

KATEDRA ZA BIOFARMACIJO IN FARMAKOKINETIKO



Člani Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko (od leve proti desni): Tjaša Felicijan, asist. Jurij Zdovc, asist. Žane Temova Rakuša, Nevenka Lilič, Timeja Planinšek Parfant, doc. dr. Jurij Trontelj, izr. prof. dr. Tomaž Vovk, prof. dr. Albin Kristl (predstojnik), Andrej Grobin, asist. Katarina Rede, izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, Nika Osel, prof. dr. Marija Bogataj, Greta Cof, prof. dr. Iztok Grabnar.
Manjkajo: izr. prof. dr. Robert Roškar, izr. prof. dr. Simon Žakelj, Mihaela Kolarev.

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko raziskujemo procese, ki potekajo v človeškem telesu po aplikaciji zdravila. Te procese razdelimo na sproščanje zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike, njeno absorpcijo, porazdelitev, metabolizem in izločanje (sistem LADME). Proučujemo mehanizme in kinetiko teh procesov in poskušamo opredeliti vpliv različnih dejavnikov (hrana, sočasna uporaba drugih zdravil, različna fiziološka in patološka stanja organizma, genetski dejavniki) na farmakokinetiko in farmakodinamiko zdravilnih učinkovin.

Za vrednotenje farmakokinetike spojin razvijamo različne kromatografske metode z UV/VIS, elektrokemijskim, fluorescenčnim in masnospektroskopskim detektorjem. V okviru predformulacijskih raziskav proučujemo njihove fizikalno-kemijske lastnosti, kot so topnost, hitrost raztopljanja, stabilnost, ionizacija, permeabilnost ter metabolne pretvorbe. Na osnovi teh dejavnikov in profilov sproščanja *in vitro* napovedujemo lastnosti farmacevtske oblike *in vivo*.

S tako pridobljenim znanjem razvijamo tudi farmakokinetično-farmakodinamične modele, ki omogočajo napovedovanje kliničnih učinkov zdravil ter iskanje vzrokov za njihovo variabilnost. Ti modeli omogočajo uvedbo individualnega odmerjanja zdravil glede na posameznikove genotipske in fenotipske značilnosti. Raziskave, ki so podprtne z najsvetnejšimi tehnologijami, pripomorejo k učinkovitejšemu in varnejšemu zdravljenju. Ker nas zanima tudi nadaljnja usoda zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov, raziskujemo pojavnost le-teh v okoljskih vzorcih odpadnih, površinskih in pitnih vod s pomočjo zelo občutljivih in selektivnih metod tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektroskopijo.



ALI LAHKO Z MODELIMI NAPOVEMO USODO ZDRAVILA V TELESU IN OPTIMIRAMO ZDRAVLJENJE?

CAN MODELS PREDICT THE DRUG PERFORMANCE IN VIVO AND OPTIMISE PHARMACOTHERAPY?

AVTORJI / AUTHORS:

Prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.
Tjaša Felicijan, mag. farm.
Prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.
Izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.
Izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.
Doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.
Izr. prof. dr. Simon Žakelj, mag. farm.
Prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: albin.kristl@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

V pričujočem članku sledimo poteku farmakokinetičnih procesov: sproščanje, absorpcija, porazdeljevanje, metabolism in izločanje. Za ponazarjanje teh procesov uporabljamo različne modele. Najprej opisujemo modele za vrednotenje procesov sproščanja in modele za vrednotenje absorpcije oz. permeabilnosti *in vitro*. Na osnovi tako pridobljenih informacij lahko učinkovine razvrstimo v ustrezni razred biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema in predvidimo obseg absorpcije. Sledijo modeli za vrednotenje metabolizma in na koncu predstavitev področja farmakokinetično-farmakodinamičnega modeliranja. Osnovni namen proučevanja farmakokinetičnih procesov je optimizacija farmakoterapije bolnikov, ki jo v klinični praksi lahko nadgradimo s storitvami klinične farmacije.

KLJUČNE BESEDE:

bioanalitika, biofarmacija, farmakokinetika, klinična farmacija, modeli

ABSTRACT

In this article, the principle of pharmaceutical processes is pursued: dissolution, absorption, distribution, metabolism and elimination. For the evaluation of these processes we use different models. First we describe the models used to evaluate drug dissolution *in vitro* and the models used to estimate absorption and permeability *in vitro*. The information thus obtained can be used to classify drugs according to the pharmaceutical classification system and to predict the extent of their absorption. Then, the models for the evaluation of metabolism and the principles of pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling are described. The basic goal of studying pharmacokinetic processes is to optimise the pharmacotherapy of patients, which can be in clinical practice further upgraded with clinical pharmacy services.

KEY WORDS:

bioanalytics, biopharmacy, clinical pharmacy, models, pharmacokinetics

1 UVOD

Od učinkovine do zdravila je praviloma dolga pot. Farmacevtski tehnologi vgradijo učinkovine v zdravilo, pomembno pa je tudi, kakšne farmakokinetične lastnosti bo imelo zdravilo. Če so farmakodinamične lastnosti v največji meri odvisne od delovanja oz. lastnosti učinkovine, pa je farmakokinetika v marsičem odvisna od farmacevtske oblike. Vplivamo lahko predvsem na sproščanje učinkovine iz zdravila in tako na njeno absorpcijo. Absorbirana učinkovina se po organizmu porazdeli ter iz telesa izloči v kemijsko nespremenjeni obliki ali v obliki metabolitov.

