



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗΣ ΤΗΣ
ΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗΣ
ΒΟΥΣΟΥΛΦΑΝΗΣ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Νερούτσος Ευθύμιος
Χημικός Msc, Medicinal Chemistry

ΑΘΗΝΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΒΑΛΣΑΜΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝΙΔΗΣ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΔΟΚΟΥΜΕΤΖΙΔΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΒΑΛΣΑΜΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝΙΔΗΣ

ΣΟΦΙΑ ΚΥΡΟΥΔΗ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΔΟΚΟΥΜΕΤΖΙΔΗΣ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΣΙΡΙΓΩΤΗΣ

ΜΑΡΙΑ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

*‘Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου
Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.’*

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής στον τομέα Φαρμακευτικής τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Γεωργία Βαλσαμή, στο χρονικό διάστημα από τον Φεβρουάριο του 2012 έως Δεκέμβριο του 2017.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βαλσαμή για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου καθώς, και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αριστείδη Δοκουμετζίδα για την πολύτιμη καθοδήγησή του, τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της διατριβής. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Σπυριδωνίδη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, καθώς και τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Παναγιώτη Τσιριγώτη ,μέλος της επταμελούς επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις συμβουλές τους.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής για τη συμβολή τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπλ. Καθηγήτρια Ελένη Αρχοντάκη του τμήματος Χημείας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την βοήθειά και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον ιατρό αιματολόγο και πρώην διευθυντή της μονάδας κ. Στέλιο Γραφάκο καθώς και την νυν Διευθύντρια κ. Βίκυ Κίτρα, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συνεργαστώ μαζί τους καθώς και την τυφλή εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλους τους αιματολόγους της κλινικής και ιδιαίτερα, στους ιατρούς αιματολόγους κ. Άννα Παϊσίου και κ. Πόπη Ζησάκη, για την άριστη συνεργασία που αναπτύξαμε και τις πολύτιμες ώρες που περάσαμε μαζί. Εν συνεχεία θα ήθελα να αποδώσω ένα μεγάλο τις ευχαριστίες μου στο νοσηλευτικό προσωπικό της μονάδας και ιδιαίτερα στην Νοσηλεύτρια κ. Παρασκευή Μούρτη για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ομ. Καθηγητή Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής κ. Παναγιώτη Μαχαίρα, επιστημονικό υπεύθυνο του προγράμματος «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011» στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ-II) με τίτλο «Individualized drug therapy in Greek hospitals based on pharmacokinetic mathematical modeling: Focus on generics», για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο πρόγραμμα και την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια του προγράμματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής και ιδιαίτερος στους απόφοιτους του μεταπτυχιακού

προγράμματος Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Ειρήνη Κεχαγιά και Στέλλα Αποστολίδη καθώς και τις Διδάκτορες Ιωάννα Αθανασιάδου και Ειρήνη Χριστοδούλου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο συνάδελφό και φίλο Γιάννη Καπετανστρατάκη για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου όπως και τον αδερφό μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

**Στα παιδιά
με καρκίνο και
τις οικογένειές τους**

Περίληψη

Η φαρμακοκινητική της i.v βουσουλφάνης ποικίλει σημαντικά μεταξύ των παιδιών και το βέλτιστο θεραπευτικό εύρος (ΘΕ) (εκφραζόμενο ως εύρος τιμών AUC) στα παιδιά δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια. Δεδομένου ότι, η υψηλότερη συστηματική έκθεση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας, όπως βλεννογονίτιδα, GvHD, VOD ή ηπατική φλεβοαποφρακτική νόσος, ενώ η χαμηλή συστηματική έκθεση στη βουσουλφάνη έχει συσχετιστεί με υψηλότερη πιθανότητα απόρριψης μοσχεύματος ή υποτροπής της νόσου, είναι ευνόητο ότι η εφαρμογή TDM για την εξατομίκευση της δόσης της i.v. βουσουλφάνης είναι απαραίτητη σε παιδιά που υποβάλλονται σε αλλογενή HSCT και περιγράφεται στο SPC του εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος Η έγχυση της i.v. βουσουλφάνης σε παιδιά πραγματοποιείται με πολύ χαμηλή ροή ("μικροέγχυση") και μπορεί να επηρεάσει τον υπολογισμό της έκτασης της απορρόφησης (AUC) λόγω του χρόνου υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος, ο οποίος οφείλεται στο νεκρό όγκο φυσιολογικού ορού που υπάρχει στη διάταξη της συσκευής έγχυσης ο οποίος πρέπει να απομακρυνθεί ώστε να αρχίσει να εισέρχεται το φάρμακο στη γενική κυκλοφορία του αίματος.

Γενικά, η έγχυση φαρμάκων με χαμηλό ρυθμό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του lagtime (χρόνου υστέρησης εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος) η οποία μπορεί να επηρεάσει αισθητά τον υπολογισμό της AUC αν δε ληφθεί υπόψη. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε φάρμακα με στενό ΘΕ για τα οποία η εξατομίκευση της δόσης γίνεται θεωρώντας ότι ακολουθούν γραμμική φαρμακοκινητική με χρήση της υπολογιζόμενης AUC. Επομένως, σε περιπτώσεις που χρειάζεται η ρύθμιση της δόσης με βάση την AUC θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν: 1) Η μέτρηση και ανάλυση των προφιλ συγκέντρωσης-χρόνου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση BU και η εξατομίκευση της δοσολογίας σε παιδιατρικούς ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε HSCT στο «Κέντρο Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών» στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», όπως προβλέπεται στο SPC του χορηγούμενου φαρμάκου, 2) Η in vitro αξιολόγηση του προκαλούμενου χρόνου υστέρησης άφιξης του BU στη γενική κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της έγχυσης του φαρμάκου σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση αντλίας σύριγγας, με βάση το σωματικό βάρος και την ηλικία του ασθενούς, σύμφωνα με την σχετική κατηγοριοποίηση που αναφέρεται στο SPC του

χορηγούμενου φαρμάκου (Busilvex®), 3) Η ενσωμάτωση του in vitro προσδιοριζόμενου χρόνου υστέρησης στη μεθοδολογία υπολογισμού της AUC και της εξατομίκευσης της δοσολογίας καθώς και η αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης στην προβλεπόμενη διόρθωση της χορηγούμενης δόσης, 4) Η ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου για το BU σε παιδιατρικούς ασθενείς με ενσωμάτωση του χρόνου υστέρησης άφιξης του BU στη γενική κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της έγχυσης του φαρμάκου σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση αντλίας σύριγγας, η εφαρμογή της Μπαεσιανής εξατομίκευσης της δοσολογίας και η σύγκριση με την συνήθη μεθοδολογία.

Η παρούσα διατριβή διαρθρώνεται σε 5 κεφάλαια. **Στο πρώτο εισαγωγικό κεφάλαιο** περιγράφονται βασικές θεωρητικές έννοιες ενώ στα υπόλοιπα τέσσερα περιγράφονται μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν ή/και αναπτύχθηκαν για την επίτευξη των στόχων της μελέτης και συζητούνται τα επιτευχθέντα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα:

Το δεύτερο κεφάλαιο της διατριβής ασχολείται με την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC με ανιχνευτή UV για τη μέτρηση των επιπέδων των επιπέδων του Bu σε πλάσμα αίματος, που ήταν απαραίτητη για την αξιόπιστη και αποτελεσματική εφαρμογή θεραπευτικής παρακολούθησης και εξατομίκευσης της δόσης του BU. Η αναλυτική μέθοδος απαιτεί μικρό όγκο πλάσματος (250 μ L) και μικρό χρόνο ανάλυσης (13 min) και χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία. (εύρος: 0.048 – 4.8 μ g/mL, LOD: 0.048 μ g/mL, LOQ:0.013 μ g/mL) Η μέθοδος είναι εκλεκτική και ακριβής με τις τιμές εντός- και μεταξύ- εργαστηριακών ημερών ακρίβειας και πιστότητας να μην ξεπερνούν το 6.5%. Έτσι, είναι πλήρως εφαρμόσιμη για TDM σε παιδιατρικούς ασθενείς, όπου απαιτείται ποσοτικοποίηση σε μικρούς όγκους πλάσματος με χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης.

Το τρίτο κεφάλαιο πραγματεύεται τον προσδιορισμό του χρόνου υστέρησης έγχυσης κατά τη χορήγηση BU σε παιδιατρικούς ασθενείς. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν διάφορες προσομοιώσεις in vitro για τις 5 διαφορετικές δοσολογικές κατηγορίες που περιγράφονται στην Περίληψη Χαρακτηριστικών Προϊόντος (SPC) ανάλογα με το ανάλογα με το πραγματικό βάρος σώματος του ασθενούς (actual body weight ABW) (Κατηγορία 1: 1.0mg/kg για ΒΣ < 9kg, Κατηγορία 2: 1.2 mg/kg για 9-16kg, Κατηγορία 3: 1.1 mg/kg για ΒΣ 16-23 kg, Κατηγορία 4: 0.95 mg/kg για ΒΣ 23-34 kg και Κατηγορία 5: 0.8 mg/kg για ΒΣ >34kg). Η εξατομίκευση της δόσης γίνεται με βάση την υπολογιζόμενη, με τη μέθοδο των

τραπεζίων, τιμή της AUC. Για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνονται δείγματα στους χρόνους: πριν την έγχυση (0 h), αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης, και 30 min, 1 h, και ~2-3 h μετά το τέλος της έγχυσης. Για την μελέτη του χρόνου υστέρησης πραγματοποιήθηκαν ενδεικτικές προσομοιώσεις ανά δοσολογική κατηγορία, οι οποίες αντιστοιχούν σε ένα εύρος ροών έγχυσης από 15 mL/h έως 30 mL/h. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χρόνος υστέρησης εξαρτάται από το ρυθμό μεταφοράς του φαρμάκου από την αντλία στον ασθενή, η παρασκευή των διαλυμάτων προσομοίωσης της έγχυσης βασίστηκε στην επιλογή της επιθυμητής ροής που οδηγεί σε συγκεκριμένο όγκο του φαρμάκου και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο βάρος σώματος ανά δοσολογική κατηγορία φαρμάκου για τις προτεινόμενες στο SPC του φαρμάκου κατηγορίες ασθενών. Το δειγματοληπτικό σχήμα αποτελούνταν από 3 περιόδους. Κατά την περίοδο Α συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min για τα πρώτα 30 min. Η περίοδος Β που συλλέγονταν δείγματα ανά 10 min μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) και η περίοδος Γ που συλλέγονταν δείγματα ανά 5 min μέχρι την έκπλυση του συστήματος έγχυσης. Έτσι, βρέθηκε ότι σε για ασθενείς μικρού σωματικού βάρους έχουμε υψηλό χρόνο υστέρησης που φτάνει τα 40 min και όσο αυξάνεται το σωματικό βάρος ο χρόνος υστέρησης μειώνεται σημαντικά. Συγκεκριμένα για ασθενείς με ΣΒ < 9kg και ΣΒ 9-16 kg ο προσδιοριζόμενος χρόνος υστέρησης έγχυσης (lag-time) είναι 40min. Σε ασθενείς με ΣΒ 16-23 kg παρατηρείται lag-time που κυμαίνεται μεταξύ 35-25 min. για ΣΒ 23-34 kg ο lag-time υπολογίζεται στα 20 min. Ενώ για ΣΒ> 34 ο υπολογιζόμενος lag-time κυμαίνεται από 20 έως 5 min.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η εφαρμογή θεραπευτικής παρακολούθησης και εξατομίκευσης της δοσολογίας της i.v. βουσουλφάνης που πραγματοποιήθηκε σε 76 παιδιατρικούς ασθενείς με μέση ηλικία 7.6 χρόνια (εύρος 0.5-19 χρονών) που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση Μυελού των οστών στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» μεταξύ Ιουλίου του 2014 και Ιανουαρίου 2017. Η δόση που χορηγήθηκε ήταν από 0,8-1,2 mg/kg ανάλογα με το βάρος του ασθενή. Κάθε έγχυση διαρκούσε περίπου δύο έως τρεις ώρες και χορηγήθηκε σε κάθε ασθενή ανά έξι ώρες επί τέσσερις συνεχόμενες ημέρες πριν από τη χημειοθεραπεία ή δυο συνεχόμενες ημέρες. Τα δείγματα λαμβάνονταν σε χρόνο 0 (πριν την έναρξη της έγχυσης), στις 2-3 h (στο τέλος της έγχυσης), στις 2.5 ή 3.5- h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης), στις 4 και 6 ώρες, μετά την έναρξη της χορήγησης της πρώτης δόσης. Χρησιμοποιώντας τον πραγματικό χρόνο δειγματοληψίας και τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις

Busulfan υπολογίζεται η AUC_{total} με τον κανόνα των τραπεζίων. Το ποσοστό των ασθενών που βρέθηκε εντός ΘΕ ήταν 59.2% ενώ 7.9% βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ 900.0-1350 $\mu M \cdot min$ και 32.9% κάτω από αυτό. Για το ποσοστό των ασθενών που βρέθηκε εκτός ΘΕ πραγματοποιήθηκε εξατομίκευση της δόσης. Το ποσοστό των ασθενών που εισήλθε εντός ΘΕ (900.0-1350 $\mu M \cdot min$) μετά την τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης ήταν 89.04% ενώ 10.96% % βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu M \cdot min$.

Λαμβάνοντάς υπόψη το χρόνο υστέρησης έγχυσης (lag-time) για τον υπολογισμό της AUC (AUC_{lag}), από το σύνολο των 76 ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη ένα ποσοστό 42.1% βρίσκονται εντός του ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu M \cdot min$, το 7.9% βρίσκονται πάνω από το ΘΕ και 50% βρίσκεται κάτω από το ΘΕ, ενώ το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ μετά την τροποποίηση της δόσης αυξάνει σε 89.0% με το 4.1% κάτω από το ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu M \cdot min$ και το 6.9% να βρίσκεται πάνω αυτό. Σε κάθε περίπτωση μετά την εξατομίκευση της δόσης όλοι οι ασθενείς βρίσκονται κάτω από το ανώτερο τοξικό επίπεδο των 1500.0 $\mu M \cdot min$ με βάση το διευρυμένο ΘΕ 900.0-1500.0 $\mu M \cdot min$, ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (με ή χωρίς τη συνεισφορά του lagtime).

Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης έγχυσης οι υπολογιζόμενες τιμές AUC_{lag} είναι μικρότερες σε σύγκριση με αυτές που υπολογίζονται χωρίς το χρόνο υστέρησης, AUC_{nolag} . Η χρήση του AUC_{lag} είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($AUC < 900 \mu M \cdot min$) ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που βρίσκονται πάνω από ΘΕ ($AUC > 1350 \mu M \cdot min$). Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η διόρθωση της δόσης με βάση το περιορισμένο ΘΕ ($900 < AUC < 1350 \mu M \cdot min$) ώστε όλοι οι ασθενείς να βρίσκονται σε επίπεδα κατώτερα του μέγιστου επιτρεπόμενου τοξικού ορίου ($AUC < 1500 \mu M \cdot min$) ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (AUC_{lag} ή AUC_{nolag}).

Στο πέμπτο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής τα δεδομένα συγκέντρωσης – χρόνου, λαμβάνοντάς υπόψη το χρόνο υστέρησης, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου με τη χρήση των μοντέλων μεικτών επιδράσεων (NONMEM).

Το μοντέλο που περιέγραψε καλύτερα τα δεδομένα ήταν το διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωταξική κινητική απομάκρυνσης. Οι ΦΚ παράμετροι προς εκτίμηση

ήταν η CL, Vc, Vr και Q. Η διατομική μεταβλητότητα εκτιμήθηκε για τις 2 πρώτες παραμέτρους, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης (CL) και του όγκου κατανομής στο κεντρικό διαμέρισμα (Vc). Το μοντέλο σφάλματος ήταν το συνδυαστικό. Σημαντική επίδραση στην καλή προσαρμογή των δεδομένων είχε ο συνδυασμός του βάρους και της ηλικίας ως συμμεταβλητές στη CL και το βάρος στον Vc. Το μοντέλο αξιολογήθηκε ως προς την προσαρμογή του στα δεδομένα (διαγράμματα καλής προσαρμογής), της σταθερότητας του (bootstrap) και τις προβλεπτικές του δυνατότητες (VPC plot) και θεωρήθηκε κατάλληλο για την περιγραφή της ΦΚ του BU στους παιδιατρικούς ασθενείς.

Οι post hoc εκτιμήσεις των εξατομικευμένων ΦΚ παραμέτρων για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της παραμέτρου AUC και στη συνέχεια για την εξατομίκευση της δόσης. Στη συνέχεια συγκρίθηκε το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονταν εντός ΘΕ όταν η AUC υπολογίζεται με τη μέθοδο των τραπεζίων ($AUC_{\text{trapezoidal-lagtime}}$) και το ποσοστό των ασθενών με τη χρήση της πληθυσμιακής μοντελοποίησης (AUC_{Bayesian}). Το ποσοστό των ασθενών με την μέθοδο των τραπεζίων που έχει ληφθεί υπόψη ο χρόνος υστέρησης διαφέρει λίγο από αυτή της Μπαεσιανής μεθόδου, και πιο συγκεκριμένα με τη Μπαεσιανή εξατομίκευση μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών είναι εντός ΘΕ (44.7%) μετά την πρώτη έγχυση, σε σχέση με αυτό των τραπεζίων που εμπεριέχει το lagtime και είναι 42.1%.

Επιπλέον, και για την διερεύνηση του καλύτερου δειγματοληπτικού σχήματος (λιγότερα σημεία δειγματοληψίας), ακολούθησε η σύγκριση του ποσοστού των ασθενών που είναι εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) με βάση την Μπαεσιανή εξατομίκευση λαμβάνοντας υπόψη το δειγματοληπτικό σχήμα της μελέτης, σε σχέση με μικρότερα δειγματοληπτικά σχήματα όπου έχει αφαιρεθεί 1, 2 και 3 δείγματα από το αρχικό δειγματοληπτικό σχήμα. Από τη σύγκριση προέκυψε ότι πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να εκτιμήσει σωστά την AUC με την posthoc μέθοδο στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται ο χρόνος υστέρησης και με αυτό δειγματοληπτικού σχήματος 1 μετά από posthoc εκτίμηση.

Συμπερασματικά από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι:

- Η βιο-αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι πλήρως εκλεκτική και ακριβής με τις τιμές τις εντός- και μεταξύ- εργαστηριακών ημερών ακρίβειας και πιστότητας να μην ξεπερνούν το 6.3%. Ταχεία, επαναλήψιμη, με όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων της βουσουλφάνης στο αίμα και σχετικά μικρό κόστος.
- Κατά την εφαρμογή θεραπευτικής παρακολούθησης και εξατομίκευσης της δοσολογίας της BU σε παιδιατρικούς ασθενείς όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης έγχυσης οι υπολογιζόμενες τιμές AUC είναι μικρότερες σε σύγκριση με αυτές που υπολογίζονται χωρίς το χρόνο υστέρησης, και η χρήση του AUC_{lag} είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($AUC < 900 \mu M \cdot \min$) ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που βρίσκονται πάνω από ΘΕ ($AUC > 1350 \mu M \cdot \min$).
- Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η διόρθωση της δόσης με βάση το περιορισμένο ΘΕ ($900 < AUC < 1350 \mu M \cdot \min$) ώστε όλοι οι ασθενείς να βρίσκονται σε επίπεδα κατώτερα του μέγιστου επιτρεπόμενου τοξικού ορίου ($AUC < 1500 \mu M \cdot \min$) ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (AUC_{lag} ή AUC_{nolag}).
- Το πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο που αναπτύχθηκε εκτιμά σωστά τα ποσοστά των ασθενών εντός, πάνω και κάτω από το ΘΕ 900-1350 $\mu M \cdot \min$ σε σύγκριση με την προτεινόμενη στο SPC μέθοδο των τραπεζίων.
- Επιπλέον το πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο με την posthoc μέθοδο μπορεί να εκτιμήσει σωστά την AUC στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται ο χρόνος υστέρησης και με αυτό του αρχικού δειγματοληπτικού σχήματος μετά από posthoc εκτίμηση.

Abstract

The pharmacokinetics of i.v busulfan vary significantly in pediatric population, and the optimal therapeutic range (TR) (expressed as AUC) for children has not been accurately determined. Since higher systemic exposure is associated with an increased risk of toxic adverse effects, such as mucositis, GvHD, VOD, or hepatic venous obstruction, whereas low systemic exposure to busulfan has been associated with a higher risk of graft rejection or recurrence, individualization of the dose of iv busulfan is necessary in children undergoing allogeneic HSCT, as described in the SPC of the commercially available formulation. In children, Busulfan is administered by i.v. infusion at a very low flow rate ("microinfusion") which may affect the calculation of the area under the curve (AUC), since a lag-time of drug entry into the general bloodstream. is generated due to the dead volume that must be removed from the injection device assembly until the drug enters the general bloodstream.

In general, infusion of drugs at a low rate results in an increased lagtime (delay time of drug release into the bloodstream) which may significantly affect the calculation of AUC if it is not taken into account. This is of particular importance for narrow-therapeutic range drugs for which the individualization of the dose is performed using the calculated AUC assuming linear pharmacokinetics. Therefore, in cases where AUC-based dose adjustment is needed, lagtime should be taken into account.

The objectives of this study were: 1) The measurement and interpretation of concentration-time profiles following intravenous BU administration and the individualization of dosage in pediatric patients which underwent HSCT at the "Bone Marrow Transplantation Center" in "Agia Sofia" Children Hospital of Athens, as described in the SPC of the administered drug, 2) In vitro evaluation of the lagtime of BU entrance in the bloodstream during the syringe pump-assisted microinfusion of BU in pediatric patients, using the patient's body weight based dosage categories described in the SPC of the drug (Busilvex®), 3) The incorporation of the in vitro determined lag-time in the AUC calculation methodology and dosage individualization as well as the evaluation of the possible effect on the predicted dose correction, 4) The development of a population pharmacokinetic model for BU in pediatric patients by incorporating the lag-time of BU entrance in the blood during i.v. syringe-pump-assisted microinfusion of the drug in pediatric patients, application of Bayesian individualization of dosage, and comparison with the conventional methodology.

This thesis is structured in 5 chapters. The **first introductory chapter** describes basic theoretical concepts, while the remaining four describe the methodologies that were followed and / or developed to achieve the objectives of the study, and discuss the results achieved. More specifically:

The **second chapter** of the dissertation deals with the development and validation of a HPLC method with a UV detector to measure the levels of BU levels in blood plasma, which was necessary for the reliable and effective application of therapeutic monitoring and individualization of the BU dose. The analytical method which was developed requires low plasma volume (250 μL) and low analytical time (13 min) and is characterized by low cost, accuracy, repeatability and sensitivity (Range: 0.048 - 4.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$, LOD: 0.048 $\mu\text{g} / \text{mL}$, LOQ: 0.013 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The method is selective and accurate for within- and between-laboratory precision and accuracy not exceeding 6.5%. Thus, it is fully applicable to TDM in pediatric patients, where quantification in small plasma volumes with a lower quantification threshold is required.

The **third chapter** deals with the determination of the infusion lagtime when BU is administered to pediatric patients. For this purpose, various *in vitro* simulations were performed for the 5 different dosage categories described in the Summary of Product Specifications (SPC) of BU according to the actual body weight ABW (Category 1: 1.0mg / kg for MS <9kg, Category 2: 1.2 mg / kg for MS 9-16kg, Category 3: 1.1 mg / kg for MS 16-23 kg, Category 4: 0.95 mg / kg for MS 23-34 kg and Category 5: 0.8 mg / MS kg for MS > 34kg). Dose individualization was based on the calculated AUC value, using the trapezoidal method. For the calculation of AUC samples are taken at times: before infusion (0 h), immediately after the end of infusion, and 30 min, 1 h, and ~ 2-3 h after the end of infusion. Indicative time-series simulations were performed to study lag-time, corresponding to an infusion flow range of 15 mL / h to 30 mL / h. Given that the lag-time depends on the rate of transfer of the drug from the pump to the patient, the preparation of the infusion simulation solutions was based on the choice of the appropriate flow in order to achieve to the required volume of the drug to be administered according to the body weight per drug dosage category as described in the SPC of the drug. The sampling schedule consisted of 3 periods. During period A, samples were collected every 5 min for the first 30 min. During period B samples were collected every 10 min until the end of the infusion (~ 2h) and during period C samples were collected every 5 min until the infusion was rinsed. Thus, it was found that in patients with low body weight we have a high lagtime of 40 min, and as the body weight

increases the lagtime is significantly reduced. More specifically, for patients with BW <9kg and BW 9-16 kg the estimated lag-time is 40 min. In patients with 16-23 kg BW, lag-time ranging between 35-25 min is observed. For BW 23-34 kg the lag-time is calculated at 20 min. While for BW > 34 the estimated lag-time ranges from 20 to 5 min.

Chapter 4 presents the application of therapeutic drug monitoring (TDM) and dose individualization i.v. BU in 76 pediatric patients with a mean age of 7.6 years (range 0.5-19 years) undergoing bone marrow transplantation at "Agia Sophia" Children's Hospital of Athens, between July 2014 and January 2017. The dose given was 0.8-1.2 mg / kg depending on patient weight. Each infusion lasted about two to three hours and was administered to each patient every six hours for four consecutive days before chemotherapy or two consecutive days. Samples were taken at time 0 (before infusion), at 2-3 h (at the end of infusion), at 2.5 or 3.5 h (half an hour after the end of infusion), at 4 and 6 hours after starting the administration of the first dose. Using real-time sampling and calculated Busulfan concentrations, AUC_{total} was calculated using the trapezoidal rule. The percentage of patients found within TR was 59.2%, while 7.9% of the patients were above TR 900.0-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ and 32.9% below it. Dose individualization was performed for the patients found out of the TR. The percentage of patients within the TR (900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) after the dose modification was 89.04% while 10.96% were above the TR 900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$.

Taking into account lag-time for the calculation of AUC (AUC_{lag}), 42.1% of the 76 patients who participated in the study were within the range 900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, 7.9% were above the TR and 50% is below the TR, while the proportion of patients within the TR after dose modification increases to 89.0% with 4.1% below the TR 900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ and 6.9% laying above it. In each case, after dose individualization, all patients are below the upper toxic level of 1500.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ based on the extended TR 900.0-1500.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, regardless of how the AUC is calculated (with or without lag-time contribution).

The present study showed that when infusion lag-time was taken into account, the calculated AUC_{lag} values are lower than those calculated without the lag time, AUC_{nolag} . The use of AUC_{lag} is more sensitive to the detection of patients on subtherapeutic levels ($AUC < 900 \mu\text{M} \cdot \text{min}$), while the number of patients above the threshold ($AUC > 1350 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) is not significantly affected. At the same time, it is necessary to adjust the dose based on the strict TR ($900 < AUC < 1350 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) so

that all patients are below the maximum permitted toxic limit ($AUC < 1500 \mu M * min$) regardless of the method of calculation. of the AUC (AUC_{lag} or AUC_{nolag}).

In **fifth chapter** of this thesis, the concentration-time data, taking into account the lag-time, were used to develop a population PK (POPPK) model using the nonlinear mixed effect models (NONMEM 7.3).

The model that best described the data was the two-compartment model with first order elimination kinetics. The estimated parameters were clearance, CL, volume of distribution of the central V_c and peripheral V_p compartments and intercompartmental clearance, Q. Inter-individual variability (IIV) was estimated for the first 2 parameters, and a significant correlation was found between CL and V_c . The combined error model was used to describe residual variability. The combination of weight and age as covariates in CL and weight in V_c had a significant effect on the fit of the data. The model was evaluated for the fit to the data (goodness of fit plots), by bootstrap analysis, and its predictive ability (VPC plot) and was considered suitable for describing BU's PK in pediatric patients.

Post hoc estimates of the individualized PK parameters for each patient were used to estimate the AUC parameter which was used for dose-individualization. Subsequently, the percentage of patients within the TR when AUC was calculated by the trapezoidal method ($AUC_{trapezoidal-lagtime}$) and the respective percentage of patients using population modeling ($AUC_{Bayesian}$) were compared. The percentage of patients within TR using the trapezoidal method and taking into account the lag-time differs slightly from that of the Bayesian method, and in particular the Bayesian individualization revealed a higher proportion of patients within the TR (44.7%) after the first infusion, compared to that of trapezoidal AUC containing the lag-time which is 42.1%.

In addition, and in order to investigate the best sampling scheme and the possibility of using fewer sampling points, a comparison was performed for the percentage of patients within the TR ($900.0-1350.0 \mu M * min$) based on the Bayesian individualization, between the sampling design of the study, and smaller sample sizes by removing 1, 2 and 3 sampling times from the original sample scheme. The comparison showed that the population-based PK model developed could correctly estimate the AUC by the posthoc method even if one sampling point was removed immediately after the end of the infusion, as the percentages of patients within the TR

did not differ from that calculated using the trapezoidal AUC which takes into account the lag-time and with the sample scheme used in the study, after posthoc estimation.

Overall, this study shows that:

- The bio-analytical method developed is fully selective and accurate with values of within and between laboratory days accuracy and precision not exceeding 6.3%. The method is rapid, repeatable, with a limit of detection and quantification that allows the determination of low concentrations of busulfan in the blood with relatively low cost.
- When applying TDM and individualization of BU dosage in pediatric patients, taking into account the infusion lag-time, the calculated AUC values are lower than those calculated without the lag-time, and the use of AUC_{lag} is more sensitive for the determination of patients at sub-therapeutic levels (AUC < 900 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$), while the number of patients above AE (AUC > 1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) is not significantly affected.
- At the same time, it is necessary to adjust the dose based on the restricted TR (900 < AUC < 1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) so that all patients are below the maximum permitted toxic limit (AUC < 1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) regardless of the method of AUC calculation (AUC_{lag} or AUC_{no lag}).
- The POPPK model developed correctly estimates patient percentage within, above and below the 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ range similar to the SPC proposed trapezoidal method.
- Additionally, the POPPK model with the posthoc method can correctly estimate the AUC if one sampling point is removed immediately after the end of the infusion as the percentages of patients within the TR do not differ from those determined using the trapezoidal method which takes into account the infusion lag-time and with that of the original sampling scheme after posthoc individualization.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή.....	32
1. Θεωρητικό	33
1.1. Εισαγωγή Θεραπευτική παρακολούθηση του φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring).....	33
1.2. Συλλογή και Ανάλυση Φαρμακοκινητικών δεδομένων.....	36
1.2.1. Μη Διαμερισματική Ανάλυση (Non-Compartmental Analysis, NCA).....	38
1.2.2. Φαρμακοκινητική μοντελοποίηση - Πληθυσμιακή φαρμακοκινητική.....	42
1.2.2.1. Παραμετρική πληθυσμιακή φαρμακοκινητική	45
1.2.2.2. Μέθοδος 2 σταδίων.....	47
1.2.2.3. Μοντέλα μικτών επιδράσεων.....	47
1.2.2.4. Μπαεσιανή εξατομίκευση.....	48
1.3. Βουσουλφάνη -Γενικά- Ιστορική αναδρομή.....	50
1.3.1. Τοξικότητα της peros Bu και η ανάγκη ανάπτυξης ενός i.v σκευάσματος	51
1.3.2. Πλεονεκτήματα της i.v. Bu και δοσολογικό σχήμα	54
1.3.3. Εφαρμογή της i.v. Bu ως προπαρασκευαστικό σχήμα σε παιδιατρικούς ασθενείς 55	
1.3.4. Φαρμακοκινητική της i.v. Bu σε παιδιατρικούς ασθενείς-ΘΕ- εξατομίκευση της δόσης 56	
1.4. Ιδιαιτερότητες στην ενδοφλέβια έγχυση Βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς 57	
1.4.1. Χρόνος υστέρησης	57
1.4.2. Αντλίες σύριγγας για ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων	58
1.4.3. Ενδοφλέβια έγχυση σε παιδιά με χρήση αντλίας σύριγγος	59
1.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό έγχυσης.....	59
1.4.4.1. Ύψος μεταξύ του άκρου του καθετήρα και της αντλίας.....	60
1.4.4.2. Μέγεθος και σχεδιασμός της σύριγγας	61
1.4.4.3. Μέγεθος και σχεδιασμός του σωλήνα έγχυσης.....	61
1.4.4.4. Είδος κεντρικού φλεβο-καθετήρα (Vascular access devices)	61
1.4.4.5. Φίλτρα εντός της γραμμής έγχυσης (Inline Filter).....	62
1.4.4.6. Βαλβίδες ελέγχου και βαλβίδες αντεπιστροφής (Check valves and antisiphon valves).....	62
1.4.5. Σύστημα πολλαπλών εγχύσεων που καταλήγει σε μια γραμμή έγχυσης	63
Κεφάλαιο 2 - Ανάπτυξη & Επικύρωση Βιοαναλυτικής Μεθόδου Προσδιορισμού Βουσουλφάνης.....	67
2. Εισαγωγή	68
2.1. Ανάπτυξη Βιο-αναλυτικής μεθόδου	68
2.2. Πειραματικό μέρος	69
2.2.1. Όργανα και συσκευές.....	69
2.2.2. Διαλύτες – Πρότυπα – Διαλύματα Παρακαταθήκης	70
2.3. Καμπύλη βαθμονόμησης και επεξεργασία δειγμάτων.....	71
2.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας Βουσουλφάνης.....	71

2.3.2.	Παρασκευή διαλύματος εργασίας Εσωτερικού προτύπου	71
2.3.3.	Παρασκευή προτύπων δειγμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου (QC) σε πλάσμα	72
2.3.4.	Προκατεργασία δείγματος.....	72
2.4.	Αποτελέσματα παραμέτρων επικύρωσης.....	74
2.4.1.	Εκλεκτικότητα.....	74
2.4.2.	Γραμμικότητα.....	76
2.4.2.1.	Έλεγχος γραμμικότητας.....	77
2.4.3.	Ανιχνευσιμότητα – Όριο ανίχνευσης (LOD) και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ).....	79
2.4.4.	Πιστότητα (Επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα)	80
2.4.5.	Ακρίβεια	82
2.4.6.	Ανάκτηση	82
2.4.7.	Σταθερότητα.....	83
2.4.8.	Εφαρμογή ενδεικτική ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινου πλάσματος στο πλαίσιο Φαρμακοκινητικής μελέτης.....	84
2.5.	Συμπεράσματα	86
Κεφάλαιο 3 - Μελέτη του χρόνου υστέρησης της ενδοφλέβιας έγχυσης της βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς.....		87
3.	Εισαγωγή	88
3.1.	Επίδραση του χρόνου υστέρησης στην εξατομίκευση της δόσης σε φάρμακα στενού Θεραπευτικού Εύρους (ΘΕ).....	88
3.2.	Πειραματική Μεθοδολογία	94
3.2.1.	Κατηγορίες Δόσεων ανά βάρος.....	94
3.2.2.	Οργανολογία και Αναλώσιμα.....	95
3.2.3.	Παρασκευή διαλυμάτων.....	95
3.2.4.	Ποσότητα βουσουλφάνης και όγκος Busilvex® που λαμβάνεται από την εμπορική συσκευασία των 6 mg/mL	95
3.2.5.	Πειραματική διάταξη in vitro προσομοίωση έγχυσης Busilvex®	96
3.2.6.	Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης έγχυσης και Δειγματοληπτικό σχήμα	98
3.2.7.	Το δειγματοληπτικό σχήμα περιλαμβάνει:	99
3.2.8.	Παρασκευή Διαλυμάτων προσομοίωσης έγχυσης	99
3.2.9.	Ποσοτικός προσδιορισμός Bu σε υδατικά διαλύματα.....	102
3.2.9.1.	Χειρισμός δειγμάτων	102
3.2.9.2.	Χρωματογραφικές συνθήκες.....	102
3.2.9.3.	Επεξεργασία αποτελεσμάτων	103
3.3.	Αποτελέσματα.....	104
3.3.1.	Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου.....	104
3.3.2.	Μελέτη του χρόνου υστέρησης.....	104
3.3.2.1.	Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 1 με ΒΣ<9 (15mL/h)	104
3.3.2.2.	Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg (15-17mL/h)	107
3.3.2.3.	Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 3 με ΒΣ 16-23 kg (16-23mL/h)	110

3.3.2.4.	Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 4 ΒΣ 23-34 kg (20-30 mL/h)	114
3.3.2.5.	Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 5 με ΒΣ > 34 kg (Ροή>25mL/h)	117
3.3.2.6.	Προσομοίωση κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού	120
3.3.2.7.	Προσομοίωση έγχυσης μέσω ασκού για την εύρεση μηδενικού χρόνου υστέρησης	124
3.4.	Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων χρόνου υστέρησης ανά δοσολογική κατηγορία - Συμπεράσματα	130
Κεφάλαιο 4 – Εξατομίκευση Δοσολογίας Βu σε Παιδιατρικούς Ασθενείς που Χρρίζουν Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών και έλεγχος επίδρασης του χρόνου υστέρησης έγχυσης		
4.	Εισαγωγή	133
4.1.	Ασθενείς – Πρωτόκολλο μελέτης – Υλικά και μέθοδοι	133
4.1.1.	Θεραπευτικό σχήμα και υπολειπόμενη νόσος	134
4.1.2.	Καταγραφή δημογραφικών στοιχείων	135
4.1.3.	Δοσολογικό σχήμα Busilvex®	135
4.2.	Δειγματοληπτικό σχήμα	136
4.2.1.	Ανάλυση δειγμάτων – υπολογισμός αποτελεσμάτων	136
4.3.	Αποτελέσματα – Συζήτηση	138
4.3.1.	Δοσολογικό σχήμα 1.0 mg/kg	139
4.3.2.	Δοσολογικό σχήμα 1.2 mg/kg	141
4.3.3.	Δοσολογικό σχήμα 1.1 mg/kg	143
4.3.4.	Δοσολογικό σχήμα 0.95 mg/kg	145
4.3.5.	Δοσολογικό σχήμα 0.8 mg/kg	147
4.4.	Εφαρμογή του χρόνου υστέρησης στον υπολογισμό του AUC – εξατομίκευση της δόσης	150
4.4.1.	Υπολογισμός AUC λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο υστέρησης ανά δοσολογική κατηγορία	150
4.4.2.	Εξατομίκευση-τροποποίηση δοσολογίας στους ασθενείς εκτός ΘΕ λαμβάνοντας υπόψη το lag-time	153
4.4.2.1.	Δοσολογικό σχήμα 1.0 mg/kg	154
4.4.2.2.	Δοσολογικό σχήμα 1.2 mg/kg	156
4.4.2.3.	Δοσολογικό σχήμα 1.1mg/kg	158
4.4.2.4.	Δοσολογικό σχήμα 0.95 mg/kg	160
4.4.2.5.	Δοσολογικό σχήμα 0.8 mg/kg	162
4.5.	Συνολική συζήτηση - συμπεράσματα	164
Κεφάλαιο 5 – Ανάπτυξη Πληθυσμιακού Φαρμακοκινητικού Μοντέλου Βουσουλφάνης σε Παιδιατρικούς Ασθενείς		
5.	Πληθυσμιακή ΦΚ Μοντελοποίηση - Σύγκριση τρόπου εξατομίκευσης	170
5.1.	Γενική Διαδικασία ανάπτυξης ΦΚ μοντέλου	170
5.1.1.	Ανάπτυξη βασικού πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου	170
5.1.1.1.	Δομικό μοντέλο	170
5.1.1.2.	Στατιστικά μοντέλα	170

5.1.1.3.	Ανάπτυξη μοντέλου συμμεταβλητών	172
5.1.1.4.	Γραφικός έλεγχος καλής προσαρμογής μοντέλου	174
5.1.1.5.	Ακρίβεια εκτιμώμενων παραμέτρων μοντέλου.....	176
5.1.1.6.	Προβλεπτικές ικανότητες μοντέλου.....	177
5.2.	Σύνοψη πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής μοντελοποίησης.....	178
5.2.1.	Διερεύνηση του καλύτερου δειγματοληπτικού σχήματος.....	179
5.3.	Αποτελέσματα.....	180
5.3.1.	Σχεδιασμός και ανάπτυξη δομικού μοντέλου.....	180
5.3.2.	Ανάπτυξη μοντέλου συμμεταβλητών.....	184
5.3.3.	Εφαρμογή του πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου	189
5.4.	Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	192
Κεφάλαιο 6 –	Συνολική συζήτηση-Συμπεράσματα.....	198
A.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	221
B.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	223
Γ.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ.....	229
Δ.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ.....	248
E.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε.....	258

Λίστα πινάκων

Πίνακας 1.1: Δοσολογικό σχήμα που ακολουθείται σε παιδιατρικούς ασθενείς.	55
Πίνακας 2.1: Τα στατιστικά δεδομένα για τις 6 καμπύλες βαθμονόμησης.	77
Πίνακας 2.2: Τα δεδομένα που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς.	77
Πίνακας 2.3: Μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης της καμπύλης αναφοράς.	78
Πίνακας 2.4: Αποτελέσματα από την εφαρμογή της δοκιμασίας t-test.	79
Πίνακας 2.5: Εκτίμηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης με υπολογισμό της επαναληψιμότητας σε επίπεδο συγκέντρωσης 0.48 µg/mL.	80
Πίνακας 2.6: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων που επιτευχθήκαν για κάθε επίπεδο ελέγχου. Δίνονται οι πειραματικές τιμές της συγκέντρωσης, η μέση τιμή και η σχετική τυπική απόκλιση RSD%.	81
Πίνακας 2.7: Η πιστότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα.	82
Πίνακας 2.8: Η ακρίβεια της μεθόδου εκφρασμένη ως εντός ημέρας ακρίβεια και μεταξύ ημερών ακρίβεια.	82
Πίνακας 2.9: Ανάκτηση BU και του εσωτερικού προτύπου.	83
Πίνακας 2.10: Συγκεντρώσεις δειγμάτων ελέγχου του BU και της μετά από κάθε κύκλο ψύξης-απόψυξης. 84	
Πίνακας 3.1: Δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου δειγματοληψίας (πραγματικού και θεωρητικού) για έναν ασθενή βάρους 35 kg.	90
Πίνακας 3.2: Υπολογιζόμενες τιμές μερικών AUC και ολικής AUC.	90
Πίνακας 3.3: Δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου δειγματοληψίας (πραγματικού και θεωρητικού) για έναν ασθενή για τρία επίπεδα χρόνου υστέρησης.	91
Πίνακας 3.4: Υπολογιζόμενες τιμές AUC λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος.	91
Πίνακας 3.5: Προτεινόμενη σύμφωνα με το SPC του φαρμάκου κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς.	94
Πίνακας 3.6: Κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς, τον συνολικό όγκο έγχυσης και τη συνολική ροή.	100
Πίνακας 3.7: Χρωματογραφικές συνθήκες.	103
Πίνακας 3.8: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας BΣ < 9 kg.	104
Πίνακας 3.9: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ < 9 kg.	105
Πίνακας 3.10: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας BΣ 9-16 kg.	107
Πίνακας 3.11: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ 9-16 kg.	108
Πίνακας 3.12: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας BΣ 16-23 kg.	110
Πίνακας 3.13: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ 16-23 kg για όγκο διαλύματος φαρμάκου ίσο με 30mL και 40 mL.	111
Πίνακας 3.14: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος καθώς και το βάρος προσομοίωσης της κατηγορίας BΣ 23-34 kg.	114
Πίνακας 3.15: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας 4 με BΣ 23-34 kg.	115
Πίνακας 3.16: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 5 (BΣ >34 kg).	117
Πίνακας 3.17: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ >34 kg.	118
Πίνακας 3.18: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού.	120
Πίνακας 3.19: Χαρακτηριστικά των προσομοιωμένων εγχύσεων για ασθενείς της κατηγορίας 5 και έγχυσης μέσω ασκού.	121
Πίνακας 3.20: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για τα βάρη σώματος ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στις προσομοιώσεις.	125
Πίνακας 3.21: Χαρακτηριστικά των προσομοιωμένων εγχύσεων για την εύρεση κατηγορίας BΣ ασθενών/όγκου διαλύματος έγχυσης με μηδενικό χρόνο υστέρησης.	126

Πίνακας 3.22: Χρόνοι υστέρησης ανά κατηγορία βάρους σύμφωνα με το SPC του Busilvex®.....	130
Πίνακας 4.1: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται το νόσημα, ο αριθμός των ασθενών, το χημικοθεραπευτικό σχήμα και ο τύπος μεταμόσχευσης.	133
Πίνακας 4.2: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ύφεση της νόσου πριν τη μεταμόσχευση.....	134
Πίνακας 4.3: Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	135
Πίνακας 4.4: Προτεινόμενη σύμφωνα με το SPC του φαρμάκου κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς.	135
Πίνακας 4.5: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης ($AUC_{initial}$) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.0 mg/kg, εξατομικευμένη δόση (Δόση _{indiv}) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).	140
Πίνακας 4.6: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.2 mg/kg, εξατομικευμένη δόση (Δόση _{indiv}) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).....	142
Πίνακας 4.7: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.1 mg/kg, εξατομικευμένη δόση (Δόση _{indiv}) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).....	144
Πίνακας 4.8: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.95 mg/kg, εξατομικευμένη δόση (Δόση _{indiv}) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).....	146
Πίνακας 4.9: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.8 mg/kg, εξατομικευμένη δόση (Δόση _{indiv}) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).....	148
Πίνακας 4.10: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.0 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).155	155
Πίνακας 4.11: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.2 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).	157
Πίνακας 4.12: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.1 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).	159
Πίνακας 4.13: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.95 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).161	161
Πίνακας 4.14: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.8 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).	163
Πίνακας 4.15: Ποσοστιαίες αναλογίες των ασθενών που βρίσκονται πάνω, κάτω και εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu M \cdot \text{min}$) πριν και μετά την εξατομικευση της δόσης του BU χωρίς και με τη χρήση lagtime για τον υπολογισμό της AUC.....	166
Πίνακας 5.1: Δειγματοληπτικά σχήματα που εφαρμόστηκαν για την εξέταση της επίδοσης του μοντέλου αν χρησιμοποιούσαμε λιγότερα σημεία.	179
Πίνακας 5.2: Δημογραφικά χαρακτηριστικά ανά κατηγορία ΒΣ.....	180
Πίνακας 5.3: Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των OFV για ενδεικτικές δοκιμές.	182
Πίνακας 5.4: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εκτιμήσεων του βασικού μοντέλου.	182
Πίνακας 5.5: Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι διαφορές οι εξισώσεις για τις διάφορες δοκιμές.	185
Πίνακας 5.6: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εκτιμήσεων του τελικού μοντέλου.	187

Πίνακας 5.7: Ο αριθμός και το ποσοστό των ασθενών εντός ΘΕ ανά τρόπο υπολογισμού.	190
Πίνακας 5.8: Εκτίμηση του ποσοστού ασθενών εντός ΘΕ, πάνω και κάτω από το ΘΕ όταν εφαρμόζονται τα δειγματοληπτικά σχήματα του Πίνακας 5.1.	190

