliva na FK parametre, zato smo njen vpliv vključili v model preko fiksnega eksponenta TM, ki znaša 0,75 za Cl in Q , ter 1 za V_1 in V_2 . Parametri osnovnega modela z vključenim vplivom TM so prikazani v preglednici X in veljajo za standardno osebo s TM 70 kg. Midazolam je lipofilna učinkovina, ki se v veliki meri porazdeljuje periferno, zato je izbira dvoprostornega modela smiselna, iz istega razloga pa je razumljivo tudi dejstvo, da je v osnovnem modelu ocena za V_2 bistveno večja od V_1 ($V_2 = 40,4L$, $V_1 = 3,81L$). Kljub temu je IIV V_2 zelo visoka, iz česar lahko sklepamo, da z osnovnim modelom nismo uspešno razložili variabilnosti V_2 med posamezniki. Ocena osnovnega modela za Cl je 4,65 L/h/70kg, kar je nizka vrednost v primerjavi z literaturnimi vrednostmi za zdravo odraslo osebo s TM 70 kg, katere Cl midazolama se giblje med 18 L/h in 30 L/h (39). Nižje ocenjena vrednost Cl našega modela je lahko posledica starosti otrok v naši populaciji, katere mediana je le 9,7 tednov in med katerimi je bilo kar 13 nedonošenih novorojenčkov, kot tudi kritičnega zdravstvenega stanja, saj je znano, da ti dejavniki pomembno vplivajo na Cl (9). Ocenjevali smo IIV Cl in V_2 ter rezidualno variabilnost preko kombinacije W_a in W_p . Za opis rezidualne variabilnosti smo izbrali kombiniran model, saj je bila le v tem primeru minimizacija modela uspešna. Ker je bila W_a zanemarljivo majhna, za uspešnost minimizacije pa nujno potrebna, smo jo fiksirali na zelo majhno vrednost ($W_a = 0,001 \mu g/L$), kar je značilno izboljšalo napoved modela. Dobili smo visoko vrednost proporcionalne napake ($W_p = 55,9 \%$), kar je posledica napak pri izvedbi klinične študije, npr. pri odvzemu vzorcev krvi.

Osnovni model smo ovrednotili z diagnostičnimi diagrami (slike 2 - 4). V diagramu odvisnosti izmerjenih koncentracij midazolama od populacijsko napovedanih koncentracij lahko opazimo, da lokalna gladilka, ki prikazuje trend naših podatkov, pri višjih koncentracijah odstopa od linije enakosti, kar izkazuje pomanjkljivo oceno IIV. Enako lahko opazimo v diagramu odvisnosti izmerjenih koncentracij od individualno napovedanih koncentracij. V diagramu rezidualov so CWRES nehomogeno porazdeljeni okoli 0 in izkazujejo trend, kar kaže na slabo napoved modela. Odmik lokalne gladilke v diagramu IWRES kaže na slabo napoved rezidualne napake.

V naslednjih korakih smo začeli z nadgradnjo osnovnega modela. Za testiranje vpliva sočasnih spremenljivk smo prvotno uporabili metodo postopnega vključevanja sočasnih

spremenljivk. Ta se zaradi velike variabilnosti naših podatkov ni izkazala za primerno, saj je podajala statistično značilnost vpliva vseh sočasnih spremenljivk. Zato smo se odločili, da testiramo le vpliv MF in vpliv genotipa ABCB1.

Vključitev vpliva MF na Cl je povzročil značilni padec OFV, kar smo pričakovali, saj je znano, da je Cl midazolama v prvih mesecih življenja odvisen od zorenja encima CYP3A (42). Rezultati so pokazali, da Cl midazolama doseže vrednost Cl odraslega človeka v 79 tednu PMA, kar je v 39. tednu po rojstvu normalno donošenega otroka. 11 obravnavanih otrok je preseglo to starost, od tega 5 otrok za več kot leto dni. PMA₅₀ naših otrok znaša 45,9 tednov, kar pomeni, da 6 tednov po rojstvu Cl midazolama normalno donošenega otroka doseže 50 % vrednost Cl odraslega človeka. 16 izmed otrok, ki smo jih obravnavali, po starosti še ni doseglo polovice vrednosti Cl odraslega človeka, ostalih 22 pa dosega vrednosti med polovico in vrednostjo Cl enako odraslemu človeku.