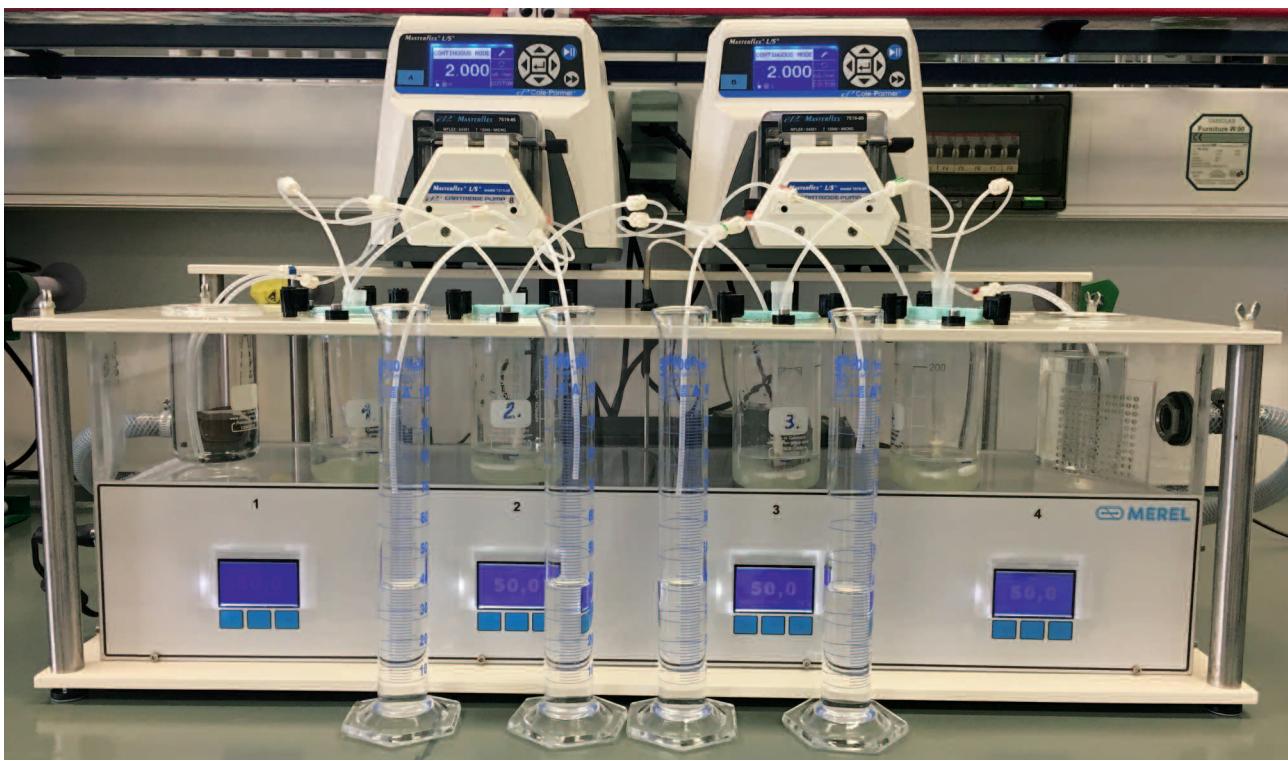
Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) načrtujemo, kakšne lastnosti morajo imeti posamezna zdravila oz. učinkovine za optimalen učinek, v največji meri z vidika sproščanja, jih proučujemo in preverjamo *in vitro* (biofarmacija) ter napovedujemo njihove farmakokinetične lastnosti *in vivo*, zlasti hitrost in obseg absorpcije. Proučujemo pa tudi povezavo med farmakokinetiko in farmakodinamiko v organizmu, pogosto znotraj različnih populacij bolnikov. Za proučevanje zgoraj navedenih procesov uporabljamo različne modele. Pri njihovem razvoju in uporabi ima pomembno mesto (bio)analitika, ki predstavlja »rdečo nit« pri vrednotenju navedenih procesov. Širši namen modelov v biofarmaciji in farmakokinetiki je razviti zdravila s čim večjo učinkovitostjo in minimalno pojavnostjo neželenih učinkov. Optimizacijo farmakoterapije v klinični praksi pa dopolnjujejo storitve klinične farmacije.

2 MODELI, KI OPISUJEJO SPROŠČANJE IN S SPROŠČANJEM POVEZANE PROCESE

Sproščanje zdravilne učinkovine je prvi proces, ki poteče po aplikaciji farmacevtske oblike in pogosto pomembno vpliva tudi na potek plazemskih koncentracij učinkovine in preko njih na terapevtski učinek zdravila. Proses sproščanja opredelimo z različnimi modeli. Matematične modele pogosto uporabljamo za opis kinetike sproščanja in so v določeni meri lahko tudi pokazatelji mehanizmov, preko katerih sproščanje poteka. Zaradi prepletanja različnih procesov znotraj sproščanja se tudi uporabljeni modeli razlikujejo glede na predpostavke in vključene parametre, ki posledi-