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1.1: Μετρούμενα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα αίματος μέχρι την επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης.	33
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση της μη διαμερισματικής φαρμακοκινητικής ανάλυσης, Non Compartmental Analysis - NCA (αριστερά) και της μοντελοποίησης με μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (δεξιά). K_0 , K , και V , στη δεξιά απεικόνιση, είναι οι παράμετροι του ΦΚ μοντέλου που εκτιμώνται με προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα ^[12]	38
Εικόνα 1.3: Απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου κατά τη διάρκεια και μετά την χορήγηση φαρμάκου με ενδοφλέβια έγχυση σταθερού ρυθμού. Η σκιασμένη επιφάνεια αντανακλά υποεκτίμηση της επιφάνειας στη διάρκεια των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμάκου και υπερεκτίμηση στη διάρκεια των μειούμενων συγκεντρώσεων. Με μείωση του χρονικού μεσοδιαστήματος (Δt) μειώνεται και ο βαθμός υπό- και υπερεκτίμησης. ^[14]	39
Εικόνα 1.4: Γραφική απεικόνιση του γραμμικού κανόνα των τραπεζίων. $AUC_{t_i-t(i+1)}$ είναι η επιφάνεια μεταξύ t_i και t_{i+1} . C_i και C_{i+1} είναι οι αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης, και Δt είναι το χρονικό μεσοδιάστημα. Σημείωση: το Δt μπορεί να διαφέρει στα διαφορετικά τραπέζια ^[14]	40
Εικόνα 1.5: Ημιλογαριθμική απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου όπου φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού της κλίσης του τελικού τμήματος, λ . Εφαρμόζεται γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα τελικά σημεία για τον υπολογισμό της κλίσης της ευθείας ^[14]	41
Εικόνα 1.6: Ατομικό ΦΚ προφίλ – Προσαρμογή σε διαμερισματικό ΦΚ μοντέλο ^[15]	42
Εικόνα 1.7: Πληθυσμιακά ΦΚ προφίλ ^[15]	43
Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής της δι-ατομικής μεταβλητότητας και του τυπικού σφάλματος αντίστοιχα ^[19]	48
Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση Μπαεσιανής εξατομίκευσης.	49
Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που επηρεάζουν το ρυθμό ενδοφλέβιας έγχυσης.	60
Εικόνα 2.1: Χρωματογράφημα λευκού δείγματος(πλάσμα).....	74
Εικόνα 2.2: Χρωματογράφημα μηδενικού δείγματος (πλάσμα + IS).	75
Εικόνα 2.3: Χρωματογράφημα δείγματος BU ($C_{BU}=2.88 \mu\text{g/mL}$) και IS ($C_{IS}= 1.248$) $\mu\text{g/mL}$	75
Εικόνα 2.4: Φάσμα υπεριώδους Busulfan.	76
Εικόνα 2.5: Φάσμα υπεριώδους IS.	76
Εικόνα 2.6: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης ($n=6$, κατασκευασμένες σε 6 διαφορετικές ημέρες). Παρουσιάζονται και οι τυπικές αποκλίσεις των αποκρίσεων.....	77
Εικόνα 2.7: Διάγραμμα σταθερότητας BU.	84
Εικόνα 2.8: Το ΦΚ προφίλ μετά από χορήγηση 3.2mg/kg για 2 ημέρες.....	85
Εικόνα 2.9: Το ΦΚ προφίλ μετά από χορήγηση 0.8 mg/kg για 2 δόσεις.	85
Εικόνα 3.1: Φαρμακοκινητικό προφίλ ασθενούς μετά από δίωρη έγχυση i.v. Busilvex®.....	90
Εικόνα 3.2: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 10 min.	92
Εικόνα 3.3: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 20 min.	92
Εικόνα 3.4: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 30 min.	92
Εικόνα 3.5: Αντλία HOSPIRA Plum A+ Pump i.v. Infusion (A), αντλία Abbott LIFECARE® 5000 infusion system (B) καλώδιο παροχής (Δ) και κασέτα (Γ).	97
Εικόνα 3.6: Βαλβίδα διασποράς όπως συνδέεται με την σύριγγα.	98
Εικόνα 3.7: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C , $\mu\text{g/ml}$) και του ρυθμού εξόδου ($\mu\text{g/ml}$) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας $B\Sigma < 9 \text{ kg}$ (η μπλε γραμμή είναι η συγκέντρωση $\mu\text{g/mL}$ σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραμμή ο ρυθμός εξόδου $\mu\text{g/min}$	106
Εικόνα 3.8: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης ($\mu\text{g/mL}$, μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου ($\mu\text{g/min}$, κόκκινη γραμμή) ως προς το χρόνο δειγματοληψίας για ασθενείς της κατηγορίας 1 με $B\Sigma < 9 \text{ kg}$. 106	

Εικόνα 3.9: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 1 με ΒΣ < 9 kg.....	107
Εικόνα 3.10: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 9-16 kg (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	109
Εικόνα 3.11: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για ασθενείς της κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg.....	109
Εικόνα 3.12: Σχηματική απεικόνιση της µετρούµενης συγκέντρωσης BU ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg.....	110
Εικόνα 3.13: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για το διάλυμα όγκου 30 ml (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	112
Εικόνα 3.14: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για διάλυμα όγκου 40 ml (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	112
Εικόνα 3.15: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για ασθενή της κατηγορίας 3 με ΒΣ 16 kg.....	112
Εικόνα 3.16: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για ασθενή της κατηγορία 3 με ΒΣ 20 kg.....	113
Εικόνα 3.17: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 3 ΒΣ 16 kg.....	113
Εικόνα 3.18: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 3 ΒΣ 20 kg.....	114
Εικόνα 3.19: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 23-34 kg (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	116
Εικόνα 3.20: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης BU (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για ασθενή της κατηγορίας 4 με ΒΣ 29 kg.....	116
Εικόνα 3.21: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία ΒΣ 23-34 kg.....	117
Εικόνα 3.22: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ >34 kg (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	118
Εικόνα 3.23: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης BU (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για ασθενή της κατηγορίας 5 ΒΣ >34 kg.....	119
Εικόνα 3.24: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 5 με ΒΣ >34 kg.....	120
Εικόνα 3.25: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού, όγκος διαλύµατος 50 ml (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	122
Εικόνα 3.26: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθµού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού, όγκος διαλύµατος 60 ml (η μπλε γραµµή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραµµή ο ρυθµός µg/min).....	122
Εικόνα 3.27: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για την κατηγορία έγχυσης μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 28.5 kg και εγχεόµενο διάλυμα όγκου 50 mL.....	122
Εικόνα 3.28: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 28.5 kg και όγκο εγχεόµενου διαλύµατος 50 mL.....	123
Εικόνα 3.29: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραµµή) και του ρυθµού εξόδου (κόκκινη γραµµή) για την κατηγορία 5 έγχυσης μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 41 kg και εγχεόµενο διάλυμα όγκου 60 mL.....	123

Εικόνα 3.30: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 41 kg και όγκο εγχόμενου διαλύματος 60 mL.	124
Εικόνα 3.31: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 70 mL.	126
Εικόνα 3.32: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 80 mL.	127
Εικόνα 3.33: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 90 mL.	127
Εικόνα 3.34: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 70 mL.	128
Εικόνα 3.35: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 80 mL.	128
Εικόνα 3.36: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 90 mL.	129
Εικόνα 4.1: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ πριν την εξατομίκευση της δόσης (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$).	138
Εικόνα 4.2: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης. (900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$).	139
Εικόνα 4.3: Κατηγορία 1 (χορηγούμενη δόση 1.0 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).	140
Εικόνα 4.4: Κατηγορία 2 (χορηγούμενη δόση 1.2 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).	143
Εικόνα 4.5: Κατηγορία 3 (χορηγούμενη δόση 1.1 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).	145
Εικόνα 4.6: Κατηγορία 4 (χορηγούμενη δόση 0.95 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).	147
Εικόνα 4.7: Κατηγορία 5 (χορηγούμενη δόση 0.80 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).	149
Εικόνα 4.8: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.	150
Εικόνα 4.9: Συγκριτική ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) πριν την εξατομίκευση της δόσης του BU, όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε) και δεν λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	153
Εικόνα 4.10: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.	154
Εικόνα 4.11: Κατηγορία 1 (χορηγούμενη δόση 1.0 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	156
Εικόνα 4.12: Κατηγορία 2 (χορηγούμενη δόση 1.2 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	158
Εικόνα 4.13: Κατηγορία 3 (χορηγούμενη δόση 1.1 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον	

υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	160
Εικόνα 4.14: Κατηγορία 4 (χορηγούμενη δόση 0.95 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	162
Εικόνα 4.15: Κατηγορία 5 (χορηγούμενη δόση 0.80 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.	164
Εικόνα 5.1: Διαγράμματα καλής προσαρμογής δομικού μοντέλου. Το DV VS IPRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulnex, observations, OBS) έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών τιμών (IPRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης. Το διάγραμμά DV VS PRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulnex, observations, OBS) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης.....	183
Εικόνα 5.2: Γράφημα VPC δομικού μοντέλου (TAD). Οι κόκκινες γραμμές αποτελούν τα 5, 50 και 95% ποσοστά πρόβλεψης (prediction interval). Οι σκιαγραφημένες επιφάνειες αποτελούν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τα ποσοστά πρόβλεψης (confidence interval, CI).....	184
Εικόνα 5.3: Διαγράμματα καλής προσαρμογής τελικού μοντέλου. Το DV VS IPRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulnex, observations, OBS) έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών τιμών (IPRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης. Το διάγραμμα DV VS PRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulnex, observations, OBS) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης.....	188
Εικόνα 5.4: Γράφημα VPC τελικού μοντέλου (TAD). Οι κόκκινες γραμμές αποτελούν τα 5, 50 και 95% ποσοστά πρόβλεψης (prediction interval). Οι σκιαγραφημένες επιφάνειες αποτελούν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τα ποσοστά πρόβλεψης (confidence interval, CI).....	189
Εικόνα 5.5: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για την κάθαρση συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης και των συμμεταβλητών.	193
Εικόνα 5.6: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για τον όγκο του κεντρικού διαμερίσματος συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του όγκου του κεντρικού διαμερίσματος και των συμμεταβλητών.....	194
Εικόνα 5.7: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για την κάθαρση συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι η κάθαρση μεταβάλλεται ανεξάρτητα των συμμεταβλητών.....	195
Εικόνα 5.8: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για τον όγκο του κεντρικού διαμερίσματος συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι ο όγκος του κεντρικού διαμερίσματος μεταβάλλεται ανεξάρτητα των συμμεταβλητών.	196

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

Σύντμηση	Όρος
ABW	Actual Body Weight
ACN	Acetonitrile
AIC	Akaike Information Criterion
ALT	Alanine Aminotransferase
AML	Acute Myeloid Leukemia
ANOVA	Analysis of Varianceability
ASBMT	American Society for Blood and Marrow Transplantation
ATG	Antithymocyte Globulin
AUC	Area Under the Curve
BSA	Body Surface Area
Bu	Busulfan, Βουσουλφάνη
BW	Body weight
CI	Confidence IntervalInternal
CKPD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CL	Clearance
CML	Chronic Myeloid Leukemia
CR1	First Complete remission
CSF	Cerebrospinal fluid
C_{ss}	Steady State Concentration
CV	Coefficient of Variation
CWRES	Conditional Weighted Residuals
Cy	Cyclophosphamide
CYP450	Cytochromes P450
D	Dose
DDTC	Sodium diethyldithiocabamate
DF	Degrees freedom
DFS	Disease-Free Survival
Dose_{adj}	Dose adjustment
DV	Dependent Variable
EBE	Empirical Bayesian Estimate
Elisa	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETA	Eta
FDA	Food and Drug Administration
Flu	Fludarabine
FOCE	First-Order Conditional estimation
GC	Gas Chromatography

GSH	Glutathione
GvHD	Graft-versus-Host Disease
HPLC	High performance liquid chromatography
HSCT	Human stem cell transplantation
HT	Height
IBW	ideal body weight
IIV	Inter individual Variability
INTER	Interaction
IOV	Inter occasion Variability
IPK	Individual PK
IPRED	Individual prediction
IS	Internal standard
IWRES	Individual WEighted Residuals
LC-MSMS	Liquid chromatography mass spectrometry
LLOQ	Lower Limit of quantification
LOD	Limit of detection
LR	Likelihood Ratio
LRT	Likelihood Ratio Test
MDS	Myelodysplastic Syndrome
Mel	Melphalan
NBL	Neuroblastoma
NCA	Non-Compartmental Analysis
NHL	Non-Hodgkin's lymphoma
NONMEM	Non Linear Mixed Effects Model
OBS	Observations
OFV	Objective Function Value
OS	Overall Survival,
PD	Pharmacodynamic
PK	Pharmacokinetic
PMA	Post Menstrual Age
POPPK	Population Pharmacokinetic
PRED	Prediction
PsN	Perl-speaks-NONMEM
Q	Intercompartmental clearance
QC	Quality control
RE	Relative Error
RIC	Reduced-Intensity Conditioning
RSD	Relative standard deviation
RSE	Relative standard error
S/N	Signal to noise ratio
SD	Standard deviation
SE	Systemic exposure

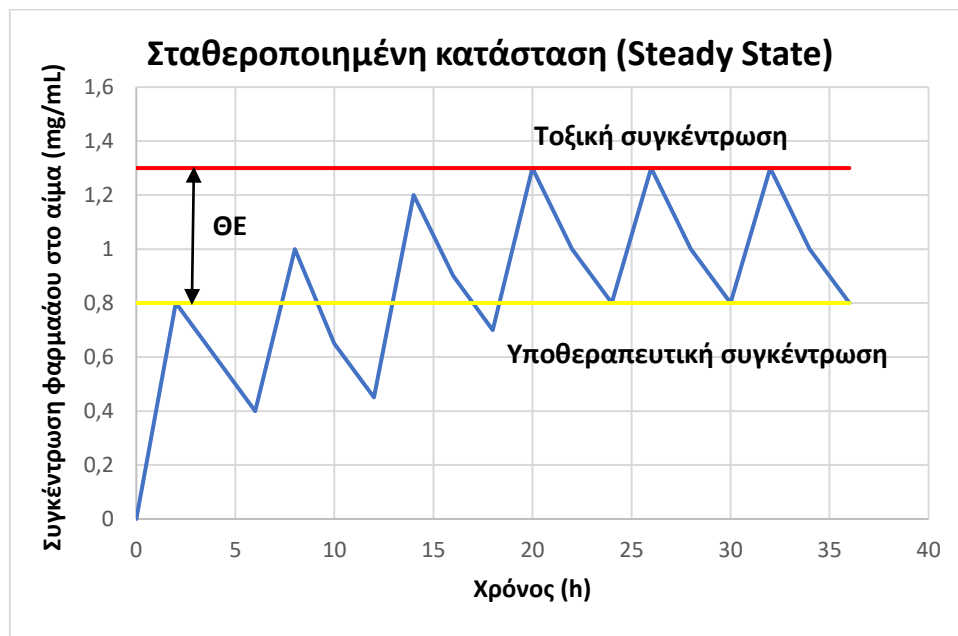
SE	Standard Error
SOP	Standard Operating Procedure
SOS	Sinusoidal Obstruction Syndrome
SPC	Summaryies of Product Characteristics
TAD	Time After Dose
TBI	Total Body Irradiation
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TR	Therapeutic Range
TRM	Treatment-Related Mortality
TT	ThioTEPA
UV	Ultraviolet
V1	Volume of distribution in central comdepartment
V2	Volume of distribution in poeripheral compartmentdepartment
VOD	venoocclusive disease
VPC	Visual Predictiveed Check
VS	Versus
wfn	Wings for NONMEM
WRES	Weighted Residuale
WT	Weight
AMMO	Αλογενή Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών
ΔOFV	DiferenceDifference of Objective Function Value
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ΘΕ	ΘεραπευτικόΘεραπευτικοί ΕυρόςΕύρος
ΙΒΣ	Ιδανικό Βάρος Σώματος
ΜΑΑΚ	Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
ΜΜΟ	Μονάδα μεταμόσχευσης μυελού
ΟΜΛ	Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία
ΣΒ	Σωματικό Βάρος
ΣΒΣ	Συνολικά Βάρος Σώματος
ΦΔ	Φαρμακοδυναμική
ΦΚ	Φαρμακοκινητική
ΧΜΛ	Χρόνια μυελογενή Λευχαιμία

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή

1. Θεωρητικό

1.1. Εισαγωγή Θεραπευτική παρακολούθηση του φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring)

Η θεραπευτική παρακολούθηση του φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) είναι η κλινική πρακτική για τη μέτρηση των επιπέδων στο αίμα συγκεκριμένων φαρμάκων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, ώστε να τροποποιείται αν χρειάζεται η χορηγούμενη δόση και να εξασφαλίζεται η διατήρηση σταθεροποιημένης συγκέντρωσης του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος (Steady state concentration, C_{ss} , **Εικόνα 1.1**). Τα φάρμακα τα οποία απαιτούν παρακολούθηση είναι αυτά που έχουν στενό "θεραπευτικό εύρος" (ΘΕ ή Therapeutic range, TR). Αυτό σημαίνει ότι η απαραίτητη ποσότητα φαρμάκου για να είναι αποτελεσματική η θεραπεία, δεν απέχει πολύ από την ποσότητα που προκαλεί σημαντικές παρενέργειες και / ή τοξικότητα, ή από αυτή που δεν θα υπάρξει καμία φαρμακοδυναμική απόκριση. Τα φάρμακα αυτά χαρακτηρίζονται συνήθως από σημαντική ενδο-ατομική μεταβλητότητα (inter occasion variability, IOV) ή δι-ατομική μεταβλητότητα (inter individual variability, IIV) ή συνδυασμό των παραπάνω.



Εικόνα 1.1: Μετρούμενα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα αίματος μέχρι την επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης.

Το TDM στηρίζεται στην υπόθεση ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δόσης του φαρμάκου και της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα και της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε σχέση με το θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Το TDM ξεκινάει από τον αρχική επιλογή του φαρμάκου, τον προσδιορισμό του δοσολογικού σχήματος και λαμβάνει υπόψη, την κλινική κατάσταση του ασθενούς, τα χαρακτηριστικά αυτού όπως, βάρος (body weight, BW), επιφάνεια σώματος (Body Surface Area, BSA), ηλικία (Age), φύλο (Sex), τη λειτουργία των οργάνων και τη ταυτόχρονη θεραπεία με άλλα φάρμακα (συγχορηγούμενα φάρμακα). Κατά την ερμηνεία των μετρήσεων της συγκέντρωσης, οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, περιλαμβάνουν το χρόνο δειγματοληψίας σε σχέση με τη δόση του φαρμάκου, την ιστορία της δοσολογίας, την ανταπόκριση του ασθενούς, και το θεραπευτικό αποτέλεσμα που επιτεύχθηκε σε σχέση με το θεραπευτικό εύρος, ΘΕ. Ο στόχος του TDM είναι η επίτευξη και διατήρηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο αίμα ώστε να έχουμε τη βελτιστοποίηση της κλινικής έκβασης του ασθενούς σε διάφορες κλινικές καταστάσεις.

Το TDM ορίζεται ως η κλινικό-εργαστηριακή μέτρηση μιας φαρμακοδυναμικής παραμέτρου η οποία με την ενδεδειγμένη ιατρική ερμηνεία, θα επηρεάσει άμεσα τη φαρμακοθεραπεία ^[1]. Επιπλέον αναφέρεται στην εξατομίκευση της δοσολογίας του φαρμάκου διατηρώντας τη συγκέντρωση αυτού στο πλάσμα ή το αίμα μέσα σε ένα στοχευμένο θεραπευτικό εύρος ^[2]. Έτσι, συνδυάζοντας την φαρμακοκινητική (ΦΚ) και τη φαρμακοδυναμική (ΦΔ) γίνεται η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και διασφαλίζεται η ασφαλής χρήση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου στην κλινική πράξη. Ο στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η εξατομίκευση της θεραπευτικής αγωγής προς όφελος του ασθενή ^[3-5]. Το TDM περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε βιολογικά υγρά (αίμα, πλάσμα, ούρα, κλπ.) και τη συσχέτιση αυτού με τις κλινικές παραμέτρους.

Η πρώτη φαρμακοκινητική μελέτη που συνδέει τη χρήση μαθηματικών μοντέλων με το κλινικό αποτέλεσμα παρουσιάζεται το 1960^[6]. Το 1974 οι Duhme et al. εστιάζοντας στις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων κατέληξαν στην εξαγωγή του θεραπευτικού εύρους παρατηρώντας την τοξικότητα σε φάρμακα όπως η διγοξίνη ^[7], φαινυτοΐνη και η θεοφυλλίνη ^[8]. Το πεδίο της κλινικής φαρμακοκινητικής παρουσίασε μεγάλη εξέλιξη μετά την συσχέτιση της συγκέντρωσης του φαρμάκου με την απόκριση αυτού. Παράλληλα, παρουσιάζεται μια ταχύτατη εξέλιξη τόσο σε αναλυτική τεχνολογία (αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των φαρμάκων) όσο και στη

μαθηματική μοντελοποίηση (εξέλιξη προηγμένων υπολογιστικών προγραμμάτων που χρησιμοποιούνται στο TDM) [9].

Η εφαρμογή του TDM αποτελεί μια διεπιστημονική προσέγγιση η οποία περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε βιολογικά δείγματα όσο και την κλινική εφαρμογή. Οι επιστήμονες υγείας που ασχολούνται με την εφαρμογή του TDM στην κλινική πράξη οργανώνονται σε ομάδες που αποτελούνται από κλινικούς ιατρούς, νοσηλεύτες, και φαρμακοποιούς. Η άριστη συνεργασία των ομάδων έχει σαν αποτέλεσμα την βέλτιστη απόδοση του TDM [10,11].

Στην πράξη συλλέγονται δείγματα αίματος σε γνωστό χρόνο σε σχέση με τη χορήγηση της τελευταίας/επόμενης δόσης. Η συγκέντρωση του φαρμάκου ή του μεταβολίτη μετριέται στο δείγμα, προσδιορίζονται οι τιμές συγκεκριμένων φαρμακοκινητικών παραμέτρων και συγκρίνονται με ένα θεραπευτικό στόχο ώστε να καθοριστεί αν οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου του ασθενούς είναι σε θεραπευτικά, τοξικά ή υποθεραπευτικά επίπεδα. Στη συνέχεια, όταν χρειάζεται, ακολουθεί τροποποίηση της δόσης (Dose_{adj}).

Συνοπτικά, η εφαρμογή του TDM είναι απαραίτητη:

- 1) Σε φάρμακα με στενό θεραπευτικό εύρος (η διαφορά μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης και της ελάχιστης τοξικής συγκέντρωσης, χαρακτηρίζονται από ΦΚ μεταβλητότητα)
- 2) Όταν η σχέση μεταξύ δόσης του φαρμάκου και συγκέντρωσης αίματος είναι εξαιρετικά μεταβλητή και όχι προβλέψιμη και θα πρέπει να τηρούνται τα παρακάτω κριτήρια:
 - A. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αίματος και των κλινικών/τοξικών αποτελεσμάτων θα πρέπει να είναι σαφώς καθορισμένες.
 - B. Υπάρχουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου σχετιζόμενες με υπέρ ή υπό δοσολογία
 - Γ. Τα αποτελέσματα του TDM πρέπει να ερμηνεύονται και να αξιολογούνται, ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη κλινική έκβαση, απαντώντας και σε κλινικά ερωτήματα.

Τα περισσότερα φάρμακα για τα οποία εφαρμόζεται TDM στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία χρόνιων παθήσεων όπως η επιληψία και αντιβιοτικά με υψηλή τοξικότητα όπως οι αμινογλυκοσίδες και βανκομυκίνη. Οι κυριότερες

κατηγορίες φαρμάκων για τα οποία είναι απαραίτητη η εφαρμογή TDM είναι οι ακόλουθες:

- Αντιεπιληπτικά
- Ανοσοκατασταλτικά
- Καρδιολογικά
- Ψυχιατρικά
- Αντιβιοτικά και αντι-ιικά
- Χημειοθεραπευτικά-Αντικαρκινικά

1.2. Συλλογή και Ανάλυση Φαρμακοκινητικών δεδομένων

Για την ανάλυση των ΦΚ δεδομένων ενός φαρμάκου θα πρέπει να έχει οριστεί ο τρόπος και ο αριθμός των δειγμάτων που θα πρέπει να συλλεχθούν από έναν ασθενή. Τα πιο συνηθισμένα βιολογικά δείγματα που αναλύονται είναι το πλάσμα και ο ορός, ωστόσο το εγκεφαλονωτιαίο και το ολικό αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για TDM.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του φαρμάκου είναι κρίσιμος και, ως εκ τούτου, η συλλογή δειγμάτων στο σωστό φιαλίδιο συλλογής (ηπαρίνης, EDTA, κλπ) είναι πρωταρχικής σημασίας. Για παράδειγμα, η χρήση σωλήνων πήγματος δεν συνιστάνται καθώς, πολλά φάρμακα είναι γνωστό ότι δεσμεύονται με το πήκτωμα και εσφαλμένα οδηγούν σε μείωση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του φαρμάκου. Έτσι, θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες για την εξάλειψη τέτοιων σφαλμάτων. Παράλληλα, η πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων είναι σημαντικός παράγοντας σφάλματος. Για παράδειγμα, μια ενδοφλέβια γραμμή που δεν έχει ξεπλυθεί μετά τη χορήγηση του φαρμάκου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μόλυνση με φάρμακο κατά τη συλλογή του δείγματος. Η μόλυνση που δεν έχει ελεγχθεί μπορεί να οδηγήσει σε προσδιορισμό υψηλότερων επιπέδων σε σχέση με τα πραγματικά επηρεάζοντας δυσμενώς τη δοσολογία.

Επιπλέον, η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου θα πρέπει να παρέχει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα, καθώς η συγκέντρωση του φαρμάκου αποτελεί ένα από τα βασικά στοιχεία υπολογισμού των ΦΚ παραμέτρων και της εξατομίκευσης της δόσης.

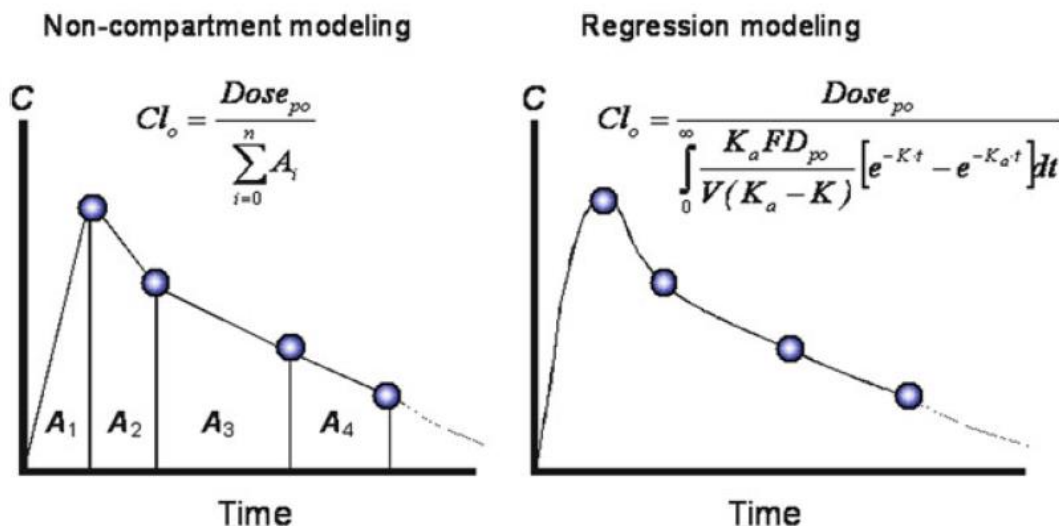
Ανεξάρτητα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή (HPLC, GC, LCMSMS, ELISA, etc), πρέπει να καθοριστεί και η κλινική ερμηνεία και η συσχέτιση με το θεραπευτικό αποτέλεσμα του φαρμάκου που μας ενδιαφέρει. Οι συγκεντρώσεις

του φαρμάκου στον ορό πρέπει, όπου αυτό είναι δυνατόν, να συσχετίζονται με την επιδιωκόμενη φαρμακολογική δράση. Έτσι, η ορθή ερμηνεία και συσχέτιση των συγκεντρώσεων του φαρμάκου και του παρατηρούμενου ή επιδιωκόμενου φαρμακολογικού αποτελέσματος θα βοηθήσει στην καθιέρωση του βέλτιστου TDM ασθενούς.

Όταν το TDM εφαρμόζεται μετά από i.v. χορήγηση η εξατομίκευση της δόσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον υπολογισμό της έκτασης της απορρόφησης ($AUC_{0-\infty}$) του φαρμάκου με εφαρμογή του κανόνα των τραπεζίων (**Εικόνα 1.1, Παράγραφος 1**). Σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιούνται δειγματοληψίες πριν την i.v. χορήγηση αμέσως μετά και σε διάφορά άλλα χρονικά σημεία που έχουν οριστεί. Παράλληλα, η εξατομίκευση της δόσης τόσο μετά από i.v. όσο και μετά από εξωαγγειακή χορήγηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της φαρμακοκινητικής μοντελοποίησης, με τη χρήση της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής και την ανάπτυξη πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου (μη γραμμικό μοντέλο μικτών επιδράσεων, nonlinear mixed effect model) και τη εφαρμογή της Μπαεσιανής εξατομίκευσης (βλέπε παράγραφο **1.2.2** και **1.2.2.4**)

Τα φαρμακοκινητικά (ΦΚ) δεδομένα (προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου) είναι δυνατό να αναλυθούν είτε με προσαρμογή ενός μοντέλου (ΦΚ μοντελοποίηση) με χρήση μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης, είτε με εφαρμογή μη διαμερισματικής ανάλυσης (Non-Compartmental Analysis, NCA) (**Εικόνα 1.2**).

Η NCA περιλαμβάνει αθροίσματα εμβαδών ενώ η ΦΚ μοντελοποίηση χρησιμοποιεί μια συνάρτηση και παραμέτρους παλινδρόμησης. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από το στόχο της ανάλυσης. Αν ο πρωταρχικός στόχος είναι ο προσδιορισμός της έκτασης της έκθεσης στο φάρμακο μετά από τη χορήγησή του, δηλαδή ο υπολογισμός της AUC και των βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων όπως η κάθαρση (CL), ο χρόνος ημίσειας ζωής απομάκρυνσης του φαρμάκου ($t_{1/2}$), η μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) και ο χρόνος επίτευξης C_{max} (T_{max}), τότε η NCA είναι η μέθοδος επιλογής δεδομένου ότι απαιτεί λιγότερες παραδοχές σε σύγκριση με την προσέγγιση της φαρμακοκινητικής μοντελοποίησης ^[12].



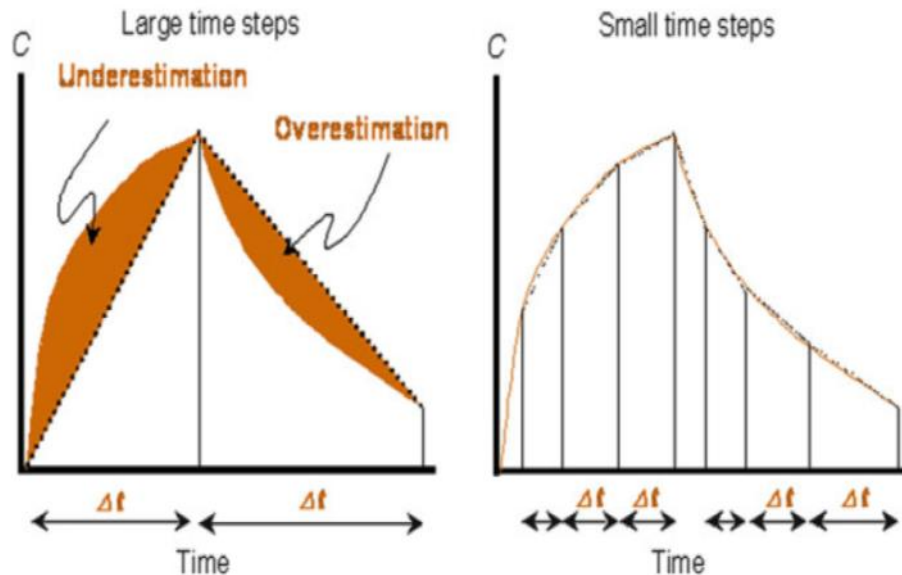
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση της μη διαμερισματικής φαρμακοκινητικής ανάλυσης, Non Compartmental Analysis - NCA (αριστερά) και της μοντελοποίησης με μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (δεξιά). K_a , K , και V , στη δεξιά απεικόνιση, είναι οι παράμετροι του ΦΚ μοντέλου που εκτιμώνται με προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα [12].

1.2.1. Μη Διαμερισματική Ανάλυση (Non-Compartmental Analysis, NCA)

Η NCA χρησιμοποιεί τον «κανόνα των τραπεζίων» για τον υπολογισμό της AUC, η οποία είναι παράμετρος στενά εξαρτώμενη αφενός από την ποσότητα του φαρμάκου που εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία αφετέρου από την ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει το φάρμακο όπως αντανακλάται στην τιμή της κάθαρσης CL. Ως εκ τούτου η AUC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ποσότητας του φαρμάκου που έχει απορροφηθεί ή για την αποτελεσματικότητα των φυσιολογικών διεργασιών που χαρακτηρίζουν την απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό.

Ο κανόνας των τραπεζίων εφαρμόζεται σε πρωτοταξικά (γραμμικά) μοντέλα, δεν προϋποθέτει παραδοχές και οι υπολογισμοί μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν. Όπως φαίνεται στην, **Εικόνα 1.3** ο κανόνας των τραπεζίων αντιμετωπίζει την AUC ως ένα σύνολο από επιφάνειες τραπεζίων και προσεγγίζει την ολοκλήρωση για ένα χρονικό διάστημα κατατέμνοντας τη συνολική επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου σε μικρότερες επιφάνειες για τις οποίες ο υπολογισμός του εμβαδού είναι πιο εύκολος. Οι υπολογισμοί με βάση τον κανόνα των τραπεζίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το δειγματοληπτικό σχήμα. Η πυκνότητα του δειγματοληπτικού σχήματος αιμοληψίας (δηλ. το μέγεθος των χρονικών μεσοδιαστημάτων) επηρεάζει τις προσδιοριζόμενες τιμές. Όσο πιο πυκνό είναι το

δειγματοληπτικό σχήμα (όσο πιο μικρό το χρονικό μεσοδιάστημα μεταξύ των δειγμάτων) τόσο καλύτερα τα τραπέζια περιγράφουν το πραγματικό σχήμα της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου (Εικόνα 1.3)^[13,14].



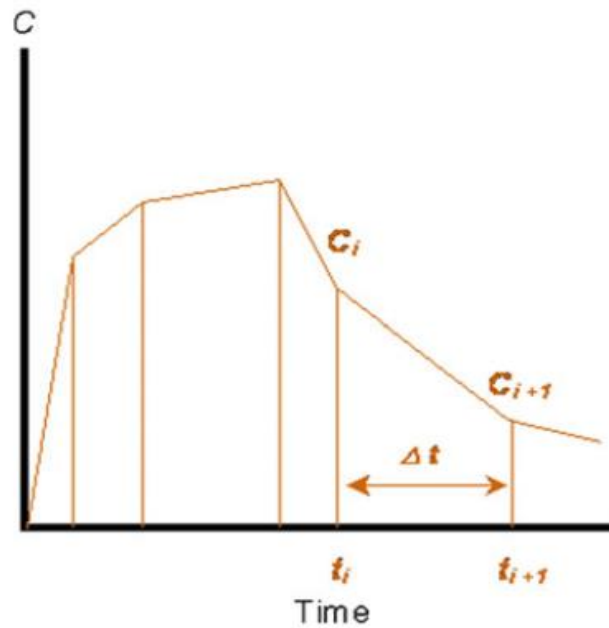
Εικόνα 1.3: Απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου κατά τη διάρκεια και μετά την χορήγηση φαρμάκου με ενδοφλέβια έγχυση σταθερού ρυθμού. Η σκιασμένη επιφάνεια αντανακλά υποεκτίμηση της επιφάνειας στη διάρκεια των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμάκου και υπερεκτίμηση στη διάρκεια των μειούμενων συγκεντρώσεων. Με μείωση του χρονικού μεσοδιαστήματος (Δt) μειώνεται και ο βαθμός υπό- και υπερ-εκτίμησης.^[14]

Η συνολική AUC υπολογίζεται αθροίζοντας τα εμβαδά των επιμέρους τραπεζίων (Εικόνα 1.4). Χρησιμοποιώντας τη γραμμική μέθοδο των τραπεζίων, ο υπολογισμός της επιφάνειας από χρόνο 0 έως t_n ($AUC_{0-t_{last}}$) γίνεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$AUC_0^{t_{last}} = \sum_{i=1}^n \frac{C_i + C_{i+1}}{2} \cdot \Delta t$$

Εξίσωση 1.1

όπου $\Delta t = t_{i+1} - t_i$ και t_{last} είναι ο χρόνος της τελευταίας μετρήσιμης συγκέντρωσης.



Εικόνα 1.4: Γραφική απεικόνιση του γραμμικού κανόνα των τραπεζίων. $AUC_{t_i-t(i+1)}$ είναι η επιφάνεια μεταξύ t_i και t_{i+1} . C_i και C_{i+1} είναι οι αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης, και Δt είναι το χρονικό μεσοδιάστημα. Σημείωση: το Δt μπορεί να διαφέρει στα διαφορετικά τραπέζια ^[14].

Με εξαίρεση τις περιπτώσεις όπου ο χρόνος δειγματοληψίας είναι μεγάλος και οι μετρούμενες συγκεντρώσεις είναι μηδενικές, η υπολογιζόμενη με τον κανόνα των τραπεζίων AUC, όπως περιγράφεται πιο πάνω, είναι υποεκτιμημένη. Για το λόγο αυτό, συνήθως επιβάλλεται η επέκταση της καμπύλης για άπειρο χρόνο ($t = \infty$) και υπολογισμός του εμβαδού της επιφάνειας $AUC_{t_{last}-\infty}$, όπου t_{last} είναι ο χρόνος της τελευταίας δειγματοληψίας.

Για τον υπολογισμό της $AUC_{t_{last}-\infty}$, χρησιμοποιείται η τελευταία μετρούμενη συγκέντρωση, C_{last} , σε συνδυασμό με την κλίση του τελικού γραμμικού τμήματος της καμπύλης συγκέντρωσης χρόνου (terminal slope, λ) σε λογαριθμική κλίμακα συγκέντρωσης σύμφωνα με την :

$$AUC_{t_{last}}^{\infty} = \frac{C_{last}}{\lambda}$$

Εξίσωση 1.2

Η συνολική $AUC_{0-\infty}$ υπολογίζεται ως το άθροισμα των $AUC_{0-t_{last}}$ και $AUC_{t_{last}-\infty}$ (Εξίσωση 1.3):

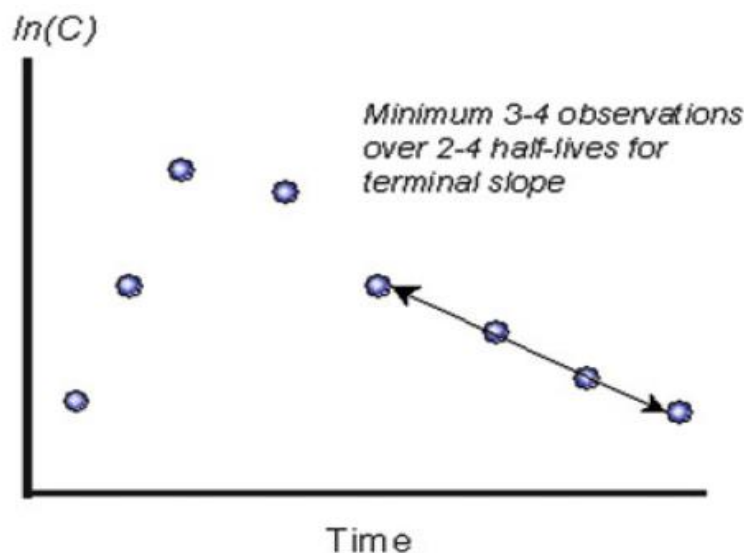
$$AUC_{total} = AUC_0^{\infty} = AUC_0^{t_{last}} + AUC_{t_{last}}^{\infty}$$

Εξίσωση 1.3

Η παράμετρος λ υπολογίζεται γραφικά ως η κλίση του τελικού γραμμικού τμήματος της ημιλογαριθμικής απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου (Εικόνα 1.5), με χρήση τουλάχιστον 3-4 σημείων ώστε να εξασφαλιστεί αξιόπιστη εκτίμηση. Ο άξονας των Y (Y-axis, $\ln(C)$) είναι ο φυσικός λογάριθμος (\log) της συγκέντρωσης denotes the natural (C). Θεωρώντας πρωτοταξική κινητική, η κλίση (λ) της τελικής φάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του χρόνου ημι-ζωής απομάκρυνσης ($t_{1/2}$), παραμέτρου που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της μείωσης της συγκέντρωσης του φαρμάκου με βάση την Εξίσωση 1.4:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

Εξίσωση 1.4



Εικόνα 1.5: Ημιλογαριθμική απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου όπου φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού της κλίσης του τελικού τμήματος, λ . Εφαρμόζεται γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα τελικά σημεία για τον υπολογισμό της κλίσης της ευθείας^[14].

Η κάθαρση (CL), ή ο λόγος κάθαρση/F (CL/F, ή CL₀), όπου F η βιοδιαθεσιμότητα μετά από εξωαγγειακή χορήγηση, μπορεί να υπολογιστεί από την AUC και την χορηγούμενη δόση χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις (1.5α,β) και άμεσα να ερμηνευτεί έχοντας φυσιολογική σημασία.

$$Cl = \frac{D_{iv}}{AUC_0^{\infty}}$$

Εξίσωση 1.5α

$$Cl_0 = \frac{Cl}{F} = \frac{D_{po}}{AUC_0^{\infty}}$$

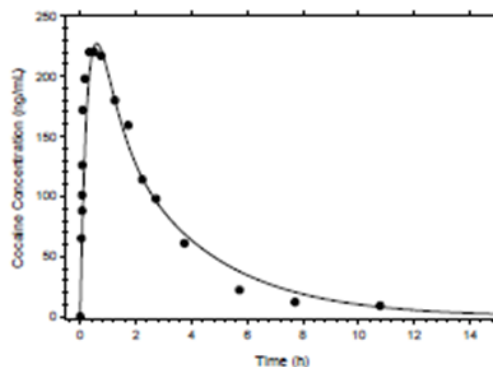
Εξίσωση 1.5β

1.2.2. Φαρμακοκινητική μοντελοποίηση - Πληθυσμιακή φαρμακοκινητική

Όπως έχει ήδη ειπωθεί, η NCA περιγράφει το φαρμακοκινητικό (ΦΚ) προφίλ (απεικόνιση της συγκέντρωσης-χρόνου) του φαρμάκου με απλές και χρήσιμες ΦΚ παραμέτρους, ενώ δίνει επίσης και μια αρχική περιγραφική ανάλυση των ΦΚ ιδιοτήτων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στη διαδικασία της ΦΚ μοντελοποίησης (ανάπτυξη ΦΚ μοντέλων).

Η ΦΚ μοντελοποίηση είναι ένα μαθηματικό εργαλείο που μας βοηθάει να προβλέψουμε και να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο το φάρμακο μεταφέρεται μέσα στο σώμα μας (με άλλα λόγια «τι κάνει το σώμα μας στο φάρμακο») και συνήθως διαχωρίζεται σε ατομική (individual PK, IPK) και πληθυσμιακή (Population PK, POPPK) ΦΚ μοντελοποίηση.

Όταν τα ατομικά ΦΚ προφίλ παρέχουν επαρκή δεδομένα τότε μπορούν να προσαρμοστούν σε ένα διαμερισματικό ΦΚ μοντέλο (Εικόνα 1.6).



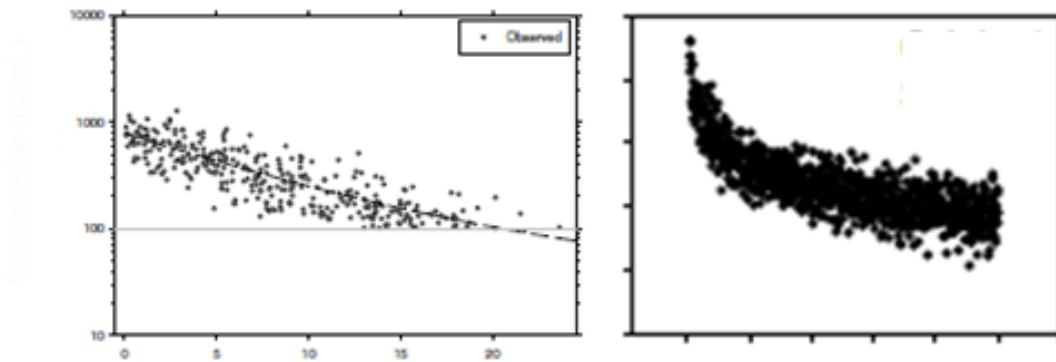
Εικόνα 1.6: Ατομικό ΦΚ προφίλ – Προσαρμογή σε διαμερισματικό ΦΚ μοντέλο ^[15].

Η προσαρμογή ενός διαμερισματικού ΦΚ μοντέλου στα ατομικά ΦΚ δεδομένα (IPK) έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά :

- Η διαμερισματική ανάλυση χρησιμοποιεί εκθετικές εξισώσεις για να περιγράψει την μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου με το χρόνο.

- Επιτυγχάνεται με τη χρήση θεωρητικών "διαμερισμάτων" και των ρυθμών μεταφοράς μεταξύ αυτών των διαμερισμάτων.
- Περιορισμένη δυνατότητα προσομοιώσεων.
- Προσδιορισμός βασικών ΦΚ παραμέτρων (CL , F , V_d , k_a , $t_{1/2}$), προφίλ κατανομής, μεταβολικής πορείας/μετατροπής.

Όταν όμως θέλουμε να κατανοήσουμε με ποιο τρόπο τα άτομα που προέρχονται από έναν πληθυσμό διαφέρουν μεταξύ τους, είναι απαραίτητη η POPPK ανάλυση (Εικόνα 1.7). Σε αυτού του είδους την ανάλυση (μοντελοποίηση) όλα τα δεδομένα από όλα τα άτομα θεωρούνται ταυτόχρονα σε ένα ενοποιημένο μοντέλο.



Εικόνα 1.7: Πληθυσμιακά ΦΚ προφίλ ^[15].

Η πληθυσμιακή ΦΚ μοντελοποίηση (POPPK ανάλυση) έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Αξιολόγηση όλου του πληθυσμού
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προβλέψεις και προσομοιώσεις
- Απαιτητική υπολογιστικά
- Εφαρμόζεται σε πυκνή και αραιή δειγματοληψία
- Απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης
- Δυνατότητα Φαρμακοκινητικής/Φαρμακοδυναμικής μοντελοποίησης (PK/PD modeling, συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του φαρμάκου και της φαρμακολογικής δράσης);
- Υπολογισμός των παραμέτρων CL , V_d , και της επίδρασης συμμεταβλητών (π.χ. ηλικία, βάρος σώματος, φύλλο, νεφρική λειτουργία).