Anderson in Larson (44) sta ocenila, da oseba doseže 50 % vrednost Cl midazolama pri PMA 73,6 tednov, kar je 33 tednov po rojstvu normalno donošenega otroka. Hillov koeficient je v njihovem primeru znašal 3, med tem ko smo ga mi ocenili na 14, kar kaže na to, da so ocenili počasnejši proces zorenja Cl kot v našem primeru. Različne ocene MF so lahko posledica razlik med obema populacijama in količino podatkov, ki je bila na voljo za posamezno analizo. Anderson in Larson (44) sta v raziskavo zajela podatke o Cl midazolama iz 16 študij od nedonošenčkov do odraslih, medtem ko je naša populacija omejena na otroke do 3 let starosti. V obzir lahko vzamemo tudi, da so imeli zelo malo podatkov o Cl otrok med PMA 44 in 80, medtem ko je večina naše populacije ravno znotraj tega območja.

Zanimal nas je tudi vpliv genotipa ABCB1 na Cl midazolama, saj smo po pregledu literature ugotovili, da si izsledki že narejenih raziskav niso povsem enotni. Gen ABCB1 kodira membranski prenašalec Pgp, ki sodeluje pri absorpciji, porazdelitvi in izločanju mnogih učinkovin. Nahaja se na epitelnih celicah številnih organov v telesu, med drugim tudi na krvno-možganski barieri, kjer preprečuje akumulacijo mnogih hidrofobnih molekul v CŽS. Je visoko polimorfen in polimorfizem se kaže v 2- do 3-kratnem zmanjšanju aktivnosti Pgp (13). Če se koncentracija Pgp na krvno-možganski barieri zmanjša, lahko pride do višje koncentracije midazolama v CŽS, in posledično večjega učinka in pojava neželenih učinkov. V literaturi najdemo nasprotujoče si ugotovitve o trditvi, da je midazolam substrat Pgp. Medtem ko so Tolle-Sander in sodelavci (14) slednje trditev potrdili, so Kim in sodelavci (15) ugotovili, da midazolam ni substrat Pgp. Tudi naši rezultati so bili v skladu s slednjo

ugotovitvijo. Stopnja Cl se je sicer pri polimorfnih homozigotih in heterozigotih znižala za 15 % v primerjavi s homozigoti divjega tipa, kar pa ni bilo dovolj, da bi potrdili značilen vpliv polimorfizma genotipa ABCB1 na Cl midazolama, saj je vključitev genotipa ABCB1 v model povzročila padec OFV le za 2,96, kar je bilo premalo za statistično značilnost (min. 3,84; $p < 0,05$).

Za naš končni model smo izbrali dvoprostorni model z alometrično vključenim vplivom TM z eksponentom 0,75 za Cl in Q ter 1 za V_1 in V_2 , ter vključenim vplivom MF na Cl. Ocenjevali smo IIV na Cl in V_2 ter rezidualno variabilnost preko kombinacije W_a in W_p . Vrednost W_a je bila zanemarljivo majhna, model v katerem smo jo fiksirali na 0 pa ni bil uspešen z vidika minimizacije, zato smo jo obdržali v modelu in fiksirali na vrednost $W_a = 0,001 \mu\text{g/L}$.

Za končni model smo izvedli tudi metodo ponovljenega vzorčenja, s čimer pridobimo informacije o natančnosti ocen parametrov končnega modela.