čno definirajo predpostavljeno kinetiko sproščanja (1, 2). Pogoste so enostavne kinetike 0., 1. ali \sqrt{t} reda, ki jih uporabljamo za opis sproščanja iz različnih farmacevtskih oblik (3), kinetiko sproščanja pa lahko predstavimo tudi z bolj kompleksnimi modeli, kot je npr. Korsmeyer-Peppasov, katerih prednost je, da so mehanistično bolj relevantni (1). Z modeli pa ne opisujemo samo sproščanja, temveč tudi nekatere procese, ki jim je izpostavljena farmacevtska oblika po aplikaciji in ki lahko ključno vplivajo na sam proces sproščanja. Z matematičnimi modeli smo tako opisali proces prehoda pelet iz želodca v dvanajstnik, ki je izjemno pomemben pri večenotnih farmacevtskih oblikah, katerih sproščanje je odvisno od pH. Večenotne oblike, npr. pelete, prehajajo iz želodca v daljšem časovnem intervalu in pogosto je sproščanje iz njih odvisno tudi od časa njihovega zadrževanja v želodcu. Na osnovi literarnih podatkov smo razvili matematične modele, ki opisujejo kinetiko individualnih prehodov in tudi povprečnega prehoda pelet iz želodca za aplikacijo na tešče (4, 5) in aplikacijo s hrano (6). Prehod tablet iz želodca je enostavnejši, saj preide tableta, ki v želodcu ne razпадa, v dvanajstnik v določenem trenutku. Čas prehoda je najpogosteje med nekaj minutami in dvema urama po aplikaciji. V populaciji obstaja distribucija časov prehodov znotraj tega intervala, kar tudi lahko opišemo z modelom (5).

Za določanje kinetike sproščanja in opazovanje obnašanja farmacevtskih oblik uporabljamo tudi različne laboratorijske – eksperimentalne modele. Najpogosteje uporabljamo v farmakopejah opisane modele, t. i. naprave 1, 2, 3 in 4, v katerih je farmacevtska oblika izpostavljena mediju, ki običajno ponazarja medij prebavnega trakta, in določenim mehanskim obremenitvam oz. gibanju, kar pa se razlikuje med napravami (7). Te naprave so dejansko modeli, ki ponazarjajo situacijo v prebavnem traktu po peroralni aplikaciji farmacevtske oblike, so pa hkrati tudi eno od osnovnih orodij za kontrolo kakovosti farmacevtskih oblik in zato zanje veljajo izjemno stroge zahteve. To zmanjšuje njihovo fleksibilnost z vidika spremenjanja parametrov v širokih fizioloških intervalih, zato so razvili številne t. i. biorelevantne modele sproščanja, ki se z različnimi parametri in pogoji, kolikor je le mogoče, približajo pogojem v prebavnem traktu (7, 8). Izvedbe segajo od zelo enostavnih poskusov v laboratorijskih čašah do modelov, ki ponazarjajo obliko delov prebavnega trakta, sile in čase prehoda, ki so jim farmacevtske oblike izpostavljene (9–12). Tudi na UL FFA smo razvili model, ki s pomočjo uporabe steklenih kroglic ponazarja značilno gibanje farmacevtske oblike, parametri modela, kot so pretoki, volumni, temperatura, sestava medijev, pa so znotraj fizioloških vrednosti (slika 1) (13). S



Slika 1: Model za sproščanje – pretočni sistem s kroglicami, razvit na UL FFA.

Figure 1: Dissolution model – flow through system with glass beads, developed at UL FFA.

takšnim modelom lahko ponazarjamo tudi individualne pH vrednosti vzdolž prebavnega trakta ter spremljamo njihov vpliv na sproščanje učinkovine (14). S pomočjo opisanih biorelevantnih modelov lahko ponazarjamo procese, ki potekajo *in vivo* v prebavnem traktu po aplikaciji farmacevtske oblike, in v primerjalnem smislu napovedemo kinetiko sproščanja zdravilnih učinkovin iz dveh ali več farmacevtskih oblik. Čim bolj se model približa dejanskim pogojem v prebavnem traktu, večja je verjetnost, da je napoved pravilna oz. biološko relevantna.

3 MODELI ZA VREDNOTENJE PERMEABILNOSTI OZ. ABSORPCIJE

Metode za napovedovanje in vrednotenje absorpcije zdravilnih učinkovin iz prebavnega trakta v grobem delimo na nebiološke in biološke. Nebiološke metode (npr. določanje polarne/nepolarne površine molekule, porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda, metode *in silico* ...) temelijo predvsem na molekularni strukturi učinkovine. Tako smo v naših

laboratorijih že v 90. letih proučevali termodinamske lastnosti logP kot tudi njegovo uporabnost za predvidevanje absorpcije in biološke uporabnosti (15, 16). Kasneje smo razvili metodo določanja permeabilnosti skozi različne membrane v Ussingovih komorah (17), kar smo nadgradili s t. i. difuzijskimi celicami EasyMount (slika 2), ki so modificirane celice Sweetana-Grass. Določanje permeabilnosti v omenjenih difuzijskih celicah skozi izolirane segmente črevesa poskusnih živali oz. skozi monosloj celičnih kultur, kot so celice Caco-2, pa uvrščamo med najpomembnejše biološke metode *in vitro*. Biološki metodi *in vivo* predstavljata perfuzija *in vivo* ter določanje biološke uporabnosti oz. frakcije absorpcije.