Πιο συγκεκριμένα η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική (Population Pharmacokinetics, PK) μελετά τις βασικές αιτίες που προκαλούν διακυμάνσεις και διαφοροποιήσεις στις μετρούμενες συγκεντρώσεις ενός φαρμάκου στο πλάσμα, όταν τυπικά δοσολογικά σχήματα αυτού χορηγούνται σε διαφορετικά άτομα μιας υπό εξέτασης ομάδας ασθενών. Η μελέτη της φαρμακοκινητικής είναι πολύ σημαντική ιδίως κατά τη φάση της ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου καθώς συμβάλλει στην εκτίμηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας. Παράγοντες όπως τα διαφορετικά δημογραφικά χαρακτηριστικά (π.χ. ύψος, ηλικία, βάρος κλπ.), η διαφορετική παθοφυσιολογία (π.χ. διαφορετικός μεταβολισμός και λειτουργίες απέκκρισης) και η πιθανή ταυτόχρονη λήψη άλλων θεραπειών συμβάλλουν στην εκδήλωση μεταβλητότητας μεταξύ των διαφορετικών ατόμων. Γενικά, είναι σημαντικό να προσδιορίζονται και να ποσοτικοποιούνται οι παράγοντες που συντελούν σε αυτή τη μεταβλητότητα, καθώς έτσι μπορεί να εκτιμηθεί η επίδραση αυτών των παραγόντων στο τελικό φαρμακοδυναμικό αποτέλεσμα και κατ'επέκταση να γίνουν οι κατάλληλες εξατομικευμένες τροποποιήσεις στη χορηγούμενη δόση, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ασθενούς ^[16].

Κάθε πληθυσμιακή φαρμακοκινητική μελέτη εμπεριέχει τα ακόλουθα στοιχεία: ^[17]

- Συλλογή των φαρμακοκινητικών δεδομένων των ασθενών (συγκέντρωση φαρμάκου στον οργανισμό, μεταβολήτες κλπ.) που είναι αντιπροσωπευτικοί του πληθυσμού που θα λαμβάνει το αντίστοιχο φάρμακο.
- Προσδιορισμό και μέτρηση της μεταβλητότητας.
- Επεξήγηση της μεταβλητότητας μέσω της αναγνώρισης δημογραφικών, παθοφυσιολογικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά του φαρμάκου.
- Ποσοτική εκτίμηση του μεγέθους της ανεξήγητης μεταβλητότητας (unexplained variability) στον πληθυσμό.

Κατά την εκτέλεση μιας πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής μελέτης χρησιμοποιούνται κατάλληλα μαθηματικά μοντέλα τα οποία ποσοτικοποιούν την πληροφορία που εμπεριέχεται στα πειραματικά ή κλινικά δεδομένα (συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα ή biomarkers κλπ). Μέσω της μοντελοποίησης αυτής επιτυγχάνεται η εκτίμηση μιας άγνωστης πληθυσμιακής κατανομής. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη χορήγηση ενός φαρμάκου σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, η συμπεριφορά του φαρμάκου στο κάθε άτομο περιγράφεται στοχαστικά από μία

άγνωστη παράμετρο-διάνυσμα θ . Το διάνυσμα θ διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ατόμων δημιουργώντας έτσι αυτή τη μεταβλητότητα εντός του πληθυσμού. Το φαρμακοκινητικό μοντέλο, στηριζόμενο στα κλινικά δεδομένα, εκτιμά αυτή την πληθυσμιακή κατανομή της παραμέτρου θ ^[18].

Η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική μπορεί να ταξινομηθεί σε παραμετρική ή μη παραμετρική ανάλογα με το αν χρησιμοποιούνται παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση της πληροφορίας. Στην περίπτωση της παραμετρικής πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής, η πληροφορία που εμπεριέχεται στα αποτελέσματα ενός πειράματος περιγράφεται από ένα μικρό σύνολο παραμέτρων που μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν και να συγκριθούν με άλλα πειράματα. Το παραμετρικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνουν προβλέψεις και προσομοιώσεις στον υπολογιστή, εικονικών πειραμάτων, διαφορετικών από αυτά που έχουν υλοποιηθεί στην πράξη, διερευνώντας έτσι εναλλακτικά σενάρια. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιούνται στατιστικά μοντέλα που περιγράφουν τη μεταβλητότητα των παραμέτρων αυτών σε πληθυσμούς εθελοντών ή ασθενών. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι θεωρείται ότι ανήκουν σε μια γνωστή συγκεκριμένη παραμετρική στατιστική κατανομή (π.χ. κανονική κατανομή), όπου όμως η μέση τιμή μ της παραμέτρου και η διακύμανση Ω θεωρούνται άγνωστες. Μέσω των δεδομένων των ασθενών εκτιμώνται οι πληθυσμιακές τιμές των παραμέτρων. Η περιγραφή της στατιστικής κατανομής των τιμών των φαρμακοκινητικών παραμέτρων είναι απαραίτητη διότι η μεταβλητότητα στα βιολογικά συστήματα είναι μια σύμφυτη ιδιότητα τους, καθώς κανένα βιολογικό ον δεν είναι πανομοιότυπο με το άλλο. Αντίθετα, στην περίπτωση της μη παραμετρικής πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής δεν πραγματοποιείται καμία υπόθεση σχετικά με τις κατανομές που ακολουθούν οι παράμετροι και εκτιμάται απευθείας η κατανομή. Σε αυτή την προσέγγιση, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των συμμετεχόντων, τόσο περισσότερο η εκτιμώμενη τιμή συγκλίνει προς την αληθή τιμή ^[16].

1.2.2.1. Παραμετρική πληθυσμιακή φαρμακοκινητική

Το φαρμακοκινητικό μοντέλο που χρησιμοποιείται για την παραμετρική ποσοτικοποίηση της πληροφορίας που εμπεριέχεται στα πειραματικά δεδομένα (δηλ. τις μετρούμενες συγκεντρώσεις στο αίμα σε σχέση με το χρόνο), περιγράφεται ως εξής:

$$C_{ij} = f(\xi_i, t_i) + \varepsilon_{ij}$$

Εξίσωση 1.6

Το C_{ij} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου για τον ασθενή i τη χρονική στιγμή j . Με τον όρο ξ_i περιγράφονται οι τιμές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων για κάθε ασθενή i . Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, στην περίπτωση της παραμετρικής πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής γίνεται μια αρχική υπόθεση σχετικά με την κατανομή που ακολουθούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι ξ . Συνήθως, θεωρείται ότι οι φαρμακοκινητικές παράμετροι ανήκουν σε μια κανονική κατανομή, με μέση τιμή θ και διακύμανση Ω . Μέσω της συνάρτησης $f(\xi_i, t_j)$ εκφράζεται η συγκέντρωση του φαρμάκου για τον ασθενή i τη χρονική στιγμή j . Το διάνυσμα των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ξ_i μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω ως εξής:

$$\xi_i = g(\theta, b_i) + \eta_i$$

Εξίσωση 1.7

Όπου θ είναι οι πληθυσμιακές τιμές των παραμέτρων, b_i μια συμμεταβλητή (covariate) για τον ασθενή i (π.χ. βάρος, ηλικία, ύπαρξη αλληλομόρφων), $g(\theta, b_i)$ η συνάρτηση που συνδέει αυτά τα μεγέθη και η_i η δι-ατομική μεταβλητότητα δηλαδή, η απόκλιση της φαρμακοκινητικής παραμέτρου για τον ασθενή i από τις πληθυσμιακές τιμές θ , που δεν ερμηνεύεται από τη συμμεταβλητή b_i . Τέλος, στη **Εξίσωση 1.6** ο όρος ε_{ij} περιγράφει το σφάλμα του μοντέλου, το οποίο συχνά καλείται και ως υπόλοιπη μεταβλητότητα. Ουσιαστικά, εκφράζει την απόκλιση του μοντέλου από τα πειραματικά δεδομένα και αντιστοιχεί στη μεταβλητότητα που δεν ερμηνεύεται από τη δι-ατομική μεταβλητότητα. Ο όρος ενδο-ατομική μεταβλητότητα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την υπόλοιπη μεταβλητότητα, παρόλα αυτά στο παρόν κείμενο ως ενδο-ατομική μεταβλητότητα θα ορίζεται η διαφορά που παρατηρείται στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους μεταξύ δυο χορηγήσεων στο ίδιο άτομο. Σκοπός της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής είναι η εκτίμηση της μέσης τιμής θ και της διακύμανσης Ω όλων των φαρμακοκινητικών παραμέτρων στο δεδομένο πληθυσμό^[19]. Υπάρχουν γενικά δύο μέθοδοι για την εκτίμηση των τιμών θ και Ω , η μέθοδος των δύο σταδίων (The two-stage approach) και τα μοντέλα των μικτών επιδράσεων (The Nonlinear Mixed-Effects Modeling Approach).

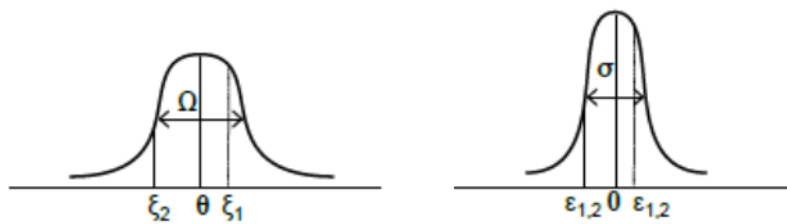
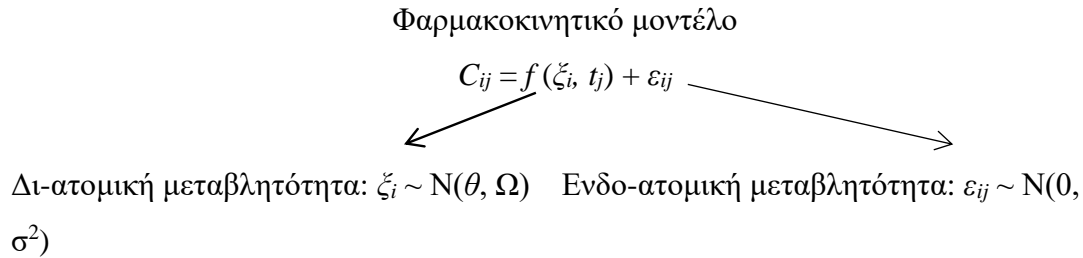
1.2.2.2. Μέθοδος 2 σταδίων

Στο πρώτο στάδιο της μεθόδου αυτής γίνεται εκτίμηση των τιμών των φαρμακοκινητικών παραμέτρων σε κάθε ασθενή χωριστά με μη γραμμική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας τα πυκνά δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου του κάθε ατόμου. Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιούνται οι εκτιμήτριες τιμές του πρώτου σταδίου, ώστε να υπολογισθούν η μέση τιμή, η διακύμανση (ή η τυπική απόκλιση) και η συνδιακύμανση όλων των φαρμακοκινητικών παραμέτρων στο δεδομένο πληθυσμό. Η ανάλυση πιθανών εξαρτήσεων των φαρμακοκινητικών παραμέτρων με κάποια συμμεταβλητή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιώντας κλασικές στατιστικές προσεγγίσεις όπως είναι η γραμμική παλινδρόμηση, η ανάλυση της συμμεταβλητότητας και η ανάλυση κατά συστάδες. Με την εφαρμογή αυτής της προσέγγισης, εξασφαλίζεται μια επαρκής και αμερόληπτη εκτίμηση της μέσης τιμής των φαρμακοκινητικών παραμέτρων αλλά σε ότι αφορά τη μεταβλητότητα και τη συνδιακύμανση, συνήθως, προκύπτουν υπερεκτιμημένες τιμές ^[20].

1.2.2.3. Μοντέλα μικτών επιδράσεων

Τα μοντέλα των μικτών επιδράσεων χρησιμοποιούνται κυρίως όταν τα διαθέσιμα δεδομένα των ασθενών δεν είναι πολύ πυκνά. Σε αυτή την περίπτωση, δεν μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος των δύο σταδίων, διότι οι εκτιμήσεις των επιμέρους παραμέτρων θα απέχουν πολύ από τις πραγματικές τιμές του πληθυσμού. Η διαφορά μεταξύ της μεθόδου των δύο σταδίων και του μοντέλου των μικτών επιδράσεων είναι ότι στη δεύτερη χρησιμοποιείται το σύνολο των δεδομένων του πληθυσμού και όχι τα ατομικά δεδομένα για την εκτίμηση της κατανομής των παραμέτρων και της σχέσης τους με τις πιθανές συμμεταβλητές. Γίνεται ταυτόχρονη προσαρμογή του φαρμακοκινητικού μοντέλου στα δεδομένα όλων των ασθενών, καθώς θεωρείται ότι ο ένας ασθενής βοηθάει τον άλλο στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων και λαμβάνεται υπόψη η δι-ατομική και η ενδο-ατομική μεταβλητότητα. Τόσο η δι-ατομική όσο και η ενδο-ατομική μεταβλητότητα θεωρείται ότι κατανέμονται στοχαστικά και ακολουθούν παραμετρικές στατιστικές κατανομές. Συνήθως, η δι-ατομική μεταβλητότητα, που εκφράζει τη μεταβλητότητα του πληθυσμού γύρω από τις τυπικές τιμές θ , ακολουθεί μια κατάλληλη στατιστική κατανομή με μέση τιμή θ και

διακύμανση Ω . Η υπολειπόμενη μεταβλητότητα ή αλλιώς το σφάλμα του μοντέλου ακολουθεί επίσης μια στατιστική κατανομή (πολλές φορές θεωρείται ότι ακολουθεί κανονική κατανομή) με μέση τιμή 0 και διακύμανση σ^2 [19,20].



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής της δι-ατομικής μεταβλητότητας και του τυπικού σφάλματος αντίστοιχα [19].

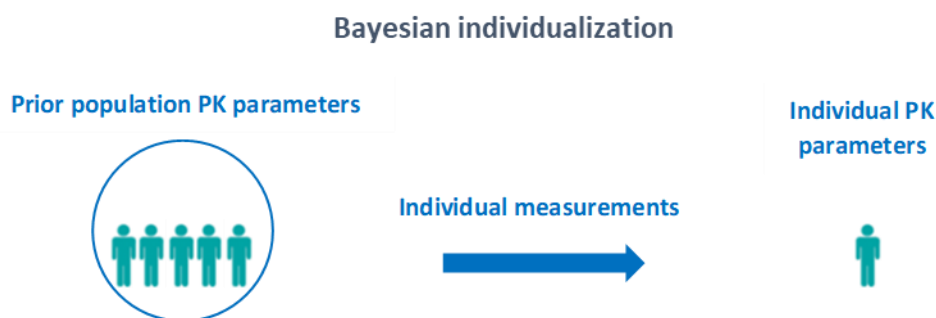
Μέσα από το μοντέλο των μικτών επιδράσεων εκτιμώνται οι πληθυσμιακές τιμές των παραμέτρων θ , Ω , σ καθώς και τα τυπικά σφάλματα αυτών (standard errors). Οι εκτιμήτριες των παραμέτρων συνοψίζουν την πληροφορία που περιέχεται στα πειραματικά δεδομένα και επιτρέπουν την πραγματοποίηση προβλέψεων και προσομοιώσεων σε εικονικούς ασθενείς. Η χρήση των μοντέλων μικτών επιδράσεων είναι σύνθετη υπολογιστικά γι' αυτό και απαιτείται η χρήση ειδικού λογισμικού. Το πρώτο και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο λογισμικό είναι το NONMEM, το οποίο δημιουργήθηκε από τους Sheiner και Beal. [19]. Άλλα αντίστοιχα διαθέσιμα προγράμματα είναι το Monolix και το ADAPT.

1.2.2.4. Μπαεσιανή εξατομίκευση

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής στην κλινική πράξη είναι η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων του φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring, TDM). Λόγω της δι-ατομικής μεταβλητότητας που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι ασθενείς σε φάρμακα με μικρό

θεραπευτικό εύρος είναι σημαντικό η χορηγούμενη δόση να εξατομικευθεί. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να υπολογισθούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι για κάθε ασθενή, κάτι που όμως απαιτεί τη συλλογή πολλών δειγμάτων από τον ασθενή, γεγονός το οποίο δεν είναι ιδιαίτερα πρακτικό. Με τη βοήθεια της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής, οι ατομικές τιμές των παραμέτρων μπορούν να εκτιμηθούν ακόμη και με πολύ λιγότερα σημεία δειγματοληψίας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των πληθυσμιακών τιμών των παραμέτρων και με τη χρήση Μπαεσιανών τεχνικών για την εκτίμηση των εξατομικευμένων παραμέτρων [17].

Η Μπαεσιανή προσέγγιση, που παίρνει το όνομά της από το θεώρημα του Bayes, είναι μια εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδος για την εξαγωγή της μέγιστης δυνατής πληροφορίας από τα πειραματικά δεδομένα, γιατί δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης της προϋπάρχουσας πληροφορίας (prior) συνδυάζοντάς την με την πληροφορία που περιέχεται στα δεδομένα. Ως προϋπάρχουσα πληροφορία χρησιμοποιούνται συνήθως οι τιμές των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών παραμέτρων μαζί με τη μεταβλητότητά τους, δηλαδή τις τιμές θ και Ω . Χρησιμοποιώντας αυτές τις τιμές ως prior και τα φαρμακοκινητικά δεδομένα του ασθενή και εφαρμόζοντας την αρχή του θεωρήματος του Bayes προσδιορίζονται οι φαρμακοκινητικές παράμετροι ενός συγκεκριμένου ασθενούς (ατομικές εμπειρικές Μπαεσιανές εκτιμήσεις, empirical Bayesian estimate, EBE) και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την εξατομίκευση της θεραπείας. Το θεώρημα του Bayes περιγράφει ότι για μια στοχαστική μεταβλητή (στην προκειμένη περίπτωση μια φαρμακοκινητική παράμετρο για έναν ασθενή) η posterior κατανομή είναι ανάλογη του γινομένου της prior κατανομής επί την πιθανότητα που προκύπτει από τα διαθέσιμα δεδομένα για τη μεταβλητή αυτή (data likelihood). Η prior κατανομή εδώ προκύπτει από την πληθυσμιακή πληροφορία [17,20].



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση Μπαεσιανής εξατομίκευσης.

Οι εξατομικευμένες τιμές των παραμέτρων ξ , γνωρίζοντας τις πληθυσμιακές τιμές θ , Ω και σ , εκτιμώνται ελαχιστοποιώντας την παρακάτω αντικειμενική συνάρτηση:

$$F(\xi) = \sum_{k=1}^p \frac{(\theta_k - \xi_k)^2}{\Omega_k^2} + \sum_{j=1}^n \frac{(C_j - f(\xi, t_j))^2}{\sigma^2}$$

Εξίσωση 1.8

Έχοντας διαθέσιμο ένα σετ φαρμακοκινητικών παραμέτρων για ένα συγκεκριμένο ασθενή είναι εύκολος ο ακριβής εξατομικευμένος καθορισμός του δοσολογικού σχήματος με τη βοήθεια προσομοιώσεων στον υπολογιστή, που λαμβάνουν υπόψη συγκεκριμένου επιθυμητούς κλινικούς στόχους, π.χ. ένα συγκεκριμένο επιθυμητό εύρος στις συγκεντρώσεις ή μια επιθυμητή AUC ή C_{max} .^[17]

1.3. Βουσουλφάνη -Γενικά- Ιστορική αναδρομή

Η βουσουλφάνη (BU) είναι ένας ισχυρός παράγων διπλής λειτουργίας (κυτταροτοξικός και αλκυλιωτικός). Στις μέρες μας, χρησιμοποιείται ως εναλλακτική θεραπεία της ολοσωματικής ακτινοβολίας (Total body Irradiation, TBI) στο προπαρασκευαστικό σχήμα που εφαρμόζεται πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (MAAK, Human stem cell transplantation, HSCT).

Αρχικά, από τη δεκαετία του 1950, η peros χορηγούμενη Bu χρησιμοποιήθηκε ως σχήμα κατά τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Chronic myelogenous leukemia, CML) και άλλων μυελοδυσπλαστικών διαταραχών^[21]. Τότε, αρκετά παράγωγα σουλφονικών εστέρων είχαν ταυτοποιηθεί ότι έχουν ισχυρή αντικαρκινική δράση ωστόσο, μόνο το 1,4-βουτανδιολ-διμεθανοσουλφονίδιο (Βουσουλφάνη, Bu) έδειξε έντονες κατασταλτικές ιδιότητες στον πολλαπλασιασμό των μυελογενών κυττάρων σε σύγκριση με τις ακτίνες X και ταυτόχρονα δεν κατέστειλε αισθητά τον σχηματισμό λεμφοκυττάρων προκαλώντας μείωση 50% του αριθμού των ουδετερόφιλων της γενικής κυκλοφορίας. Στη συνέχεια, οι Santos και Tutschka^[22], έπειτα από το εύρημα ότι η Bu προκαλεί ισχυρή καταστροφή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, πρότειναν την εφαρμογή του συνδυασμού peros Bu με κυκλοφωσφαιμίδη (Bu/Cy), ως προπαρασκευαστικό σχήμα πριν την αλλογενή HSCT σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (OMΛ, Acute myeloid leukemia, AML)^[23]. Έτσι, το 1983 πρώτη φορά οι Santos και Tutschka^[23] αντικαθιστούν την TBI

από υψηλές δόσεις Bu (1 mg/kg κάθε 6 h για 4 ημέρες, 16 δόσεις) σε συνδυασμό με i.v χορηγούμενη Cy (50 mg/kg για τέσσερις ημέρες). Η 6-ώρη χορήγηση Bu επιλέχθηκε αυθαίρετα με μοναδικό ίσως κριτήριο επιλογής την ερεθιστική για τον γαστρικό βλεννογόνο δράση και πρόκληση εμέτου στους ασθενείς οι οποίοι έπρεπε να πάρουν μεγάλο αριθμό δισκίων για να επιτύχουν την επιθυμητή συστηματική έκθεση στο Bu. Στη μελέτη των Santos και Tutschka ^[23] το 44% των ασθενών με αρχική νόσο στην πρώτη πλήρη ύφεση (CR1) πέτυχε σταθερή μακροχρόνια ύφεση, σε σύγκριση με το 0% για τους ασθενείς με πιο προχωρημένη νόσο. Επιπλέον το 44% ανέπτυξε οξεία νόσο μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (acute graft-versus-host disease, aGVHD) τύπου II-IV, 22% παρουσίασε χρόνια αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (cGVHD) και 3 ασθενείς φλεβοαποφρακτική νόσο του ήπατος (venoocclusive disease, VOD). Στη συνέχεια ακολούθησε η μελέτη των Tutschka et al ^[24], τροποποιώντας την χορηγούμενη δόση της Cy από 200 mg/kg σε 120 mg/kg (60 mg/kg ημερησίως χορηγούμενη για 2 ημέρες) και διατηρώντας σταθερή τη δόση του peros Bu. Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης ήταν αξιοσημείωτα καθώς επιτεύχθηκε αναπαραγωγή ουδετερόφιλων στο 96% των ασθενών εντός 13 ημερών, ένας ασθενής ανέπτυξε κλινικά σημαντικό αλλά αναστρέψιμο VOD και το ποσοστό τριετούς επιβίωσης ήταν 65%. Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύγκριση μεταξύ των σχημάτων TBI/Cy και Bu/Cy ^[25] καθιερώνοντας ένα νέο πρότυπο στη κλινική χημειοθεραπεία για HSCT σε ασθενείς με ΧΜΛ. Επιπλέον, από τη σύγκριση των θεραπευτικών σχημάτων Bu/Cy2 (Bu 1 mg/kg / 6h / 4 days και 60 mg Cy / kg / 2 days) και TBI/Cy (10 Gy, μονάδα Grey και 60 mg Cy/kg/2 days) που πραγματοποιήθηκε από τους Socie et al. ^[26] παρατηρήθηκε μικρή διαφορά στη 10-ετή κλινική έκβαση μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με Bu/Cy2 και TBI/Cy (65% έναντι 63% αντίστοιχα) στη ΧΜΛ, ενώ παρατηρήθηκε αριθμητική αλλά στατιστικά μη σημαντική διαφορά στην επιβίωση στους ασθενείς με ΟΜΛ. Ωστόσο η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καταρράκτη, η ελαφρά υψηλότερη επίπτωση μόνιμης αλωπεκίας, η καθυστέρηση της πνευματικής ανάπτυξης σε παιδιά και η ανάπτυξη δευτεροπαθών κακοηθειών, η οποία χρειάστηκε περισσότερο από μία δεκαετία μετά την ακτινοθεραπεία για να εμφανιστεί ^[27-29] οοδήγησε στην καθιέρωση της χορήγησης της Bu ως εναλλακτικό θεραπευτικό σχήμα.

1.3.1. Τοξικότητα της peros Bu και η ανάγκη ανάπτυξης ενός i.v σκευάσματος

Η τοξικότητα του χημειοθεραπευτικού σχήματος που περιλαμβάνει χορήγηση Bu σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση VOD ^[30-32] κυρίως λόγω της υψηλής

μεταβλητότητας των συγκεντρώσεων Bu στο αίμα μετά από του στόματος χορήγηση^[33], ενώ εκτός από το Bu, η Cy είναι επίσης ηπατοτοξική. Η συμβολή άλλων αλκυλιωτικών παραγόντων στην εμφάνιση του VOD, όπως η Cy ή το θειοτέπα (ThioTEPA, TT), έχουν αναφερθεί από διάφορους ερευνητές^[34-36]. Εν συντομία, οι Hassan et al.^[34] αναφέρουν ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ της τελευταίας δόσης Bu και της πρώτης δόσης Cy στο Bu/Cy2 παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του VOD. Όταν μεσολαβεί διάστημα 24 ωρών, ο κίνδυνος VOD είναι σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με μεσοδιάστημα χορήγησης 12 ώρες. Οι McDonald et al.^[35] αναφέρουν τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων στο αίμα ορισμένων μεταβολιτών της Cy και την ανάπτυξη του VOD μετά από χορήγηση TBI/Cy. Τέλος, ο Przeriorka et al.^[36] αναφέρουν ότι η αντικατάσταση ποσοστού 25% έως 30% της δόσης Bu στο σχήμα Bu/Cy2 με TT (TT-Bu/Cy) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης VOD πάνω του 30% σε σχέση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για το σχήμα Bu/Cy2 σε ασθενείς που έχουν μεταμοσχευθεί για αιματολογικές κακοήθειες υψηλού κινδύνου. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η ανάπτυξη του VOD είναι πιθανόν πολυπαραγοντική. Τα ευρήματα των McDonald et al.^[35] αναφέρουν ότι οι δι-ατομική μεταβλητότητα (inter-individual) της Bu έχει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του VOD, καθώς η Cy πιθανό να συμβάλει στον συνολικό κίνδυνο. Ο κίνδυνος αυτός αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω με τη χρήση 2 ή περισσότερων αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούν ηπατικά αποθέματα γλουταθειόνης (GSH) για την διάρκεια του μεταβολισμού. Όταν τέτοια φάρμακα συνδυάζονται σε κοντινή χρονική απόσταση, συμβάλλουν από κοινού στην εξάντληση της ηπατικής GSH, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο σοβαρού ηπατικού τραυματισμού, VOD, επίσης γνωστό ως σύνδρομο ημιτονοειδούς απόφραξης (sinusoidal obstruction syndrome, SOS).

Η peros χορηγούμενη Bu έχει συσχετιστεί σε ζώα τόσο με το VOD, όσο και με νευροτοξικότητα^[38]. Οι Vassal et al.^[39] αναφέρουν ότι οι υψηλότερες δόσεις BU (>600/m² ή 16 mg/kg) σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νευροτοξικότητας. Τέτοιες ανεπιθύμητες ενέργειες σχετίζονται με την ικανότητα του Bu να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα την εκδήλωση γενικευμένων κρίσεων. Η περιορισμένη πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα επιτρέπει στο Bu, να διέρχεται εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να επιτυγχάνονται επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) παρόμοια με εκείνα στο πλάσμα σε αντίθεση με άλλους λιπόφιλους αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως το melphalan (Mel)^[40-41]. Οι

επιληπτικές κρίσεις είναι πιο συχνές σε ηλικιωμένους ασθενείς και φαίνεται ότι εξαρτώνται από τη δόση τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά ^[39,41,42]. Σε ενήλικες, οι επιληπτικές κρίσεις συμβαίνουν συνήθως την τρίτη ή τέταρτη ημέρα χορήγησης του peros Bu, πιθανώς ως αποτέλεσμα συσσώρευσης φαρμάκου^[43-45]. Ακόμη και χωρίς την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων, ανωμαλίες στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μπορεί να εμφανιστούν έως και στο 60% των ασθενών^[43]. Διάφορα αντιεπιληπτικά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί για την προφύλαξη από επιληπτικές κρίσεις με κύριο εκπρόσωπο την φαινυτοΐνη. Ως προφύλαξη χορηγείται η i.v. φαινυτοΐνη για να επιτευχθεί συγκέντρωση (10-20 ng/mL). Οι Hassan et al ^[34] απέδειξαν ότι η φαινυτοΐνη που χρησιμοποιείται ως προφύλαξη προκαλεί υψηλότερη κάθαρση στη χορηγούμενη από του στόματος Bu σε αντίθεση με τη χρήση της διαζεπάμης και πρότειναν τη χρήση φαρμάκων που δεν επηρεάζονται από τους επαγωγείς των ηπατικών μικροσωμικών ενζύμων.

Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ένα i.v. σκεύασμα θα παρουσίαζε μικρότερη βλάβη στο ήπαρ, μιας και η παρεντερική χορήγηση θα έλυνε το πρόβλημα της υψηλής μεταβλητότητας της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου μετά από peros χορήγηση. Επιπλέον, ο συνδυασμός Bu με ένα άλλο ανοσοκατασταλτικό παράγοντα που δεν βιομετατρέπεται στο ήπαρ όπως η Cy, θα παρείχε αυξημένη ασφάλεια θεραπείας, καθώς δεν θα απαιτούνται μεγάλα αποθέματα ηπατικής GSH.

Οι πρακτικοί περιορισμοί στη χρήση της peros Bu σχετίζονται κυρίως με την υψηλή μεταβλητότητα βιοδιαθεσιμότητα λόγω της προβληματικής εντερικής απορρόφησης. Αυτό οδήγησε στο σχεδιασμό ενός i.v. Bu σκευάσματος επιτυγχάνοντας τη μέγιστη ασφαλή δόση ελέγχοντας την χορηγούμενη δόση ^[46]. Η φαρμακοκινητική του i.v. Bu αξιολογήθηκε σε μια κλινική μελέτη φάσης I σε 15 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Το νέο σκεύασμα αξιολογήθηκε χορηγούμενο σε σύγκριση με το peros χορηγούμενο σχήμα Bu/Cy και, η δόση 0.8 mg/kg μετά από i.v. χορήγηση βρέθηκε να επιτυγχάνει την επιθυμητή τιμή AUC (1100-1200 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) και είναι ισοδύναμη με χορήγηση 1 mg/kg peros^[47]. Σε αυτή τη μελέτη, η μέση από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα (F) του Bu ήταν 69% με εύρος από <10% έως 100%. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης επιβεβαίωσαν οι Hassan et al. ^[48] και Schuler et al. ^[49], εκτιμώντας τη βιοδιαθεσιμότητα της από του στόματος χορηγούμενης Bu από 70-80%. Στη συνέχεια διεξήχθη κλινική μελέτη φάσης II σε 61 ασθενείς με προχωρημένες αιματολογικές κακοήθειες (75% με ενεργή νόσο κατά τη μεταμόσχευση) που έλαβαν θεραπεία με i.v. Bu (0.8 mg/kg κάθε 6 ώρες για τέσσερις

μέρες) ακολουθούμενη από Cy (60 mg/kg i.v. ημερησίως για 2 ημέρες). Το σχήμα ήταν πολύ καλά ανεκτό (ημέρα 100 TRM <10% παρουσίασαν τοξικότητα), ωστόσο, 2 ασθενείς εμφάνισαν θανατηφόρο VOD, 1 από τους οποίους είχε υποβληθεί και σε προηγούμενη HSCT. Το 83% των ασθενών πέτυχε AUC 800-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ^[50].

1.3.2. Πλεονεκτήματα της i.v. Bu και δοσολογικό σχήμα

Η ακρίβεια της δοσολογίας της χημειοθεραπείας πριν από τη μεταμόσχευση έχει μεγάλη σημασία και επομένως είναι πάντα προτιμότερη η χρήση παρεντερικών φαρμακοτεχνικών μορφών. Η εισαγωγή του i.v. Bu αφενός αύξησε την ασφάλεια αφετέρου επέτρεψε και την καλύτερη αξιολόγηση των ΦΚ παραμέτρων και την ανάπτυξη ενός ΦΚ μοντέλου που θα εκτιμά με ακρίβεια τις εξατομικευμένες ΦΚ παραμέτρους^[51,52]. Η παρεντερικά χορηγούμενη Bu βελτιώνει την ασφάλεια του θεραπευτικού σχήματος, καθώς επιτυγχάνεται η μέγιστη διασφάλιση της δόσης κατά 100% κατά την i.v χορήγηση επιτρέποντας TDM που θα χαρακτηρίζεται από υψηλή ασφάλεια και ακρίβεια. Όπως συμβαίνει με όλες τις ΦΚ μελέτες, οι αξιόπιστες ΦΚ πληροφορίες μπορούν να ληφθούν μόνο εάν δοθεί προσοχή σε πλήθος λεπτομερειών που μπορούν να επηρεάσουν τη μελέτη όπως, η έγχυση, η εισαγωγή του φαρμάκου σε ασκό, η χρήση μη αλατούχων διαλυμάτων, η διαδρομή του φαρμάκου μέχρι να φτάσει στον ασθενή, η έγχυση να πραγματοποιείται με αντλία ελεγχόμενης ταχύτητας και τελικά να αποσυνδέεται η κασέτα με τον ασκό από την αντλία στο τέλος της έγχυσης χωρίς τη χρήση αλατούχων διαλυμάτων για να καθαριστεί η γραμμή από το φάρμακο (το τελευταίο είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε παιδιατρικούς ασθενείς και θα μελετηθεί **Κεφάλαιο 2**). Επιπλέον θα πρέπει να γίνεται λεπτομερής καταγραφή του χρόνου της έγχυσης και των χρόνων δειγματοληψίας. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η μεταβλητότητα στις ΦΚ παραμέτρους μετά από i.v. έγχυση Bu είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με αυτή που καταγράφηκε μετά από peros χορήγηση ^[52-54]. Ωστόσο, ΦΚ μελέτη σε παιδιά ηλικίας 0.2-17.7 ετών, με πυκνό δειγματοληπτικό σχήμα, έδειξε να υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα και στο i.v. σκεύασμα και ιδιαίτερα σε παιδιά με ανοσολογική ανεπάρκεια η μεταβλητότητα είναι παρόμοια με αυτή του peros σκευάσματος ^[55].

Μελέτες απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας του peros Bu ^[56,57] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέση βιοδιαθεσιμότητα του Bu είναι 70% έως 80% για τους ενήλικες, και αποδείχθηκε ότι η δόση 1 mg/kg του peros σκευάσματος είναι ισοδύναμη

με δόση 0.7-0.8 mg/kg για το i.v. σκεύασμα [47-49]. Σε αρκετές μελέτες φάσης II που ακολούθησαν η i.v. δόση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.8 mg/kg. Επίσης, στην μελέτη των Nguyen et al.^[58] έπειτα από μια αναδρομική πληθυσμιακή μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση των μοντέλων μικτών επιδράσεων (Non linear mixed effect model, NONMEM) βρέθηκε η μη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης (L/h) της Bu και του πραγματικό βάρος σώματος (actual body weight, ABW, kg) (Log linear regression model). Έτσι καθιερώθηκε το παρακάτω δοσολογικό σχήμα για παιδιατρικούς ασθενείς (Πίνακας 1.1, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

Πίνακας 1.1: Δοσολογικό σχήμα που ακολουθείται σε παιδιατρικούς ασθενείς.

Κατηγορία	Μάζα σώματος (BW/ΒΣ)	Προτεινόμενη Δόση σύμφωνα με το SPC (mg/kg)
1	BW < 9 kg	1.0
2	9-16 kg	1.2
3	16-23 kg	1.1
4	23-34 kg	0.95
5	BW > 34kg	0.8

1.3.3. Εφαρμογή της i.v. Bu ως προπαρασκευαστικό σχήμα σε παιδιατρικούς ασθενείς

Οι Vassal et. al. πρότειναν ένα βελτιωμένο πρόγραμμα δοσολογίας βασισμένο στο σωματικό βάρος για κέντρα που δεν εφαρμόζουν TDM [59]. Σε μια ομάδα 55 ασθενών χορηγήθηκε i.v. Bu ανά 6 ώρες για 4 ημέρες σε συνδυασμό με είτε μελφαλάνη (Melphlan, Mel) είτε Cy σε 5 μειούμενες δόσεις για προοδευτικά αυξανόμενο σωματικό βάρος, με την προϋπόθεση ότι η συνεχής μείωση της κάθαρσης του Bu απαιτεί σταδιακή μείωση της δόσης. Οι δόσεις κυμαίνονταν από 1.2 mg/kg έως 0.8 mg/kg και χορηγήθηκαν σε παιδιά σωματικού βάρους (ΣΒ) λιγότερο από 9 kg έως περισσότερο από 34 kg. Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (91%) πέτυχε AUC στο στοχευόμενο εύρος με χαμηλή δι-ατομική μεταβλητότητα.

Σ' αυτό το πλαίσιο, αξίζει να σημειωθεί ότι η αναδρομική σύγκριση μεταξύ του TBI/Cy και του peros Bu/Cy ευνόησε το σχήμα TBI/Cy έναντι της peros Bu/Cy, χωρίς τη χρήση TDM (Therapeutic drug monitoring) σε σχέση με το OS (overall survival), DFS (Disease-free survival) και TRM (treatment-related mortality). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, αφενός, η εισαγωγή του i.v. Bu και αφετέρου η αντικατάσταση της

Cy με Flu (Fludarabin) στα σχήματα, i.v. Bu/Flu και Bu/Flu/ATG συνέβαλαν στη δραστική μείωση του TRM και του DFS τόσο για ενήλικες όσο και για παιδιά με AML/MDS και ALL [54-59]. Επιπλέον, στην παιδιατρική HSCT το i.v. Bu έχει διευκολύνει την ακριβή εφαρμογή του TDM για την επίτευξη της ακριβούς δοσολογίας. Πρόσφατες αναφορές παρουσιάζουν βελτιωμένο OS και DFS για ασθενείς που χορηγήθηκε i.v. Bu σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν peros Bu, όταν και στις δυο περιπτώσεις εφαρμόζεται TDM. Οι Worth et. al. ανέφεραν εξαιρετικό 10-ετές OS και DFS σε παιδιατρικούς ασθενείς υψηλού κινδύνου με AML/MDS και ALL. Συγκεκριμένα, το ποσοστό εμφύτευσης ήταν 90% και 60% πέτυχαν DFS 10 ετών, ενώ σε έναν υποπληθυσμό ασθενών που έλαβαν μία και μόνο μεταμόσχευση αίματος ομφάλιου λώρου για προχωρημένη λευχαιμία ήταν ενθαρρυντικοί [60]. Τέλος, οι Russell et al. χρησιμοποιώντας τα τροποποιημένα σχήματα και τη χρήση TDM για το Bu κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με τη χρήση του TDM βελτιστοποιείται η θεραπεία σε παιδιατρικούς ασθενείς [59].

1.3.4. Φαρμακοκινητική της i.v. Bu σε παιδιατρικούς ασθενείς-ΘΕ-εξατομίκευση της δόσης

Η φαρμακοκινητική του i.v Bu ποικίλει σημαντικά μεταξύ των παιδιών και το βέλτιστο θεραπευτικό εύρος (ΘΕ) (εκφραζόμενο ως εύρος τιμών AUC) στα παιδιά δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια. Η υψηλότερη συστηματική έκθεση (εκφραζόμενη ως τιμή AUC) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας, όπως βλεννογονίτιδα, GvHD, VOD ή ηπατική φλεβοαποφρακτική νόσος. Η χαμηλή συστηματική έκθεση της βουσουλφάνης έχει συσχετιστεί με υψηλότερη πιθανότητα απόρριψης μοσχεύματος ή υποτροπής της νόσου [61-63]. Επομένως, η εφαρμογή του TDM για την εξατομίκευση της δόσης της i.v. Bu είναι απαραίτητη σε παιδιά που υποβάλλονται σε αλλογενή HSCT. Διάφορες εκφράσεις ΘΕ (π.χ., AUC 58-86 mg*h/L ή AUC₀₋₆ δηλ. AUC υπολογιζόμενη από 0-6 h μετά τη χορήγηση της βουσουλφάνης, ανά δόση 900.0-1350.0 μM*min ή τη συγκέντρωση σε σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) από 0-6 μετά την πρώτη χορήγηση βουσουλφάνης ή μετά από πολλές χορηγήσεις 600-900 ng/mL) έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι για την εκτίμηση της AUC και στη συνέχεια τον υπολογισμό της εξατομικευμένης δόσης (εκτίμηση AUC από τον κανόνα των τραπεζίων, AUC από 0-∞ [AUC_{0-∞}] και από τη συγκέντρωση στη σταθεροποιημένη κατάσταση από 0 έως 6 h). Σε πρόσφατη

αναδρομική μελέτη των Bartelink et al^[64] σε 790 ασθενείς προτείνει την αλλαγή των ΘΕ που προτείνει τόσο ο EMA (900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) όσο και ο FDA (900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) σε 1188-1538 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Επιπλέον, η Αμερικανική Ένωση Αιματολογίας και Μεταμόσχευσης Μυελού (American Society for Blood and Marrow Transplantation, ASBMT)^[65] αναφέρει ότι θα πρέπει να πραγματοποιείται εξατομίκευση της δόσης καθώς χαμηλά επίπεδα Bu συσχετίζονται με υποτροπή της νόσου και την απόρριψη μοσχεύματός ενώ υψηλά επίπεδα με την εμφάνιση VOD. Μεταξύ άλλων αναφέρει ότι θα πρέπει να ακολουθείται η μονογραφία του Ευρωπαϊκού οργανισμού φαρμάκων (EMA) για τα παιδιά με $\text{AUC}_{\text{target}}$ 1125 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Επιπλέον, σε μια νέα μελέτη των Philippe et al.^[66] λαμβάνοντας υπόψη το ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ έγινε TDM με στόχο η AUC μετά την εξατομίκευση της δόσης της βουσουλφάνης να κυμαίνεται από 980-1250 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$.

1.4. Ιδιαιτερότητες στην ενδοφλέβια έγχυση Βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς

Η βουσουλφάνη χορηγείται σε δίωρη "μικροέγχυση" σε παιδιατρικούς ασθενείς με δόση από 0.8 -1.2 mg/kg ανάλογα με το βάρος του ασθενούς, με τη χρήση αντλίας σύριγγας. Η ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων από αντλίες σύριγγας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικό χρόνο υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος καθώς και επίτευξης σταθερών επιπέδων έγχυσης όταν χρησιμοποιείται πολύ χαμηλή ροή ("μικροέγχυση").

1.4.1. Χρόνος υστέρησης

Σε βαριά πάσχοντες ασθενείς ή σε χορηγήσεις αναισθησίας, συνήθως χορηγούνται βραχείας δράσης εγχεόμενα φάρμακα. Για τη χορήγηση μικρών ποσοτήτων φαρμάκου, πολλές κλινικές χρησιμοποιούν αντλίες σύριγγας, με αποτέλεσμα η μεταφορά του διαλύματος του φαρμάκου να πραγματοποιείται με πολύ χαμηλό ρυθμό έγχυσης ("μικροέγχυση")^[67]. Όταν ο νεκρός όγκος που υπάρχει στο εγχεόμενο σύστημα συνδέεται με ένα συνολικά μικρό ρυθμό έγχυσης, οδηγεί σε σταθερά μεγάλα χρονικά διαστήματα υστέρησης (lag time, νεκρός όγκος διαιρούμενος με το συνολικό ρυθμό ροής του ρευστού)^[68] εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος

Σε συνθήκες χαμηλής ροής, έχει αποδειχθεί *in-vitro*, ότι η επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης μεταφοράς ενός φαρμάκου χαρακτηρίζεται από υστέρηση σε σχέση με αυτή που αναμένεται στη κλινική πράξη [69-71]. Ο χρόνος υστέρησης μπορεί να κυμαίνεται από 20-30 min και όταν εντοπίζεται πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην κλινική πράξη. Οι χρόνοι υστέρησης μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικά δοσολογικά σφάλματα στην κλινική εφαρμογή. Οι εγχύσεις σε παιδιατρικούς ασθενείς χαρακτηρίζονται από χαμηλό ρυθμό έγχυσης και υψηλά επίπεδα νεκρού όγκου με αποτέλεσμα να χρήζουν προσοχής στην κλινική πράξη.

1.4.2. Αντλίες σύριγγας για ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων

Η εξωτερική αντλία έγχυσης σύμφωνα με τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) ορίζεται ως η ιατρική συσκευή που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ρευστών στον ασθενή με ελεγχόμενο τρόπο. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι αντλιών έγχυσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς και σε διάφορες συνθήκες.

Οι αντλίες έγχυσης πρέπει να είναι ικανές να μεταφέρουν τόσο μικρές όσο και μεγάλες ποσότητες υγρών και χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών ή φαρμάκων - όπως ινσουλίνη ή άλλες ορμόνες, αντιβιοτικά, φάρμακα χημειοθεραπείας, αναλγητικά [72].

Το 2010 ο FDA δημοσίευσε στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια των αντλιών έγχυσης για το χρονικό διάστημα από 01/01/2005 έως 31/12/2009 και ανέφερε την καταγραφή 710 θανάτων, 19.040 σοβαρών τραυματισμών και 34.720 δυσλειτουργιών. Τα προβλήματα που αναφέρθηκαν οφείλονταν σε λάθος χειρισμό από το χρήστη, αλλά και σε προβληματικό σχεδιασμό και λειτουργία της συσκευής, που μπορεί είτε να προκαλούσε το πρόβλημα είτε να οδηγούσε σε λανθασμένο χειρισμό. Τα προβλήματα που αναφέρθηκαν συχνότερα σχετίζονταν με ελαττώματα στο λειτουργικό σύστημα, τη διεπαφή χρήστη (user interface) και μηχανικές ή ηλεκτρικές βλάβες. Για το λόγο αυτό ο FDA εξέδωσε οδηγία που περιγράφει τις προδιαγραφές που θα πρέπει να πληρούνται από τους κατασκευαστές αντιμετωπίζοντας επαρκώς τα ζητήματα ασφάλειας. Επιπλέον, δημιουργήθηκε το ISO 28960 που καθορίζει τις ειδικές σχεδιαστικές παραμέτρους και τις απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν οι μη-ηλεκτρονικές και ηλεκτροκίνητες αντλίες [73].