Ocene parametrov končnega modela so dobro primerljive z ocenami parametrov metode ponovljenega vzorčenja, kar kaže na uspešnost našega modela. Ocena Cl končnega modela je enkrat višja od ocene Cl osnovnega modela in znaša 8,52 L/h, kar je tudi bližje literaturnim vrednostim Cl za osebo s TM 70 kg, katere Cl midazolama se giblje med 18 L/h in 30 L/h (39). Izboljšanje ocene Cl potrjuje tudi IIVCl, ki je pri končnem modelu bistveno nižja ($\text{IIVCl}_{\text{osnovni model}} = 106 \%$, $\text{IIVCl}_{\text{končni model}} = 72 \%$), kar pomeni, da vpliv TM in PMA bistveno bolje razložita razlike v vrednosti Cl med posamezniki, kot sam vpliv TM. Tudi 95 % IZ za oceno IIVCl je pri končnem modelu ožji (95% IZ IIVCl = 51,5 – 91,4 %) kot pri osnovnem modelu (95% IZ IIVCl = 69,4 – 142,2 %), kar dokazuje večjo natančnost ocene Cl končnega modela. Ocena V_2 končnega modela ($V_2 = 39,8 \text{ L}$) je primerljiva z oceno osnovnega modela ($V_2 = 40,4 \text{ L}$) in prav tako z oceno dobljeno z metodo ponovljenega vzorčenja ($V_2 = 42,8 \text{ L}$). Pri obeh modelih in pri metodi ponovljenega vzorčenja pa smo dobili zelo visoko IIV V_2 (338 %), iz česar lahko zaključimo, da nismo uspeli dobro pojasniti razlik v V_2 med posamezniki. Ocena V_2 ni zanesljiva, kar vidimo tudi iz širokega 95% IZ osnovnega modela (95% IZ $V_2 = 14,5 - 66,2 \text{ L}$), ki se pri končnem modelu ne izboljša (95 % IZ $V_2 = 18,7 - 60,8 \text{ L}$).

Uspešnost končnega modela smo ovrednotili z diagnostičnimi diagrami (slike 5 – 7). Rahlo izboljšanje napovedi v primerjavi z osnovnim modelom lahko opazimo v diagramu

odvisnosti izmerjenih od populacijsko napovedanih koncentracij, kar je posledica boljše napovedi IIV parametrov. Pri ostalih diagramih nismo dobili bistvenih razlik glede na osnovni model. Nehomogena porazdelitev CWRES okoli 0 glede na napovedane koncentracije in glede na čas kaže na določene pomanjkljivosti v napovedi in strukturi modela. Prav tako se pomanjkljivosti v oceni IIV kažejo z odstopanjem lokalne gladilke od črte enakosti, predvsem pri višjih koncentracijah v diagramih odvisnosti izmerjenih koncentracij od populacijsko in individualno napovedanih koncentracij. Iz diagrama IWRES v odvisnosti od individualno napovedane koncentracije lahko vidimo, da lokalna gladilka pri nižjih koncentracijah izkazuje trend, kar kaže na slabo oceno rezidualne napake v tem območju.

Zaključno vrednotenje končnega modela smo izvedli z metodo pvcVPC. Meritve ležijo znotraj 95 % IZ napovedi, kar potrjuje, da smo bili pri postavitvi modela uspešni. Rahlo odstopanje je opaziti v območju mediane, kjer so meritve po času 3,5h pod 95 % IZ napovedanih vrednosti. Razlog temu je, da v tem časovnem območju ni bilo narejenih veliko meritev plazemske koncentracije, saj je bil osnovan načrt jemanja plazemskih vzorcev 5min, 25min, 60min, 720min po začetku infuzije fentanila in ob koncu infuzije. Natančneje je bilo v območju od 2h do 4h narejenih le 9 meritev plazemske koncentracije, kar je le 4 % vseh meritev. Opazimo lahko tudi širok 95 % IZ v 95. centilu plazemske koncentracije, ki kaže, da so v tem območju ocene parametrov variabilne in nenatančne.

6. SKLEP

Razvili smo populacijski farmakokinetični model za midazolam pri otrocih z bronhiolitisom, ki so na umetnem predihavanju. Naša populacija je obsegala 49 otrok, od tega 33 dečkov in 16 deklic, starih od 0 do 130 tednov (mediana 9,7 tednov). Mediana PMA je znašala 49 tednov, 36 otrok je bilo normalno donošenih, 13 pa nedonošenčkov. Mediana telesne mase je znašala 5,3 kg.