Metode *in vitro* pa poleg napovedovanja biološke uporabnosti omogočajo tudi vpogled v mehanizme absorpcije, vključno z nekaterimi interakcijami med zdravili in s hrano, ter vrednotenje pasivnih in aktivnih mehanizmov v procesih intestinalne absorpcije in eliminacije učinkovin. Tako smo proučevali permeabilnost nesteroidnih monokarboksilnih antirevmatikov skozi podganji jejunum *in vitro*. Ugotovili smo, da gre za polariziran ter od pH odvisen prehod, kot tudi da imajo nesteroidni monokarboksilni antirevmatiki toksičen vpliv na intestinalno tkivo pri višjih koncentracijah

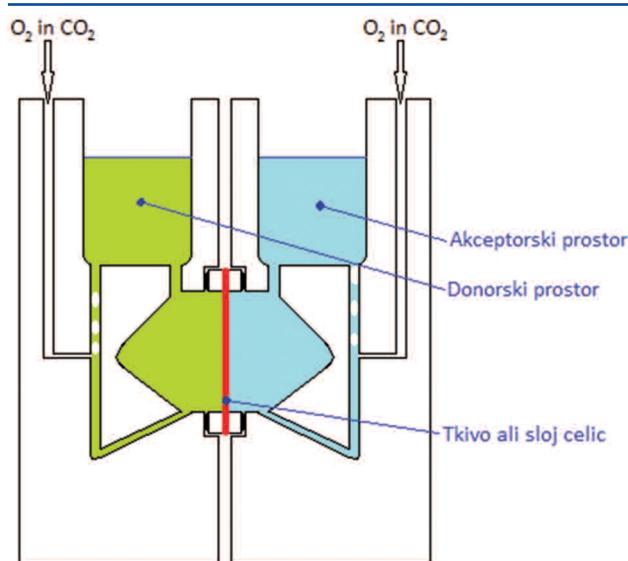
(18). Z raziskavo razapljanja in permeabilnosti smo kot prvi sistematično pojasnili mehanizem interakcij med fluorokinoloni in kovinskimi ioni ter dokazali, da kompleksi med kovinskimi ioni in fluorokinoloni ne prehajajo skozi absorpcijsko bariero v prebavnem traktu (19). Nadalje smo odkrili in v veliki meri pojasnili možne interakcije med antiretrovirusnimi učinkovinami in prehranskimi dopolnilni na osnovi staranega ekstrakta česna s kombinacijo pristopov raziskav intestinalnega in jetrnega metabolizma *in vitro*, permeabilnosti skozi celične monosloje Caco-2 in skozi tanko črevo podgane (20). Ugotovili smo, da ima lahko česnov ekstrakt na absorpcijo teh učinkovin značilen vpliv.

Na primeru imatiniba smo v pogojih *in vitro* raziskali aktivne procese, povezane z zadrževanjem učinkovine v tarčnih celicah (21), in ugotovili, da zaradi delovanja različnih prenašalcev, ki prenašajo učinkovino v tarčne celice in iz njih, visoke plazemske koncentracije ne zagotavljajo nujno tudi uspešnega zdravljenja. S kombinacijo meritev permeabilnosti *in vitro* in analize vzorcev po poskusih *in vivo* pa smo pojasnili mehanizem prehoda učinkovine skozi hematoencefalno bariero v pogojih *in vitro* (22).

Z uporabo ustreznih difuzijskih celic smo nekaterim učinkovinam, ki jih apliciramo v kapljicah za oko (ciprofloksacin, lidokain in timolol), določili permeabilnost skozi beločnico, veznico, roženico in mrežnico prašičjega, zajčjega in govejega očesa (23). Opazili smo velike razlike v permeabilnosti skozi različne membrane kot tudi med obravnavanimi vrstami. Na osnovi teh rezultatov lahko predvidevamo, kakšno oviro za absorpcijo učinkovine iz kapljic za oko predstavljajo te membrane v očesu pri človeku.

V okviru razvoja modela za proučevanje nazalne absorpcije pa smo ovrednotili človeško nazalno celično linijo RPMI2650. S 23 učinkovinami in nekaj označevalci t. i. ničelnega transporta ter s primerjavo dobljenih rezultatov permeabilnosti s celično linijo Caco-2 in s prehodom spojin skozi izoliran segment podganjega jejunuma smo pokazali, da celična linija RPMI2650 predstavlja obetaven farmakološki model za predvidevanje nazalne absorpcije (24).

Za predvidevanje absorpcije razvijamo tudi pristope na osnovi modeliranja PBPK (*physiologically based pharmacokinetic*). S pomočjo programa GastroPlus™ in z uporabo literarnih in eksperimentalnih farmakokinetičnih podatkov smo zgradili ustrezen model PBPK za proučevanje vpliva hrane na generično in referenčno zdravilo z učinkovino iz drugega razreda biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema v amorfni in kristalinični obliki (25). Z modelom smo uspešno predvideli vplive hrane pri obeh pripravkih in tudi dokazali bioekvivalenco med obema pripravkom v stanju po obroku.



Slika 2: Difuzijske celice »Easy-mount«.
Figure 2: 'Easy-mount' diffusion chambers.

4 MODELI ZA VREDNOTENJE METABOLIZMA

Metabolizem je v več kot dveh tretjinah najpogosteje predpisanih zdravil glavna pot izločanja učinkovin. Zato je za uspešno napovedovanje in razlaganje obnašanja učinkovin po aplikaciji zdravila ključno dobro poznavanje tega procesa. Vpeljali smo vrsto metaboličnih modelov, ki skušajo ponazarjati metabolne procese, ki se odvijajo na nivoju mikrosomalnih, citosolnih in plazemskih transformacij učinkovin v organizmu. V skladu z deležem učinkovin na tržišču, ki se presnavljajo z mikrosomalnimi encimi, smo največji poudarek namenili prav mikrosomom, ki v večini primerov tudi izkazujejo najvišjo metabolično aktivnost. Razvili smo postopek za pripravo in izolacijo mikrosomov iz sveže pridobljenih jeter, črevesja, ledvic in pljuč žrtvovanih živali in pridobili dovolj velike količine visokoaktivnih encimov, da smo z njihovo pomočjo lahko izvajali tudi bioprodukcijo nekaterih metabolitov zdravilnih učinkovin, ki komercialno niso dostopni. Taki so bili npr. glukuronidi raloksifena, bazedoksifena in bisfenola A ter sulfati nekaterih bisfenolov (26, 27). V primeru raloksifena smo prvi izolirali njegov do takrat neobjavljeni metabolit (diglukuronid), ki je hkrati tudi najbolj zastopan metabolit v človeški plazmi (28). Za kvantifikacijo metabolitov v bioloških vzorcih smo razvili učinkovite analizne postopke (29, 30).