1.4.3. Ενδοφλέβια έγχυση σε παιδιά με χρήση αντλίας σύριγγας

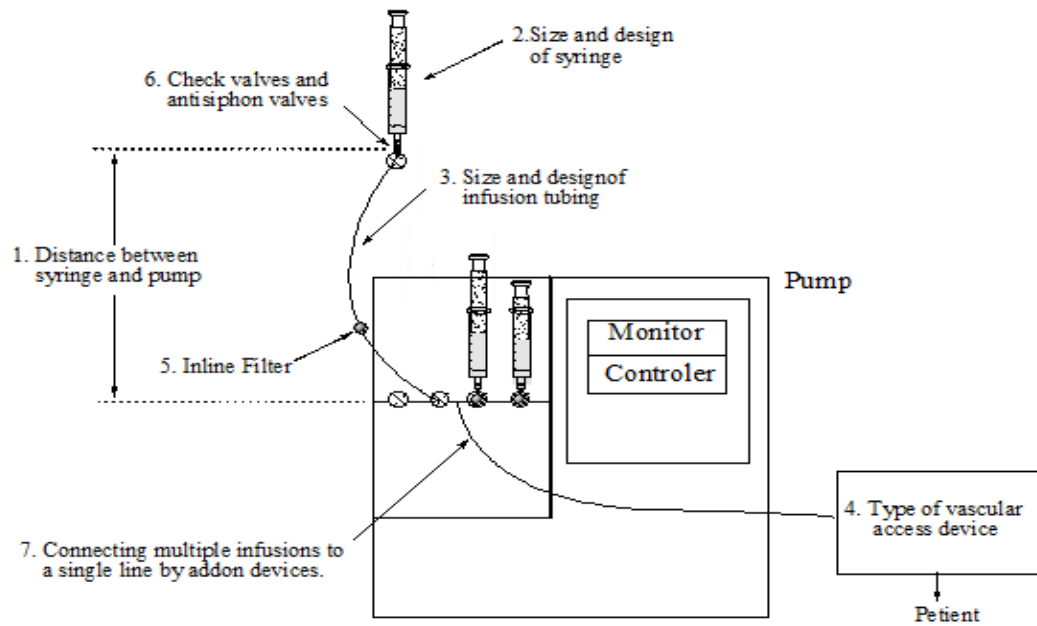
Ο ρυθμός έγχυσης, κατά την ενδοφλέβια χορήγηση φαρμάκων σε παιδιατρικούς ασθενείς, χαρακτηρίζεται από μεταβλητότητα η οποία προέρχεται από τον προγραμματισμό στο ρυθμό έγχυσης μέσω του προγράμματος που φέρει η αντλία, τις αλλαγές στην υδροστατική πίεση και τη φύση των εγχεόμενων φαρμάκων [74].

Όλοι οι ασθενείς σε μια μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) ή μονάδα χορήγησης χημειοθεραπείας λαμβάνουν ενδοφλέβια (i.v.) θεραπεία [75-77]. Σε τέτοιου είδους θεραπείες, τα φάρμακα χορηγούνται ταυτόχρονα ή σε σειρά με αποτέλεσμα η ενδοφλέβια χορήγηση σε άτομα όπως παιδιά ή νεογνά να χαρακτηρίζεται από διάφορους περιορισμούς. Στην περίπτωση της ταυτόχρονης έγχυσης τουλάχιστον 2 διαλυμάτων με διαφορετικούς ρυθμούς έγχυσης ανά φάρμακο, στον ασθενή τελικά φτάνει ένας όγκος με μια ροή που είναι άγνωστα. Έτσι, λόγω της αλληλεπίδρασης των ροών της αντλίας, ο όγκος που καταλήγει στον ασθενή μπορεί να ποικίλει [78,79]. Το φαινόμενο αυτό αυξάνεται σε μικρούς ηλικιακά ασθενείς καθώς ο όγκος που πρόκειται να χορηγηθεί (κατά συνέπεια και ο ρυθμός) είναι μικρότερος (ρυθμός έγχυσης σε νεογνά: 0.1~5 mL / h) σε σχέση με αυτό των ενηλίκων [80].

1.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό έγχυσης

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό έγχυσης σε i.v. θεραπεία είναι οι παρακάτω (Εικόνα 1.10)

1. Το ύψος μεταξύ του άκρου του καθετήρα και της αντλίας.
2. Το μέγεθος της σύριγγας και ο σχεδιασμός της.
3. Το μέγεθος και ο σχεδιασμός του σωλήνα έγχυσης.
4. Το είδος του κεντρικού φλεβο-καθετήρα (Vascular access devices Hickman, port-a-cath, κ.α.)
5. Τα φίλτρα εντός της γραμμής έγχυσης (Inline Filter)
6. Οι βαλβίδες ελέγχου και οι βαλβίδες αντεπιστροφής (Check valves and antisiphon valves)
7. Το σύστημα πολλαπλών εγχύσεων που καταλήγει σε μια γραμμή έγχυσης [74].



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που επηρεάζουν το ρυθμό ενδοφλέβιας έγχυσης.

1.4.4.1. Ύψος μεταξύ του άκρου του καθετήρα και της αντλίας

Σε αυτή την περίπτωση εξετάζεται η μετατόπιση των ρευστών μεταξύ του άκρου του καθετήρα και της αντλίας. *In-vitro* μελέτες διαφόρων τύπων αντλιών σύριγγας, έχουν αποδείξει ότι ο ρυθμός έγχυσης επηρεάζεται από το ύψος του άκρου του καθετήρα και της αντλίας^[81-83]. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι για 30 cm μετατόπιση της αντλίας προς τα πάνω ο ρυθμός του μεταφερόμενου ρευστού επταπλασιάζεται^[84]. Σε περιπτώσεις μετατόπισης της αντλίας προς τα κάτω παρατηρήθηκε ότι χρειάζονται έως 180 sec μέχρι να επανέλθει η σταθεροποιημένη κατάσταση^[84]. Έτσι, για κατακόρυφες μετατοπίσεις της αντλίας, ο ρυθμός μεταφοράς αυξάνεται ή μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με το προγραμματισμένο ρυθμό ροής. Σε *in-vivo* μελέτες σε μοντέλο κουνελιών παρατηρήθηκε ότι για 50 cm μετατόπιση προς τα κάτω της αντλίας και ροή 1 mL/min παρατηρήθηκε αύξηση της εσωτερικής πίεσης του συστήματος κατά 37.4 ± 2.6 mmHg (5.0 ± 0.3 kPa). Επιπλέον, στην περίπτωση μετατόπισης της αντλίας προς τα κάτω κατά την διάρκεια έγχυσης νορεπινεφρίνης σε κουνέλια με ροή 1 mL/min παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συστολικής πίεσης κατά $17 \pm 6.9\%$. Μετατόπιση της αντλίας προς τα πάνω οδήγησε σε μείωση της εσωτερικής πίεσης και αύξηση της συστολικής πίεσης^[85].

1.4.4.2. Μέγεθος και σχεδιασμός της σύριγγας

Διάφορες μελέτες αναφέρουν την επίδραση του μεγέθους και του σχεδιασμού της σύριγγας στον τελικό όγκο που καταλήγει στον ασθενή ^[86-88]. Η επίδραση του σχεδιασμού της σύριγγας, μελετήθηκε με μέτρηση της δύναμης που απαιτείται για τη μετατόπιση του εμβόλου της, ώστε να επέλθει η επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης στη ροή, σε σχέση με το χρόνο που απαιτείται να σταθεροποιηθεί. Σε περιπτώσεις που το έμβολο στάματα να λειτουργεί έχουμε διακοπή της ροής ή μείωση του ρυθμού αυτής ^[89]. Έτσι, η επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης στο ρυθμό έγχυσης εξαρτάται από τη μετατόπιση του εμβόλου της σύριγγας και από το ρυθμό έγχυσης που προγραμματίζεται από την αντλία.

1.4.4.3. Μέγεθος και σχεδιασμός του σωλήνα έγχυσης

Όταν ο όγκος του σωλήνα έγχυσης είναι σχετικά μικρός (2-3 mL) σε σύγκριση με τον όγκο της σύριγγας, παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στο ρυθμό έγχυσης ^[90,91]. Ο ρυθμός εξόδου του ρευστού από το σωλήνα παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση και εξαρτάται από τον όγκο του σωλήνα και τον όγκο του ρευστού στη σύριγγα. Επιπλέον, μετατόπιση της αντλίας οδηγεί σε αλλαγή της σταθεροποιημένης κατάστασης του ρυθμού έγχυσης. Σε αυτή την περίπτωση όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός έγχυσης τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος υστέρησης και αντιστρόφως. Τέλος, το μέγεθος του σωλήνα έγχυσης σχετίζεται με το χρόνο υστέρησης ροής του ρευστού και με τη μεγάλη διακύμανση στον ρυθμό έγχυσης στις περιπτώσεις κατακόρυφης μετατόπισης της αντλίας.

1.4.4.4. Είδος κεντρικού φλεβο-καθετήρα (Vascular access devices)

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία κεντρικών φλεβο-καθετήρων που χρησιμοποιούνται σε i.v. θεραπείες (Hickman, Port-a-cath, καθετήρες σφαγίτιδας κ.α.). Η χρήση των συγκεκριμένων συσκευών εξαρτάται από τη διάρκεια της θεραπείας και το είδος του φαρμάκου που χορηγείται. Μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίδραση των κεντρικών φλεβο-καθετήρων στη μεταβλητότητα του ρυθμού έγχυσης ^[92]. Η μεταβλητότητα στο ρυθμό έγχυσης εξαρτάται από το είδος του κεντρικού φλεβο-καθετήρα, το νεκρό όγκο και από την ταχύτητα του φέροντος ρευστού ^[93]. Οι Bartles et al. (2009 χρονολογία)

μελέτησαν την επίδραση του νεκρού όγκου των κεντρικών φλεβο-καθετήρων στον όγκο του ρευστού που μεταφέρεται στον ασθενή σε περιπτώσεις χαμηλού ρυθμού έγχυσης. Σε αυτή τη μελέτη, έγινε προσομοίωση της έγχυσης για ρυθμούς από 2 και 12 mL/h. Ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί το ήμισυ της επιθυμητής δόσης για τους ρυθμούς έγχυσης 2 και 12 mL/h χ είχε απόκλιση 23.5 ± 2.1 min και 15.7 ± 2.9 min, αντίστοιχα. Επίσης, στη περίπτωση του χαμηλού ρυθμού έγχυσης ο χρόνος επίτευξης σταθεροποιημένης κατάστασης ήταν μεγαλύτερος από 40 min. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η εκκίνηση του συστήματος έγχυσης και ο νεκρός όγκος της διαδρομής του ρευστού επηρεάζουν το χρόνο επίτευξης του επιθυμητού σταθερού ρυθμού μεταφοράς του ρευστού ^[94].

1.4.4.5. Φίλτρα εντός της γραμμής έγχυσης (Inline Filter)

Λόγω της φθοράς των συρίγγων που χρησιμοποιούνται σε i.v. εγχύσεις, πλαστικά σωματίδια ενδέχεται να εισέλθουν στη γενική κυκλοφορία των ασθενών. Τα σωματίδια που εισέρχονται στη γενική κυκλοφορία μπορεί να προκαλέσουν κάποια ενδοθηλιακή βλάβη ή να δράσουν σαν υπόστρωμα και να προκαλέσουν θρομβώσεις ^[95,96]. Ο θάνατος ενός νεογνού που προκλήθηκε από θραύσματα πολυπροπυλενίου που εισήλθαν στη γενική κυκλοφορία από i.v. έγχυση ώθησε τους κατασκευαστές να καταβάλουν μεγαλύτερες προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από σωματίδια και να εξετάσουν τη δυνατότητα χρήσης φίλτρων στην ενδοφλέβια χορήγηση ^[97,98]. Στο πλαίσιο αυτό οι Nazeravich et al. ^[96] σε μελέτη που πραγματοποίησαν για δεδομένο ρυθμό έγχυσης 8.26 min/h χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά φίλτρα (Travenol 0.22 μm , Travenol 0.5 μm , και Pall Ultipor 0.2 μm) σε τέσσερις θέσεις (οριζόντια θέση με αύξουσα ή φθίνουσα σειρά ροής ρευστού και κάθετη θέση με αύξουσα ή φθίνουσα σειρά ροής ρευστού) παρατήρησαν ότι ο ρυθμός μεταφοράς του ρευστού αυξήθηκε αισθητά όταν χρησιμοποιήθηκε το Travenol 0.22 μm φίλτρο σε σχέση με τα υπόλοιπα φίλτρα.

1.4.4.6. Βαλβίδες ελέγχου και βαλβίδες αντεπιστροφής (Check valves and antisiphon valves)

Για να αποφεύγεται το φαινόμενο της επιστροφής των ρευστών προς τα πίσω στην ενδοφλέβια χορήγηση και το φαινόμενο της διαφυγής των ρευστών προς άλλους

αυλούς, εισάγονται διάφορες βαλβίδες στο σύνολο του συστήματος. Επιστροφή ρευστού προς τα πίσω εμφανίζεται στην περίπτωση που πολλαπλές εγχύσεις πραγματοποιούνται και συνδέονται μεταξύ τους με ειδικές συσκευές. Εκρροή του ρευστού προς άλλο σωλήνα εμφανίζεται στη περίπτωση που το ρευστό συναντήσει αντίσταση από άλλο ρευστό διαφορετικής γραμμής^[99]. Στην περίπτωση εκρροής ρευστού έχουμε μη ελεγχόμενο ρυθμό έγχυσης (ακανόνιστο) είτε από τη σύριγγα προς τον ασθενή ή αντίστροφα. Αυτό μπορεί να συμβεί επειδή δεν έχει τοποθετηθεί σωστά η σύριγγα ή επειδή υπάρχει αέρας στο σύστημα^[81, 100-101]. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βαλβίδες εκτόνωσης/αντεπιστροφής για σχετικά υψηλή πίεση που ονομάζονται anti-siphon valve. Ο συνδυασμός του χαμηλού ρυθμού έγχυσης και της υψηλής αντίστασης ενός ρευστού στη ροή έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή μεταβλητότητα στο ρυθμό έγχυσης. Η χρήση των anti-siphon valve έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται περισσότερο ο χρόνος που θα χρειαστεί το φάρμακο για να εισέλθει στον οργανισμό, και όσο πιο χαμηλοί ρυθμοί έγχυσης χρησιμοποιούνται τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση^[100]. Παρά το γεγονός, λοιπόν, ότι οι anti-siphon valves σταθεροποιούν το ρυθμό έγχυσης ταυτόχρονα, αυξάνουν αισθητά το χρόνο που χρειάζεται το φάρμακο να εισέλθει στον οργανισμό σε σχέση με ένα σύστημα που δεν θα χρησιμοποιούσε τέτοιου τύπου βαλβίδες^[101].

1.4.5. Σύστημα πολλαπλών εγχύσεων που καταλήγει σε μια γραμμή έγχυσης

Σε περιπτώσεις που η αγγειακή πρόσβαση είναι περιορισμένη τότε οι πολλαπλές γραμμές έγχυσης καταλήγουν σε ένα σωλήνα που οδηγεί στον κεντρικό φλεβοκαθετήρα. Σε αυτή την περίπτωση όσο μικρότερος είναι ο ρυθμός έγχυσης τόσο περισσότερο αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται το φάρμακο να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία του ασθενή^[99]. Επιπλέον, προσθέτοντας μια τέτοιου είδους γραμμή δεν επηρεάζεται μόνο ο ρυθμός ροής, λόγω της αύξησης του όγκου, αλλά υπάρχουν επίσης προβλήματα στην ανάμιξη των φαρμάκων και το φαινόμενο επιστροφής κάποιου ρευστού προς τα πίσω^[68,69,71,101]. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα για τη πρόβλεψη των δυναμικών διαταραχών και του χρόνου απόκρισης του φαρμάκου εξαιτίας των αλλαγών που μπορεί να συμβούν στο προγραμματισμένο ρυθμό έγχυσης ή στο μέσο μεταφοράς^[68,69]. Έτσι απαιτείται περισσότερος χρόνος για να επιτευχθεί η σταθεροποιημένη κατάσταση έπειτα από μια αλλαγή στο μέσο μεταφοράς ή στο φάρμακο προς έγχυση, καθώς αυξάνεται ο νεκρός όγκος που χρειάζεται το φάρμακο

να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία του αίματος του ασθενή. Επίσης όσο πιο χαμηλός είναι ο ρυθμός έγχυσης του φορέα τόσο πιο αργή η επίτευξη της σταθεροποιημένης κατάστασης στο ρυθμό εισόδου^[92]. Επιπλέον, ο χρόνος για την επίτευξη της σταθεροποιημένης κατάστασης του ρυθμού εισόδου του φαρμάκου στον οργανισμό εξαρτάται από το βάρος/επιφάνεια σώματος του ασθενούς, το ρυθμό έγχυσης του φαρμάκου και τη συμπεριφορά στην ανάμιξη του φαρμάκου^[101]. Τέλος, ο μεταφερόμενος όγκος μπορεί να επηρεαστεί από την ανάμιξη των φαρμάκων, τις αλλαγές στο ρυθμό έγχυσης και την αντίστροφη ροή κάποιου ρευστού, λόγω φυσικοχημικών φαινομένων.

Σκοπός της μελέτης

Η φαρμακοκινητική της i.v βουσουλφάνης ποικίλει σημαντικά μεταξύ των παιδιών και το βέλτιστο θεραπευτικό εύρος (ΘΕ) (εκφραζόμενο ως εύρος τιμών AUC) στα παιδιά δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια. Δεδομένου ότι, η υψηλότερη συστηματική έκθεση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας, όπως βλεννογονίτιδα, GvHD, VOD ή ηπατική φλεβοαποφρακτική νόσος, ενώ η χαμηλή συστηματική έκθεση στη βουσουλφάνη έχει συσχετιστεί με υψηλότερη πιθανότητα απόρριψης μοσχεύματος ή υποτροπής της νόσου,^[102,103] είναι ευνόητο ότι η εφαρμογή TDM για την εξατομίκευση της δόσης της i.v. βουσουλφάνης είναι απαραίτητη σε παιδιά που υποβάλλονται σε αλλογενή HSCT και περιγράφεται στο SPC του εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου και η εφαρμογή της Μπαεσιανής εξατομίκευσης θα μπορούσε να μειώσει τον αριθμό των απαιτούμενων δειγμάτων αίματος και ταυτόχρονα να διευκολύνει και να επιταχύνει τη διαδικασία της εξατομίκευσης της δόσολογίας της βουσουλφάνης. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι η βουσουλφάνη χορηγείται σε δίωρη "μικροέγχυση" σε παιδιατρικούς ασθενείς με δόση από 0.8 -1.2 mg/kg ανάλογα με το βάρος του ασθενούς με χρήση αντλίας σύριγγας. Η ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων από αντλίες σύριγγας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικό χρόνο υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος καθώς και επίτευξης σταθερών επιπέδων έγχυσης όταν χρησιμοποιείται πολύ χαμηλή ροή ("μικροέγχυση"), και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό της AUC και της εξατομικευμένης δόσης στη διαδικασία εφαρμογής TDM.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι: 1) Η μέτρηση και ανάλυση των προφιλ συγκέντρωσης-χρόνου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση BU και η εξατομίκευση της δόσολογίας σε παιδιατρικούς ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε HSCT στο «Κέντρο Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών» στο Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία», όπως προβλέπεται στο SPC του χορηγούμενου φαρμάκου, 2) Η in vitro αξιολόγηση του προκαλούμενου χρόνου υστέρησης άφιξης του BU στη γενική κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της έγχυσης του φαρμάκου σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση αντλίας σύριγγας, με βάση το σωματικό βάρος και την ηλικία του ασθενούς, σύμφωνα με την σχετική κατηγοριοποίηση που αναφέρεται στο SPC του χορηγούμενου φαρμάκου (Busilvex®),^[104] 3) Η ενσωμάτωση του in vitro

προσδιοριζόμενου χρόνου υστέρησης στη μεθοδολογία υπολογισμού της AUC και της εξατομίκευσης της δοσολογίας καθώς και η αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης στην προβλεπόμενη διόρθωση της χορηγούμενης δόσης, 4) Η ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου για το BU σε παιδιατρικούς ασθενείς με ενσωμάτωση του χρόνου υστέρησης άφιξης του BU στη γενική κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της έγχυσης του φαρμάκου σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση αντλίας σύριγγας, η εφαρμογή της Μπαεσιανής εξατομίκευσης της δοσολογίας και η σύγκριση με την συνήθη μεθοδολογία.

Κεφάλαιο 2 - Ανάπτυξη & Επικύρωση Βιοαναλυτικής Μεθόδου Προσδιορισμού Βουσουλφάνης

2. Εισαγωγή

2.1. Ανάπτυξη Βιο-αναλυτικής μεθόδου

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων Busulfan αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν και περιλαμβάνουν μεθοδολογίες όπως, HPLC-UV, HPLC με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLPharmaceutical Technology, ELISA, UHPLC-UV, LC/MS, LC-MS/MS, GC-ECD, GC-MS/MS ^[105-113]. Από τις παραπάνω μεθοδολογίες και διαδικασίες ανάλυσης αυτές που χρησιμοποιούν ανιχνευτή μάζας είναι πιο ευαίσθητες αλλά χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος εξοπλισμού/ στηλών/ προτύπων/ αντιδραστηρίων/ kit. Οι μέθοδοι HPLC-UV και HPLC-FL που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία είναι πιο οικονομικές αλλά υστερούν ως προς την ευαισθησία (υψηλότερο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης) σε σύγκριση με τις μεθόδους LC/MS, LC-MS/MS, GC-ECD, GC-MS/MS. Επιπλέον, η εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων στη κλινική ρουτίνα δεν είναι πάντα ρεαλιστική σε επίπεδο TDM καθώς οι αναλύσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα (<3h). Επιπλέον για τον παραπάνω εξοπλισμό απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό με υψηλή τεχνογνωσία που δεν είναι διαθέσιμο σε όλες της κλινικές. Έτσι, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων, αρχικά είχε εφαρμοστεί η μέθοδος HPLC-UV, που αναφέρεται από τον Haggie et al ^[114]. Ωστόσο η ανάγκη εφαρμογής μιας χαμηλού κόστους (εξοπλισμός πρότυπα και αντιδραστήρια) γρήγορης και πλήρως εφαρμόσιμης μεθόδου στο TDM σε παιδιατρικό πληθυσμό, που απαιτεί ποσοτικοποίηση σε μικρούς όγκος πλάσματος με χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης η οποία να χαρακτηρίζεται από υψηλή πιστότητα και ακρίβεια οδήγησαν στην βελτιστοποίηση της παραπάνω μεθόδου. Οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι: 1) μείωση του όγκου του πλάσματος από τα 500 μL στα 250 μL , 2) αλλαγή της στήλης σε Thermo Hypersil BDS C18 150*4.5mm, 5 μm έναντι της αναφερόμενης Waters NovaPak octadecylsilyl (ODS) (150*3.9 mm I.D.), 3) αύξηση του ενιόμενου όγκου δείγματος από τα 20 μL στα 40 μL .

Οι παράμετροι που επικυρώθηκαν είναι:

- Εκλεκτικότητα (Specificity)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Ανιχνευσιμότητα (LOD/LOQ)
- Πιστότητα (Precision)
- Ακρίβεια (Accuracy)

- Ανάκτηση (Recovery)
- Σταθερότητα (Stability)

2.2. Πειραματικό μέρος

2.2.1. Όργανα και συσκευές

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν την εταιρεία Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Ιαπωνία), της σειράς Shimadzu Prominence 20 και αποτελείται από μονάδα απαέρωσης Degassing Unit DGU-20A5R, αντλία LC-20AD, ψυχωμένο αυτόματο δειγματολήπτη SIL-HTC, ανιχνευτή ορατού υπεριώδους SPD-M20A και φούρνο στήλης CTO-20AC. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo Scientific-Keystone BDS-Hypersyl C18 150*4.6 mm, 5 μm συζευγμένη με προστήλη Thermo Scientific, BDS-Hypersil C18, 10x4 mm, 5μm.

Για τις ζυγίσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός KERNAEJ (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Γερμανία). Το μέγιστο και το ελάχιστο βάρος ζύγισης του ζυγού είναι 0.01 g και 220 g και η ακρίβεια ανάγνωσής του είναι ± 0.1 mg. Η κινητή φάση πριν τη διοχέτευση της στο χρωματογραφικό σύστημα υφίσταντο διήθηση υπό κενό, σε συσκευή διήθησης διαλυτών τύπου Millipore (Merck KGaA, Gernsheim, Germany), μέσω φίλτρων μεμβράνης Nylon μεγέθους πόρων 0.45 μm και διαμέτρου 47 mm (Cronus Membrane Filter Nylon). Για την ανάδευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας περιδίτισης τύπου IKA MS3 Basic (IKA Works, INC, Wilmington, USA) και η φυγοκέντρωση των δειγμάτων γινόταν σε ψυχόμενη, υψηλής ταχύτητας φυγόκεντρο HERMLE Z32HK, (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Γερμανία) 16 θέσεων (max. RCF: 38012 x g, speed range: 200-20000 min⁻¹, max. volume: 4 x 100 mL). Τέλος, για τις ανάγκες της ανάλυσης και της προετοιμασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακόμη: υάλινοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες, απλοί δοκιμαστικοί σωλήνες, φυγοκεντρικά πλαστικά erppendorf με κωνικό πάτο, ογκομετρικές φιάλες 5, 10, 25 mL τύπου A, γυάλινες πιπέτες Pasteur, αυτόματες πιπέτες ακριβείας με εύρος όγκων 2-20 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL για τη λήψη των επιθυμητών όγκων των δειγμάτων χρησιμοποιώντας γυάλινα φιαλίδια με insert (HPLC vials), για την τοποθέτηση των δειγμάτων στον αυτόματο δειγματολήπτη της HPLC.

Ηλεκτρονικός υπολογιστής – Στατιστικά προγράμματα

Για τον έλεγχο του χρωματογραφικού συστήματος, την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός υπολογιστής τύπου Dell Optiplex 9020, εξοπλισμένος με το πρόγραμμα LC Solution της Shimadzu. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης έγιναν με τη χρήση του Microsoft Excel 2010.

2.2.2. Διαλύτες – Πρότυπα – Διαλύματα Παρακαταθήκης

Διαλύτες

- Ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC (Macron Fine Chemicals-Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland).
- Νερό (H₂O) βαθμού καθαρότητας HPLC (Carlo Erba Reagents S.A.S.-Dasit Group, Val de Reuil, Γαλλία).
- Μεθανόλη (CH₃OH) βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer Chemical-Fischer Scientific, Loughborough, UK).
- Οξικός εθυλεστέρας (CH₃COOCH₂CH₃) βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer Chemical-Fischer Scientific, Loughborough, UK).

Αντιδραστήρια – Πρότυπες ουσίες:

- Βουσουλφάνη (Busulfan), πρότυπη ουσία της Sigma Aldrich, Austria, Lot No BCBF0893V, CAS No 55-98-1.
- Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DDTC) της Sigma Aldrich, Cas No: 20624-25-3.
- 1,6-δισ(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξάνιο [1,6 bis(methanosulffinoxy)hexane] το οποίο αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο (internal standard IS) και παρασκευάστηκε από το τμήμα χημείας κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας της Ειρήνης Παναγοπούλου. Ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος έγινε με ανακρυστάλλωση με τη χρήση EtOH, το τελικό προϊόν ήταν καθαρότητας 99.99%^[115].

Διαλύματα Παρακαταθήκης

Ζυγίζονται 15.0 mg πρότυπης ουσίας Βουσουλφάνης και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Ακολουθεί προσθήκη 10 mL με ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη ακετονιτρίλιου μέχρι τη χαραγή, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 600 µg/mL (ppm). Κατά

τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται και ένα δεύτερο διάλυμα παρακαταθήκης Βουσουλφάνης, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα ελέγχου στην καμπύλη αναφοράς (Quality control sample). Για την παρασκευή του mg 1,6-διμεθυλ-σουλφονικό εξάνιο ζυγίζονται 15.0 mg και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και ακολουθεί προσθήκη 10 mL με ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια προστίθεται ακετονιτρίλιο μέχρι τη χαραγή, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 600 µg/mL (ppm). Όλα τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους -20 °C.

Για το αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (DDTC) ζυγίζονται 400 mg διαιθυλοδιθειο-καρβαμικό νάτριο και αραιώνεται σε 10mL νερό καθαρότητας HPLC. Το διάλυμα παρασκευάζεται κάθε μέρα πριν την ανάλυση.

2.3. Καμπύλη βαθμονόμησης και επεξεργασία δειγμάτων

2.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας Βουσουλφάνης

Για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας λαμβάνονται από το διάλυμα παρακαταθήκης της Βουσουλφάνης οι ακόλουθοι όγκοι: 5, 10, 20, 60, 130, 200, 300 και 500 µL και μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL (τύπου A). Τα διαλύματα αραιώνονται με ακετονιτρίλιο μέχρι τη χαραγή ώστε να προκύπτουν διαλύματα με εύρος συγκεντρώσεων 0.048-4.8 µg/mL (0.6, 1,2, 2.4, 6, 15,6, 24, 36, 48 και 60µg/mL). Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονται πάντα την ημέρα της ανάλυσης και ανεξάρτητα το καθένα. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιούνται στη συνέχεια, για τον εμβολιασμό πλάσματος και την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς.

2.3.2. Παρασκευή διαλύματος εργασίας Εσωτερικού προτύπου

Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου λαμβάνονται 130 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL (τύπου A). Ακολουθεί αραιώση με ακετονιτρίλιο ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 15.6 µg/mL.

2.3.3. Παρασκευή προτύπων δειγμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου (QC) σε πλάσμα

Τα πρότυπα δείγματα βουσουλφάνης/εσωτερικού προτύπου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της βουσουλφάνης σε πλάσμα, παρασκευάζονται με εμβολιασμό καθαρού πλάσματος αίματος με συγκεκριμένο όγκο, από τα διαλύματα εργασίας βουσουλφάνης και εσωτερικού προτύπου.. Το πλάσμα που χρησιμοποιείται φυλάσσεται στον υπερκαταψύκτη στους -80°C και αποψύχεται κατά την ημέρα της ανάλυσης (το φυσιολογικό πλάσμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ευγενική χορηγία από τη μονάδα αιμοδοσίας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Σισμανόγλειο»).

Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα παρασκευάζεται μία καμπύλη αναφοράς η οποία, πέρα από τα πρότυπα δείγματα αναφοράς (working standards) περιλαμβάνει ένα λευκό δείγμα (blank sample, μόνο πλάσμα), ένα 'μηδενικό' δείγμα (zero sample, πλάσμα και εσωτερικό πρότυπο), και τρία δείγματα ελέγχου (quality control samples, QCs). Κάθε ένα από τα πρότυπα δείγματα αναφοράς και τα δείγματα ελέγχου παρασκευάζονται εις τριπλούν. Οι συγκεντρώσεις των τελικών δειγμάτων αναφοράς της βουσουλφάνης, ύστερα από αναγωγή σε μL καθαρού πλάσματος είναι 0.048, 0.096, 0.192, 0.576, 0,125, 2.88, 3.84 και 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου στο πλάσμα είναι 0.096, 0.576, 1.92 και 3.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο πλάσμα είναι 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Όλα τα δείγματα (πρότυπα, δείγματα ελέγχου και άγνωστα δείγματα ασθενών) επεξεργάζονται κατά τον ίδιο τρόπο πριν αναλυθούν. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η προκατεργασία που υφίστανται τα δείγματα.

2.3.4. Προκατεργασία δείγματος

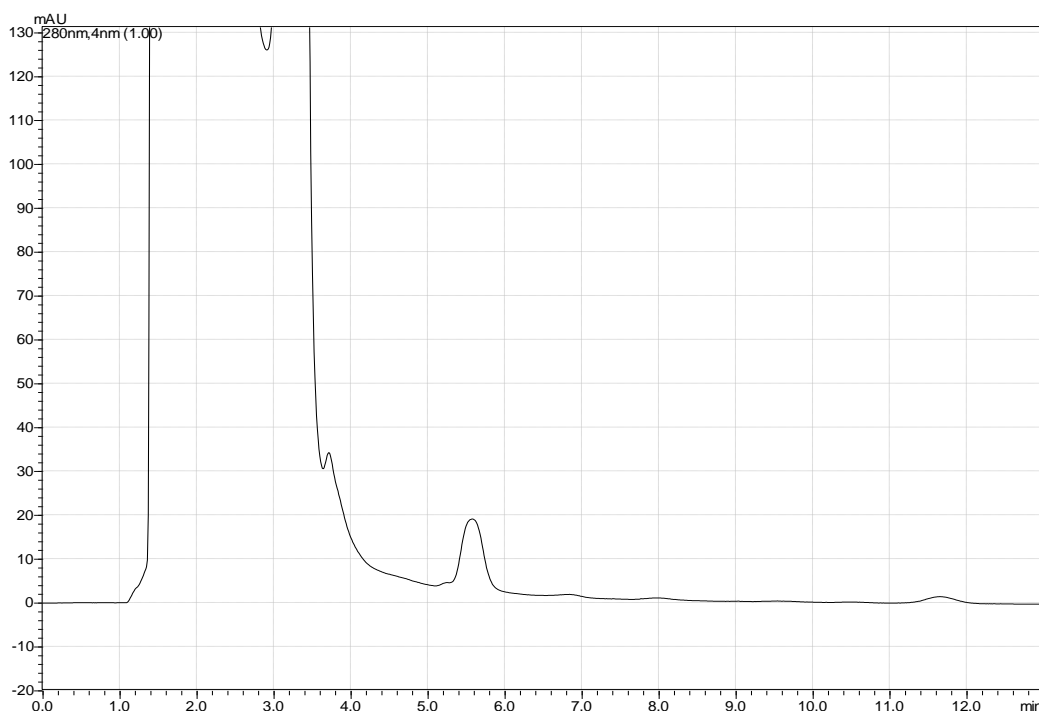
250 μL πλάσματος μεταφέρονται σε κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα χωρητικότητας 6 mL. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 μL διαλύματος εργασίας Βουσουλφάνης της εκάστοτε συγκέντρωσης ή 20 μL ακετονιτριλίου αν πρόκειται για άγνωστα δείγματα, 20 μL από το διάλυμα εργασίας εσωτερικού προτύπου και τα δείγματα υφίστανται γρήγορη ανάδευση με vortex. Ακολουθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, με προσθήκη 2 mL οξικού αιθυλεστέρα και ανάδευση με vortex για 30 sec. Μετά την ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 800 g, στους 0°C για 5 min. Στη συνέχεια ακολουθεί παραλαβή του υπερκείμενου, μεταφορά σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθήκη 100 μL αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης περιεκτικότητας 80 % β/ο. Το

διάλυμα αυτό εξατμίζεται μέχρι ξηρού και ακολουθεί η ανασύσταση με 100 μL μεθανόλη και 40 μL ενίονται στο σύστημα της HPLC

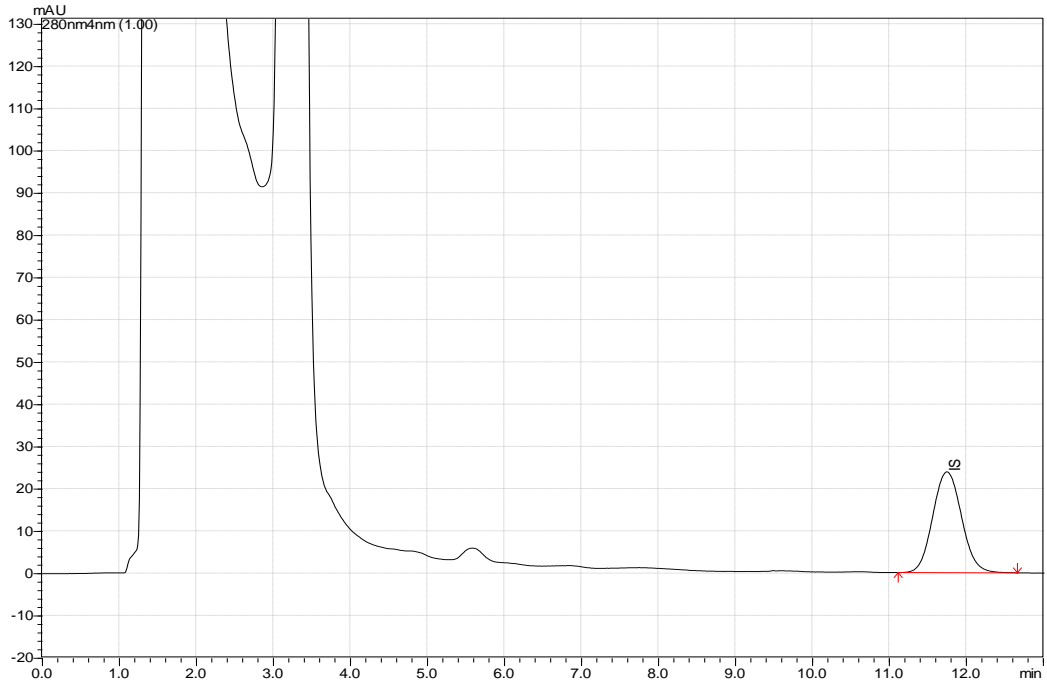
2.4. Αποτελέσματα παραμέτρων επικύρωσης

2.4.1. Εκλεκτικότητα

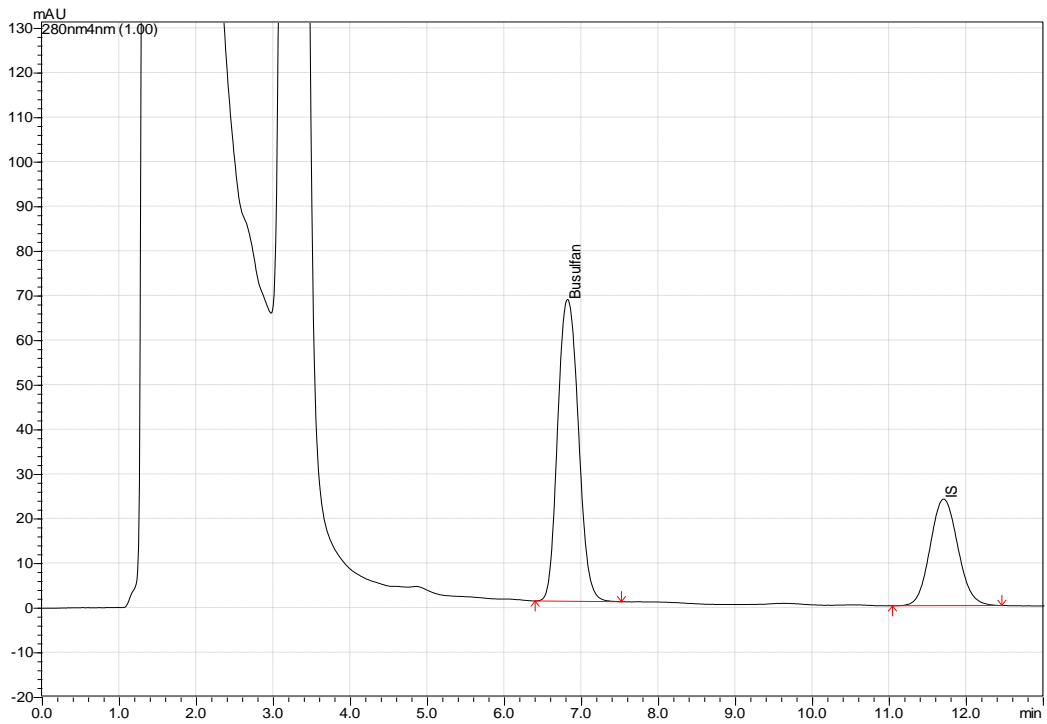
Η παρούσα αναλυτική μέθοδος αποδείχθηκε πλήρως εκλεκτική, καθώς επέτρεπε το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών, υπό την παρουσία και άλλων ενδογενών και μη, συστατικών στο βιολογικό δείγμα, όπως τα συστατικά της μήτρας του πλάσματος ή άλλα συγχορηγούμενα φάρμακα. Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων της επικύρωσης ελέγχθηκαν διάφορα είδη πλάσματος (περισσότερο από 8), πέραν του φυσιολογικού, όπως αιμολυμένο, λιπαιμικό και χολερυθρεμικό. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, υπήρξε ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου, ενώ παράλληλα δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδογενών συστατικών της μήτρας και των αναλυτών. Παράλληλα, κατά την ανάλυση και την ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων των ασθενών, ο διαχωρισμός των κορυφών ήταν εξίσου ικανοποιητικός και κανένα από τα ενδογενή συστατικά ή τα συγχορηγούμενα φάρμακα δεν επηρέασαν την κορυφή του BU και του IS. Στις **Εικόνα 2.1 - Εικόνα 2.5** που ακολουθούν, παρατίθενται ενδεικτικά χρωματογραφήματα, τα οποία αποδεικνύουν την εκλεκτικότητα της μεθόδου και τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των αναλυτών καθώς και φάσματα απορρόφησης UV της BU και του IS. Ο χρόνος ανάσχεσης του BU ήταν περίπου 6.8 min, ενώ για το IS ήταν περίπου στα 11.9 min. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης για κάθε δείγμα ήταν 13 min.



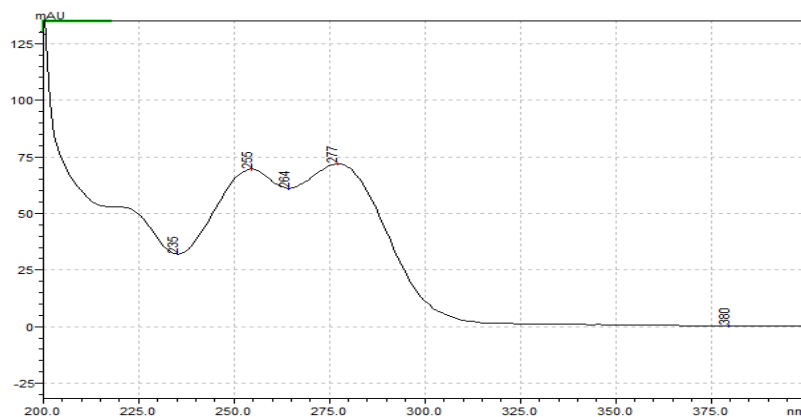
Εικόνα 2.1: Χρωματογράφημα λευκού δείγματος(πλάσμα).



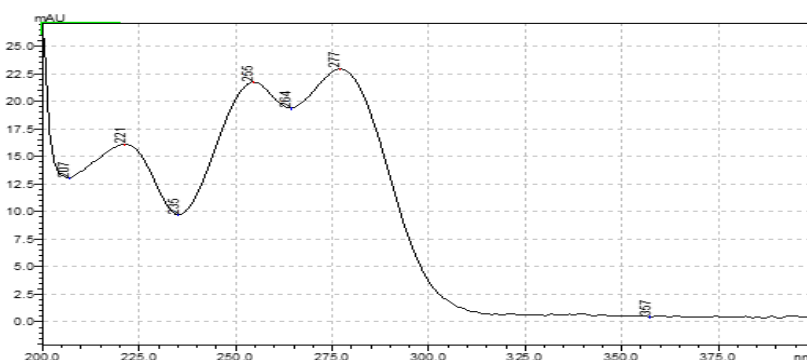
Εικόνα 2.2: Χρωματογράφημα μηδενικού δείγματος (πλάσμα + IS).



Εικόνα 2.3: Χρωματογράφημα δείγματος BU ($C_{BU}=2.88 \mu\text{g/mL}$) και IS ($C_{IS}= 1.248$) $\mu\text{g/mL}$.



Εικόνα 2.4: Φάσμα υπεριώδους Busulfan.



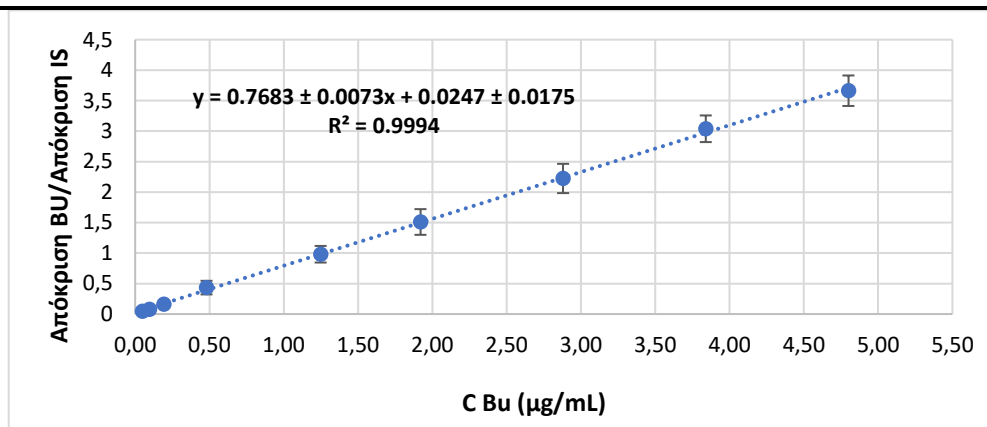
Εικόνα 2.5: Φάσμα υπεριώδους IS.

2.4.2. Γραμμικότητα

Παρασκευάστηκαν έξι (6) καμπύλες αναφοράς σε διάστημα έξι (6) ημερών (1 καμπύλη αναφοράς ανά ημέρα). Η καμπύλη αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του BU, περιλάμβανε εννιά (9) πρότυπα αναφοράς (calibration standards) εις τριπλούν, σε επίπεδα συγκεντρώσεων 0.048, 0.096, 0.0192, 0.576, 1.248, 1.920, 2.880, 3.840, 4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). Για κάθε καμπύλη υπολογίστηκε η κλίση (slope) και η τομή με τον άξονα των Y (intercept) με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες μέσες τιμές $\pm\text{SD}$. Κάθε καμπύλη αναφοράς εμπειρείχε ένα λευκό δείγμα (μόνο μήτρα), ένα μηδενικό δείγμα (μόνο εσωτερικό πρότυπο), ενώ παράλληλα συνοδευόταν από τέσσερα (4) δείγματα ελέγχου (QCs) συγκέντρωσης 0.096, 0.576, 1.920 και 3.840 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα. Παρακάτω δίνονται οι έξι καμπύλες αναφοράς, συνοδευόμενες από τις αντίστοιχες εξισώσεις και τους συντελεστές προσδιορισμού R^2 , όπως αυτά προέκυψαν μέσω της γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης.

Πίνακας 2.1: Τα στατιστικά δεδομένα για τις 6 καμπύλες βαθμονόμησης.

Καμπύλη Βαθμονόμησης	Κλίση (b)	S _b	Τομή (a)	S _a	R ²
1	0.7047	0.0082	0.0193	0.0197	0.999
2	0.957	0.0153	0.0197	0.0366	0.998
3	0.714	0.0167	0.0265	0.0401	0.996
4	0.688	0.0171	-0.0047	0.0409	0.996
5	0.854	0.0088	-0.0035	0.0213	0.999
6	0.703	0.0110	0.0296	0.0263	0.998



Εικόνα 2.6: Μέση καμπύλη βαθμονόμησης (n=6, κατασκευασμένες σε 6 διαφορετικές ημέρες). Παρουσιάζονται και οι τυπικές αποκλίσεις των αποκρίσεων

Στον Πίνακας 2.2 παρουσιάζονται τα εννέα επίπεδα συγκέντρωσης με τις αντίστοιχες αποκρίσεις. Ο αριθμός των δειγμάτων n ανά επίπεδο ήταν 6. Επιπλέον, παρουσιάζονται οι τυπικές αποκλίσεις και η ευαισθησία (y/x).