Končni model midazolama predstavlja dvoprostorni model, definiran s FK parametri očistek (Cl), volumen osrednjega prostora (V_1), volumen stranskega prostora (V_2) in distribucijski očistek (Q). Ocenjevali smo IIV na Cl in V_2 ter rezidualno variabilnost s kombinacijo W_a in W_p . V model je vključen vpliv telesne mase in vpliv MF na Cl.

Ocene parametrov končnega modela podane za povprečnega človeka s telesno maso 70 kg so naslednje (v oklepajih za FK parametri so 95 % IZ): Cl = 8,5 L/h (5,4-11,7 L/h), V_1 = 5,7 L (0,7-10,8 L), V_2 = 39,8 L (18,7-60,8 L) in Q = 25,5 L/h (6,0-45,1 L/h). Koeficient variacije IIV Cl znaša 72 %, V_2 pa 338 %.

Vpliv telesne mase smo vključili preko fiksnega eksponenta 0,75 za Cl in Q ter 1 za V_1 in V_2 . Hillov koeficient MF znaša 14 (6,7-21,2), PMA_{50} pa smo ocenili na 45,9 tednov (42,3-49,4 tednov).

Testirali smo tudi vpliv polimorfizma gena ABCB1 na Cl, ki se ni izkazal za statistično značilnega.

Populacijsko farmakokinetično modeliranje smo izvedli s podatki novorojenčkov in otrok na intenzivni negi, ki so zaradi hudega bronhiolitisa umetno predihavani. PFK modeli za populacije kot je naša so redki, a zelo pomembni. Z izdelavo končnega modela za midazolam smo pripomogli k optimizaciji režima odmerjanja midazolama pri otrocih na intenzivni negi, ki so mehansko predihavani.

7. LITERATURA

1. Bavdekar SB, Mahajan MD, Chandu K V. Analgesia and sedation in paediatric intensive care unit. *J Postgrad Med. Medknow Publications*; 1999 Jan 1;45(3):95–102.
2. Maroney DI. Recognizing the potential effect of stress and trauma on premature infants in the NICU: how are outcomes affected? *J Perinatol.* 2003;23(8):679–83.
3. Cravero JP, Blike GT. Review of pediatric sedation. *Anesth Analg.* 2004 Nov;99(5):1355–64.
4. Blumer JL. Clinical pharmacology of midazolam in infants and children. *Clin Pharmacokinet.* 1998;35(1):37–47.
5. Altamimi MI, Sammons H, Choonara I. Inter-individual variation in midazolam clearance in children. *Arch Dis Child.* 2015;100(1):95–100.
6. Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA A — benzodiazepine receptor in psychiatric disorder New insights into the role of the GABA A ^ benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. 2011;390–6.
7. de Wildt SN, de Hoog M, Vinks a a, van der Giesen E, van den Anker JN. Population pharmacokinetics and metabolism of midazolam in pediatric intensive care patients. *Crit Care Med.* 2003;31(7):1952–8.
8. Seo K-A, Bae SK, Choi Y-K, Choi CS, Liu K-H, Shin J-G. Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7. *Drug Metab Dispos.* 2010 Nov;38(11):2007–13.
9. Ince I, de Wildt SN, Peeters MYM, Murry DJ, Tibboel D, Danhof M, et al. Critical illness is a major determinant of midazolam clearance in children aged 1 month to 17 years. *Ther Drug Monit.* 2012 Aug;34(4):381–9.
10. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 2011 Aug;11(4):274–86.
11. Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H. CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J Toxicol Sci.* 2013 Jan;38(3):349–54.
12. Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet Genomics.* 2010 Oct;20(10):611–8.
13. Špela M. Magistrsko delo: Vpliv izbranih polimorfizmov v genih OPRM1, ABCB1 in COMT na varnost in učinkovitost terapije s fentanilom pri otrocih. *FFA.* 2014;1–71.
14. Tolle-Sander S, Rautio J, Wring S, Polli JW, Polli JE. Midazolam exhibits characteristics of a highly permeable P-glycoprotein substrate. *Pharm Res.* 2003 May;20(5):757–64.
15. Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-