Mikrosomov nismo uporabljali zgolj v preparativne namene, temveč smo z njihovo pomočjo tudi ugotavljali parametre encimske kinetike, s pomočjo katerih smo izračunali intrinzični očistek tkiva, ga skalirali na organ in ocenili očistek celotnega organa v telesu. Ta pristop se je izkazal še posebej uspešen pri razlagi vpliva genetskih polimorfizmov v genih za encime, ki kodirajo metabolične encime (31).

S pomočjo uporabe še kompleksnejšega modela od mikrosomov, to so celice HepG2 ter Caco-2 smo pričeli proučevati kinetiko metaboličnih pretvorb učinkov na nivoju intaktne celice. Pri tem smo se soočali s številnimi izvivi, kot so nizka ekspresija encimov v celični liniji ter obsežna vezava substrata na komponente celic. Uporabili smo tudi tkivne rezine iz črevesja in jeter podgan, kasneje pa tudi difuzijske celice tipa Sweetana-Grass, s čimer smo med prvimi na svetu pričeli proučevati metabolizem, ki poteka hkrati že med procesom absorpcije ksenobiotikov skozi sluznico v koščku živega izoliranega segmenta živalskega duodenuma, jejunuma ali ileuma (32).

Ker so metaboliti, ki večinoma nastanejo v notranjosti celic, značilno bolj polarni od izhodnih spojin, je za njihov prenos v izvencelični prostor potreben membranski (aktivni) transport. Tudi ta proces smo proučevali z uporabo modelov rastoče kompleksnosti, od membranskih veziklov, celičnih linij pa do difuzijskih celic. Doprinos posameznih membranskih prenašalcev smo uspešno ocenili s pomočjo uporabe bolj ali manj specifičnih inhibitorjev, potrditev pravilnosti hipotez in izvedenih poskusov *in vitro* pa smo pridobili s pomočjo farmakogenetskih raziskav, s katerimi smo potrdili vpliv prisotnih polimorfizmov v genih, ki kodirajo te prenašalce, na farmakokinetiko proučevanih spojin (33).

Pri proučevanju metabolizma učinkov in transporta v notranjost celic in iz njih smo naleteli na ključen analizni iziv – kako občutljivo izmeriti znotrajcelično koncentracijo učinkov in metabolitov. Z namenom napovedovanja uspešnosti zdravljenja kronične mieloične levkemije z imatinibom smo uspeli razviti enostavno, a hkrati ultraobčutljivo analizno metodo na osnovi masne spektrometrije za vrednotenje privzema imatiniba v tarčne celice, ki se lahko kosa po občutljivosti z detekcijo radioaktivno označene učinkovine (21).

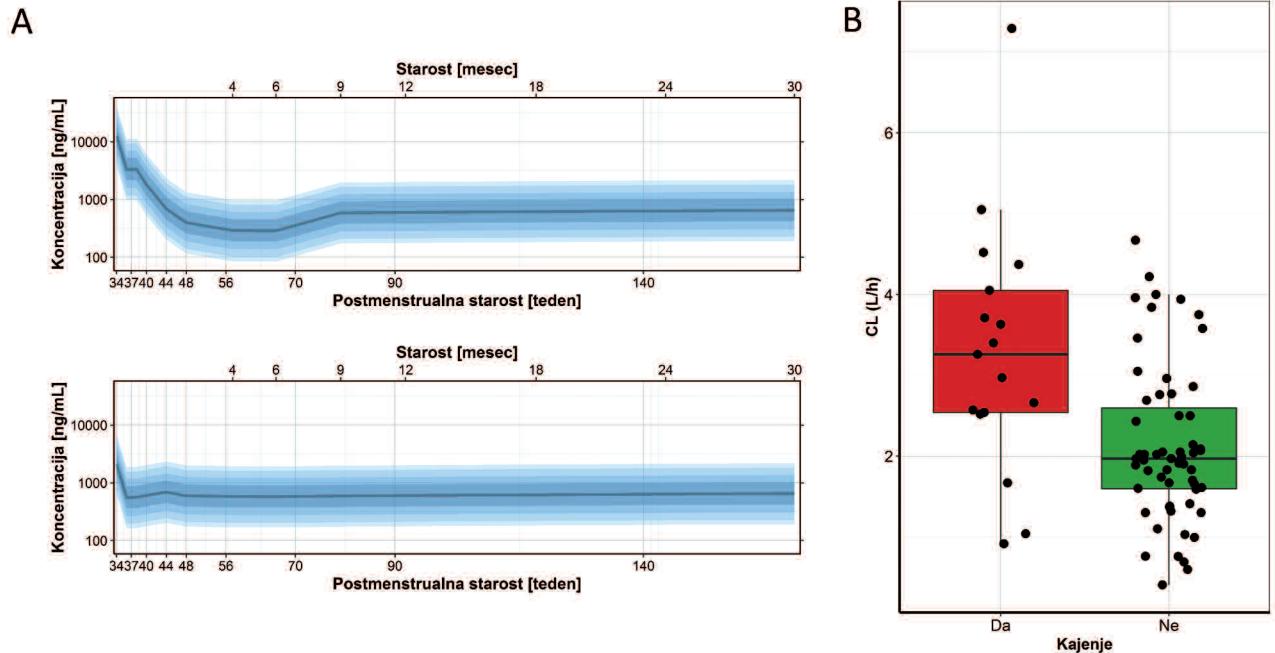
5 FARMAKOKINETIČNO-FARMAKODINAMIČNI MODELI

Farmakokinetika mnogih zdravilnih učinkovin se med različnimi bolnikti lahko zelo razlikuje, kar lahko skupaj z va-