Πίνακας 2.2: Τα δεδομένα που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς.

C _{BU} (µg/mL)	Απόκριση BU /Απόκριση IS	Τυπική απόκλιση σήματος	Ευαισθησία (y/x)
0.048	0.046	0.008	0.961
0.096	0.076	0.008	0.790
0.192	0.161	0.015	0.841
0.576	0.434	0.112	0.753
1.248	0.981	0.136	0.786
1.920	1.510	0.211	0.786
2.880	2.224	0.323	0.772
3.846	3.039	0.442	0.791
4.832	3.663	0.538	0.763

2.4.2.1. Έλεγχος γραμμικότητας

Σε καθεμία από τις έξι καμπύλες αναφοράς πραγματοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης της παλινδρόμησης (one-way ANOVA). Μέσω της

ANOVA αποδεικνύεται η καταλληλότητα του γραμμικού μοντέλου να περιγράψει τα δεδομένα, ενώ παράλληλα εντοπίζεται ποιο ποσοστό από τη μεταβλητότητα της εξαρτημένης μεταβλητής (y) οφείλεται στην παλινδρόμηση και ποιο σε τυχαία σφάλματα. Για να ισχύει η γραμμική σχέση, πρέπει η κλίση της ευθείας να είναι σημαντικά διαφορετική από το μηδέν. Έτσι, ορίσθηκαν η μηδενική υπόθεση $H_0: b=0$ και η εναλλακτική υπόθεση $H_1: b \neq 0$.

Στον Πίνακα 2.3 που ακολουθεί δίνονται τα αποτελέσματα της ANOVA, για τη σύνολο των έξι καμπύλων αναφοράς.

Πίνακας 2.3: Μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης της καμπύλης αναφοράς

Πηγή διακύμανσης	df	SS	MS	F	F _{critical}	Significance F
Regression (Παλινδρόμηση)	1	14.69	14.69	11019.80	5.59	1.88 x 10 ⁻¹²
Residual (Υπόλοιπο)	7	0.009	0.001			
Total (Σύνολο)	8	14.70				

Έγινε σύγκριση μεταξύ της τιμής F , που υπολογίσθηκε από το λόγο MS_{REG}/MS_{RES} και της τιμής $F_{critical}$, όπως αυτή υπολογίσθηκε για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και $n-2$ βαθμούς ελευθερίας ($n=0$ αριθμός των παρατηρήσεων). Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του Πίνακα 2.3, η τιμή F ήταν πολύ μεγαλύτερη από την τιμή $F_{critical}$ ($F=11019.80 \gg F_{critical}=5.59$), με αποτέλεσμα να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση ($Significance F = 1.88 \times 10^{-12} \ll 0.05$) και να αποδειχθεί ότι η κλίση της ευθείας ήταν σημαντικά διαφορετική από το μηδέν. Ως εκ τούτου, το γραμμικό μοντέλο που επιλέχθηκε περιέγραφε ικανοποιητικά τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης (x) και του σήματος (y) και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 ($R^2=SS_{REG}/SS_{TOTAL}$) δήλωνε το % ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που μπορούσε να εξηγηθεί μέσω της παλινδρόμησης. Στην προκειμένη περίπτωση, το 99.93% της συνολικής διακύμανσης μπορούσε να αποδοθεί στην ύπαρξη γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ συγκέντρωσης-σήματος, ενώ το υπόλοιπο 0.07% οφειλόταν στο τυχαίο σφάλμα.

Παράλληλα, ο έλεγχος της καταλληλότητας του γραμμικού μοντέλου έγινε και μέσω της δοκιμασίας t -test δύο άκρων (για στάθμη εμπιστοσύνης 95%). Συγκεκριμένα, έγινε η σύγκριση της κλίσης της ευθείας b σε σχέση με το μηδέν και ορίσθηκαν η μηδενική ($H_0: b=0$) και η εναλλακτική υπόθεση ($H_1: b \neq 0$). Έγινε σύγκριση μεταξύ της τιμής t_{stat} , η οποία υπολογίσθηκε από το λόγο κλίση/ s_b και της τιμής $t_{critical}$, όπως αυτή υπολογίσθηκε για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και $n-2$ βαθμούς ελευθερίας. Η τιμή t_{stat} ήταν πολύ μεγαλύτερη από την τιμή $t_{critical}$ ($t_{stat}=188.53 \gg t_{critical}=1.83$), με αποτέλεσμα

να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση ($p\text{-value} = 1.88 \times 10^{-12} \ll 0.05$), να γίνει αποδοχή της εναλλακτικής υπόθεσης και να αποδειχθεί ότι η κλίση της ευθείας ήταν σημαντικά διαφορετική από το μηδέν.

Σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη ή μη συστηματικού σφάλματος και έγινε σύγκριση της τομής Y της ευθείας με το μηδέν. Έτσι, ορίστηκαν η μηδενική και η εναλλακτική υπόθεση: $H_0: a=0$ και $H_1: a \neq 0$. Μετά από σύγκριση των τιμών t_{stat} και t_{critical} , αποδείχθηκε πως ίσχυε η μηδενική υπόθεση ($t_{\text{stat}}=1.40 < t_{\text{critical}}=1.83$ / $p\text{-value}=0.20 \gg 0.05$), επομένως η τομή της ευθείας ήταν στατιστικώς ίση με το μηδέν και συνεπώς δεν υφίσταντο συστηματικό σφάλμα.

Πίνακας 2.4: Αποτελέσματα από την εφαρμογή της δοκιμασίας t-test.

	Coefficients	Standard Error	t_{stat}	p-value
Intercept	0.0247	0.0175	1.40	0.20
Slope	0.768	0.007	104.97	1.88×10^{-12}

2.4.3. Ανιχνευσιμότητα – Όριο ανίχνευσης (LOD) και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης και του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης έγινε με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο (signal to noise ratio, S/N). Έγινε σύγκριση των σημάτων λευκού δείγματος (θόρυβος) και δειγμάτων με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Έτσι, προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία ο αναλύτης μπορούσε να ανιχνευθεί ή να ποσοτικοποιηθεί αξιόπιστα. Λόγος σήματος προς θόρυβο μεταξύ 3:1 θεωρήθηκε αποδεκτός για την εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης. Αντίστοιχα, λόγος σήματος προς θόρυβο 10:1, θεωρήθηκε αποδεκτός για την εκτίμηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης. Έτσι, εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τύποι και υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης:

$$LOD = 3.3 \times \frac{S}{N} \quad \text{Εξίσωση 2.1}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{S}{N} \quad \text{Εξίσωση 2.2}$$

Για το BU, μετά την εφαρμογή των παραπάνω τύπων ισχύουν τα εξής για το κατώτερο όριο ανίχνευσης και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης:

$$LOD = 0.013 \pm 0.0014 \mu\text{g/mL} \quad \text{και} \quad LLOQ = 0.047 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}.$$

Εκτιμώντας τα ανωτέρω αποτελέσματα, υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα εμβολιασμένου δείγματος με συγκέντρωση BU 0.048 $\mu\text{g/mL}$. Έγινε εμβολιασμός 15

προτύπων δειγμάτων, σε μήτρα πλάσματος και αναλύθηκαν εντός της ίδιας εργαστηριακής ημέρας ακολουθώντας όλη την αναλυτική διαδικασία. Κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης βάσει της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων και υπολογίσθηκε η % τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων και το % σχετικό σφάλμα. Στον Πίνακα 2.5 που ακολουθεί παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από τα 20 εμβολιασμένα δείγματα BU.

Πίνακας 2.5: Εκτίμηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης με υπολογισμό της επαναληψιμότητας σε επίπεδο συγκέντρωσης 0.48 µg/mL.

Συγκέντρωση BU 0.048 µg/mL		
Εμβολιασμένο δείγμα	Συγκέντρωση BU (µg/mL)	E_r%
1	0.0470	-2.1
2	0.0450	-6.3
3	0.0407	-15.3
4	0.0481	0.2
5	0.0470	-2.1
6	0.0530	10.4
7	0.0461	-4.0
8	0.0448	-6.6
9	0.0510	6.2
10	0.0470	-2.1
11	0.0490	2.1
12	0.0468	-2.5
13	0.0450	-6.3
14	0.0450	-6.3
15	0.0442	-8.0
Mean	0.047	Mean Error
Standard deviation	0.003	-2.8%
RSD%	6.3	

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η πιστότητα όσο και η ακρίβεια σε αυτό το επίπεδο συγκέντρωσης ήταν ικανοποιητικά και εντός των προκαθορισμένων ορίων (<20%) επομένως το επίπεδο συγκέντρωσης 0.048 µg/mL μπορεί να θεωρηθεί ως το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου για το BU.

2.4.4. Πιστότητα (Επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα)

Ο έλεγχος της πιστότητας έγινε με την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας και της ενδιάμεσης πιστότητας και εκφράζει τη συμφωνία του

μέσου όρου των πειραματικών τιμών μετά από πολλαπλή ανάλυση του ίδιου δείγματος και εκφράζεται με τον όρο % τυπική απόκλιση (CV% ή RSD%), σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%RSD = \frac{\text{standard deviation of the concentration}}{\text{average concentration}} \times 100 \quad \text{Εξίσωση 2.3}$$

Στον Πίνακα 2.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα ελέγχου ανά ημέρα. Η ενδιάμεση πιστότητα υπολογίστηκε με one way ANOVA.

Πίνακας 2.6: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων που επιτευχθήκαν για κάθε επίπεδο ελέγχου. Δίνονται οι πειραματικές τιμές της συγκέντρωσης, η μέση τιμή και η σχετική τυπική απόκλιση RSD%.

Χαμηλό δείγμα ελέγχου, Συγκέντρωση: 0.97 µg/mL							
Ημέρα	Παρασκευή 1	Παρασκευή 2	Παρασκευή 3	C _{mean}	SD	RSD%	Mean % RE
1	0.099	0.095	0.104	0.099	0.0045	4.5	2.8
2	0.096	0.099	0.092	0.096	0.0035	3.7	-1.0
3	0.093	0.099	0.100	0.097	0.0038	3.9	0.7
4	0.102	0.104	0.096	0.101	0.0042	4.1	4.2
5	0.092	0.096	0.092	0.093	0.0023	2.5	-3.4
6	0.099	0.095	0.104	0.099	0.0045	4.5	2.8
Μεσαίο δείγμα ελέγχου, Συγκέντρωση: 0.58 µg/mL							
Ημέρα	Παρασκευή 1	Παρασκευή 2	Παρασκευή 3	C _{mean}	SD	RSD%	Mean % RE
1	0.553	0.556	0.570	0.560	0.009	1.6	-3.5
2	0.580	0.593	0.601	0.591	0.010	1.7	1.9
3	0.595	0.590	0.589	0.591	0.003	0.5	2.0
4	0.579	0.582	0.583	0.581	0.002	0.4	0.3
5	0.596	0.597	0.585	0.593	0.007	1.1	2.2
6	0.601	0.603	0.585	0.596	0.010	1.7	2.8
Μεσαίο δείγμα ελέγχου, Συγκέντρωση: 1.93 µg/mL							
Ημέρα	Παρασκευή 1	Παρασκευή 2	Παρασκευή 3	C _{mean}	SD	RSD%	Mean % RE
1	1.850	1.902	1.870	1.874	0.026	1.4	-3.0
2	1.790	1.95	1.850	1.863	0.081	4.3	-3.6
3	1.990	1.92	2.001	1.970	0.044	2.2	1.9
4	2.090	1.96	1.97	2.007	0.072	3.6	3.8
5	1.992	1.89	2.07	1.984	0.090	4.5	2.6
6	1.997	1.89	1.96	1.949	0.054	2.8	0.8
Υψηλό δείγμα ελέγχου, Συγκέντρωση: 3.87 µg/mL							
Ημέρα	Παρασκευή 1	Παρασκευή 2	Παρασκευή 3	C _{mean}	SD	RSD%	Mean % RE
1	3.640	3.890	3.970	3.833	0.172	4.5	-0.8
2	3.780	3.865	3.922	3.55	0.071	1.8	-0.3
3	3.970	3.980	3.783	3.910	0.113	2.9	1.1
4	3.690	3.970	3.883	3.847	0.143	3.7	-0.5
5	3.840	3.891	3.981	3.903	0.071	1.8	1.0
6	3.978	3.930	3.822	3.909	0.081	2.1	1.1

Στον Πίνακα 2.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα.

Πίνακας 2.7: Η πιστότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα.

	Δείγμα ελέγχου			
	Χαμηλό QC (0.096 µg/mL)	Μεσαίο QC (0.576 µg/mL)	Μεσαίο QC (1.92 µg/mL)	Υψηλό QC (3.84 µg/mL)
Ενδοεργαστηριακή πιστότητα %RSD	4.2	2.4	4.0	2.6
Μεταξύ εργαστηριακών ημέρων πιστότητα (RSD%)	6.3	3.2	4.7	2.3

2.4.5. Ακρίβεια

Στον Πίνακα 2.8 συνοψίζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ακρίβειας. Όπως παρατηρείται, η εντός ημέρας ακρίβεια κυμαίνεται μεταξύ 96.5% - 102.8% (%Er κυμαίνεται από -3.5% – 2.8%) - στα δείγματα ελέγχου, ενώ στο όριο ποσοτικοποίησης το % Er είναι -2.8%. Η μεταξύ ημερών ακρίβεια κυμαίνεται μεταξύ 100.3% και 101.0% (%Er κυμαίνεται από 0.3% – 1.0%).

Πίνακας 2.8: Η ακρίβεια της μεθόδου εκφρασμένη ως εντός ημέρας ακρίβεια και μεταξύ ημερών ακρίβεια.

	Δείγμα ελέγχου			
	Χαμηλό QC (0.096 µg/mL)	Μεσαίο QC (0.576µg/mL)	Μεσαίο QC (1.92µg/mL)	Υψηλό QC (3.84µg/mL)
Ενδοεργαστηριακή Ακρίβεια	102.8 %Er: 2.8	96.5 %Er: -3.5	97.0 %E: -3.0	99.2 %E: -0.8
Μεταξύ εργαστηριακών ημέρων Ακρίβεια	101.0 %Er: 1.0	101.0 %Er: 1.0	100.4 %Er: 0.4	100.3 %Er: 0.3

2.4.6. Ανάκτηση

Ο έλεγχος της ανάκτησης έγινε μέσω των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, 2 μεσαία και υψηλό). Έγινε σύγκριση μεταξύ των εμβαδών των δειγμάτων που αρχικά είχαν υποστεί εμβολιασμό με αναλύτη και στη συνέχεια κατεργασία (υγρή-υγρή εκχύλιση, καταβύθιση πρωτεϊνών) και των δειγμάτων που αρχικά είχαν υποστεί κατεργασία και στη συνέχεια εμβολιασμό με αναλύτη. Η % ανάκτηση από την εκχύλιση, για την προσδιοριζόμενη ουσία, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{[\text{spiked analyte peak area}]_{\text{after extraction}}}{[\text{spiked analyte peak area}]_{\text{before extraction}}} \times 100 \quad \text{Εξίσωση 2.4}$$

Κάθε επίπεδο συγκέντρωσης αναλύθηκε εις τριπλούν, εντός της ίδιας εργαστηριακής ημέρας και στη συνέχεια έγινε ο υπολογισμός της συνολικής ανάκτησης και του συντελεστή μεταβλητότητας (CV% ή RSD%). Στην περίπτωση του εσωτερικού προτύπου, ο έλεγχος της ανάκτησης έγινε σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης, που αντιστοιχούσε σε αυτό του διαλύματος εργασίας. Στον Πίνακα 2.9 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα ποσοστά της εκχύλισης του BU, και του εσωτερικού προτύπου.

Πίνακας 2.9: Ανάκτηση BU και του εσωτερικού προτύπου.

	Δείγμα ελέγχου			
	Χαμηλό	Μεσαίο	Μεσαίο	Υψηλό
Μέση Ανάκτηση (RSD%)	99.3 (5.5)	99.2 (5.2)	94.5 (0.7)	91.8 (5.3)
Ανάκτηση IS	94.8 (6.0)			

Με βάση τις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες για την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων, δεν υπάρχουν καθορισμένα αποδεκτά όρια στα οποία πρέπει να κυμαίνεται η ανάκτηση ενός αναλύτη. Ως εκ τούτου, η ανάκτηση ενός αναλύτη σε μια βιολογική μήτρα δεν είναι απαραίτητο να αγγίζει το 100% αλλά πρέπει να είναι σταθερή, ακριβής και επαναλήψιμη. Γενικά, οι υψηλές τιμές ανάκτησης αποδεικνύουν ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία, από μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα, ενώ παράλληλα τιμές $RSD\% < 20\%$ αποδεικνύουν την σταθερότητα και την επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου. Με βάση τα παραπάνω, η ανάκτηση της μεθόδου θεωρήθηκε ικανοποιητική για τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο.

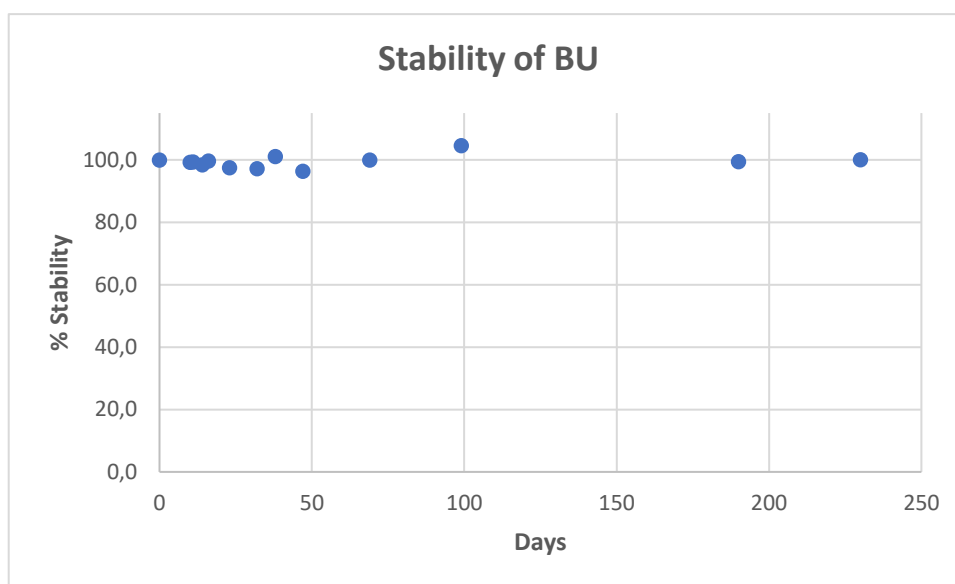
2.4.7. Σταθερότητα

Η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης ελέγχθηκε μέσω των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου, σε συνθήκες μακράς φύλαξης αυτών και μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης των διαλυμάτων. Συγκεκριμένα, μετά από κάθε κύκλο ψύξης-απόψυξης, καθαρή μήτρα πλάσματος εμβολιαζόταν με αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με αυτή του μεσαίου δείγματος ποιοτικού ελέγχου και η απόκριση (C_{stock}) που λαμβανόταν κάθε φορά συγκρινόταν με την αντίστοιχη απόκριση που ελήφθηκε για το δείγμα την πρώτη ημέρα παρασκευής του διαλύματος παρακαταθήκης ($C_{initial}$). Κατά τη φάση της απόψυξης, το διάλυμα παρακαταθήκης παρέμενε σε

θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 έως 45 min και μέχρι να γίνει η επόμενη απόψυξη μεσολαβούσαν τουλάχιστον 24 ώρες ψύξης στους -20°C .

Πίνακας 2.10: Συγκεντρώσεις δειγμάτων ελέγχου του BU και της μετά από κάθε κύκλο ψύξης-απόψυξης.

Days	C($\mu\text{g/mL}$)	Stability (%)
0	1.97	100.0
10	1.96	99.3
11	1.95	99.4
14	1.93	98.5
16	1.95	99.7
23	1.91	97.5
32	1.90	97.2
38	1.98	101.1
47	1.89	96.4
69	1.96	100.0
99	2.05	104.6
190	1.95	99.5
230	1.95	100.1

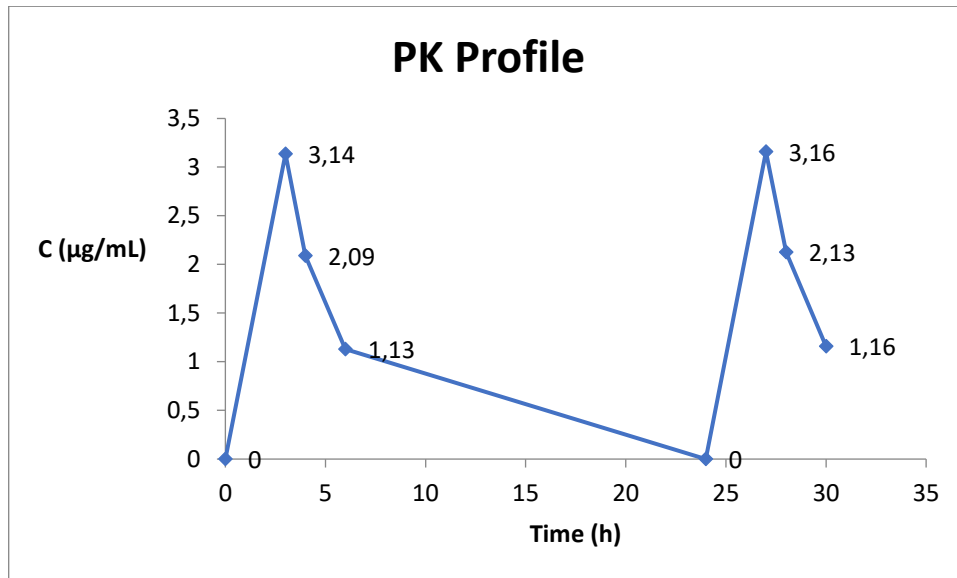


Εικόνα 2.7: Διάγραμμα σταθερότητας BU.

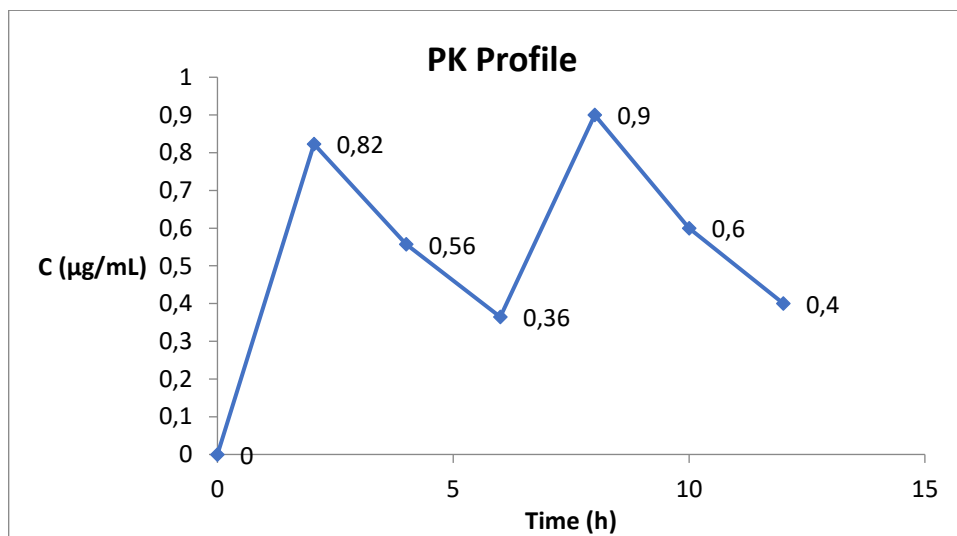
2.4.8. Εφαρμογή ενδεικτική ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινου πλάσματος στο πλαίσιο Φαρμακοκινητικής μελέτης

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της μεθόδου να ποσοτικοποιεί το BU σε πραγματικά δείγματα πλάσματος αίματος ανθρώπου, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση αγνώστων δειγμάτων πλάσματος σε ασθενείς που έχει χορηγηθεί BU τόσο σε δόση

0.8mg/kg ανά 6 h για τέσσερις μέρες όσο και για δόση ίση με 3.2mg/kg ημερησίως για τέσσερις μέρες. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ΦΚ προφίλ 2 ασθενών.



Εικόνα 2.8: Το ΦΚ προφίλ μετά από χορήγηση 3.2mg/kg για 2 ημέρες



Εικόνα 2.9: Το ΦΚ προφίλ μετά από χορήγηση 0.8 mg/kg για 2 δόσεις.

2.5. Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC για την μέτρηση των επιπέδων του Bu σε πλάσμα αίματος. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία και να είναι πλήρως εφαρμόσιμη για TDM σε παιδιατρικούς ασθενείς, όπου απαιτείται ποσοτικοποίηση σε μικρούς όγκος πλάσματος με χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης.

Η νέα μέθοδος που αναπτύχθηκε επικυρώθηκε πλήρως σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες που έχουν εκδώσει ο FDA και ο EMA σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων^[116,117]. Κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου μελετήθηκαν χαρακτηριστικά ποιότητας όπως η εκλεκτικότητα/ειδικότητα, η ανιχνευσιμότητα (η οποία περιλαμβάνει το όριο ανίχνευσης και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης), η καμπύλη βαθμονόμησης-γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα, η ανάκτηση, η σταθερότητα και η ανθεκτικότητα. Η μέθοδος αποδείχθηκε πλήρως εκλεκτική και ακριβής με τις τιμές τις εντός- και μεταξύ- εργαστηριακών ημερών ακρίβειας και πιστότητας να μην ξεπερνούν το 6.3%.

Έτσι, η παραπάνω μέθοδος χαρακτηρίζεται από την παροχή γρήγορων και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων με ευαισθησία, ακρίβεια και σχετικά μικρό κόστος. Μετά την επικύρωσή της, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση και την ποσοτικοποίηση δειγμάτων πλάσματος σε παιδιατρικούς ασθενείς, που είχαν λάβει i.v. Bu και εφαρμόστηκε TDM όπως θα αναφερθεί διεξοδικά στο **Κεφάλαιο 4**. Όλες οι μετρούμενες συγκεντρώσεις, για όλους τους ασθενείς βρίσκονταν εντός του εύρους της καμπύλης.

Κεφάλαιο 3 - Μελέτη του χρόνου υστέρησης της ενδοφλέβιας έγχυσης της βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς

3. Εισαγωγή

Η ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων από αντλίες σύριγγας μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικό χρόνο υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος καθώς και επίτευξης σταθερών επιπέδων έγχυσης, όταν χρησιμοποιείται πολύ χαμηλή ροή ("μικροέγχυση"). Η βουσουλφάνη χορηγείται σε δίωρη "μικροέγχυση" σε παιδιατρικούς ασθενείς με δόση από 0.8 -1.2 mg/kg ανάλογα με το βάρος του ασθενούς όπως φαίνεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .

3.1. Επίδραση του χρόνου υστέρησης στην εξατομίκευση της δόσης σε φάρμακα στενού Θεραπευτικού Εύρους (ΘΕ)

Η έγχυση φαρμάκων με χαμηλό ρυθμό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του lagtime (χρόνου υστέρησης εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος) η οποία μπορεί να επηρεάσει αισθητά τον υπολογισμό της AUC αν δε ληφθεί υπόψη. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε φάρμακα με στενό ΘΕ για τα οποία η εξατομίκευση της δόσης γίνεται θεωρώντας ότι ακολουθούν γραμμική φαρμακοκινητική με χρήση της υπολογιζόμενης AUC. Επομένως, σε περιπτώσεις που χρειάζεται η ρύθμιση της δόσης με βάση την AUC θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

Στην περίπτωση έγχυσης του Busilvex® σε παιδιατρικούς ασθενείς, η εξατομίκευση της δόσης γίνεται με βάση την υπολογιζόμενη, με τη μέθοδο των τραπεζίων, τιμή της AUC. Συγκεκριμένα το Busilvex® σε παιδιατρικούς ασθενείς χορηγείται σε 5 διαφορετικές δόσεις ανά βάρος σώματος ανάλογα με το πραγματικό βάρος του ασθενούς (actual body weight ABW). Για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνονται δείγματα στους χρόνους: πριν την έγχυση (0 h), αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης, και 30 min, 1 h, και ~2-3 h μετά το τέλος της έγχυσης. Ο υπολογισμός της AUC γίνεται με τη μέθοδο των τραπεζίων όπως προτείνεται και στο SPC (μονογραφία προϊόντος για παιδιά) του φαρμάκου^[104]. Κατά την χορήγηση χρησιμοποιούνται διατάξεις όπως αυτή της **Εικόνα 3.1**, που μπορεί να οδηγήσουν σε υστέρηση του χρόνου εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος (lagtime), και είναι πιθανό να έχουμε απόκλιση στην υπολογιζόμενη τιμή της AUC εάν δεν τον λάβουμε υπόψη που μπορεί να επηρεάσει την εξατομίκευση της δόσης ιδιαίτερα όταν η υπολογιζόμενη τιμή της AUC είναι κοντά στα όρια του ΘΕ (900-1500 $\mu\text{M}\times\text{min}$)^[104].

Σύμφωνα με το SPC^[104], η ολική AUC για την πρώτη δόση υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την **Εξίσωση 3.1α** ενώ μετά την πρώτη δόση υπολογίζεται με την **Εξίσωση 3.1β**.

$$AUC_{total} = AUC_{0-2} + AUC_{2-2.30} + AUC_{2.5-3} + AUC_{3-6} + AUC_{6-\infty}$$

Εξίσωση 3.1

$$AUC_{total} = \frac{C_{max} * (t_2 - t_0)}{2} + \frac{(C_{max} + C_2) * (t_{2.5} - t_2)}{2} + \frac{(C_3 + C_{2.5}) * (t_3 - t_{2.5})}{2} + \frac{(C_3 + C_6) * (t_6 - t_3)}{2} + \frac{C_6}{k_{el}}$$

Εξίσωση 3.1α

$$AUC_{total} = \frac{C_{max} * (t_2 - t_{lagtime} - t_0)}{2} + \frac{(C_{max} + C_2) * (t_{2.5} - t_2)}{2} + \frac{(C_3 + C_{2.5}) * (t_3 - t_{2.5})}{2} + \frac{(C_3 + C_6) * (t_6 - t_3)}{2} + \frac{C_6}{k_{el}}$$

Εξίσωση 3.1β

$$AUC_{total} = AUC_{0-2} + AUC_{2-2.30} + AUC_{2.5-3} + AUC_{3-6}$$

Εξίσωση 3.2

$$AUC_{total} = \frac{C_{trough} C_{max} * (t_2 - t_0)}{2} + \frac{(C_{max} + C_2) * (t_{2.5} - t_2)}{2} + \frac{(C_3 + C_{2.5}) * (t_3 - t_{2.5})}{2} + \frac{(C_3 + C_6) * (t_6 - t_3)}{2}$$

Εξίσωση 3.2.α

$$AUC_{total} = \frac{C_{trough} C_{max} * (t_2 - t_{lagtime} - t_0)}{2} + \frac{(C_{max} + C_2) * (t_{2.5} - t_2)}{2} + \frac{(C_3 + C_{2.5}) * (t_3 - t_{2.5})}{2} + \frac{(C_3 + C_6) * (t_6 - t_3)}{2}$$

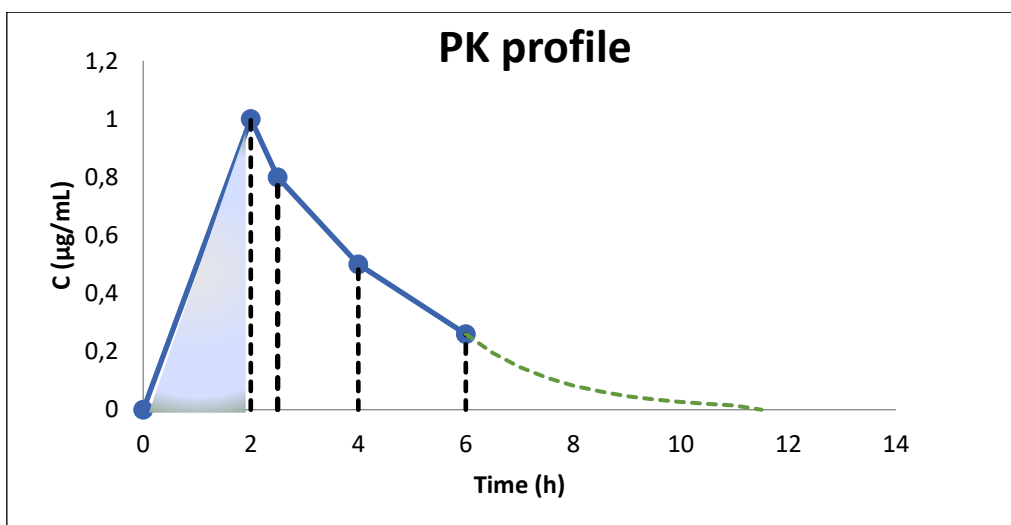
Εξίσωση 3.2.β

Έστω ένας ασθενής με βάρος 35 kg που του χορηγείται δόση Busilvex® 0.8 mg/kg με έγχυση που διαρκεί 2 h. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται πριν τη χορήγηση (αμέσως πριν την έναρξη της έγχυσης), 2 h (αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης), 2.5 h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης), 4h (2 ώρες μετά το τέλος της έγχυσης) και 6 h (4 ώρες μετά το τέλος της έγχυσης) που αντιστοιχούν σε πραγματικούς χρόνους: 13:00 pre dose, 15:00, 15:30, 17:00 και 19:00 αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν είναι: 0, 1.2, 1.0, 0.8 και 0.5 µg/mL, για τους αντίστοιχους χρόνους όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.1**).

Πίνακας 3.1: Δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου δειγματοληψίας (πραγματικού και θεωρητικού) για έναν ασθενή βάρους 35 kg.

Time	Actual time of Sample Collection	Nominal Time (h)	C (µg/mL)
t ₁	13:00	0	0
t ₂	15:00	2	1.0
t ₃	15:30	2.5	0.8
t ₄	17:00	4	0.5
t ₅	19:00	6	0.26

Για τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το παρακάτω ΦΚ προφίλ (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Φαρμακοκινητικό προφίλ ασθενούς μετά από δίωρη έγχυση i.v. Busilvex®.

Για τον υπολογισμό της ολικής AUC θα πρέπει να αθροίσουμε τα εμβαδά: του αρχικού τριγώνου (AUC₀₋₂), των τραπεζιών (AUC_{2-2.30}, AUC_{2.30-4}, AUC₄₋₆) και το εμβαδό του τριγώνου που δημιουργείται από το τελικό σημείο έως το άπειρο (τομή με τον άξονα των X, AUC_{6-∞}). Κατά συνέπεια, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Υπολογιζόμενες τιμές μερικών AUC και ολικής AUC.

AUC (µg*min*mL ⁻¹)	AUC ₀₋₂	AUC _{2-2.30}	AUC _{2.30-4}	AUC ₄₋₆	AUC _{6-in}	AUC _{total} µg*min*mL ⁻¹	AUC _{total} µM*min
	1	0.45	0.975	0.760	0.785	3.97	967.1

Ωστόσο, θα πρέπει να διερευνηθεί πως επηρεάζεται η τιμή της AUC όταν στη διάταξη της Εικόνα 3.1 υπάρχει καθυστέρηση της τάξης των 10, 20 και 30 min από την έναρξη της έγχυσης έως την είσοδο του φαρμάκου στον οργανισμό και την εμφάνιση στη γενική κυκλοφορία του αίματος.

Κατά συνέπεια, για το ίδιο δειγματοληπτικό σχήμα, στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διαφορές στους χρόνους που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την κατασκευή του διαγράμματος συγκέντρωσης-χρόνου (**Πίνακας 3.3**)

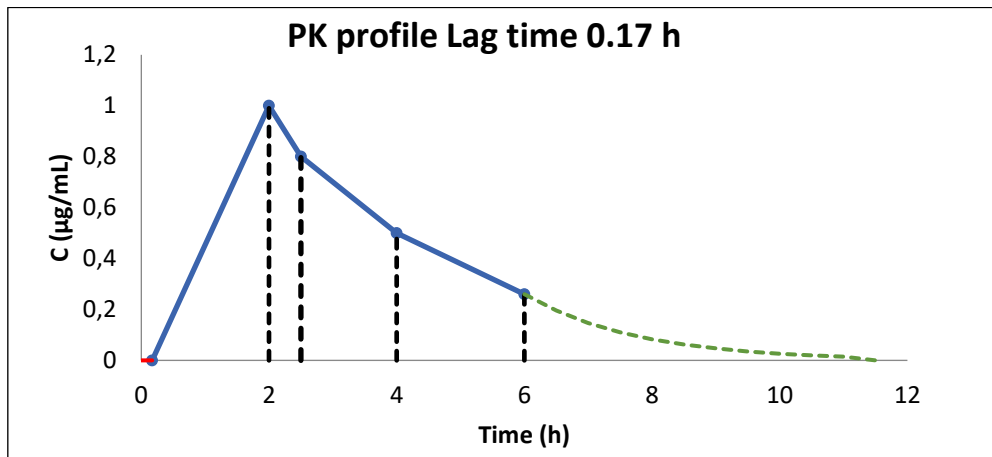
Πίνακας 3.3: Δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου δειγματοληψίας (πραγματικού και θεωρητικού) για έναν ασθενή για τρία επίπεδα χρόνου υστέρησης.

Time	Actual time of Sample Collection	Nominal time (h)				C (μg/mL)
		No Lag-time	10 min Lag-time	20 min Lagtime	30 min Lag-time	
t1	13:00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t2	15:00	2.000	1.833	1.667	1.500	1.000
t3	15:30	2.500	2.333	2.167	2.000	0.800
t4	17:00	4.000	3.833	3.667	3.500	0.500
t5	19:00	6.000	5.833	5.667	5.500	0.260

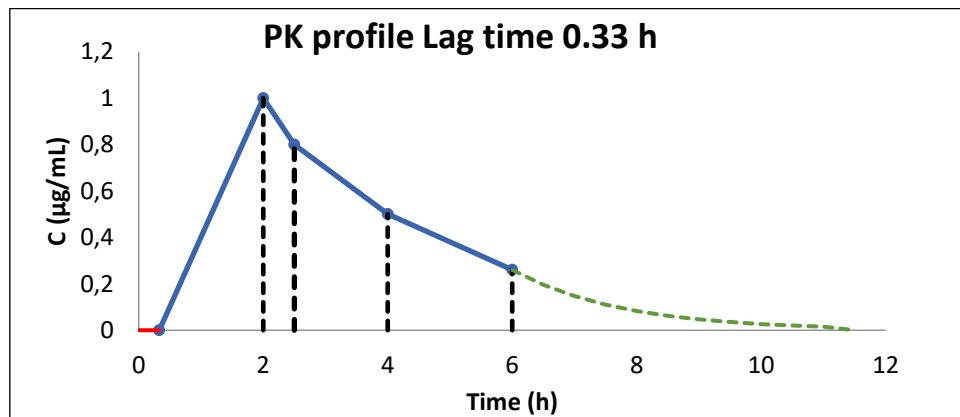
Συμπεραίνουμε ότι για τα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης και λαμβάνοντας υπόψη το κάθε lag-time, προκύπτουν διαφορετικά AUC ανά περίπτωση όπως φαίνεται στον **Πίνακας 3.4** Παρατηρείται ότι για μικρό lag-time (10 min) ο υπολογισμός της AUC δεν επηρεάζεται αισθητά ενώ όσο αυξάνεται το lag-time τόσο μειώνεται η υπολογιζόμενη τιμή της AUC όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.2**.

Πίνακας 3.4: Υπολογιζόμενες τιμές AUC λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος.

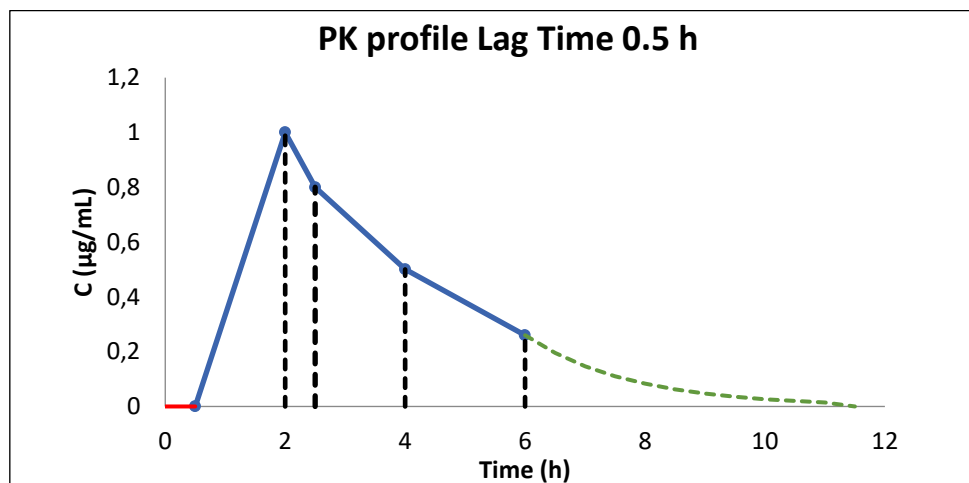
Lag time (min)	Μηδενικό	10 min	20 min	30 min
AUC ₀₋₂	1	0.917	0.833	0.750
AUC _{2-2.30}	0.450	0.450	0.450	0.450
AUC _{2.30-4}	0.975	0.975	0.975	0.975
AUC ₄₋₆	0.760	0.760	0.760	0.760
AUC _{6-inf}	0.785	0.785	0.785	0.785
AUC _{total} μg×min×mL ⁻¹	3.97	3.89	3.80	2.94
AUC _{total} μM×min	967.1	946.8	926.5	906.2



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 10 min.



Εικόνα 3.3: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 20 min.



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση μετρούμενης συγκέντρωσης-χρόνου για IV έγχυση διάρκειας 2 h με χρόνο υστέρησης 30 min.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζονται τα φαρμακοκινητικά προφίλ για χρόνο υστέρησης 10 min (0.17 h), 20 min (0.33 h) και 30 min (0.5 h). Η κόκκινη οριζόντια γραμμή είναι ο χρόνος υστέρησης, κάτω από τη μπλε γραμμή είναι η AUC

όπως υπολογίζεται με τη μέθοδο των τραπεζίων και κάτω από τη διακεκομμένη γραμμή είναι η AUC του τριγώνου που σχηματίζεται με επέκταση της καμπύλης από το τελικό σημείο έως το άπειρο (τομή με άξονα X).

3.2. Πειραματική Μεθοδολογία

Για τη διερεύνηση του χρόνου υστέρησης εισόδου του busulfan στη γενική κυκλοφορία του αίματος, κατά τη χορήγηση Busilvex®, σε παιδιατρικούς ασθενείς με τη χρήση αντλίας σύριγγας, προσομοιώθηκαν εγχύσεις σαν αυτές που πραγματοποιούνται στην κλινική πράξη για κάθε κατηγορία βάρους. Στην κλινική πράξη η έγχυση του Busilvex® σε παιδιατρικούς ασθενείς διαρκεί περίπου 2 h. Ωστόσο, μετά το τέλος της έγχυσης (2 h) υπολείπονται κάποια mL φαρμάκου μέσα στο σύστημα της διάταξης και ακολουθεί έκπλυση με τον ίδιο ρυθμό έγχυσης με φυσιολογικό ορό NaCl 0.9 %. Ο χρόνος έκπλυσης καθορίζεται από το ρυθμό έγχυσης (Flow) και από τον όγκο που παραμένει στη διάταξη (Volume). συμφωνά με την παρακάτω εξίσωση.

$$Time (h) = \frac{Volume (mL)}{Flow (mL / h)}$$

Εξίσωση 3.3

Ο όγκος του μέσου έκπλυσης εξαρτάται από το αν το φάρμακο έχει τοποθετηθεί σε σύριγγα ή ασκό. Στην περίπτωση που το φάρμακο έχει τοποθετηθεί σε σύριγγα ο όγκος του μέσου έκπλυσης είναι 15 mL ενώ στην περίπτωση που έχει τοποθετηθεί σε ασκό ο όγκος του μέσου έκπλυσης είναι 20 mL.

3.2.1. Κατηγορίες Δόσεων ανά βάρος

Η έγχυση του Busilvex® μελετήθηκε για κάθε δοσολογική κατηγορία όπως αναφέρεται στο SPC^[104] του φαρμάκου με βάση το σωματικό βάρος των ασθενών. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Για κάθε δοσολογική κατηγορία παρασκευάστηκαν διαλύματα Busilvex® προς έγχυση σύμφωνα με την προτεινόμενη, βάσει του SPC δόση του φαρμάκου (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5: Προτεινόμενη σύμφωνα με το SPC του φαρμάκου κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς.

Κατηγορία	Μάζα σώματος (BW/BΣ)	Προτεινόμενη Δόση σύμφωνα με το SPC (mg/kg)
1	BW < 9 kg	1.0
2	9-16 kg	1.2
3	16-23 kg	1.1
4	23-34 kg	0.95
5	BW > 34kg	0.8

3.2.2. Οργανολογία και Αναλώσιμα

- Αντλία HOSPIRA Plum A+ Pump i.v. Infusion & Abbott LIFECARE® 5000 infusion system.
- Plumset της εταιρείας LIFESKIELD™.
- Primary Plumset™, 15 micron filter in sight chamber, pre-pierced Y-site 272cm/19 mL.
- Βαλβίδες διασποράς, που συνδέονται μεταξύ κασέτας και σύριγγας ICU Medical, Inc, Spinning Spiros® closed Luer, Red Cap.
- Συσκευή προέκτασης για ασφαλή εμπλουτισμό κυτταροστατικών διαλυμάτων 41 cm (16") Appx 2.7mL, PUR ExtSet w/ Y-calve®, Spike, BCV, Luer Lock..
- Busilvex® 6 mg/mL concentrate solution for infusion Pierre Fabre.
- Σύριγγα Απυρογενής PF® 60 mL.
- Σύριγγα Sterile R 20 mL.
- Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9% 250 mL (DEMO ABEE).
- Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9% 100 mL (Drandex).
- Ασκός, Baxter 1000cc NaCl 0.9%.

3.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων

Η παρασκευή διαλυμάτων Busilvex® έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του SPC (*User guide page 8, Product Monograph in Children*) όπως αναφέρεται στη παρακάτω διαδικασία.

Το Busilvex® πρέπει να αραιώνεται πριν από τη χρήση με διάλυμα για έγχυση

- είτε 0.9% χλωριούχο νάτριο
- είτε 5% γλυκόζη.