- glycoprotein. *Pharm Res.* 1999 Mar;16(3):408–14.
16. Bosilkovska M, Samer CF, Déglon J, Rebsamen M, Staub C, Dayer P, et al. Geneva Cocktail for Cytochrome P450 and P-Glycoprotein Activity Assessment Using Dried Blood Spots. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(3):349–59.
 17. Zhang W, Tan TMC, Lim LY. Impact of curcumin-induced changes in P-glycoprotein and CYP3A expression on the pharmacokinetics of peroral celioprolol and midazolam in rats. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(1):110–5.
 18. Ling SY, Huizinga RB, Mayo PR, Larouche R, Freitag DG, Aspeslet LJ, et al. CYP3A and P-glycoprotein Drug-Drug Interactions with Voclosporin. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;77(6):1039–50.
 19. Park GR. Molecular mechanisms of drug metabolism in the critically ill. *Br J Anaesth.* 1996;77(1):32–49.
 20. Jacqz-Aigrain E, Daoud P, Burtin P, Maherzi S, Beaufile F. Pharmacokinetics of midazolam during continuous infusion in critically ill neonates. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992 Jan [cited 2015 Jul 20];42(3):329–32.
 21. Jacqz-Aigrain E, Wood C, Robieux I. Pharmacokinetics of midazolam in critically ill neonates. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990 Aug [cited 2016 Jan 26];39(2):191–2.
 22. DeWildt S, Kearns G, Hop W, Murry D, Abdelrahman S, Vandenanker J. Pharmacokinetics and metabolism of intravenous midazolam in preterm infants. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Dec;70(6):518–24.
 23. HARTE G, GRAY P, LEE T, STEER P, CHARLES B. Haemodynamic responses and population pharmacokinetics of midazolam following administration to ventilated, preterm neonates. *J Paediatr Child Health.* 1997 Aug;33(4):335–8.
 24. LEE TC, CHARLES, BRUCE G. HARTE GJ, GRAY PH, STEER, PETER A. FLENADY VJ. Population Pharmacokinetic Modeling in Very Premature Infants Receiving Midazolam During Mechanical Ventilation: Midazolam Neonatal Pharmacokinetics. *Surv Anesthesiol.* 2000;44(1):35–6.
 25. Ahsman MJ, Hanekamp M, Wildschut ED, Tibboel D, Mathot RAA. Population pharmacokinetics of midazolam and its metabolites during venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in neonates. *Clin Pharmacokinet.* 2010 Jun;49(6):407–19.
 26. Mulla H, McCormack P, Lawson G, Firmin RK, Upton DR. Pharmacokinetics of Midazolam in Neonates Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Anesthesiology.* 2003 Aug;99(2):275–82.
 27. Reed MD, Rodarte A, Blumer JL, Khoo KC, Akbari B, Pou S, et al. The single-dose pharmacokinetics of midazolam and its primary metabolite in pediatric patients after oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol.* 2001 Dec;41(12):1359–69.
 28. Hughes J, Gill AM, Mulhearn H, Powell E, Choonara I. Steady-state plasma concentrations of midazolam in critically ill infants and children. *Ann Pharmacother.* SAGE Publications; 1996 Jan 1;30(1):27–30.
 29. Peeters MYM, Prins SA, Knibbe CAJ, DeJongh J, Mathôt RAA, Warris C, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Midazolam and Metabolites in Nonventilated Infants after Craniofacial Surgery. *J Am Soc Anesthesiol.* The American Society of Anesthesiologists; 2006 Dec 1;105(6):1135–46.