riabilnostjo v farmakodinamiki vodi do klinično pomembnih razlik v učinkovitosti in varnosti. V okviru klinične farmakokinetike uporabljamo farmakokinetične metode z namenom načrtovanja individualnega režima odmerjanja zdravil. Z individualizacijo zdravljenja optimiramo terapevtske učinke ob minimalni pojavnosti neželenih učinkov. Posebno mesto v okviru klinične farmakokinetike predstavlja populacijska farmakokinetična analiza, ki kvantificira, proučuje in pojasnjuje razlike v farmakokinetičnih parametrih zdravilne učinkovine med različnimi skupinami bolnikov. S populacijskimi farmakokinetično-farmakodinamičnimi modeli lahko pojasnimo del interindividualne variabilnosti v plazemskih koncentracijah zdravilne učinkovine pri določenem režimu odmerjanja in napovemo časovni potek plazemskih koncentracij ali učinkov pri posameznem bolniku. Populacijsko modeliranje je še posebej smiselno pri zdravilih z zanim odnosom med plazemsko koncentracijo in učinkom, pri zdravilih z ozkim terapevtskim oknom ter pri zdravilih z veliko variabilnostjo v farmakokinetiki ali farmakodinamiki. Populacijske farmakokinetične modele pogosto uporabljamo za prilaganje odmerjanja zdravil pri ranljivejših skupinah bolnikov, pri katerih se v primerjavi s tipičnimi odraslimi bolniki farmakokinetika zelo razlikuje, npr. novorojenčki, dojenčki, starostniki.

Pri kritično bolnih otrocih, mlajših od dveh let in pol, smo s populacijskim modelom opisali farmakokinetiko midazolama. Očistek midazolama je pri tej skupini odvisen od telesne mase in zorenja jetrne metabolične funkcije. Midazolam je namreč podvržen intenzivnemu metabolizmu s citokromom 3A4. V farmakokinetičnem modelu smo z alometričnim skaliranjem določili vpliv telesne mase in iz preostalih razlik v očistku opredelili zorenje jetrne metabolične funkcije. Ugotovili smo, da ta doseže 50 % vrednosti zdravega odraslega bolnika pri 46. tednu pomenstralne starosti. S pomočjo modela smo za različne starostne skupine dojenčkov in otrok razvili nomogram za odmerjanje, ki zagotavlja doseganje optimalnih terapevtskih koncentracij midazolama (slika 3A) (34).

Pri zdravljenju bolnikov s kroničnim srčnim popuščanjem pogosto uporabljamo bisoprolol. S populacijskim farmakokinetičnim modeliranjem smo ugotovili, da je očistek bisoprolola odvisen od ledvične funkcije. Pri bolnikih z zmerno ali močno zmanjšano oceno ledvične funkcije je zato treba prilagoditi odmerjanje. Proučevali smo tudi vplive sprememb v telesni sestavi, saj se med zdravljenjem z bisoprololom običajno zmanjša telesna masa, kar se pri 5 do 15 % bolnikov razvije v kaheksijo. Zaradi zmanjšanja telesne mase bolnika se zmanjša tudi volumen po-



Slika 3: A) Simulirane povprečne plazemske koncentracije midazolama v stacionarnem stanju glede na starost otroka v primeru odmerjanja v skladu s povzetkom glavnih značilnosti zdravila (zgoraj) in alternativni režim odmerjanja na osnovi populacijske farmakokinetične analize (spodaj). Črta predstavlja mediano koncentracije midazolama, senčena področja pa 50 %, 75 %, 90 % in 95 % intervalne napovedi. Koncentracije nad 1000 ng/mL lahko nakazujejo prekomerno odmerjanje. B) Vpliv kajenja na individualne ocene očistka lamotrigina pri skupini bolnikov z epilepsijo ($n = 100$).

Figure 3: A) Simulated average steady-state midazolam concentration according to patient age using dosing regimen recommended by the summary of product characteristics (top) and alternative population pharmacokinetic modelling derived dosing regimen (bottom). Line is median concentration; shaded areas are 50%, 75%, 90% and 95% prediction intervals. Concentrations above 1000 ng/mL might indicate excessive dosing regimens. B) Influence of cigarette smoking on individual estimates of lamotrigine clearance in a group of 100 patients with epilepsy.

razdelitve, kar vodi v večje maksimalne koncentracije bisoprolola in večja nihanja koncentracij v stacionarnem stanju (35).