3.2.4. Ποσότητα βουσουλφάνης και όγκος Busilvex® που λαμβάνεται από την εμπορική συσκευασία των 6 mg/mL

Η ποσότητα (Q σε mg) της βουσουλφάνης που χορηγείται στον ασθενή υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση:

$$Q (mg) = Y * D$$

Εξίσωση 3.4

όπου Y (kg) το πραγματικό βάρος σώματος (ABW) του ασθενούς και D (mg/kg) η δόση του Busilvex® σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του **Πίνακας 3.4**.

Για την παρασκευή του διαλύματος που θα περιέχει την παραπάνω ποσότητα (Q) θα πρέπει να ληφθεί όγκος Busilvex® (A) από την εμπορική συσκευασία των 6 mg/mL ο οποίος υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$A = \frac{Q}{6 \text{ (mg/ml)}}$$

Εξίσωση 3.5

Το παραπάνω διάλυμα θα πρέπει να αραιωθεί με κατάλληλο αραιωτικό μέσο (NaCl 0.9% ή γλυκόζη 5%) διασφαλίζοντας ότι η τελική συγκέντρωση Busilvex® παραμένει 0.5 mg/mL. Ο όγκος του μέσου αραιώσης (B) είναι 10 φορές ο όγκος του Busilvex® (A) όπως υπολογίζεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$B \text{ mL από το μέσο αραιώσης} = A \text{ (mL Busilvex®)} \times 10$$

Εξίσωση 3.6

Ο τελικός όγκος προς έγχυση θα είναι το άθροισμα των όγκων A και B. Σημειώνεται ότι θα πρέπει να προστίθεται το Busilvex® στο διαλύτη και όχι ο διαλύτης στο Busilvex®.

Στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ** δίνεται πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά η κατηγορία δόσης ανά κιλό βάρους σώματος, ο όγκος του Busilvex®, ο όγκος του μέσου αραιώσης και ο συνολικός όγκος, για βάρη σώματος από 5-34 kg.

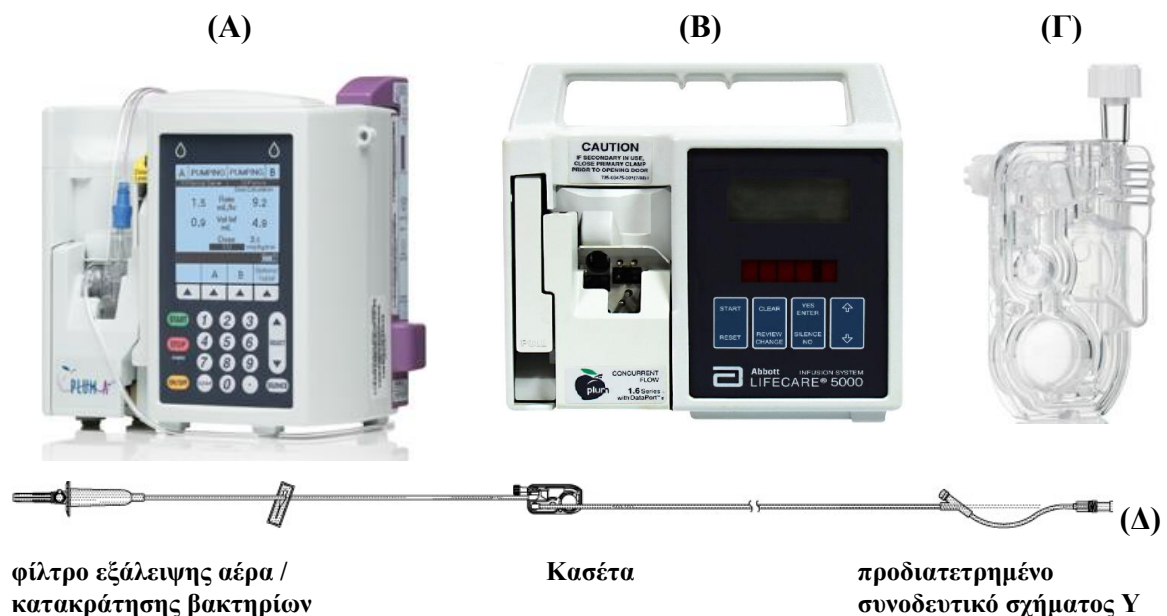
3.2.5. Πειραματική διάταξη in vitro προσομοίωση έγχυση Busilvex®

Οι συνθήκες που προσομοιώθηκαν ήταν ακριβώς ίδιες με εκείνες που πραγματοποιούνται στη κλινική πράξη όπως αυτές περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω. Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται στη κλινική είναι πολλαπλών εγχύσεων. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από 2 γραμμές, την πρωτεύουσα γραμμή ή γραμμή A στην οποία πάντα τοποθετείται φυσιολογικός ορός, NaCl 0.9 %, και τη δευτερεύουσα γραμμή ή γραμμή B στην οποία τοποθετούνται τα φάρμακα. Πριν την έναρξη της έγχυσης του Busilvex® πραγματοποιείται έγχυση με φυσιολογικό ορό από την πρωτεύουσα γραμμή και όταν ξεκινήσει η έγχυση του φαρμάκου, σταματάει η έγχυση από την πρωτεύουσα γραμμή και έχουμε έγχυση μόνο από την δευτερεύουσα γραμμή.

Στα παιδιά τα οποία πρόκειται να υποβληθούν σε ΜΜΟ τοποθετείται κεντρικός φλεβοκαθετήρας Hickman, ο οποίος δεν μπορεί να δεχθεί ροή μικρότερη από 15 mL/h γιατί υπάρχει κίνδυνος απόφραξης. Κατά συνέπεια, σε περιπτώσεις που ο όγκος του φαρμάκου προς έγχυση είναι πολύ μικρός και η έγχυση αυτού πραγματοποιείται με ρυθμό μικρότερο των 15 mL/h τότε έχουμε ταυτόχρονη έγχυση από την πρωτεύουσα και την δευτερεύουσα γραμμή ώστε η ελάχιστη ροή να είναι 15 mL/h.

Στη διάταξη χρησιμοποιήθηκαν αντλίες HOSPIRA Plum A + Pump i.v. Infusion (Εικόνα 3.5.A) ή Abbott LIFECARE® 5000 infusion system (Εικόνα 3.5.B). Το καλώδιο παροχής που χρησιμοποιήθηκε είναι Plumset της εταιρείας LIFESKIELD™ που περιέχει φίλτρο εξάλειψης αέρα/κατακράτησης βακτηρίων μεγέθους πόρων 15 μm και προδιατετηρημένο συνοδευτικό σχήματος Y όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5.Δ. Το πάνω άκρο της διάταξης είναι συνδεδεμένο με ασκό φυσιολογικού ορού και αποτελεί την πρωτεύουσα γραμμή. Η κασέτα (Εικόνα 3.5.Γ) τοποθετείται μέσα στην αντλία και στο πάνω άκρο της τοποθετείται το φάρμακο προς έγχυση και αποτελεί την δευτερεύουσα γραμμή. Το φάρμακο μπορεί να τοποθετηθεί στην κασέτα είτε σε σύριγγα είτε σε ασκό, ανάλογα με τον όγκο που πρόκειται να εγχυθεί.

Το προδιατετηρημένο συνοδευτικό σχήματος Y χρησιμοποιείται είτε για ενδοφλέβια χορήγηση είτε ως παγίδα αέρα. Οι διατάξεις σχήματος Y χρησιμοποιούνται είτε για τη γρήγορη έγχυση υγρών είτε για τη διπλή χορήγηση π.χ. όπως του αίματος με NaCl 0.9%. Επίσης μπορεί να λειτουργήσουν και ως παγίδα αέρα.



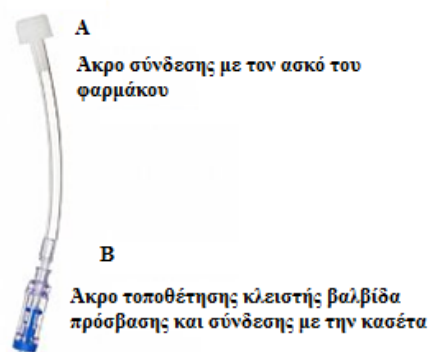
Εικόνα 3.5: Αντλία HOSPIRA Plum A+ Pump i.v. Infusion (A), αντλία Abbott LIFECARE® 5000 infusion system (B) καλώδιο παροχής (Δ) και κασέτα (Γ).

Στην περίπτωση που ο όγκος έγχυσης είναι μικρότερος των 50 mL, το φάρμακο τοποθετείται σε σύριγγα, στην οποία τοποθετείται κλειστή βαλβίδα πρόσβασης (βαλβίδα διασποράς) τύπου Spinning Spiros® (Εικόνα 3.5α). Στη συνέχεια προσδένεται στο πάνω μέρος της κασέτας. Στην περίπτωση που ο όγκος είναι μεγαλύτερος των 50 mL τότε το φάρμακο τοποθετείται σε ασκό στον οποίο τοποθετείται ειδική προέκταση χορήγησης κυτταροστατικών μέσω κλειστού κυκλώματος, για την αποφυγή διασποράς φαρμάκων, η οποία έχει μήκος 13cm.

Το ένα άκρο συνδέεται με τον ασκό που έχει τοποθετηθεί το φάρμακο, σημείο Α όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6β ενώ στο άλλο άκρο τοποθετείται κλειστή βαλβίδα πρόσβασης και ασφάλισης με αυτόματο άνοιγμα της οδού όταν συνδεθεί με την κασέτα, σημείο Β στην Εικόνα 3.6β.



Εικόνα 3.6α: Βαλβίδα διασποράς όπως συνδέεται με την σύριγγα.



Εικόνα 3.6: Ειδική προέκταση χορήγησης κυτταροστατικών, στο Α άκρο τοποθετείται το φάρμακο, στο Β τοποθετείται κλειστή βαλβίδα πρόσβασης και ασφάλισης με αυτόματο άνοιγμα της οδού όταν συνδεθεί με την κασέτα.

3.2.6. Πειραματική διαδικασία προσομοίωσης έγχυσης και Δειγματοληπτικό σχήμα

Για κάθε κατηγορία ασθενών παρασκευάστηκε το αντίστοιχο διάλυμα προς έγχυση για το αντίστοιχο σωματικό βάρος. Κάθε προσομοίωση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε μια από τις 5 κατηγορίες. Το φάρμακο τοποθετείται σε σύριγγα. Έγινε επίσης προσομοίωση για τις περιπτώσεις που έχουμε, όγκο προς έγχυση, μεγαλύτερο των 50 mL και το φάρμακο τοποθετείται σε ασκό.

Ο ελάχιστος ρυθμός έγχυσης είναι 15 mL/h για να μην υπάρχει κίνδυνος απόφραξης του Hickman. Ο ρυθμός έγχυσης του φαρμάκου (Flow) υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$Flow (mL / h) = \frac{Volume (mL)}{Time (h)}$$

Εξίσωση 3.7

όπου Volume είναι ο συνολικός όγκος φαρμάκου προς έγχυση και time ο χρόνος έγχυσης (~2 h).

Στις περιπτώσεις που ο όγκος του φαρμάκου προς έγχυση είναι πολύ μικρός και ο ρυθμός έγχυσης είναι μικρότερος των 15 mL/h τότε το υπόλοιπο ποσοστό συμπληρώνεται από τη πρωτεύουσα γραμμή μέχρι να έχουμε Flow=15 mL/h. Σε περιπτώσεις που ο ρυθμός έγχυσης είναι μεγαλύτερος των 15 mL/h τότε η έγχυση πραγματοποιείται μόνο από την δευτερεύουσα γραμμή, με τον ρυθμό που έχει υπολογιστεί.

Η κάθε έγχυση χωρίζεται σε τρεις περιόδους ανάλογα με τη διαδικασία που λαμβάνει χώρα. Η πρώτη περίοδος (Α) περιλαμβάνει την έγχυση του φαρμάκου και διαρκεί περίπου 2 h. Κατά τη δεύτερη περίοδο (Β) πραγματοποιείται έκπλυση του συστήματος, και στην τρίτη περίοδο (Γ) συνεχίζεται η έγχυση φυσιολογικού ορού NaCl 0.9 % για επιπλέον 20-30 min. Η περίοδος Γ είναι ένα χρονικό διάστημα που δεν λαμβάνει χώρα στη κλινική πράξη. Ο λόγος που μελετήθηκε η περίοδος Γ για να διερευνηθεί τότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα και κατά συνέπεια το Busilvex® σταματά να εισέρχεται στον οργανισμό.

3.2.7. Το δειγματοληπτικό σχήμα περιλαμβάνει:

- Τη συλλογή δειγμάτων κάθε πέντε λεπτά για τα πρώτα 30 min της έγχυσης.
- Ακολουθεί δειγματοληψία κάθε 10 min μέχρι να ολοκληρωθεί η έγχυση (~2 h).
- Στη συνέχεια ακολουθεί η έκπλυση για χρόνο που εξαρτάται από τον ρυθμό έγχυσης και λαμβάνονται δείγματα ανά 10 min μέχρι το τέλος της έκπλυσης.
- Τέλος, ενώ έχουν ολοκληρωθεί τόσο η έγχυση όσο και η έκπλυση, ακολουθεί η προαιρετική (πραγματοποιείται μόνο για πειραματικούς σκοπούς και δεν λαμβάνει χώρα στην κλινική πράξη) περίοδος Γ κατά την οποία, συνεχίζεται η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 20-30 min λαμβάνοντας δείγματα κάθε 5 min.

3.2.8. Παρασκευή Διαλυμάτων προσομοίωσης έγχυσης

Όπως αναφέρεται και σε προηγούμενη ενότητα (3.2.1) η χορήγηση του Busilvex® εντάσσεται σε διαφορετικές δοσολογικές κατηγορίες ανάλογα με το σωματικό βάρος του ασθενούς (Πίνακας 3.6) οι οποίες αντιστοιχούν σε ένα εύρος ροών

από 15 mL/h έως 30 mL/h. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χρόνος υστέρησης εξαρτάται από το ρυθμό μεταφοράς του φαρμάκου, η παρασκευή των διαλυμάτων προσομοίωσης της έγχυσης βασίστηκε στην επιλογή της επιθυμητής ροής που οδηγεί σε συγκεκριμένο όγκο του φαρμάκου και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο βάρος σώματος ανά δοσολογική κατηγορία φαρμάκου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται, το εύρος τελικής ροής και όγκου του τελικού διαλύματος που θα πρέπει να χορηγηθεί, όπως μεταβάλλονται για τις προτεινόμενες στο SPC του φαρμάκου κατηγορίες ασθενών 1-5, ενώ στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων προσομοίωσης ανά δοσολογική κατηγορία.

Πίνακας 3.6: Κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς, τον συνολικό όγκο έγχυσης και τη συνολική ροή.

	ΒΣ (kg)	Δόση (mg)	Συνολικός όγκος (mL)	Ροή γραμμή A (mL/h)	Ροή γραμμή B (mL/h)	Συνολική ροή (mL/h)
body weight less than 9 kg (κατηγορία 1 SPC)						
Ελάχιστο ΒΣ	5	1.0	9.2	4	11	15
Μέγιστο ΒΣ	8.9	1.0	16.3	8	7	15
body weight between 9 kg and 16 kg (κατηγορία 2 SPC)						
Ελάχιστο ΒΣ	9	1.2	19.8	5	10	15
Μέγιστο ΒΣ	15.5	1.2	34.5	0	17	17
body weight between 16 kg and 23 kg (κατηγορία 3 SPC)						
Ελάχιστο ΒΣ	16	1.1	31.9	0	16	16
Μέγιστο ΒΣ	23	1.1	46.2	0	23	23
body weight between 24 kg and 34 kg (κατηγορία 4 SPC)						
Ελάχιστο ΒΣ	23.5	0.95	40.9	0	20	20
Μέγιστο ΒΣ	34	0.95	59.2	0	30	30
body weight more than 35 kg (κατηγορία 5 SPC)						
	34.5	0.8	50.6	0	25	25

ΒΣ < 9 kg Δόση = 1.0 mg / kg, ροή = 15 mL/h: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε το χαμηλότερο βάρος σώματος, 5 kg, και ο συνολικός όγκος του φαρμάκου προς έγχυση είναι 9 mL με ροή έγχυσης 15 mL/h. Έτσι, 2.5 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 25.5 mL NaCl 0.9 %. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min. Αυτό το διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε και εν συνεχεία 9 mL τοποθετήθηκαν σε 3 σύριγγες των 10 mL προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα προσομοίωσης της έγχυσης εις τριπλούν.

ΒΣ 9 kg έως < 16 kg Δόση = 1.2 mg / kg, ροή = 15-17 mL/h: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ενδεικτικό βάρος των 9 kg και ο συνολικός όγκος του φαρμάκου προς έγχυση είναι 22 mL. Έτσι, 6.1 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 61 mL NaCl 0.9 %. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min. Αυτό το διάλυμα

ποσοτικοποιήθηκε και εν συνεχεία 22 mL τοποθετήθηκαν σε 3 σύριγγες των 60 mL και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσομοίωσης της έγχυσης εις τριπλούν.

BΣ από 16 kg έως 23 kg Δόση = 1.1 mg / kg, ροή=16-23 mL/h: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ενδεικτικό βάρος των 22 kg που αντιστοιχεί σε συνολικό όγκο του διαλύματος φαρμάκου προς έγχυση 40 mL και ροή έγχυσης 20 mL/h. Έτσι, 4 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 120 mL NaCl 0.9 %. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min. Αυτό το διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε και εν συνεχεία 40 mL τοποθετήθηκαν σε 3 σύριγγες των 60 mL και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσομοίωσης της έγχυσης εις τριπλούν.

BΣ από 23 kg έως 34 kg Δόση = 0.95mg / kg, ροή =20-30 mL/h: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ενδεικτικό βάρος των 29 kg που αντιστοιχεί σε συνολικό όγκο του διαλύματος φαρμάκου προς έγχυση 50 mL και ροή έγχυσης 25mL/h. Έτσι, 7 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 150 mL NaCl 0.9 %. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min. Αυτό το διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε και εν συνεχεία 50 mL τοποθετήθηκαν σε 3 σύριγγες των 60 mL και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσομοίωσης της έγχυσης εις τριπλούν.

BΣ > 34 kg Δόση = 0.8 mg / kg, ροή=25mL/h (έγχυση σύριγγας): Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ενδεικτικό βάρος των 35.5 kg που αντιστοιχεί σε συνολικό όγκο του διαλύματος του φαρμάκου προς έγχυση 52 mL και ροή έγχυσης 26mL/h. Έτσι, 6 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 150 mL NaCl 0.9 %. Ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min. Αυτό το διάλυμα ποσοτικοποιήθηκε και εν συνεχεία 52 mL τοποθετήθηκαν σε 3 σύριγγες των 60 mL και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσομοίωσης της έγχυσης εις τριπλούν.

Για BΣ > 34 kg Δόση = 0.8 mg / kg με τη χρήση ασκού, ροή>25mL/h: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε και πάλι το ενδεικτικό βάρος των 35.5 kg. Ο συνολικός όγκος του φαρμάκου προς έγχυση είναι 52 mL και η ροή 26 mL/h για την παρασκευή του διαλύματος, 6 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 150 mL NaCl 0.9 %, ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min, ποσοτικοποίηση του διαλύματος και τοποθέτηση 50 mL ή 60 mL σε 3 ασκούς, χωρητικότητας των 100 mL για την προσομοίωση της έγχυσης εις τριπλούν.

Προσομοίωση έγχυσης για τη διερεύνηση ελάχιστου χρόνου υστέρησης: Για την κατηγορία αυτή χρησιμοποιήθηκε τα ενδεικτικά βάρη των 48, 55 και 62 kg με συνολικό όγκο φαρμάκου προς έγχυση 70, 80 και 90 mL και ροή 35, 40, 45 mL/h. Περεταίρω διερεύνηση για βάρη μεγαλύτερα των 62 kg δεν πραγματοποιούνται καθώς ακολουθείται έγχυση ενηλίκων. Για την παρασκευή των διαλύματων, 19.2 mL Busilvex® (6 mg/mL) αναμίχθηκαν με 192 mL, 22 Busilvex® (6 mg/mL) με 220 NaCl 0.9 % και 24.8 Busilvex® (6 mg/mL) με 280 NaCl 0.9 %, αντίστοιχα. Τα διαλύματα πριν τοποθετηθούν στον ασκό, για τους αντίστοιχους όγκους αναδεύονταν με μαγνήτη για 15 min. Κάθε έγχυση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

3.2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός Bu σε υδατικά διαλύματα

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του BU στα υδατικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC (Shimadzu Prominence) που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 και εφαρμόστηκε η μέθοδος HPLC-PDA που βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε για τον προσδιορισμό του BU σε πλάσμα αίματος (**Κεφάλαιο 2**) καταλλήλως τροποποιημένη για μετρήσεις σε υδατικά διαλύματα. Η πλήρης οργανολογία ο κατάλογος υλικών και αντιδραστηρίων και η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων περιγράφονται αναλυτικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.

3.2.9.1. Χειρισμός δειγμάτων

Η ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων πραγματοποιείται με μεταφορά 20 μ L από το κάθε δείγμα σε δοκιμαστικό σωλήνα, προσθήκη 20 μ L από το διάλυμα εργασίας του IS (15.6 ppm), προσθήκη 100 μ L 0.4% DDTC και vortex, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί προσυγκέντρωση σε ρεύμα αζώτου με θέρμανση στους 60 °C. Τέλος γίνεται ανάκτηση με 100 μ L MeOH. Στις περιπτώσεις που τα άγνωστα δείγματα βρίσκονται εκτός εύρους της καμπύλης αναφοράς επαναπροσδιορίζονται έπειτα από κατάλληλη αραίωση με ACN. Στη συνέχεια από αυτό το διάλυμα μεταφέρονται 20 μ L σε δοκιμαστικό σωλήνα και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.

3.2.9.2. Χρωματογραφικές συνθήκες

Η κινητή φάση αποτελείται από MeOH:H₂O (80/20). Ο χρόνος έκλουσης της παραγωγοποιημένης βουσουλφάνης [1,4-δισ(διαιθυλδιθειοκαρβαμοϋλ)βουτανίου] και

του παραγωγωποιημένου εσωτερικού προτύπου [1,4-δις(διαιθυλδιθειοκαρβαμοϋλ)εξανίου] είναι 6.9 και 11.9 min, αντίστοιχα. Η κινητή φάση πριν από τη χρήση διηθείται, υπό κενό, σε συσκευή διήθησης διαλυτών τύπου Millipore (Merck KGaA, Gernsheim, Germany), μέσω φίλτρων μεμβράνης Nylon μεγέθους πόρων 0.45 μm και διαμέτρου 47 mm (Cronus Membrane Filter Nylon). Επίσης, η κινητή φάση τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 20 min. Η ροή της κινητής φάσης είναι 1 ml / min και ο ενιόμενος όγκος είναι 20 μL. Το μήκος κύματος ρυθμίζεται στα 280 nm και η θερμοκρασία του φούρνου που τοποθετείται η στήλη είναι 30 °C. Η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη είναι 8 °C όπως φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας.3.7: Χρωματογραφικές συνθήκες.

Χρόνος Χρωματογραφήματος	13.0 min
Μήκος κύματος	280 nm
Στήλη	Hypersil BDS C18, 150 *4.6mm, 5μm
Προστήλη	Hypersil BDS C18, 10*4.6 mm, 5μm
Κινητή φάση	MeOH / H ₂ O (80 / 20 v/v/)
Ροή	1.0 ml / min

3.2.9.3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν έπειτα από την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των απεικονίσεων συγκέντρωσης, (C, μg/mL), συναρτήσεως του χρόνου, (t, min). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της ποσότητας βουσουλφάνης (μg) που εξέρχεται ανά μονάδα χρόνου (min) από το άκρο του συστήματος (ρυθμός εξόδου, που αντιστοιχεί στο ρυθμό εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία), συμφωνά με την **Εξίσωση 3.8** και λαμβάνεται το διάγραμμα Amount BU per min (ρυθμός εξόδου, μg/min) συναρτήσεως του χρόνου, t (min).

$$\text{Amount Bu per min (ρυθμός εξόδου)} = \frac{C(\mu\text{g/mL}) * \text{Flow (mL/h)}}{60 (\text{min/h})}$$

Εξίσωση 3.8

Έγινε απεικόνιση των μέσων τιμών συγκέντρωσης Bu (C, μg/mL) συναρτήσεως του χρόνου (t, min) και των μέσων τιμών Amount Bu per min (ρυθμός εξόδου, μg/min)-χρόνου (min) καθώς η κάθε προσομοίωση έγχυσης πραγματοποιείται εις τριπλούν.

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για την ανάλυση του Busilvex® σε υδατικά διαλύματα περιλαμβάνει την μελέτη της εκλεκτικότητας, της γραμμικότητας, της ακρίβεια και της πιστότητα του συστήματος. Τα αποτελέσματα δίνονται αναλυτικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.

3.3.2. Μελέτη του χρόνου υστέρησης

Για την μελέτη του χρόνου υστέρησης προσομοιώθηκαν εγχύσεις Busilvex® με αντλία σύριγγας για κάθε κατηγορία βάρους ασθενούς (Πίνακας 3.5). Επιπλέον προσομοιώθηκαν εγχύσεις όπου το φάρμακο ήταν τοποθετημένο σε ασκό όπως γίνεται στις περιπτώσεις έγχυσης διαλύματος φαρμάκου όγκου μεγαλύτερου από 50 mL. Κάθε κατηγορία προσομοιώθηκε εις τριπλούν. Το δειγματοληπτικό σχήμα που εφαρμόστηκε αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.6.

3.3.2.1. Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 1 με ΒΣ<9 (15mL/h)

Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ < 9 kg που περιλαμβάνει το εύρος βαρών 5.0 - 8.9 kg (Πίνακας 3.6), το Busilvex® χορηγείται σε δόση 1.0 mg/kg. Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του Busilvex®, ο ελάχιστος όγκος φαρμάκου που μπορεί να εγχυθεί είναι 9.35 mL για ασθενείς με βάρος 5.0 kg και ο μέγιστος όγκος φαρμάκου είναι ίσος με 16.3 mL για ασθενείς με μέγιστο βάρος 8.9 kg. Και στις 2 αυτές περιπτώσεις ο ρυθμός έγχυσης θα είναι 15 mL/h εφαρμόζοντας την **Εξίσωση 3.7**. Στον Πίνακας: 3.8 συνοψίζονται οι παραπάνω πληροφορίες.

Πίνακας: 3.8: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας ΒΣ < 9 kg.

Κατηγορία ΒΣ < 9 kg	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (mL/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (mL/h)	Συνολικός Ρυθμός (mL/h)
Μέγιστο βάρος κατηγορίας	8.9	16.3	8	7	15
Ελάχιστο βάρος κατηγορίας	5	9.2	4	11	15

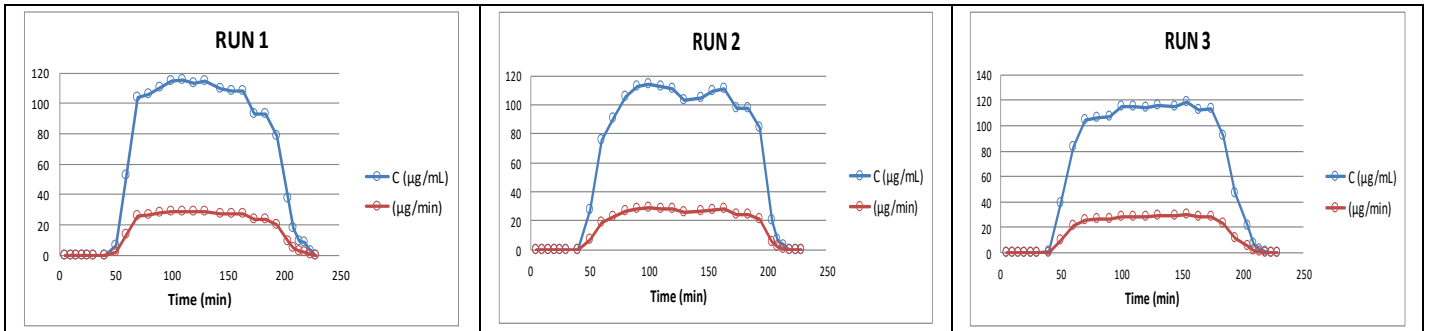
Δεδομένου ότι ο συνολικός ρυθμός έγχυσης είναι 15 mL/h και στις 2 περιπτώσεις δεν έχει σημασία σε ποιο σωματικό βάρος θα εφαρμοστεί η προσομοίωση. Έτσι επιλέχθηκε η εις τριπλούν παρασκευή και έγχυση διαλυμάτων Busilvex® που

αντιστοιχούν στο ελάχιστο βάρος της κατηγορίας, συνολικού όγκου 9.2 mL. Λόγω του μικρού όγκου του διαλύματος του φαρμάκου πραγματοποιείται ταυτόχρονη έγχυση NaCl 0.9% β/ο από την γραμμή A με ρυθμό 10 mL/h και διαλύματος φαρμάκου από τη γραμμή B με ρυθμό 5 mL/h, ώστε ο συνολικός ρυθμός να είναι 15 mL/h και να μην υπάρχει κίνδυνος απόφραξης του Hickman. Για τα πρώτα 30 min συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min και από τα 30 min μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) η συλλογή των δειγμάτων έγινε κάθε 10 min (περίοδος A). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση από την πρωτεύουσα γραμμή με NaCl 0.9% β/ο και ρυθμό 15 mL/h για 60 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 10 min (περίοδος B). Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 25 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι η έγχυση δεν είχε την αναμενόμενη διάρκεια των 2 h αλλά διήρκησε περίπου 2.25 h. Στον Πίνακα 3.10 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 3 πειραμάτων προσομοίωσης των εγχύσεων, και στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζονται οι απεικονίσεις μετρούμενης συγκέντρωσης Bu (C, $\mu\text{g/mL}$)–χρόνου και Amount Bu per min (Ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$)–χρόνου για τα τρία πειράματα προσομοίωσης των εγχύσεων στην κατηγορία ΒΣ <9 kg. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα τρία πειράματα προσομοίωσης δίνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ.1, Γ.2).

Πίνακας 3.9: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας ΒΣ < 9 kg.

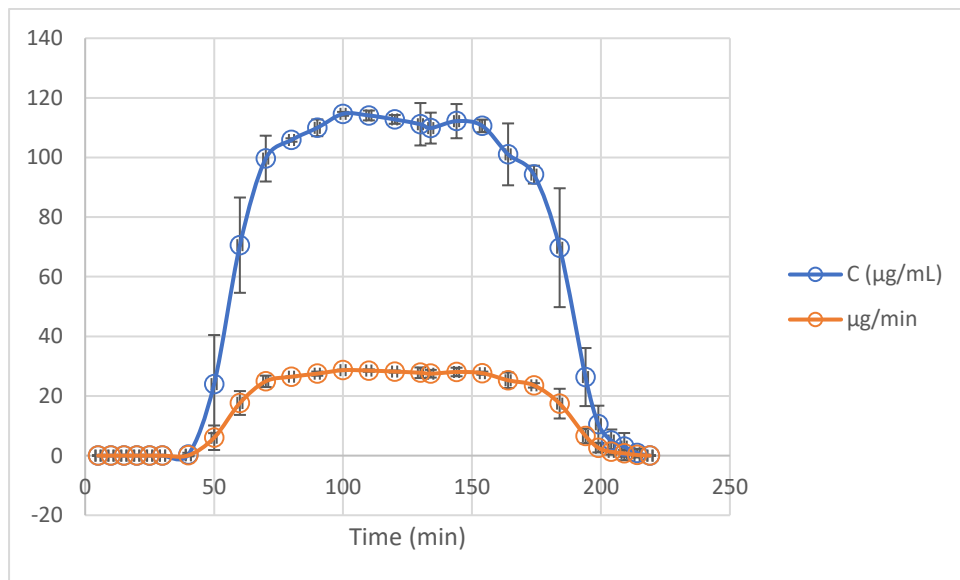
Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Γραμμή A (mL/h)	Γραμμή B (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (A)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (B)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (A+B+Γ*)
#1	8.9	502.35	11	4	15	134	15	60	229
#2	8.9	495.12	11	4	15	134	15	60	229
#3	8.9	503.32	11	4	15	134	15	60	229

* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 25 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



Εικόνα 3.7: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθμού εξόδου (µg/min) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ < 9 kg (η μπλε γραμμή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με τον χρόνο και η κόκκινη γραμμή ο ρυθμός εξόδου µg/min).

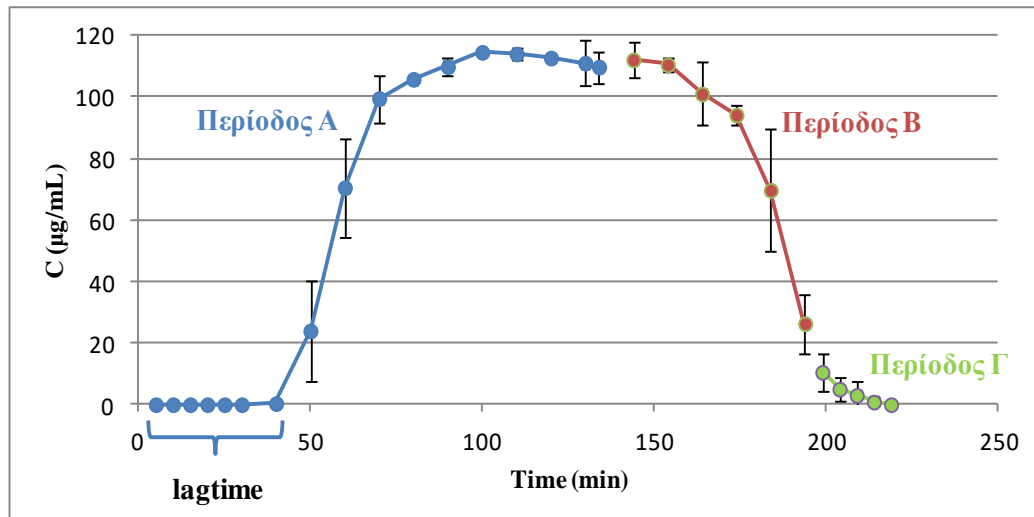
Στην **Εικόνα 3.8** παρουσιάζεται το διάγραμμα των μέσων τιμών συγκέντρωσης ως προς το χρόνο και των μέσων τιμών ρυθμού εξόδου ως προς το χρόνο, με τις αντίστοιχες τιμές της τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 3.8: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (µg/mL, μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (µg/min, κόκκινη γραμμή) ως προς το χρόνο δειγματοληψίας για ασθενείς της κατηγορίας 1 με ΒΣ < 9 kg.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία 1 (ΒΣ < 9 kg) με ενδεικτικό βάρος 5 kg και εγχέομενο όγκο 9.2 mL είναι 40 min. Πιο συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.9** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης, 40 min και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία αύξηση της εμφάνισης του φαρμάκου στο σύστημα και η μετρούμενη συγκέντρωση διατηρείται σταθερή για όλο το υπόλοιπο διάστημα της έγχυσης και τα πρώτα 40 min της περιόδου έκπλυσης, διάστημα που είναι ίσο με

το lagtime. Στο τέλος της περιόδου Β (περίοδος έκπλυσης) παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου ενώ κατά την περίοδο Γ, όπου στην κλινική πράξη έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της έκπλυσης, η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι τελικά να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.9: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 1 με ΒΣ < 9 kg.

3.3.2.2. Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg (15-17mL/h

Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ 9 - 16 kg που περιλαμβάνει το εύρος βαρών από 9.0 - 15.5 kg (Πίνακας 3.6), το Busilvex® χορηγείται σε δόση 1.2 mg / kg. Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του Busilvex® ο ελάχιστος όγκος φαρμάκου που μπορεί να εγχυθεί είναι 19.8 mL για ασθενείς με βάρος 9.0 kg και ο μέγιστος όγκος φαρμάκου είναι ίσος με 34.1 mL για ασθενείς με μέγιστο βάρος 15.5 kg. Ο ρυθμός έγχυσης θα είναι 15 mL/h και 17.0 mL/h, αντίστοιχα, εφαρμόζοντας την **Εξίσωση 3.7**. Στον Πίνακα 3.11 συνοψίζονται οι πληροφορίες.

Πίνακας 3.10: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας ΒΣ 9-16 kg.

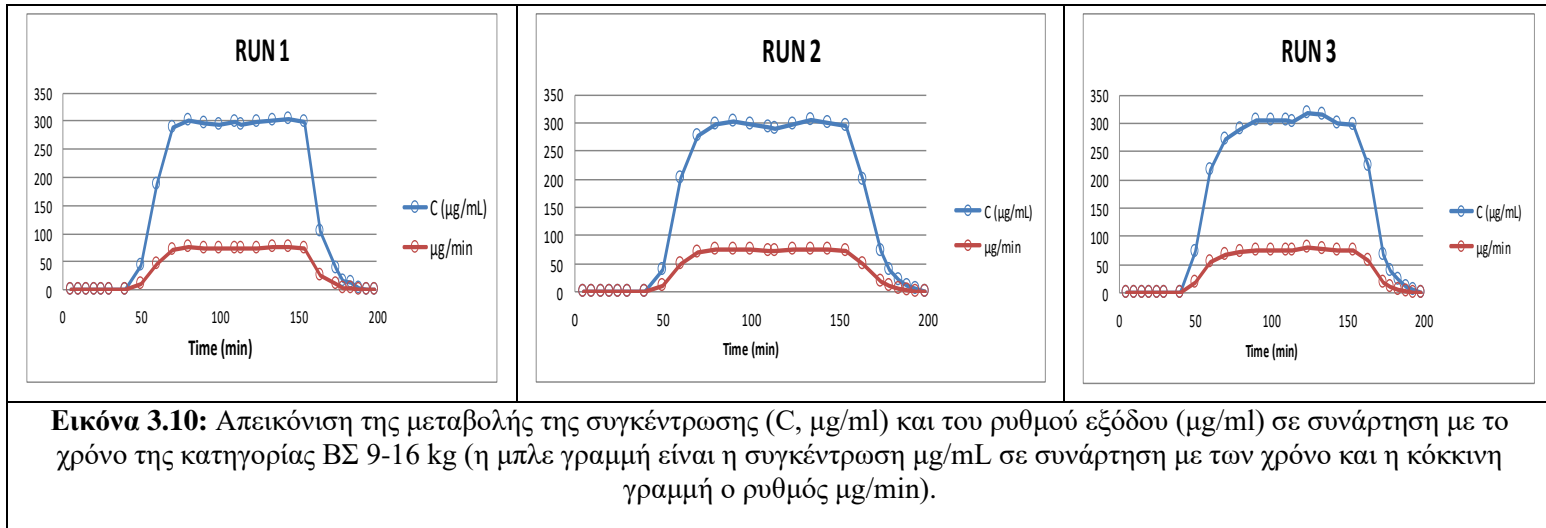
Κατηγορία ΒΣ 9-16 kg	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (mL/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (mL/h)	Συνολικός Ρυθμός (mL/h)
Ελάχιστο βάρος κατηγορίας	9.0	19.8	5	10	15
Μέγιστο βάρος κατηγορίας	15.5	34.1	0	17	17

Για τη συγκεκριμένη κατηγορία προσομοιώθηκε η έγχυση για ασθενή που έχει ενδεικτικό βάρος 9 kg επομένως το διάλυμα προς έγχυση είναι ~20 mL. Πραγματοποιήθηκε η εις τριπλούν παρασκευή και έγχυση διαλυμάτων Busilvex® που αντιστοιχούν στο βάρος 9 kg. Σύμφωνα με την **Εξίσωση 3.7** ο ρυθμός έγχυσης του BU ήταν 10 mL/h (ο ρυθμός της πρωτεύουσας ήταν 5 ml/h ώστε να έχουμε τελικό ρυθμό έγχυσης 15mL/h). Το κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται για έγχυση ποσοτικοποιείται. Εξαιτίας του μικρού όγκου φαρμάκου θα έχουμε ταυτόχρονη έγχυση από την γραμμή A με 5 mL/h 0.9% NaCl και από τη γραμμή B με 10 mL/h φαρμάκου ώστε να έχουμε συνολικό ρυθμό 15 mL/h, και να μην υπάρχει κίνδυνος απόφραξης του Hickman. Για τα πρώτα 30 min συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min και από τα 30 min μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) έγινε συλλογή των δειγμάτων κάθε 10 min (περίοδος A). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση από την πρωτεύουσα γραμμή με 0.9% NaCl και ρυθμό 15 mL/h για 60 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 10 min (περίοδος B). Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η δειγματοληψία για επιπλέον 20 min κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η παροχή φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον **Πίνακα 3.12** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 3 προσομοιωμένων εγχύσεων, ενώ στην **Εικόνα 3.10** παρουσιάζονται οι απεικονίσεις συγκέντρωσης (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) συναρτήσει του χρόνου για τις 3 προσομοιωμένες εγχύσεις της κατηγορίας 2 (BΣ 9-16 kg). Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα τρία πειράματα προσομοίωσης της κατηγορίας 2 (BΣ 9-16 kg), δίνονται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ.3, Γ.4)**.

Πίνακας 3.11: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ 9-16 kg.

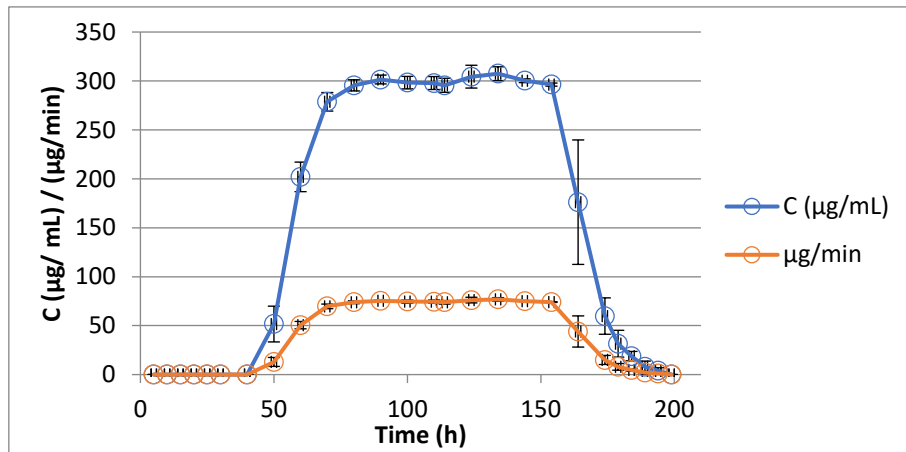
Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C (µg/mL)	Γραμμή A (mL/h)	Γραμμή B (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (A)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (B)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (A+B+Γ*)
#1	22	559.97	4	11	15	120	15	59	199
#2	22	555.48	4	11	15	120	15	59	199
#3	22	538.01	4	11	15	120	15	59	199

* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 20 min και συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



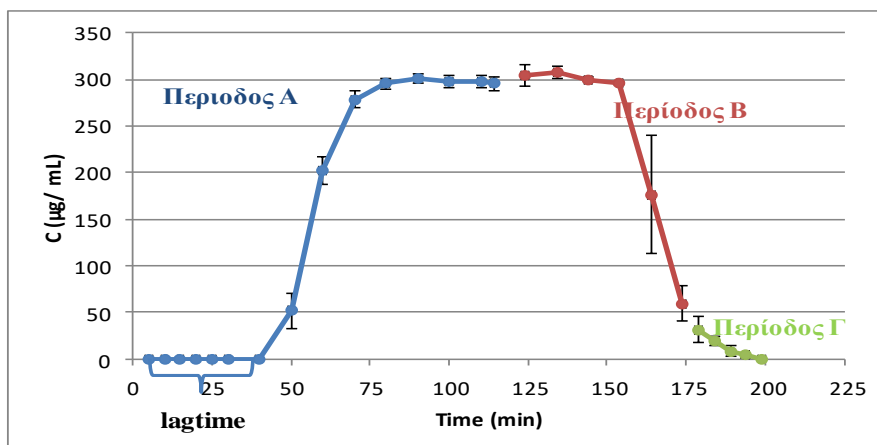
Εικόνα 3.10: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C , $\mu\text{g/mL}$) και του ρυθμού εξόδου ($\mu\text{g/min}$) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 9-16 kg (η μπλε γραμμή είναι η συγκέντρωση $\mu\text{g/mL}$ σε συνάρτηση με τον χρόνο και η κόκκινη γραμμή ο ρυθμός $\mu\text{g/min}$).

Στην **Εικόνα 3.11** παρουσιάζεται το διάγραμμα των μέσων τιμών συγκέντρωσης ως προς το χρόνο με τις αντίστοιχες τιμές της τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 3.11: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για ασθενείς της κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία 2 (ΒΣ 9-16 kg) για ασθενείς με ενδεικτικό βάρος 10 kg και εγχέομενο όγκο 22 mL είναι 40 min. Παρόμοια με την κατηγορία 1 (ΒΣ <9kg), στην **Εικόνα 3.12** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης (40 min) και στη συνέχεια ακολουθεί μια απότομη αύξηση της εμφάνισης του φαρμάκου στο σύστημα και μετράται η μέγιστη συγκέντρωση η οποία διατηρείται σταθερή για όλο το υπόλοιπο χρονικό διάστημα της έγχυσης καθώς και για τα πρώτα 40 min της περιόδου έκπλυσης (περίοδος Β), δηλαδή για χρονικό διάστημα ίσο με το lagtime. Στη διάρκεια των τελευταίων 20 min της περιόδου Β (περίοδος έκπλυσης) παρατηρείται απότομη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Τέλος κατά την περίοδο Γ όπου στην κλινική πράξη έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της έκπλυσης, η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.12: Σχηματική απεικόνιση της μετρούμενης συγκέντρωσης BU ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 2 με ΒΣ 9-16 kg.

3.3.2.3. Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 3 με ΒΣ 16-23 kg (16-23mL/h)

Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ 16 - 23 kg που περιλαμβάνει το εύρος βαρών από 16 - 23 kg, το Busilvex® χορηγείται σε δόση 1.1 mg/kg (**Πίνακας 3.6**) Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του Busilvex® ο ελάχιστος όγκος φαρμάκου που μπορεί να εγχυθεί είναι 31.9 mL για ασθενείς με βάρος 16 kg και ο μέγιστος όγκος φαρμάκου είναι ίσος με 46.2 mL για ασθενείς με μέγιστο βάρος 23 kg. Στον **Πίνακας 3.12** συνοψίζονται οι πληροφορίες.

Πίνακας 3.12: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg.