30. Minagawa K, Watanabe T. [A pharmacokinetic study of midazolam for the treatment of status epilepticus in children: a preliminary report]. *No To Hattatsu*. 2006 Jul;38(4):301–3.
31. Rey E, Delaunay L, Pons G, Murat I, Richard MO, Saint-Maurice C, et al. Pharmacokinetics of midazolam in children: comparative study of intranasal and intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991 Oct;41(4):355–7.
32. Jones RD, Chan K, Roulson CJ, Brown AG, Smith ID, Mya GH. Pharmacokinetics of flumazenil and midazolam. *Br J Anaesth*. 1993 Mar;70(3):286–92.
33. Kraus GB, Gruber RG, Knoll R, Danner U. [Pharmacokinetic studies following intravenous and rectal administration of midazolam in children]. *Anaesthesist*. 1989 Dec;38(12):658–63.
34. Roberts JA, Coulthard MG, Addison RS, Foot C, Lipman J. Midazolam Metabolism: Implications for Individualised Dosing? *J Pharm Pract Res*. 2009 Sep 13;39(3):198–201.
35. Muchohi SN, Kokwaro GO, Ogutu BR, Edwards G, Ward SA, Newton CRJC. Pharmacokinetics and clinical efficacy of midazolam in children with severe malaria and convulsions. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Oct;66(4):529–38.
36. Mathews HM, Carson IW, Lyons SM, Orr IA, Collier PS, Howard PJ, et al. A pharmacokinetic study of midazolam in paediatric patients undergoing cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 1988 Sep;61(3):302–7.
37. Tolia V, Brennan S, Aravind MK, Kauffman RE. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of midazolam in children during esophagogastroduodenoscopy. *J Pediatr*. 1991 Sep;119(3):467–71.
38. Vet NJ, de Hoog M, Tibboel D, de Wildt SN. The effect of critical illness and inflammation on midazolam therapy in children. *Pediatr Crit Care Med*. 2012 Jan;13(1):e48–50.
39. Draagle -- Vse o zdravilih. <http://si.draagle.com>. Dostop: 29.7.2015.
40. Lexicomp. Dostop: 20.11.2014.
41. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother* 2004 Oct;38(10):1702–6.
42. Ince I, De Wildt SN, Wang C, Peeters MYM, Burggraaf J, Jacqz-Aigrain E, et al. A novel maturation function for clearance of the cytochrome P450 3A substrate midazolam from preterm neonates to adults. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(7):555–65.
43. Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem*. 1997 Jul 15;247(2):625–34.
44. Anderson BJ, Larsson P. A maturation model for midazolam clearance. *Paediatr Anaesth*. 2011;21(3):302–8.
45. Bienert A, Bartkowska-Śniatkowska A, Wiczling P, Rosada-Kurasińska J, Grzeoekowiak M, Zaba C, et al. Assessing circadian rhythms during prolonged midazolam infusion in the pediatric intensive care unit (PICU) children. *Pharmacol Reports*. 2013;65(1):107–21.

46. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Goddard JM, Tanner MS, Tucker GT. Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *Br J Anaesth*. 2002 Sep;89(3):428–37.
47. Cella M, Knibbe C, de Wildt SN, Van Gerven J, Danhof M, Della Pasqua O. Scaling of pharmacokinetics across paediatric populations: The lack of interpolative power of allometric models. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(3):525–35.
48. Burtin P, Jacqz-Aigrain E, Girard P, Lenclen R, Magny JF, Betremieux P, et al. Population pharmacokinetics of midazolam in neonates. *Clin Pharmacol Ther*. 1994 Dec;56(6 Pt 1):615–25.
49. Grabnar I, Grosek Š. Protokol klinične študije: Odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko fentanila pri otrocih. 2010.
50. Nastran (Možina) M. Magistrska naloga: Populacijska farmakokinetika fentanila pri otrocih z bronhiolitisom, FFA, 2014.
51. Rožman E, Vrbeč S. Raziskovalna naloga: Razvoj in validacija LC-MS/MS metode za sočasno določanje fentanila in midazolama v plazemskih vzorcih, FFA, 2012.
52. Boeckmann A, Sheiner L, Beal S. NONMEM Users Guide: Part V. 2011;(April):2.
53. Wang C, Peeters MYM, Allegaert K, Blussé van Oud-Alblas HJ, Krekels EHJ, Tibboel D, et al. A bodyweight-dependent allometric exponent for scaling clearance across the human life-span. *Pharm Res*. 2012 Jun;29(6):1570–81.
54. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013 Jan;2:e38.
55. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J*. 2009;11(3):558–69.
56. Bolton S, Bon C. *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications*, Revised and Expanded. Taylor & Francis; 2003. 755 p.
57. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J*. 2011 Jun;13(2):143–51.