Terapevtsko spremljanje koncentracij in populacijska farmakokinetika sta uporabni orodji tudi za optimizacijo zdravljenja s protiepileptičnimi zdravili, saj je pojavnost epileptičnih napadov nenapovedljiva, hkrati pa zanesljivih označevalcev za terapevtsko učinkovitost in toksičnost protiepileptičnih zdravil še ne poznamo. Pri odraslih bolnikih z epilepsijo smo proučevali vplive genetskih polimorfizmov encima UDP-glukuronoziltransferaza (UGT1A4 in UGT2B7), prenašalnih proteinov ABCB1 in SLC22A1 ter različnih demografskih, biokemijskih in kliničnih dejavnikov na farmakokinetiko lamotrigina. Ugotovili smo, da na farmakokinetiko lamotrigina vplivajo genetski polimorfizem UGT2B7, telesna masa, ledvična funkcija, kajenje in sočasno zdravljenje s protiepileptičnimi in drugimi zdravili, ki inducirajo ali inhibirajo presnovo (slika 3B).

Ugotovili smo tudi, da na očistek neaktivnega metabolita lamotrigina (2N glukuronida) vplivata bolnikova ledvična funkcija in telesna masa (36). S pomočjo populacijske farmakokinetične analize smo razvili tudi model, ki omogoča optimizacijo zdravljenja epilepsije s topiramatom. Na očistek topiramata pomembno vplivata starost bolnika in sočasno zdravljenje s karbamazepinom; pri sočasnem zdravljenju s karbamazepinom je očistek topiramata večji kar za 70 % (37).

V zadnjem obdobju se veliko ukvarjamamo tudi s farmakokinetiko bioloških zdravil. Pri teh je modeliranje velikokrat neizogibno zaradi tarčno pogojene farmakokinetike in posledično nelinearnosti. Pokazali smo, da lahko s spremeljanjem hitrosti spremembe očistka rituksimaba pri bolnikih z difuznim velikoceličnim limfomom B napovemo izid zdravljenja (38). Zgodnja napoved izida nam omogoča podporo pri odločitvah za bolj intenzivno ali spremenjeno zdravljenje bolezni.

6 OD MODELOV DO OPTIMIZACIJE FARMAKOTERAPIJE S STORITVAMI KLINIČNE FARMACIJE

Končni cilj proučevanja biofarmacevtskih in farmakokinetičnih procesov je optimizacija farmakoterapije. Najbolj neposredna je ta povezava v primeru terapevtskega spremeljanja koncentracij in farmakokinetično-farmakodinamičnih modelov, s katerimi prilagajamo terapijo posamezniku. V klinični praksi omogočajo optimizacijo farmakoterapije tudi farmacevtske kognitivne storitve, kot so pregled uporabe zdravil, usklajevanje zdravljenja z zdravili in farmakoterapijski pregled. To so aktivnosti in storitve farmacevta, ki vodijo k celoviti obravnavi pacienta, racionalni in optimalni uporabi zdravil in sodijo na področje klinične farmacije. Osnova za implementacijo storitev v praksi je bila raziskovalna dejavnost, ki je nastala s sodelovanjem kliničnih farmacevtov in sodelavcev UL FFA. Z raziskavami ugotovljene težave pri zdravljenju z zdravili so potrdile potrebo po oblikovanju novih storitev klinične farmacije. Sledilo je oblikovanje standardnih operativnih postopkov storitev in definiranje kompetenc izvajalcev storitev, s čimer je klinična farmacija pridobila orodja in kadrovski potencial za še večjo uveljavitev znotraj zdravstvenega sistema. Tej tematiki je bila posvečena prva številka Farmacevtskega vestnika v letu 2018 (39).

7 SKLEP

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko UL FFA razvijamo in uporabljamo številne modele, tako teoretične (matematične) kot eksperimentalne. Pri tem razvijamo in uporabljamo različno zahtevne bioanalizne metode. S pristopi *in vitro* pojasnjujemo dogajanje *in vivo* in na ta način predvidevamo usodo zdravila v telesu. S tovrstnimi modeli pridobivamo biološko relevantne informacije o obnašanju farmacevtskih oblik v prebavnem traktu ter o usodi učinkovine po absorpciji. Ti podatki predstavljajo pomembno podporo raziskavam biološke uporabnosti in bioekvivalence, ki se izvajajo v okviru razvoja novih farmacevtskih oblik, po drugi strani pa omogočajo optimizacijo in individualizacijo farmakoterapije. Slednje v klinični praksi nadgrajujemo s storitvami klinične farmacije.

8 LITERATURA

1. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(2):123-33.
2. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int J Pharm.* 2013;453(1):12-24.
3. Bogataj M, Kristl A, Mrhar A, Kozjek F. Postopki priprave in kontrole mikrokapsul; Microcapsules: Preparation and control. *Farm Vest.* 1988;39(4):239-52.
4. Locatelli I, Mrhar A, Bogataj M. Gastric emptying of pellets under fasting conditions: a mathematical model. *Pharm Res.* 2009;26(7):1607-17.
5. Locatelli I, Nagelj Kovačič N, Mrhar A, Bogataj M. Gastric emptying of non-disintegrating solid drug delivery systems in fasted state: relevance to drug dissolution. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(8):967-76.
6. Bürmen B, Locatelli I, Bürmen A, Bogataj M, Mrhar A. Mathematical modeling of individual gastric emptying of pellets in the fed state. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2014;26(4):418-28.
7. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, et al. In vitro models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:342-66.
8. Culen M, Rezacova A, Jampilek J, Dohnal J. Designing a dynamic dissolution method: a review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):2995-3017.
9. Hribar M, Trontelj J, Klančar U, Markun B, Čeligoj Dujc T, Legen I. A novel intestine model apparatus for drug dissolution capable of simulating the peristaltic action. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(5):1646-56.
10. Havengaar R, Minekus M, inventors. *In vitro model of an in vivo digestive tract JP, US, European Patent.* 1994: PCT/NL 93/00225.
11. Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, Meunier JP, Denis S, Havengaar R, et al. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharm Res.* 2004;21(4):585-91.
12. Garabtz G, Klein S, Weitsches W. A biorelevant dissolution stress test device - background and experiences. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(11):1251-61.
13. Bogataj M, Cof G, Mrhar A. Development of a glass-bead device for dissolution testing. *Dissolut Technol.* 2015;22(3):18-26.
14. Felicjan T, Pišlar M, Vene K, Bogataj M. The influence of simulated fasted gastrointestinal pH profiles on diclofenac sodium dissolution in a glass-bead flow-through system. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(7):2875-84.
15. Kristl A. Estimation of aqueous solubility for some guanine derivatives using partition coefficient and melting temperature. *J Pharm Sci.* 1999;88(1):109-10.
16. Kristl A, Vesnauer G. Thermodynamic investigation of the effect of octanol-water mutual miscibility on the partitioning and solubility of some guanine derivatives. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1995;91(6):995-8.
17. Kristl A, Tukker JJ. Negative correlation of *n*-octanol/water partition coefficient and transport of some guanine derivatives through rat jejunum *in vitro*. *Pharm Res.* 1998;15(3):499-501.