Κατηγορία ΒΣ < 16-23 kg	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (mL/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (mL/h)	Συνολικός Ρυθμός (mL/h)
Ελάχιστο βάρος κατηγορίας	16	31.9	-	16	16
Μέγιστο βάρος κατηγορίας	23	46.2	-	23	23

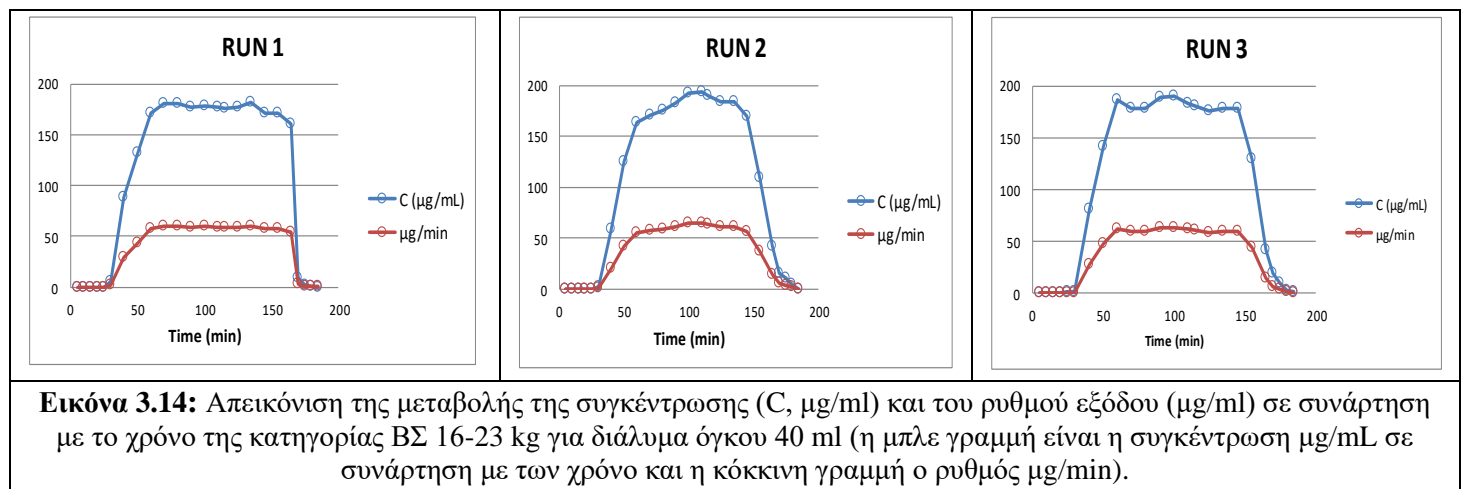
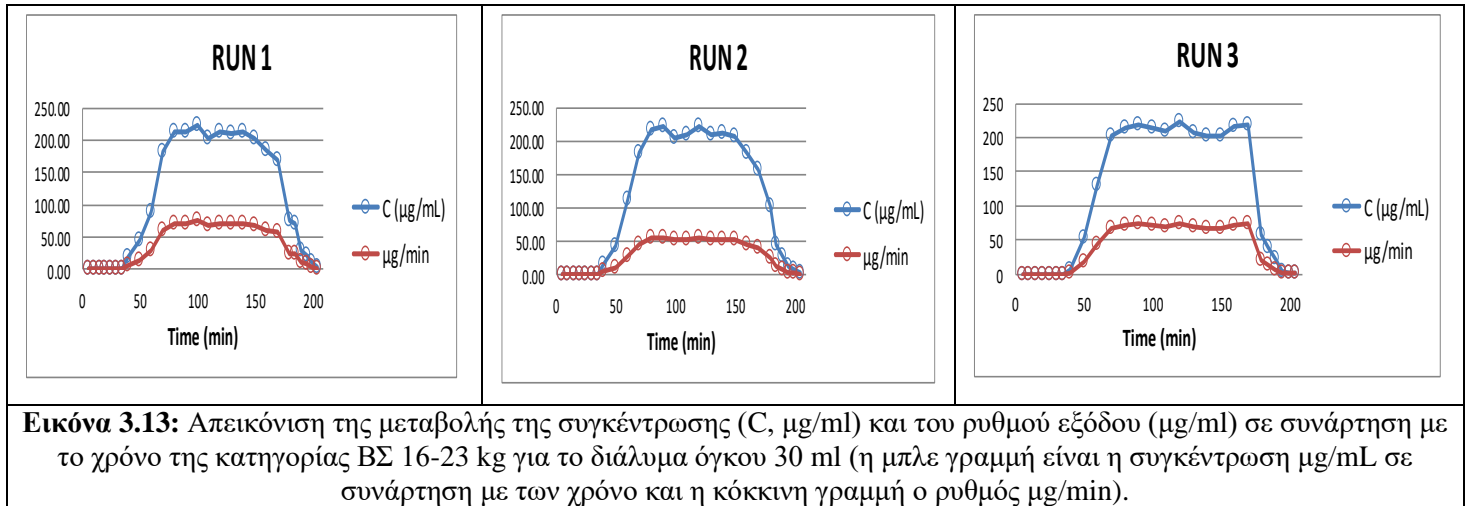
Η προσομοίωση αυτή πραγματοποιήθηκε για 2 ενδεικτικά βάρη σώματος ασθενούς, τα 16 kg που είναι το ελάχιστο ΒΣ της κατηγορίας και τα 20 kg που προσεγγίζουν το μέγιστο ΒΣ της κατηγορίας, ώστε να μελετηθούν διαλύματα προς έγχυση όγκου 31.9 mL (~32 mL) και 39.6 mL (~40 mL), με ρυθμό έγχυσης 16 mL/h και 20 mL/h, αντίστοιχα. Η επιλογή σε αυτή την περίπτωση έγινε με σκοπό να μελετηθεί αφενός ο χρόνος υστέρησης έγχυσης όταν η έγχυση όλης της ποσότητας του φαρμάκου γίνεται από την δευτερεύουσα γραμμή, αφετέρου η επίδραση της αύξησης της ροής στον προσδιοριζόμενο χρόνο υστέρησης στην ίδια κατηγορία ασθενών.

Και στις δυο περιπτώσεις η προσομοίωση της χορήγησης έγινε από την δευτερεύουσα γραμμή. Συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min για χρονικό διάστημα 40 min και 30 min για την προσομοίωση ασθενούς βάρους 16 kg και 20 kg, αντίστοιχα και στη συνέχεια κάθε 10 min μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) (περίοδος Α). Στη συνέχεια ακολούθησε η περίοδος έκπλυσης (περίοδος Β) από την πρωτεύουσα γραμμή με έγχυση NaCl 0.9% β/ο, διάρκειας 60 min με ρυθμό 15.0 mL/h και 45 min με ρυθμό 20 mL/h, για την προσομοίωση ασθενή σωματικού βάρους 16 και 20 kg αντίστοιχα. Κατά την έκπλυση (περίοδος Β) συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 10 min και στις δύο περιπτώσεις. Η δειγματοληψία ανά 5 min συνεχίστηκε και μετά το τέλος της περιόδου έκπλυσης για 25 min και 20 min για την προσομοίωση ασθενή σωματικού βάρους 16 και 20 kg αντίστοιχα, ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον Πίνακα 3.14 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 3 προσομοιωμένων εγχύσεων για τα διαλύματα μέγιστου και ελάχιστου όγκου, ενώ στις Εικόνα 3.13 έως Εικόνα 3.14 παρουσιάζονται οι απεικονίσεις μετρούμενης συγκέντρωσης (C, µg/mL) - χρόνου και amount per min (ρυθμός εξόδου, µg/min)-χρόνου. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα πειράματα προσομοίωσης της κατηγορίας 3 (ΒΣ 16-23 kg), δίνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ.5.α, Γ.5.β και Πίνακας Γ.6.α, Γ.6.β).

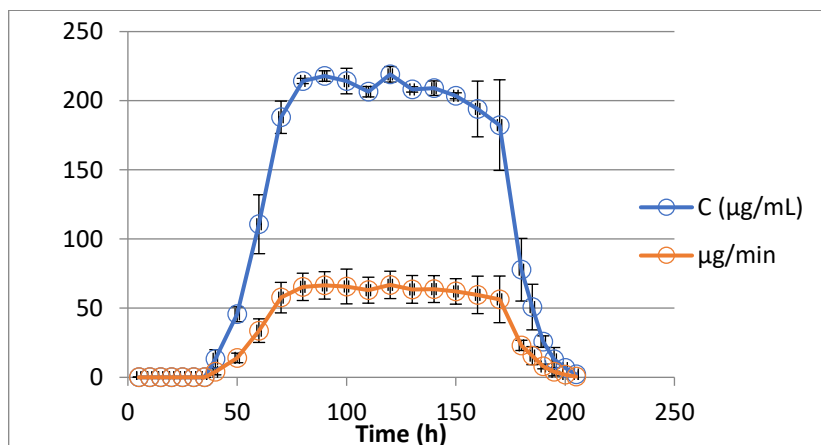
Πίνακας 3.13: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για όγκο διαλύματος φαρμάκου ίσο με 30mL και 40 mL.

Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C (µg/mL)	Γραμμή Α (mL/h)	Γραμμή Β (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (Α)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (Α+Β+Γ*)
#1	32	216.68	-	15	15	120	15	60	205
#2	32	207.55	-	15	15	120	15	60	205
#3	32	227.19	-	15	15	120	15	60	205
#1	40	300.48	-	20	20	120	15	45	185
#2	40	314.81	-	20	20	120	15	45	185
#3	40	296.96	-	20	20	120	15	45	185

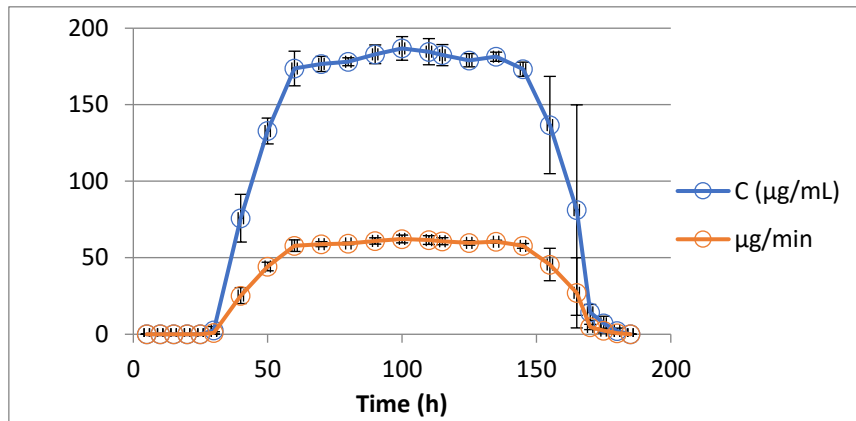
* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 20 min και 25 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



Στην **Εικόνα 3.15** και **Εικόνα 3.16** παρουσιάζονται τα διαγράμματα των μέσων τιμών συγκέντρωσης BU και ρυθμού εξόδου ως προς το χρόνο με τις αντίστοιχες τιμές τις τυπικής απόκλισης για την προσομοίωση ασθενή σωματικού βάρους 16 και 20 kg αντίστοιχα.

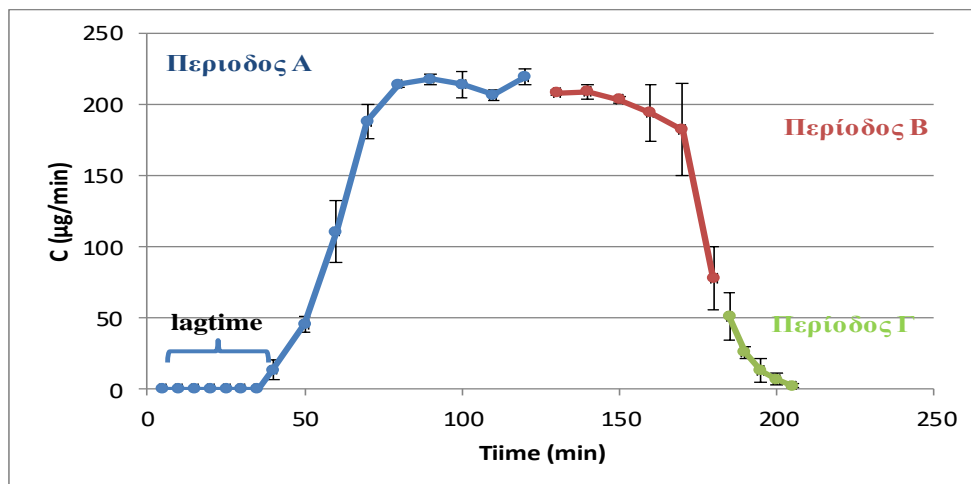


Εικόνα 3.15: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για ασθενή της κατηγορίας 3 με ΒΣ 16 kg.

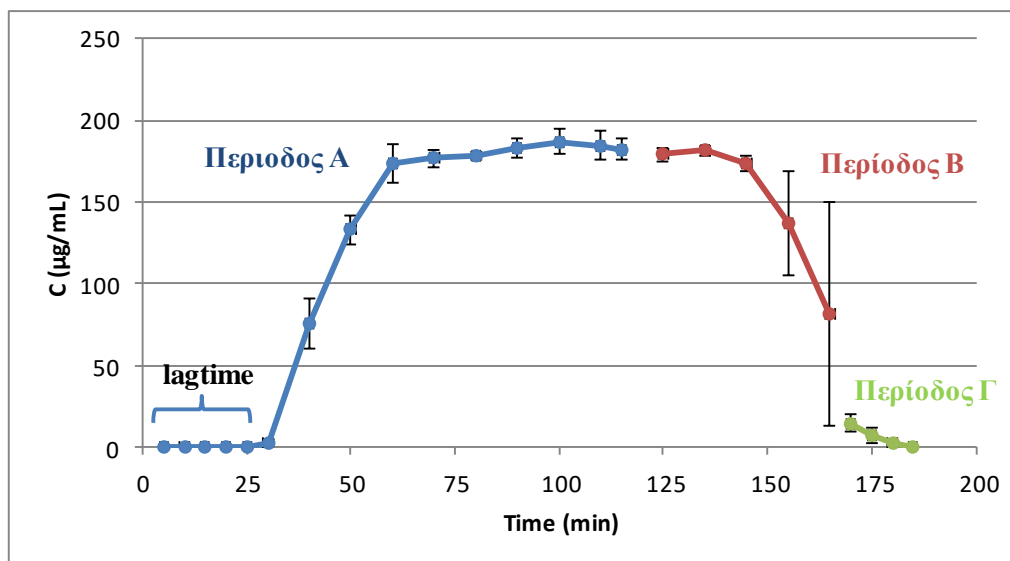


Εικόνα 3.16: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για ασθενή της κατηγορία 3 με ΒΣ 20 kg.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την την κατηγορία ΒΣ 16-23 kg με ενδεικτικό βάρος 16 kg και 20 kg και εγγεόμενο όγκο 30 και 40 mL είναι 35 και 25 min, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.17** και **Εικόνα 3.18** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία αύξηση της εμφάνισης του φαρμάκου στο σύστημα. Κατά την περίοδο Β που πραγματοποιείται η έκπλυση παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Τέλος κατά την περίοδο Γ που στην κλινική πράξη έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της έκπλυσης, η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.17: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 3 ΒΣ 16 kg.



Εικόνα 3.18: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 3 ΒΣ 20 kg.

3.3.2.4. Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς κατηγορίας 4 ΒΣ 23-34 kg (20-30 mL/h)

Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ 23-34 kg, το Busilvex® χορηγείται σε δόση 0.95 mg/kg. Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του Busilvex® ο ελάχιστος όγκος φαρμάκου που μπορεί να εγχυθεί είναι 39.6 mL για ασθενείς με βάρος 23 kg και ο μέγιστος όγκος φαρμάκου είναι ίσος με 59.2 mL για ασθενείς με μέγιστο βάρος 34 kg. Στον Πίνακας 3.14 συνοψίζονται οι πληροφορίες.

Πίνακας 3.14: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος καθώς και το βάρος προσομοίωσης της κατηγορίας ΒΣ 23-34 kg.

Κατηγορία ΒΣ 23-44 kg	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (ml/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (ml/h)	Συνολικός Ρυθμός (ml/h)
Ελάχιστο βάρος κατηγορίας	23	39.6	-	20	20
Μέγιστο βάρος κατηγορίας	34	59.2	-	30	30
**Βάρος προσομοίωσης	29	50	-	25	25

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, για ασθενή ΒΣ 23 kg ο ρυθμός έγχυσης είναι 19.8 mL/h (~20 mL/h) με εγχεόμενο όγκο διαλύματος φαρμάκου 39.6 mL (~40 mL) που μελετήθηκε στη προηγούμενη ενότητα, ενώ για ασθενή ΒΣ >34 kg ο όγκος του διαλύματος προς έγχυση είναι >59.2 mL με ρυθμό έγχυσης >30 mL/h και θα μελετηθεί

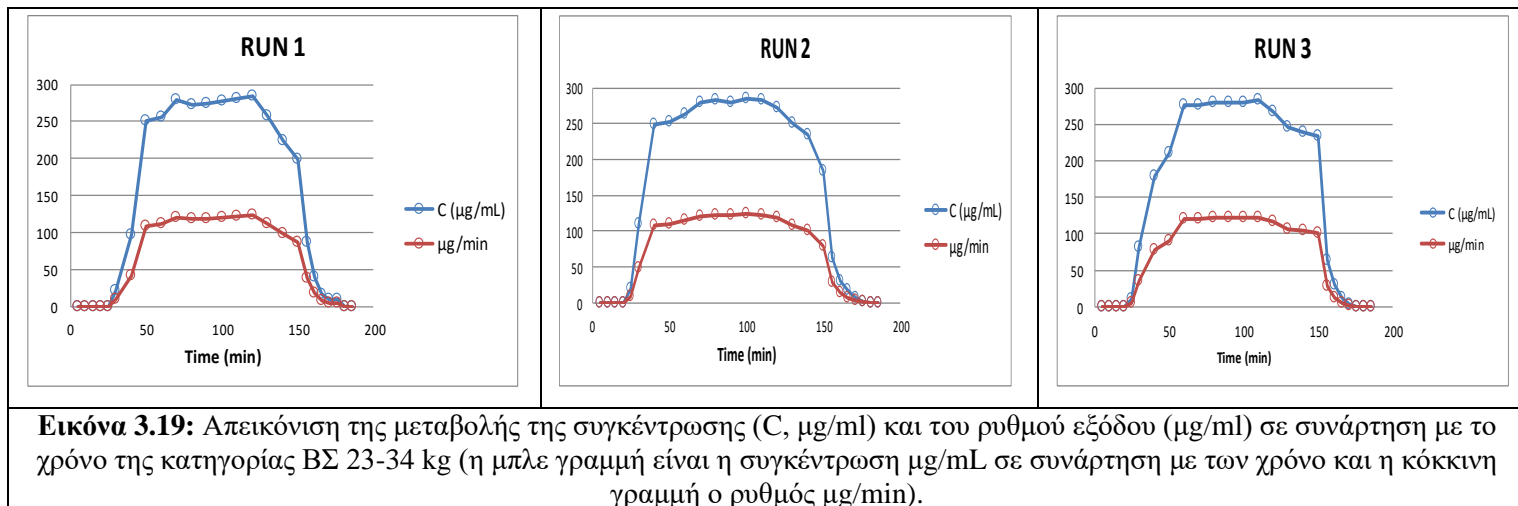
σε άλλη ενότητα καθώς όγκοι μεγαλύτεροι από 50 mL τοποθετούνται σε ασκό και σπανιότερα σε σύριγγα (Προσομοίωση κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού). Επομένως, για τη συγκεκριμένη κατηγορία ΒΣ η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε για ασθενή που έχει ενδεικτικό βάρος 29 kg με σκοπό να μελετηθεί ο τρόπος έγχυσης διαλύματος τελικού όγκου 50 mL. Ο ρυθμός έγχυσης είναι 25 mL/h εφαρμόζοντας την **Εξίσωση 3.7**.

Στα πειράματα προσομοίωσης της διαδικασίας έγχυσης, για τα πρώτα 30 min συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ενώ από τα 30 min μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) η συλλογή των δειγμάτων έγινε κάθε 10 min (περίοδος Α). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση από την πρωτεύουσα γραμμή με NaCl 0.9% β/ο με ρυθμό 25 mL/h για 36 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 10 min (περίοδος Β). Μετά το τέλος της περιόδου έκπλυσης συνεχίστηκε η δειγματοληψία κάθε 5 min για επιπλέον 30 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον **Πίνακα 3.15** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 3 προσομοιωμένων εγχύσεων, ενώ στην **Εικόνα 3.19** παρουσιάζονται οι απεικονίσεις μετρούμενης συγκέντρωσης BU (C, $\mu\text{g/mL}$) και amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) συναρτήσει του χρόνου. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, $\mu\text{g/mL}$) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα τρία πειράματα προσομοίωσης της κατηγορίας 4 (ΒΣ 23-34 kg), δίνονται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ.7, Γ.8)**.

Πίνακας 3.15: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας 4 με ΒΣ 23-34 kg.

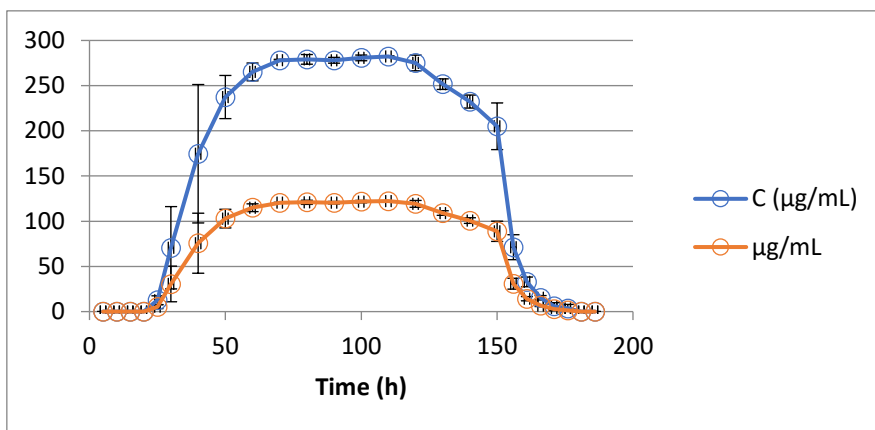
Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Γραμμή Α (mL/h)	Γραμμή Β (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (Α)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (Β)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (Α+Β+Γ*)
#1	50	296.48	-	25	25	120	15	36	186
#2	50	296.61	-	25	25	120	15	36	186
#3	50	298.13	-	25	25	120	15	36	186

* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 30 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



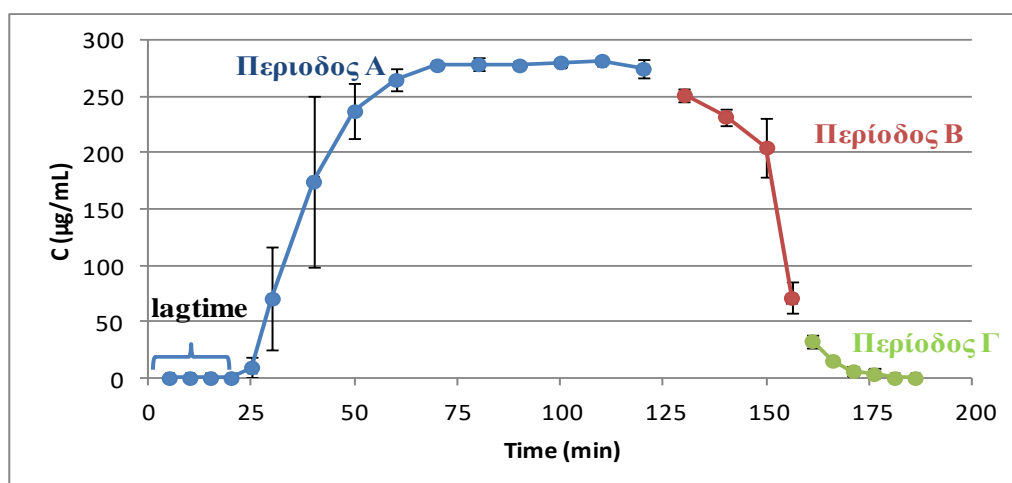
Εικόνα 3.19: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/ml}$) και του ρυθμού εξόδου ($\mu\text{g/ml}$) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας ΒΣ 23-34 kg (η μπλε γραμμή είναι η συγκέντρωση $\mu\text{g/mL}$ σε συνάρτηση με τον χρόνο και η κόκκινη γραμμή ο ρυθμός $\mu\text{g/min}$).

Στην **Εικόνα 3.20** παρουσιάζεται το διάγραμμα των μέσων τιμών συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/mL}$) ως προς το χρόνο με τις αντίστοιχες τιμές της τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 3.20: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης BU (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για ασθενή της κατηγορίας 4 με ΒΣ 29 kg.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία ΒΣ 23-34 kg με ενδεικτικό βάρος 29 kg και εγχυόμενο όγκο 50 mL είναι 20 min. Πιο συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.21** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης (20 min) και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία αύξηση της εμφάνισης του φαρμάκου στο σύστημα που παραμένει στη μέγιστη συγκέντρωση για τον υπόλοιπο χρόνο της περιόδου έγχυσης. Κατά την περίοδο Β που πραγματοποιείται η έκπλυση παρατηρείται σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου τα πρώτα 20 min (χρόνος ίσος με το χρόνο υστέρησης) και μεγαλύτερη στη συνέχεια της περιόδου έκπλυσης, ενώ τέλος κατά την περίοδο Γ ενώ στην κλινική πράξη έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της έκπλυσης, η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.21: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία ΒΣ 23-34 kg.

3.3.2.5. Προσομοίωση έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 5 με ΒΣ > 34 kg (Ροή>25mL/h)

Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ > 34 kg το Busilvex® χορηγείται σε δόση 0.8 mg/kg. Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον τρόπο παρασκευής του Busilvex® ο ελάχιστος όγκος φαρμάκου που μπορεί να εγχυθεί είναι 49.5 mL για ασθενείς με βάρος 34 kg.. Στον Πίνακα 3.16 συνοψίζονται οι πληροφορίες για τους ασθενείς της κατηγορίας 5. Σε αυτή τη περίπτωση θέλαμε να διερευνήσουμε το μοναδικό σενάριο που το φάρμακο μπορεί να εγχυθεί από σύριγγα και αντιστοιχεί σε βάρος 34.5 kg, για δόση 0.8 mg/kg που αντιστοιχεί σε όγκο ~51mL και ροή ~26mL/h σύμφωνα με την Εξίσωση 3.7. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως για δόσεις που οδηγούν σε όγκους φαρμάκου μεγαλύτερους από 50 mL το φάρμακο εγχέεται από ασκό.

Πίνακας 3.16: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για ασθενείς της κατηγορίας 5 (ΒΣ >34 kg)

Κατηγορία ΒΣ > 34 kg	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (ml/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (ml/h)	Συνολικός Ρυθμός (ml/h)
Ελάχιστο βάρος κατηγορίας	34	49.5	-	25	25
Βάρος προσομοίωσης	34.5	51	-	26	26

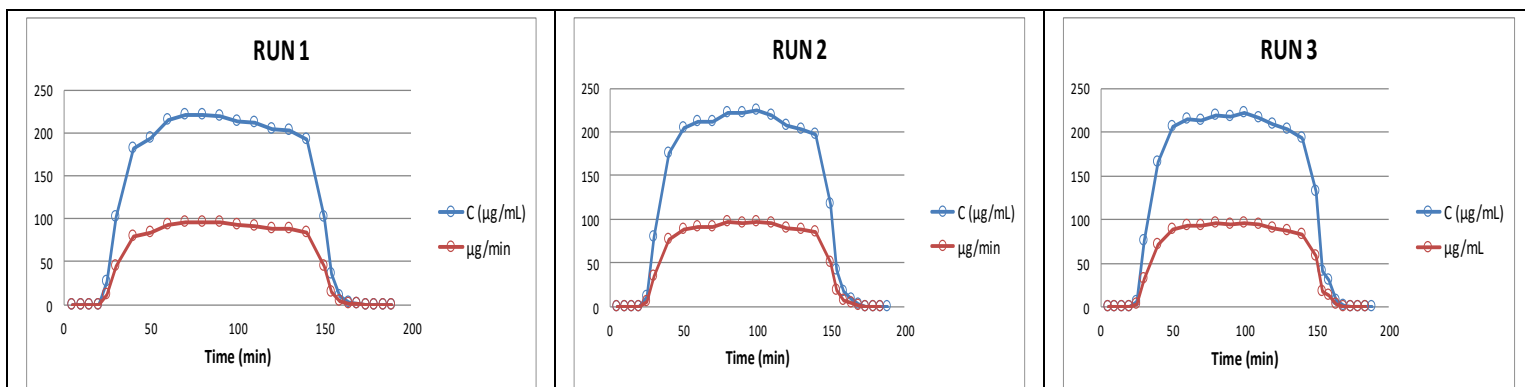
Τρία πειράματα προσομοίωσης για βάρος 34.5kg τελικού όγκου ~51 mL και ροής 26 mL/h παρασκευάστηκαν. Κατά την περίοδο της έγχυσης (περίοδος Α, 2 h) έγινε

συλλογή δειγμάτων κάθε 5 min για τα πρώτα 30 min , και στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) κάθε 10 min. Στη συνέχεια ακολούθησε η περίοδος έκπλυσης (περίοδος B) από την πρωτεύουσα γραμμή με παροχή NaCl 0.9% β/ο με ρυθμό 26 mL/h για 34 min στη διάρκεια της οποίας συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 10 min. Μετά το τέλος της περιόδου έκπλυσης συνεχίστηκε η δειγματοληψία κάθε 5 min για επιπλέον 30 min, ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον Πίνακα 3.18 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 3 προσομοιωμένων εγχύσεων, ενώ στην Εικόνα 3.22 παρουσιάζονται οι απεικονίσεις μετρούμενης συγκέντρωσης BU (C µg/mL) και amount per min (ρυθμός εξόδου, µg/min) συναρτήσει του χρόνου. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα τρία πειράματα προσομοίωσης της κατηγορίας 5 (BΣ >34 kg), δίνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ.9, Γ.10).

Πίνακας 3.17: Χαρακτηριστικά των 3 εγχύσεων της κατηγορίας BΣ >34 kg.

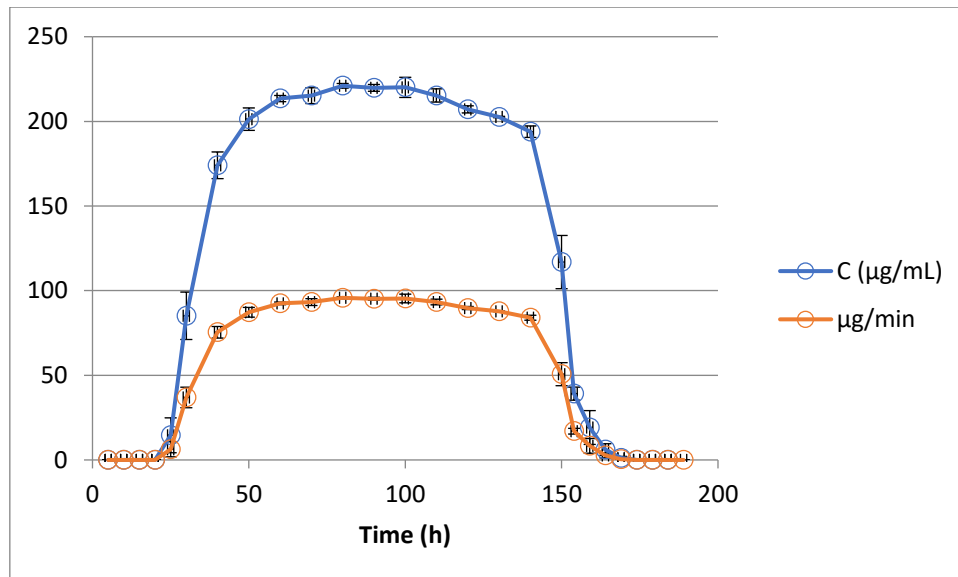
Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C (µg/mL)	Γραμμή A (mL/h)	Γραμμή B (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (A)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (B)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (A+B+Γ*)
#1	51	264.21	-	26	26	120	15	34	184
#2	51	258.85	-	26	26	120	15	34	184
#3	51	263.14	-	26	26	120	15	34	184

* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 30 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



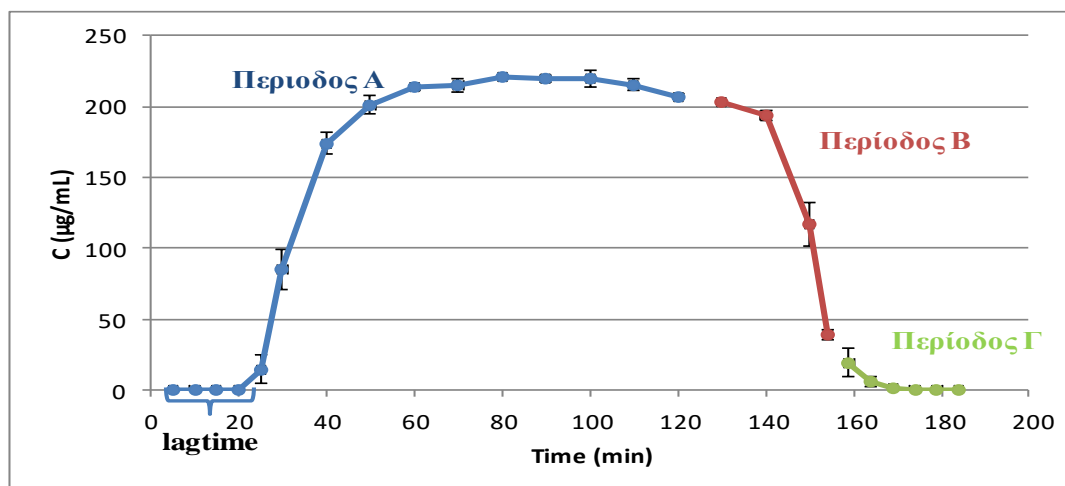
Εικόνα 3.22: Απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης (C, µg/ml) και του ρυθμού εξόδου (µg/ml) σε συνάρτηση με το χρόνο της κατηγορίας BΣ >34 kg (η μπλε γραμμή είναι η συγκέντρωση µg/mL σε συνάρτηση με των χρόνο και η κόκκινη γραμμή ο ρυθμός µg/min).

Στην **Εικόνα 3.23** παρουσιάζεται τα διαγράμματα των μέσων τιμών συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) ως προς τον χρόνο με τις αντίστοιχες τιμές τις τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 3.23: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης BU (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για ασθενή της κατηγορίας 5 ΒΣ >34 kg.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία ΒΣ >34 kg όπως προκύπτει από τα πειράματα προσομοίωσης για ασθενή με ενδεικτικό βάρος 34.5 kg και εγχέομενο όγκο διαλύματος φαρμάκου 51 mL είναι 20 min. Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.24** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης (20 min) και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία εμφάνιση του φαρμάκου στο σύστημα που διατηρείται σταθερή στη μέγιστη συγκέντρωση σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έγχυσης και τα πρώτα 20 min της περιόδου έκπλυσης (περίοδος Β), δηλαδή χρόνο ίσο με το lagtime. Στο τέλος της περιόδου έκπλυσης (περίοδος Β) παρατηρείται απότομη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου ενώ κατά την περίοδο Γ η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.24: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για ασθενή της κατηγορίας 5 με ΒΣ >34 kg.

3.3.2.6. Προσομοίωση κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί όταν ο όγκος του χορηγούμενου διαλύματος του φαρμάκου είναι μεγαλύτερος των 50 mL ενδείκνυται η τοποθέτηση του διαλύματος του φαρμάκου σε ασκό. Στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΒΣ > 34 kg αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις ασθενών με ΒΣ <34 kg, το Busilvex® χορηγείται σε δόση 0.95 ή 0.8 mg/kg και ο τελικός όγκος είναι μεγαλύτερος των 50 mL. Έγινε προσομοίωση της χορήγησης μέσω ασκού για 2 ασθενείς με ενδεικτικά βάρη 28.5 kg και 41 kg, ώστε να μελετηθούν τα διάλυμα προς έγχυση όγκου 50 mL και 60 mL, με ρυθμό έγχυσης 25 mL/h και 30 mL/h, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3.18 συνοψίζονται οι πληροφορίες.

Πίνακας 3.18: Βάρος σώματος (ΒΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για το μέγιστο και ελάχιστο βάρος της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού.

Κατηγορία έγχυσης μέσω ασκού	ΒΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (ml/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (ml/h)	Συνολικός Ρυθμός (ml/h)
Ελάχιστο βάρος προσομοίωσης	28.5	50	-	25	25
Μέγιστο βάρος προσομοίωσης	41	60	-	30	30

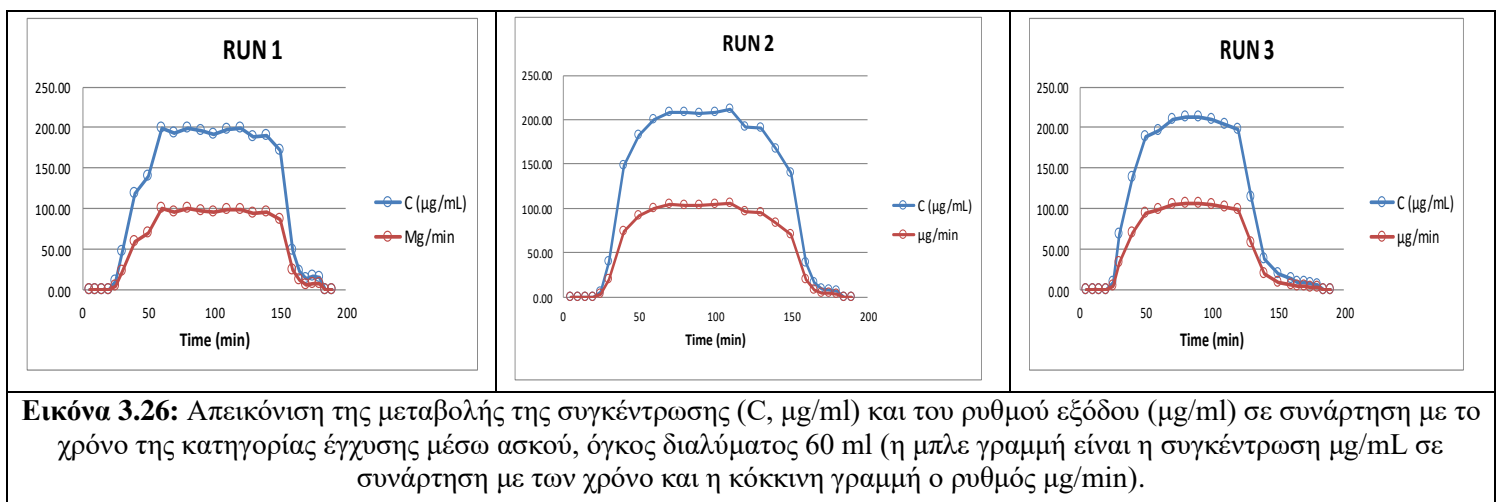
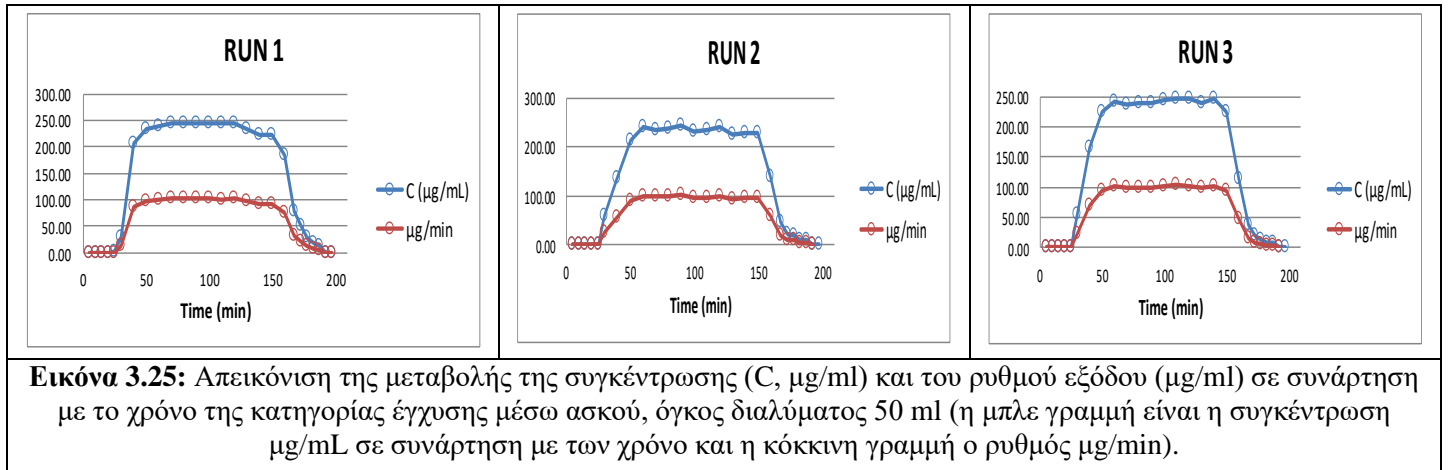
Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα για ασθενή βάρους 28.5 kg ο συνολικός ρυθμός έγχυσης είναι 25 mL/h για συνολικό όγκο διαλύματος εγχεόμενου φαρμάκου ~50 mL, ενώ για ασθενή βάρους 41 kg το τελικό διάλυμα προς έγχυση έχει συνολικό όγκο 60 mL και ο ρυθμός έγχυσης είναι 30 mL/h.

Και στις δυο περιπτώσεις η προσομοίωση της χορήγησης έγινε από την δευτερεύουσα γραμμή. Για τα πρώτα 30 min της έγχυσης συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min, ενώ από τα 30 min και μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2h) τα δείγματα συλλέχτηκαν κάθε 10 min (περίοδος A). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση από την πρωτεύουσα γραμμή με παροχή NaCl 0.9% β/ο και ρυθμό 25 και 30 mL/h για 48 min και 40 min, για ασθενή με ΒΣ 28.5 kg και 41 kg, αντίστοιχα. Στη διάρκεια της περιόδου έκπλυσης (περίοδος B) έγινε συλλογή δειγμάτων κάθε 10 min. Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η δειγματοληψία κάθε 5 min για επιπλέον 30 min, ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον Πίνακα 3.19 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των προσομοιωμένων εγχύσεων, ενώ στην Εικόνα 3.25 και Εικόνα 3.26 παρουσιάζονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης (C, µg/mL) και amount per min (ρυθμός εξόδου, µg/min) ως προς το χρόνο. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα πειράματα προσομοίωσης έγχυσης BU της κατηγορίας 5 (ΒΣ >34 kg) και χορήγηση μέσω ασκού, δίνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακας Γ10.α,β και Πίνακας Γ11.α,β).

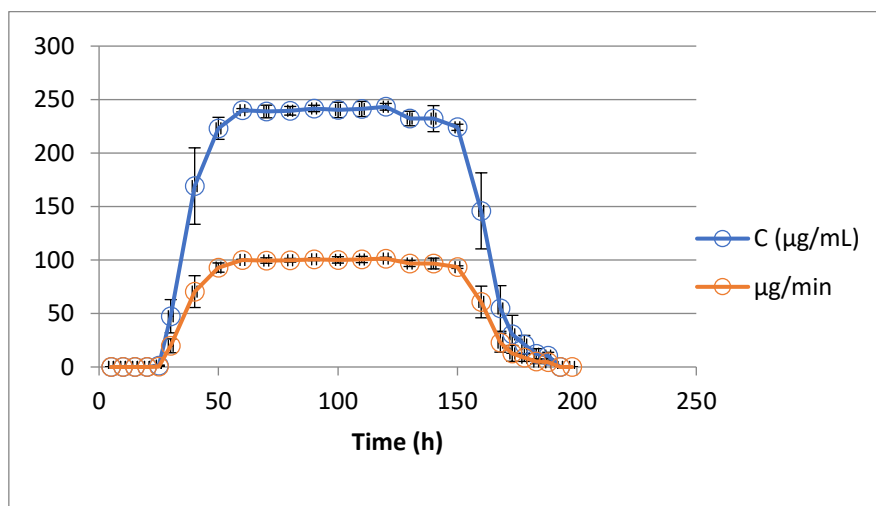
Πίνακας 3.19: Χαρακτηριστικά των προσομοιωμένων εγχύσεων για ασθενείς της κατηγορίας 5 και έγχυσης μέσω ασκού.

Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C (µg/mL)	Γραμμή A (mL/h)	Γραμμή B (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (A)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (B)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (A+B+Γ*)
#1	50	258.21	-	25	25	120	20	48	198
#2	50	259.45	-	25	25	120	20	48	198
#3	50	260.07	-	25	25	120	20	48	198
#1	60	218.10	-	30	30	120	20	40	190
#2	60	219.78	-	30	30	120	20	40	190
#3	60	214.34	-	30	30	120	20	40	190

* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 30 min και συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)

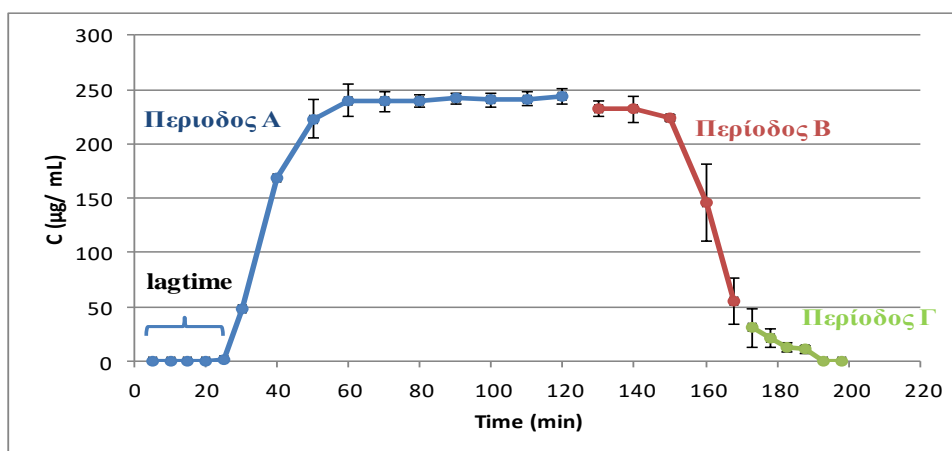


Στις **Εικόνα 3.27** έως **Εικόνα 3.30** παρουσιάζονται τα διαγράμματα των μέσων τιμών συγκέντρωσης BU (C , µg/mL) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, µg/min) ως προς το χρόνο, με τις αντίστοιχες τιμές τις τυπικής απόκλισης.

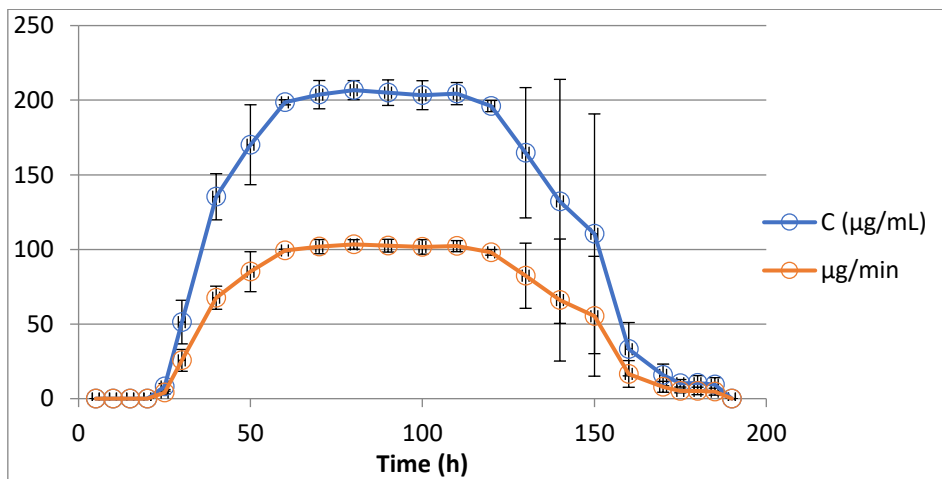


Εικόνα 3.27: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για την κατηγορία έγχυσης μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 28.5 kg και εγχεόμενο διάλυμα όγκου 50 mL.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού σε ασθενείς με ενδεικτικό βάρος 28.5 kg και εγγεόμενο όγκο 50 mL είναι 25 min. Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.28** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης (25 min) και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία εμφάνιση του φαρμάκου στο σύστημα που παραμένει στη μέγιστη συγκέντρωση μέχρι το τέλος της περιόδου έγχυσης (περίοδος A) και επιπλέον, χρόνο περίπου ίσο με το lagtime από την περίοδο έκπλυσης (περίοδος B). Κατά το υπόλοιπο διάστημα της περιόδου B που πραγματοποιείται η έκπλυση παρατηρείται απότομη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου και κατά την περίοδο Γ όπου έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία έκπλυσης η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.