18. Legen I, Kristl A. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56(1):87-94.
19. Žakelj S, Berginc K, Uršič D, Veber M, Kristl A. Metal cation-fluoroquinolone complexes do not permeate through the intestinal absorption barrier. *J Pharmaceut Biomed.* 2010;53(3):655-9.
20. Berginc K, Milisav I, Kristl A. Garlic flavonoids and organosulfur compounds: impact on the hepatic pharmacokinetics of saquinavir and darunavir. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(6):521-30.
21. Kralj E, Žakelj S, Trontelj J, Pajič T, Prelložnik Zupan I, Černelč P, et al. Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(1):123-9.
22. Košak U, Brus B, Knez D, Šink R, Žakelj S, Trontelj J, et al. Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Sci Rep.* 2016;6:39495.
23. Loch C, Žakelj S, Kristl A, Nagel S, Guthoff R, Weitschies W, et al. Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(1):131-8.
24. Sibinovska N, Žakelj S, Kristan K. Suitability of RPMI 2650 cell models for nasal drug permeability prediction. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;145:85-95.
25. Jereb R, Opara J, Legen I, Petek B, Bajc A, Žakelj S, et al. PBPK absorption modeling of food effect and bioequivalence in fed state for two formulations with crystalline and amorphous forms of BCS 2 class drug in generic drug development. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(2):59.
26. Trontelj J, Bogataj M, Marc J, Mrhar A. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;855(2):220-7.
27. Skledar DG, Carino A, Trontelj J, Troberg J, Distrutti E, Marchiano S, et al. Endocrine activities and adipogenic effects of bisphenol AF and its main metabolite. *Chemosphere.* 2019;215:870-80.
28. Trdan Lušin T, Roškar R, Trontelj J, Ravnikar M, Mrhar A. Determination of raloxifene and its glucuronides in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(23):2323-31.
29. Roškar R, Trdan Lušin T. Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples. In: De Azevedo Calderon L, editor. *Chromatography - the most versatile method of chemical analysis.* Rijeka: InTech; 2012. p. 79-126.
30. Trontelj J. Quantification of glucuronide metabolites in biological matrices by LC-MS/MS. In: Prasain Jeevan K, editor. *Tandem mass spectrometry - applications and principles.* Rijeka: InTech; 2012. p. 531-58.
31. Trdan Lušin T, Trontelj J, Mrhar A. Raloxifene glucuronidation in human intestine, kidney, and liver microsomes and in human liver microsomes genotyped for the UGT1A1*28 polymorphism. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(12):2347-54.
32. Berginc K, Trdan T, Trontelj J, Kristl A. HIV protease inhibitors: garlic supplements and first-pass intestinal metabolism impact on the therapeutic efficacy. *Biopharm Drug Dispos.* 2010;31(8-9):495-505.
33. Trdan Lušin T, Stieger B, Marc J, Mrhar A, Trontelj J, Zavrtnik A, et al. Organic anion transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 and their genetic variants influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of raloxifene. *J Transl Med.* 2012;10:76.
34. Kos MK, Miksić M, Jovanović M, Roškar R, Grosek Š, Grabnar I. Maturation of midazolam clearance in critically ill children with severe bronchiolitis: A population pharmacokinetic analysis. *Eur J Pharm Sci.* 2020;141:105095.
35. Cvan Trobec K, Grabnar I, Kerec Kos M, Vovk T, Trontelj J, Anker SD, et al. Bisoprolol pharmacokinetics and body composition in patients with chronic heart failure: a longitudinal study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016;72(7):813-22.
36. Miloshevska D, Lorber B, Vovk T, Kastelic M, Dolžan V, Grabnar I. Pharmacokinetics of lamotrigine and its metabolite N-2 glucuronide: Influence of polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(2):399-411.
37. Vovk T, Jakovljević MB, Kos MK, Janković SM, Mrhar A, Grabnar I. A nonlinear mixed effects modelling analysis of topiramate pharmacokinetics in patients with epilepsy. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(7):1176-82.
38. Rožman S, Grabnar I, Novaković S, Mrhar A, Jezeršek Novaković B. Population pharmacokinetics of rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma and association with clinical outcome. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(8):1782-90.
39. Farm Vest. 2018; 69(1):1-72.