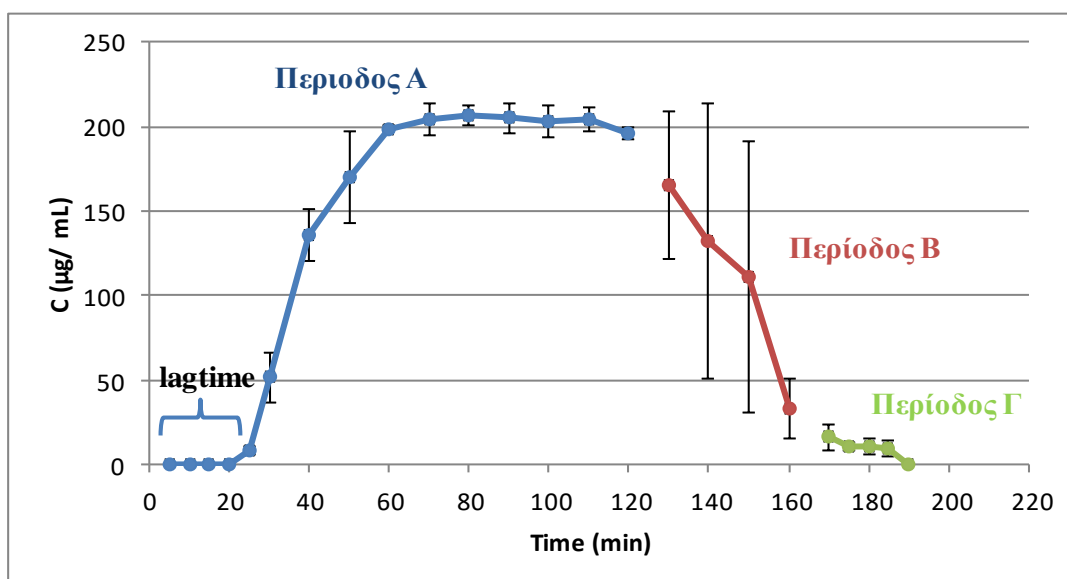


Εικόνα 3.28: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 28.5 kg και όγκο εγγεόμενου διαλύματος 50 mL.



Εικόνα 3.29: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για την κατηγορία 5 έγχυσης μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 41 kg και εγγεόμενο διάλυμα όγκου 60 mL.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού σε ασθενείς με ενδεικτικό βάρος 41 kg και εγγεόμενο όγκο 60 mL είναι 20 min. Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.30** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης (20 min) και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία εμφάνιση του φαρμάκου στο σύστημα που παραμένει στη μέγιστη συγκέντρωση σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έγχυσης (περίοδος Α). Κατά την περίοδο Β που πραγματοποιείται η έκπλυση παρατηρείται σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου η οποία συνεχίζεται και κατά την περίοδο Γ, όπου έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της έκπλυσης, μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.30: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για την κατηγορία 5 και έγχυση μέσω ασκού για ασθενή με ΒΣ 41 kg και όγκο εγγεόμενου διαλύματος 60 mL.

3.3.2.7. Προσομοίωση έγχυσης μέσω ασκού για την εύρεση μηδενικού χρόνου υστέρησης

Για την εύρεση του μηδενικού χρόνου υστέρησης πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις που περιλαμβάνουν τη χορήγηση δόσης 0.8 mg/kg σε ασθενείς με βάρος 48 kg, 55 kg και 62 kg ώστε να προκύψουν διαλύματα τελικών όγκων 70, 80, 90 mL και ρυθμό έγχυσης 35 mL/h, 40 mL/h και 45 mL/h, αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν θα πραγματοποιηθούν μελέτες για έγχυση με ροή >45 mL/h καθώς

αντιστοιχούν σε βάρη μεγαλύτερα των 62 kg και η έγχυση γίνεται όπως και στους ενήλικες χωρίς διαδικασία έκπλυσης. Στον **Πίνακας 3.20** συνοψίζονται οι πληροφορίες.

Πίνακας 3.20: Βάρος σώματος (BΣ), όγκος προς έγχυση και ρυθμός έγχυσης για τα βάρη σώματος ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στις προσομοιώσεις.

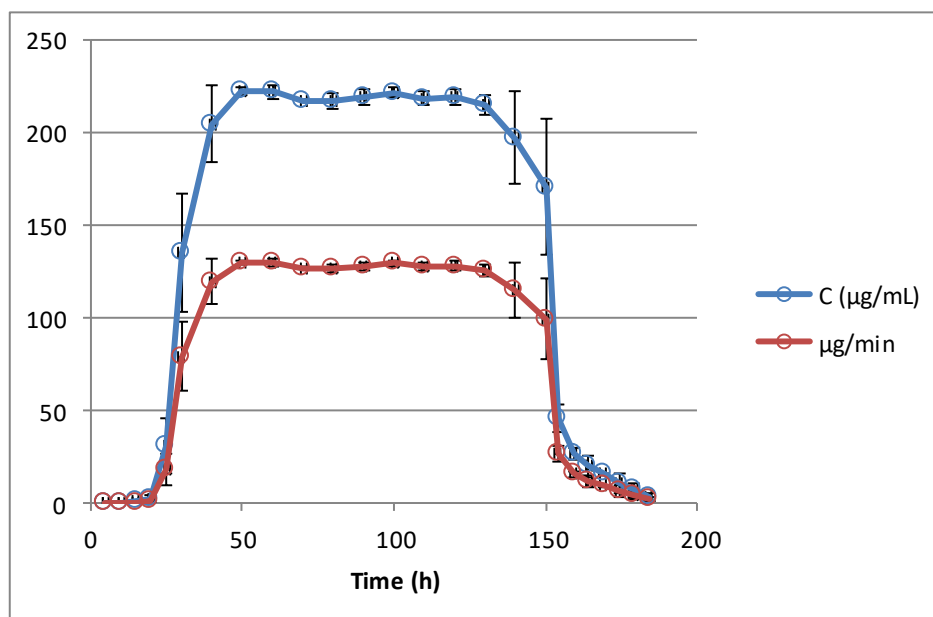
BΣ (kg)	Όγκος Busilvex® προς έγχυση (mL)	Ρυθμός Έγχυσης Πρωτεύουσας γραμμής (ml/h)	Ρυθμός Έγχυσης Δευτερεύουσας γραμμής (ml/h)	Συνολικός Ρυθμός (ml/h)
48	70	-	35	35
55	80	-	40	40
62	90	-	45	45

Το κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται για έγχυση ποσοτικοποιείται. Σε όλες τις περιπτώσεις που περιγράφονται στον **Πίνακας 3.20** η προσομοίωση της χορήγησης έγινε από την δευτερεύουσα γραμμή. Για τα πρώτα 25 min της περιόδου έγχυσης (περίοδος Α) συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 5 min και στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της έγχυσης (~2 h) έγινε δειγματοληψία ανά 10 min. Ακολούθησε έκπλυση διάρκειας 30 min (περίοδος Β) από την πρωτεύουσα γραμμή με NaCl 0.9% β/ο με ρυθμό ίδιο με το ρυθμό έγχυσης όπως αναφέρεται στον **Πίνακας 3.21**, και συλλέχτηκαν δείγματα κάθε 10 min. Μετά το τέλος της περιόδου έκπλυσης συνεχίστηκε η δειγματοληψία κάθε 5 min για επιπλέον 30 min για τις προσομοιώσεις έγχυσης σε ασθενείς BΣ 48 kg και 55 kg 25 min για τις προσομοιώσεις έγχυσης σε ασθενείς και BΣ 62 kg, ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ). Στον **Πίνακας 3.21** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των εγχύσεων για κάθε πείραμα προσομοίωσης, ενώ στην **Εικόνα 3.31** έως **Εικόνα 3.33** παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των μέσων τιμών της μετρούμενης συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, µg/min) ως προς το χρόνο με τις αντίστοιχες τιμές της τυπικής απόκλισης. Τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης BU (C, µg/mL) και amount per min (Ρυθμός εξόδου, µg/min) καθώς και τα δεδομένα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για τα συγκεκριμένα πειράματα προσομοίωσης έγχυσης BU δίνονται στο **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ (Πίνακα Γ.12, 13,14)**.

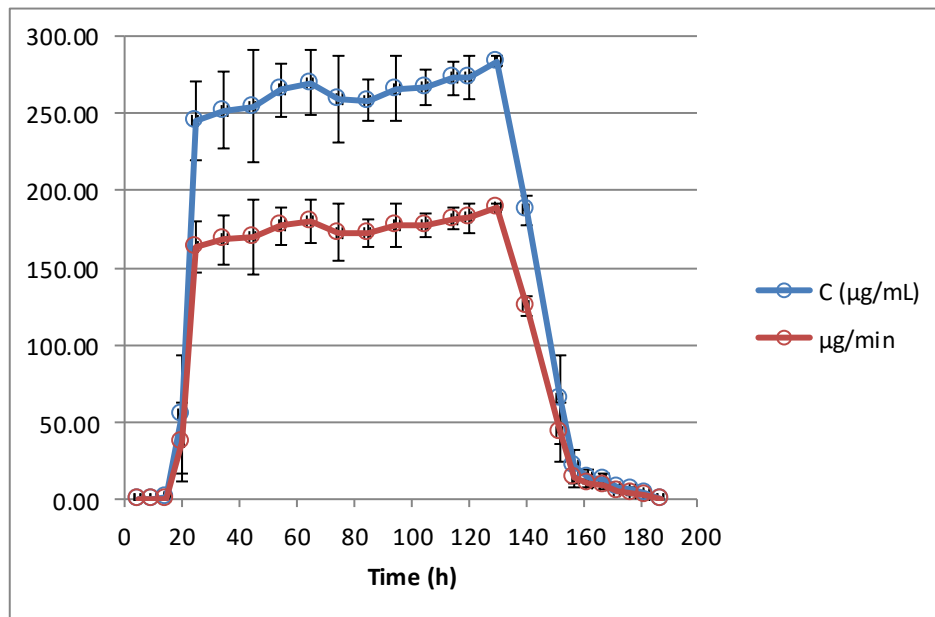
Πίνακας 3.21. Χαρακτηριστικά των προσομοιωμένων εγχύσεων για την εύρεση κατηγορίας ΒΣ ασθενών/όγκου διαλύματος έγχυσης με μηδενικό χρόνο υστέρησης.

Έγχυση	Όγκος Διαλύματος (mL)	C (µg/mL)	Γραμμή A (mL/h)	Γραμμή B (mL/h)	Ρυθμός (mL/h)	Χρόνος έγχυσης (min) (A)	Όγκος μέσου έκπλυσης (mL)	Χρόνος έκπλυσης (min) (B)	Συνολικός χρόνος έγχυσης (min) (A+B+Γ*)
1 ^η Προσομοίωση ΒΣ=48, Ροή=35 mL/h									
#1	70	217.46	-	35	35	120	20	30	185
#2	70	215.35	-	35	35	120	20	30	185
#3	70	210.34	-	35	35	120	20	30	185
2 ^η Προσομοίωση ΒΣ=55, Ροή=40 mL/h									
#1	80	309.36	-	40	40	120	20	30	180
#2	80	307.30	-	40	40	120	20	30	180
#3	80	305.06	-	40	40	120	20	30	180
3 ^η Προσομοίωση ΒΣ=62, Ροή=45 mL/h									
#1	90	225.68	-	45	45	120	20	30	173
#2	90	221.96	-	45	45	120	20	30	173
#3	90	223.38	-	45	45	120	20	30	173

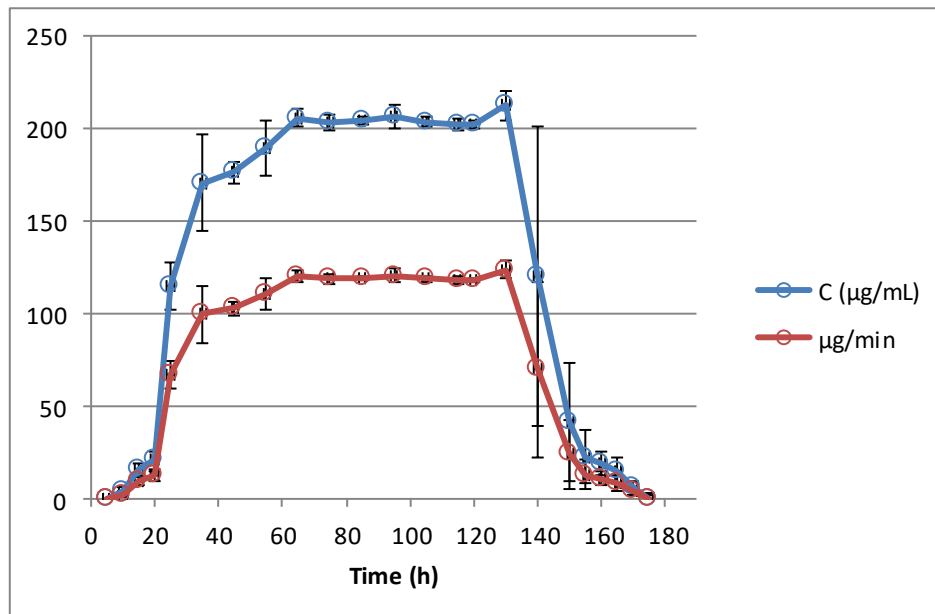
* Μετά το τέλος της έκπλυσης συνεχίστηκε η έκπλυση και δειγματοληψία για επιπλέον 30 min και 25 min και συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 5 min ώστε να διερευνηθεί πότε ολοκληρώνεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το σύστημα (περίοδος Γ)



Εικόνα 3.31: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 70 mL.



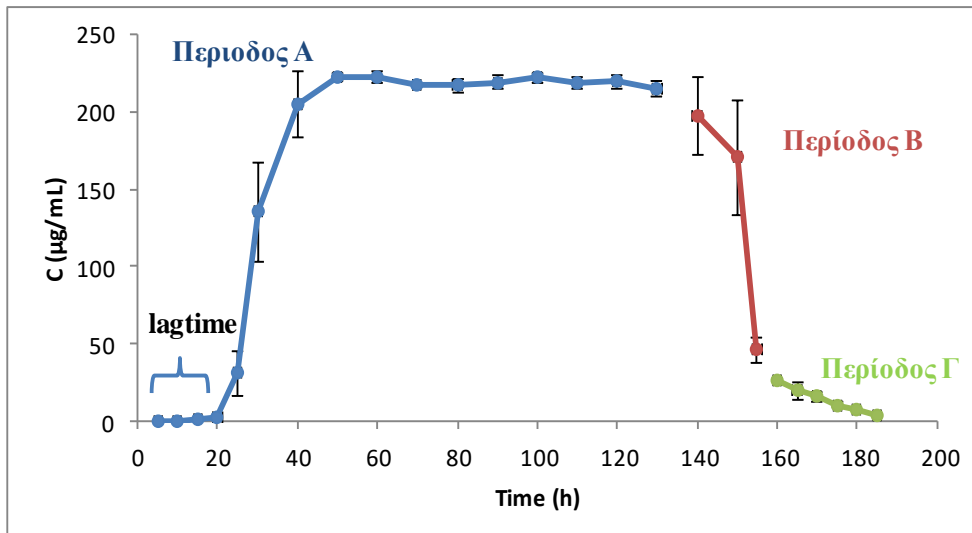
Εικόνα 3.32: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 80 mL.



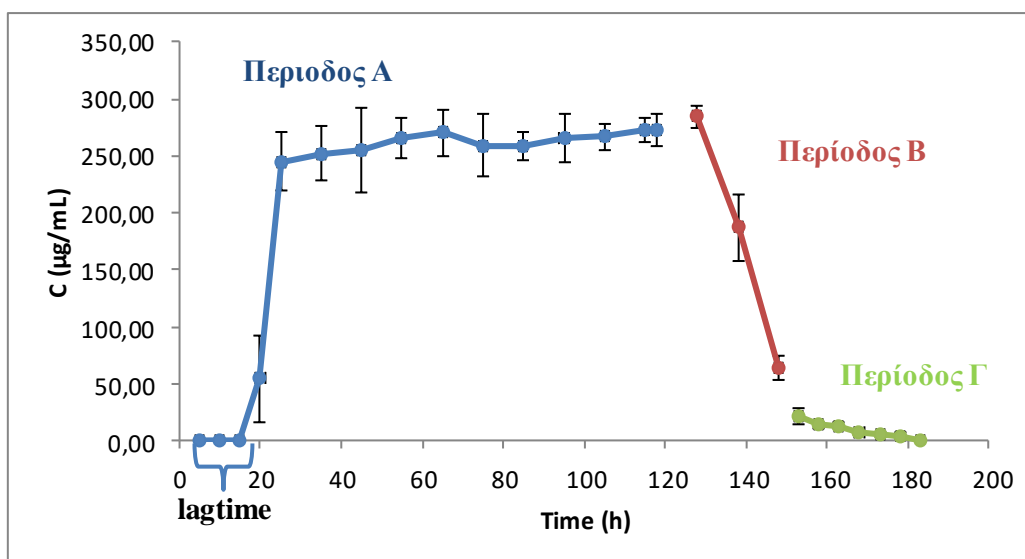
Εικόνα 3.33: Διάγραμμα των μέσων τιμών της συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) και του ρυθμού εξόδου (κόκκινη γραμμή) για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα των 90 mL.

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το lagtime για την κατηγορία έγχυσης σε ασκό με ενδεικτικό βάρος 48, 55 και 62 kg και εγγερόμενο όγκο 70, 80 και 90 mL, είναι 10, 10 και 5 min, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα στην **Εικόνα 3.34** έως **Εικόνα 3.36** παρατηρείται αρχικά ο χρόνος υστέρησης και στη συνέχεια ακολουθεί μια ταχεία

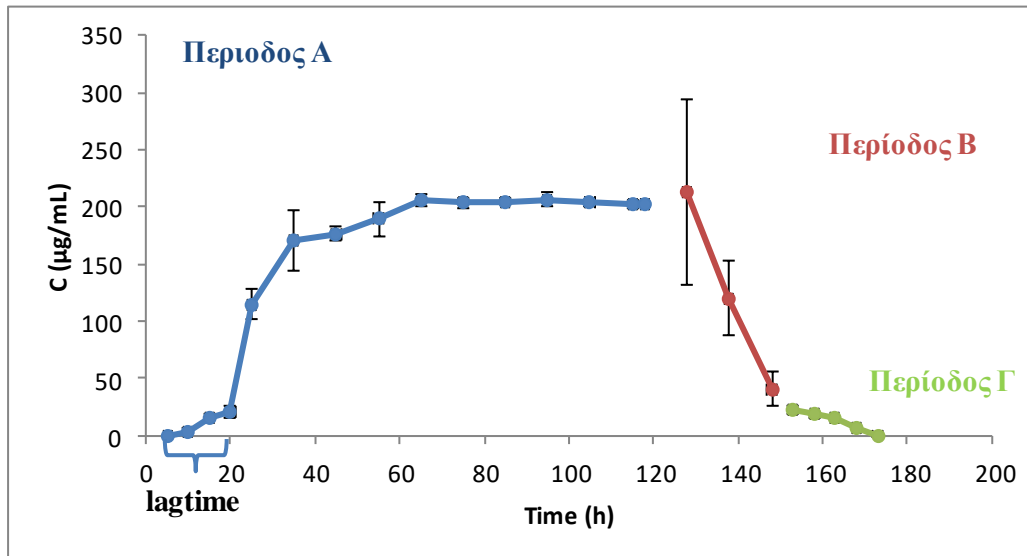
αύξηση της εμφάνισης του φαρμάκου στο σύστημα. Κατά την περίοδο Β που πραγματοποιείται η έκπλυση παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Τέλος κατά την περίοδο Γ η συγκέντρωση του φαρμάκου συνεχίζει να μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.



Εικόνα 3.34: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 70 mL.



Εικόνα 3.35: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 80 mL.



Εικόνα 3.36: Σχηματική απεικόνιση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο ανάλογα με την περίοδο της έγχυσης για το πείραμα εύρεσης μηδενικού χρόνου υστέρησης για το διάλυμα όγκου 90 mL.

3.4. Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων χρόνου υστέρησης ανά δοσολογική κατηγορία - Συμπεράσματα

Συμφώνα με τις προσομοιώσεις των εγχύσεων που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του χρόνου υστέρησης δημιουργήθηκε ένας γενικός πίνακας που περιγράφει, τον όγκο του φαρμάκου το ρυθμό έγχυσης και τον χρόνο υστέρησης σε min ανά κατηγορία βάρους σύμφωνα με το SPC^[104] του Busilvex®.

Πίνακας 3.22: Χρόνοι υστέρησης ανά κατηγορία βάρους σύμφωνα με το SPC του Busilvex®.

A/A	Βάρος Σώματος (kg)	Δόση (mg/kg)	Όγκος (mL)	Ροή πρωτεύουσας γραμμής έγχυσης (mL/h)	Ροή δευτερεύουσας γραμμής έγχυσης (mL/h)	Συνολική ροή (mL/h)	Χρόνος υστέρησης (min)	Χρόνος έκπλυσης (min)
ΒΣ <9 kg (κατηγορία 1 SPC)								
1	5	1.0	9.2	11	4	15	40	60
ΒΣ μεταξύ 9 kg και 16 kg (κατηγορία 2 SPC)								
2	10	1.2	20	5	10	15	40	59
ΒΣ μεταξύ 16 kg και 23 kg (κατηγορία 3 SPC)								
3	16	1.1	32	-	16	16	35	60
4	20	1.1	40	-	20	20	25	45
ΒΣ μεταξύ 24 kg και 34 kg (κατηγορία 4 SPC)								
5	29	0.95	50	-	25	25	20	36
ΒΣ μεγαλύτερο από 34 kg (κατηγορία 5 SPC)								
6	35.5	0.8	52	-	26	26	20	34
Έγχυση σε ασκό								
7	28.5	0.95	50	-	25	25	20	48
8	41	0.8	60	-	30	30	20	40
9	48	0.8	70	-	35	35	10	30
10	55	0.8	80	-	40	40	10	30
11	62	0.8	90	-	45	45	5	30

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακας 3.22 είναι εμφανές ότι όσο αυξάνει το βάρος σώματος του ασθενούς ο παρατηρούμενος χρόνος υστέρησης στην εμφάνιση του BU στη γενική κυκλοφορία του αίματος μειώνεται σημαντικά στα 5 min και άρα αναμένεται να έχει μειωμένη επίδραση στις μετρούμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, στον υπολογισμό της AUC και τελικά στον υπολογισμό της εξατομικευμένης δόσης για τον ασθενή. Η μεγαλύτερη επίδραση αναμένεται να

παρατηρηθεί στους ασθενείς με βάρος σώματος <9 kg έως 16 kg (κατηγορίες 1 και 2 SPC).

Επισημαίνεται ότι λαμβάνοντας υπόψη τη διακύμανση στο βάρος σώματος που οδηγεί σε διαφορετικό όγκο φαρμάκου προς έγχυση και κατά συνέπεια σε διαφορετικό ρυθμό έγχυσης, πρέπει να υπολογίζεται ο ακριβής όγκος του φαρμάκου που εγχέεται και η ροή αυτού και με βάση τον όγκο του φαρμάκου πρέπει να υπολογίζεται ο αντίστοιχος χρόνος υστέρησης ανά δοσολογική κατηγορία.

**Κεφάλαιο 4 – Εξατομίκευση Δοσολογίας Bu σε
Παιδιατρικούς Ασθενείς που Χρήζουν
Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών και
έλεγχος επίδρασης του χρόνου υστέρησης
έγχυσης**

4. Εισαγωγή

4.1. Ασθενείς – Πρωτόκολλο μελέτης – Υλικά και μέθοδοι

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» μεταξύ Ιουλίου του 2014 και Ιανουαρίου 2017. Επρόκειτο για μελέτη εξατομίκευσης της δόσης σε 76 παιδιατρικούς ασθενείς που χορηγείται Busilvex® ως μυελοαφανιστικός παράγοντας, σε συνδυασμό με τα χημικοθεραπευτικά σχήματα ανά νόσημα που αναφέρονται στον Πίνακα 4.1. Ο προσδιορισμός των επιπέδων του Busulfan (BU) στο αίμα των ασθενών και η διαδικασία εξατομίκευσης της δοσολογίας έγινε στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

Με στόχο τον έλεγχο της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της διαδικασίας και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας λάθους κατά την εφαρμογή της εξατομίκευσης της δόσης του BU, αναπτύχθηκε αρχικά, γραπτή οδηγία (SOP, Standard Operating Procedure, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ) συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων αίματος από κάθε ασθενή στο νοσοκομειακό περιβάλλον μέχρι την παράδοση στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ, για την ανάλυση των δειγμάτων.

Πίνακας 4.1: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται το νόσημα, ο αριθμός των ασθενών, το χημικοθεραπευτικό σχήμα και ο τύπος μεταμόσχευσης.

Γενική Κατηγορία	Νόσημα	Αριθμός Ασθενών	Χημικοθεραπευτικά σχήματα	Τύπος Μεταμόσχευσης
Αιματολογικές κακοήθειες (n=47)	ALL (n=9))	2	Bu/Flu/Thio+ATG	ALLO
		5	Bu/Flu/Thio + ATG	
		2	Bu/Flu/Thio	
	AML (n=36)	13	Bu/Cy + ATG	
		2	Bu/Flu/Clo+ATG	
		1	Bu/Flu/Clo	
		13	Bu/Flu/Thio + ATG	
		7	Bu/Flu/Thio	
		1	Bu/Flu/Thio + ATG	
		1	Bu/F;u/Thio + ATG	
MDS (n=1)	1	Bu/Flu/Thio + ATG		
NHL (ALK+) (n=1)	1	Bu/F;u/Thio + ATG		
Ασθενείς με γενετικό νόσημα (n=13)	Thall (n=7)	7	Bu/Cy	ALLO
	Adrenoleucodistrofia (n=2)	2	Bu/Flu/Thio +ATG	
	Blackfan – Diamond (n=1)	1	Bu/Cy+ATG	
	Wiscott – Aldrich (n=1)	1	Bu/Flu + ATG	
	Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία (n=1)	1	Bu/Cy	
	Δυσκεράτωση (n=1)	1	Bu/Flu/Cy + ATG	
Συμπαγείς όγκοι (n=16)	NBL σταδίου IV (n=11)	11	Bu/Mel	AUTO
	Ewing sarcoma (n=5)	5	Bu/Mel	

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με Adrenoleucodistrofia, ALL, T-ALL, AML, B-AML, αναιμία Blackfan – Diamond,

σάρκωμα Ewing, MDS, NBL σταδίου IV, NHL (ALK+), θαλασσαιμίες, Wiskott – Aldrich σύνδρομο και δυσκεράτωση. Η μελέτη έλαβε έγκριση πραγματοποίησης από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» (αριθμός έγκρισης 22050/29/09/2014).

4.1.1. Θεραπευτικό σχήμα και υπολειπόμενη νόσος

Στον κάθε ασθενή εφαρμόστηκε συγκεκριμένο πρωτόκολλο ώστε να επιτευχθεί μηδενική ή όσο το δυνατόν μικρότερη υπολειπόμενη νόσος. Το θεραπευτικό πρωτόκολλο πριν τη μεταμόσχευσή εξαρτάται από το νόσημα και την ανθεκτικότητα αυτού. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2) παρουσιάζονται τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται ώστε να έχουμε τη καλύτερη ύφεση της ασθένειας πριν τη ΜΜΟ ανά κατηγορία νοσημάτων.

Πίνακας 4.2: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ύφεση της νόσου πριν τη μεταμόσχευση.

Νόσημα	Αριθμός Ασθενών	Θεραπευτικό Πρωτόκολλο	Status pre
Ewing	5	Euro Ewing 1999	SD, CR
B-ALL	1	ALLIC-BFM-2009	CR1
	1	ALLIC-2009	CR1
	4	ALL REZ BFM 2002/IDA FLAG	CR2
	1	ALLIC/BFM2009	CR1
	1	ALLIC/BFM2009 +NELARABIN	CR1
	1	ALLIC-2009	CR1
	1	ALLIC-2009 / ALL-REZ-BFM-2002+Clo-VP16-CY	CR1
	1	ALLIC-2009+EsPhALL / Clo-VP16-CY	CR2
	2	ALLIC-BFM 2009 HR	CR1
	1	ALLIC-BFM-2009+ALL-REZ-BFM2012	CR2
	1	ALLIC-BFM-2009+NOVA FLAG+BLINA	CR2
	1	ALLIC-BFM-2009ALL REZ BFM 2002+Clo+Endoxan+VP16	CR2
	1	ALLIC-BFM-2009+Clo+Endoxan+VP16	CR1
	1	ALL-REZ-BFM2002+Clo+Endoxan+Vip	CR2
	1	ALLIC-BFM-2009+IDA+FLAG	CR2
	1	ALLIC-BFM-2009+ALL-REZ-BFM2002+Clo+Endoxan+Vip	CR3
	1	ALLIC-BFM-2009+ 1 Cycle Clo+Endoxan + VP16	CR1
	T-ALL	4	ALLIC-BFM-2009
1		ALLIC-BFM-2009ALL-REZ-BFM2012+Nelarabin	CR2
1		ALLIC-BFM-2009+Nelarabin+Endoxan+ Velcate	CR1
1		ALLIC-BFM-2009+ALL-REZ-BFM2002	CR2
1		ALLIC-BFM-2009+2 Cycle Nelarabine	CR1
AML	3	AML-BFM2004	CR1
	1	MRC BFM AML 2004	
	1	MRC BFM AML 2004 + ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΥΠΟΤΡΟΠΗΣ	
	5	BFM AML 2012	
	1	AML-BFM 2009 + IEDA/FLAG	
	1	AML-BFM 2009+Clo+AraC+2 Cycle IDA FLAG	
	1	MRC BFM AML12 + 1 κύκλος συντήρησης	
NBL IV	7	HR-NBL1	CR

	2	HR-NBL1+ 2cycle TVD	CR
	1	HR-NBL1+ 4cycle TVD	SD
	1	R-NBL1+2 cycle TVD+7cycle ice+11 HD Endoxan + carbo	SD
NHL (ALK+)	1	AUTO (BEAM) / adcetris - Nelarabin+VP16+CY	
*MDS, Adrenoleucodistrofia, THAL, Blackfan – Diamond, Δυσκεράτωση, Microrepancitric, Wiscott - Aldrivh	14	Δεν εφαρμόζεται κάποιο θεραπευτικό πρωτόκολλο.	

* Για αυτές τις ασθένειες δεν εφαρμόζεται θεραπευτικό σχήμα για την ύφεσή της νόσου.

4.1.2. Καταγραφή δημογραφικών στοιχείων

Για κάθε παιδιατρικό ασθενή καταγράφονται η ηλικία, το ύψος, το βάρος και το φύλλο. Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο. Παρακάτω δίνεται ο Πίνακας 4.3 με τη διάμεσο, τη μέση τιμή, και το εύρος, για το βάρος, το ύψος, την ηλικία, και το φύλο για το σύνολο των ασθενών.

Πίνακας 4.3: Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Χαρακτηριστικό	Διάμεσος (Median)	Μέση τιμή	Εύρος
Πραγματικό Βάρος (kg)	26	30.6	7.4-104.0
Ύψος (cm)	124.5	121.8	0.7-207.0
Ηλικία (years)	6.5	7.6	0.5-19
Φύλο (Α/Γ)	49/27	-	-

4.1.3. Δοσολογικό σχήμα Busilvex®

Η θεραπεία με Busilvex® εφαρμόστηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς στους οποίους ακολουθούσε αλλογενής ΜΜΟ. Η συνιστώμενη δόση του Busilvex® καθορίζεται από το βάρος του παιδιού και ποικίλει μεταξύ 0.8 - 1.2 mg/kg (Πίνακας 4.4 & ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α).

Πίνακας 4.4: Προτεινόμενη σύμφωνα με το SPC του φαρμάκου κατηγοριοποίηση της χορηγούμενης δόσης βουσουλφάνης με βάση το σωματικό βάρος του ασθενούς.

Κατηγορία	Μάζα σώματος (BW/BΣ)	Προτεινόμενη Δόση σύμφωνα με το SPC (mg/kg)
1	BW < 9 kg	1.0
2	9-16 kg	1.2
3	16-23 kg	1.1
4	23-34 kg	0.95
5	BW > 34kg	0.8

Το Busilvex® χορηγείται με ενδοφλέβια έγχυση σε κεντρική φλέβα (ενστάλαξη σε κεντρική φλέβα στο στήθος). Κάθε έγχυση διαρκεί δύο έως τρεις ώρες και χορηγείται στον ασθενή ανά έξι ώρες επί τέσσερις συνεχόμενες ημέρες πριν από τη χημειοθεραπεία ή δυο συνεχόμενες ημέρες. Το χημειοθεραπευτικό σχήμα εξαρτάται από το νόσημα του ασθενή (Πίνακας 4.2). Πριν από τη λήψη του Busilvex®, χορηγούνται στους ασθενείς αντιεπιληπτικά φάρμακα (για να προληφθούν σπασμοί) και αντιεμετικά φάρμακα (για να προληφθεί ο έμετος).

4.2. Δειγματοληπτικό σχήμα

Η δειγματοληψία για τον προσδιορισμό των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα έγινε σύμφωνα με ένα τροποποιημένο δειγματοληπτικό σχήμα του SPC (0, 2, 4, 6h). Τα δείγματα λαμβάνονταν σε χρόνο 0 (πριν την έναρξη της έγχυσης), στις 2-3 h στο τέλος της έγχυσης), στις 2.5 ή 3.5- h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης), στις 4 και 6 ώρες, μετά την έναρξη της χορήγησης της πρώτης δόσης. Το επιπλέον δείγμα που προστέθηκε (2.5 ή 3.5- h) αποτελεί ένα ενδιάμεσο σημείο μεταξύ του σημείου μετά το τέλος της έγχυσης και αυτό της δειγματοληψίας 1 h μετά τέλος της έγχυσης όπως αναφέρει το SPC. Το επιπλέον σημείο προστέθηκε έτσι ώστε να λαμβάνονται περισσότερα σημεία υπόψη για την εκτίμηση του k_{el} . Το αίμα συλλέγεται σε ηπαρινισμένα φιαλίδια. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνονται 4-8 cc αίματος σε φιαλίδια ηπαρίνης, από περιφερική φλέβα ή από κεντρικό φλεβο-καθετήρα αφού έχει πραγματοποιηθεί έκπλυση. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 800 g για 5 min στους 0 °C και έπειτα το πλάσμα μεταφέρεται σε ependorff και καταψύχονται σε θερμοκρασία ≤ -20 °C μέχρι τη μεταφορά τους στο Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ), όπου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των επιπέδων Busilvex®.

4.2.1. Ανάλυση δειγμάτων – υπολογισμός αποτελεσμάτων

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (βλ. Κεφάλαιο 2). Με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις Busilvex® υπολογίζεται η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου (AUC, Area Under the Curve) και η επόμενη δόση, που πρέπει να χορηγηθεί ώστε η τιμή της AUC να είναι μέσα στα αποδεκτά θεραπευτικά όρια. Χρησιμοποιώντας το πραγματικό χρόνο δειγματοληψίας και τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις Busulfan υπολογίζεται η

AUC_{trap} με τον κανόνα των τραπεζίων σε μονάδες $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$ μέχρι το τελευταίο σημείο δειγματοληψίας σε χρόνο 6 h. Στη συνέχεια εκτιμάται με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης από τα 3 τελευταία σημεία (μετά από λογαρίθμηση των συγκεντρώσεων, \ln) η τελική κλίση η οποία αντιστοιχεί στη σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης k_{el} ($1/\text{h}$). Η ολική AUC_{total} ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$) υπολογίζεται από την εξίσωση 4.1:

$$AUC_{total} = AUC_{trap} + \frac{C_6}{k_{el}} \quad \text{Εξίσωση 4.1}$$

και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μονάδες $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πολλαπλασιαζόμενο με τον συντελεστή **243.6**.

Ο συντελεστής **243.6** προκύπτει ως εξής:

$$\begin{aligned} \frac{\mu\text{g} \cdot \text{h}}{\text{mL}} &= \frac{\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot 60 \frac{\text{min}}{\text{h}}}{\text{MW} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \cdot \frac{\text{mL}}{1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}}}} = \frac{60 \cdot 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}}{\text{MW} \cdot \text{L}} = \frac{60000}{\text{MW}} \mu\text{M} \cdot \text{min} \\ &= \frac{60000}{246.304} \mu\text{M} \cdot \text{min} = 243.6 \mu\text{M} \cdot \text{min} \end{aligned}$$

MW Busulfan: 246.304 g/mol.

Η **Κάθαρση (L/h/Kg)** υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$CL = \frac{\text{Δόση}}{AUC_{total}} \quad \text{Εξίσωση 4.2}$$

Εάν η υπολογιζόμενη AUC δεν βρίσκεται εντός του θεραπευτικού εύρους, 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, γίνεται τροποποίηση-εξατομίκευση της δόσης με θεραπευτικό στόχο $AUC_{target} = 1125 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ σύμφωνα με την εξίσωση:

$$DOSE_{indiv} = \frac{DOSE_{initial} \times 1125}{AUC_{total}} \quad \text{Εξίσωση 4.3}$$

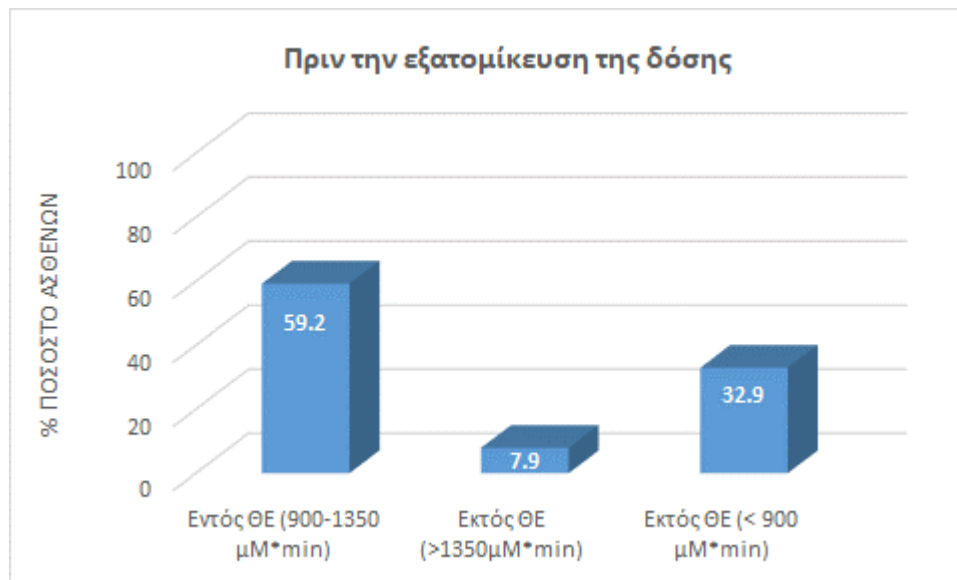
Όπου, $DOSE_{indiv}$: Διορθωμένη δόση

$DOSE_{initial}$: αρχική δόση

AUC_{total} : η υπολογιζόμενη AUC σε μονάδες $\mu\text{M} \cdot \text{min}$.

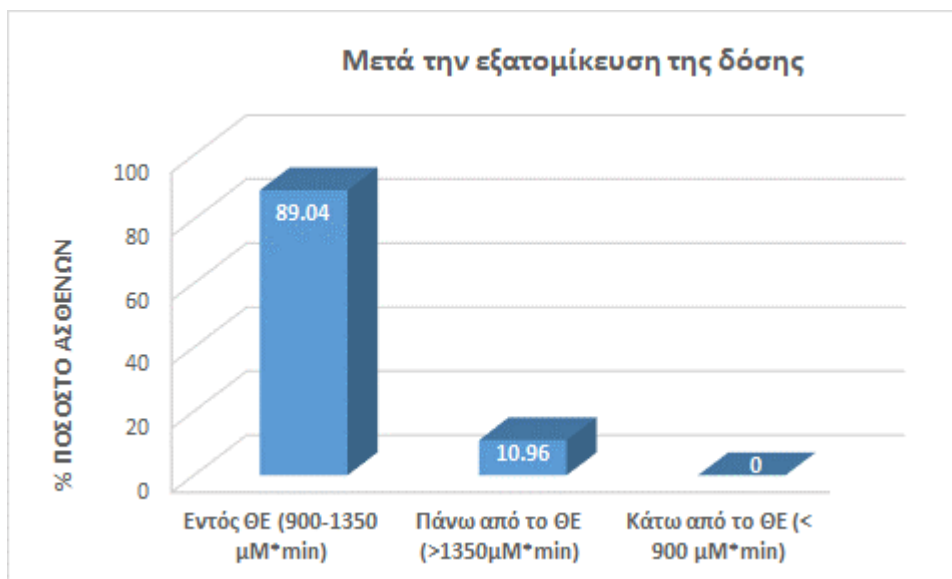
4.3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Από τις υπολογιζόμενες τιμές AUC, 45 από τους συνολικά 76 ασθενείς βρέθηκαν να είναι εντός του ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (59.2%). Έξι (6) ασθενείς βρέθηκαν να είναι πάνω από το ΘΕ (7.9%) και 25 βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ (32.9%). Τα ποσοστά αυτά έρχονται σε συμφωνία με ποσοστά που αναφέρονται και στη βιβλιογραφία^[118-121]. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ και το ποσοστό αυτών που είναι πάνω και κάτω από το ΘΕ.



Εικόνα 4.1: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ πριν την εξατομίκευση της δόσης (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$).

Από τους 31 ασθενείς που βρέθηκαν εκτός ΘΕ στους 28 ασθενείς εφαρμόστηκε η εξατομίκευση της δόσης. Οι τρεις ασθενείς δεν εξατομικεύτηκαν καθώς διέκοψαν τη θεραπεία. Έτσι, από τους 28 ασθενείς που έλαβαν εξατομικευμένη δόση, οι είκοσι (20) ασθενείς βρέθηκαν εντός ΘΕ 900.0 -1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (71.4%) και συνολικά 89.04% των ασθενών βρίσκονται εντός ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης BU (Εικόνα 4.2). Για τους οκτώ (8) ασθενείς που βρέθηκε να είναι εκτός ΘΕ 900-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ οι επτά (7) ασθενείς βρίσκονται κάτω από ανώτατο όριο του διευρυμένου ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (εκ των οποίων 3 ασθενείς βρίσκονταν οριακά πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), και ένας (1) ασθενής βρίσκονταν οριακά πάνω από 1500.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (1505.3 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Τα αποτελέσματα των ασθενών εντός, πάνω και κάτω από το ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU για όλους τους ασθενείς της μελέτης απεικονίζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης. (900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$).

4.3.1. Δοσολογικό σχήμα 1.0 mg/kg

Συγκεκριμένα σε 4 ασθενείς από τους 76 χορηγήθηκε η δόση 1.0 mg/kg. Από τους 4 ασθενείς οι τρεις (3) βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) συγκεκριμένα βρίσκονταν κάτω από το ΘΕ. Για τους ασθενείς που βρίσκονταν εκτός ΘΕ έγινε εξατομίκευση της δόσης και δύο (2) από αυτούς βρέθηκε να είναι εντός ΘΕ 900.0-1350.0, ενώ ο ένας (1) βρέθηκε να είναι οριακά πάνω από το ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$), ωστόσο εντός του διευρυμένου ΘΕ 900.0-1500.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$.

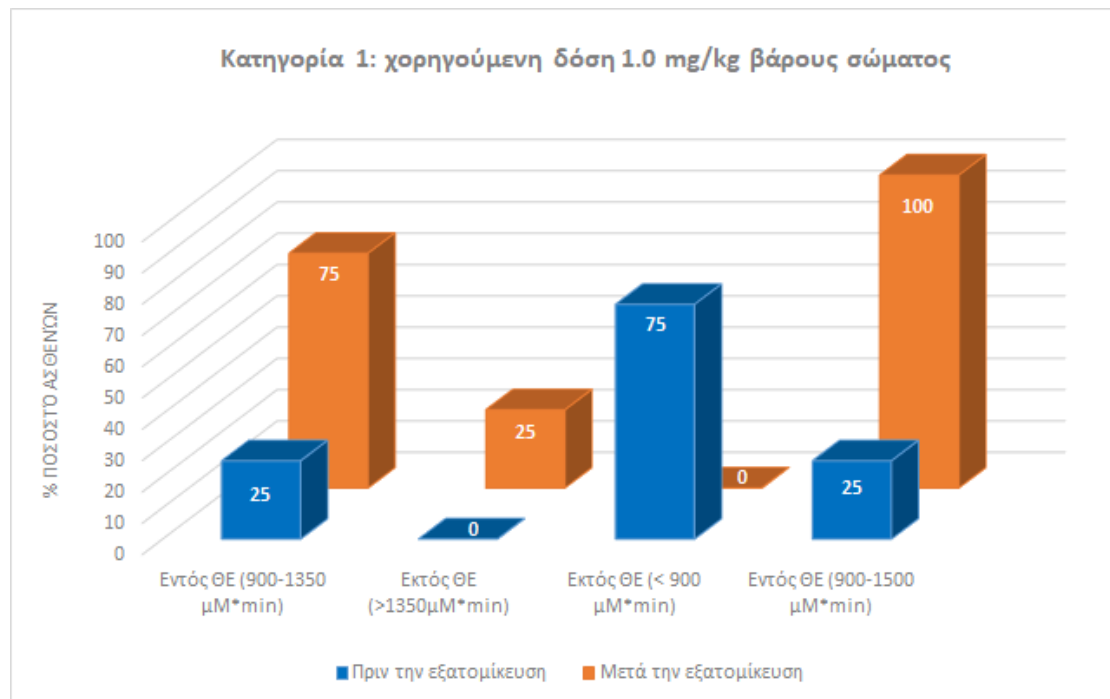
Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζεται η έκταση της απορρόφησης (AUC) πριν και μετά την εξατομίκευση της δόσης, καθώς και τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω και κάτω από το ΘΕ πριν και μετά την εξατομίκευση.

Συνολικά, μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU μπορεί να θεωρηθεί ότι όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας 1 βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα.

Πίνακας 4.5: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης ($AUC_{initial}$) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.0 mg/kg, εξατομικευμένη δόση ($Δόση_{indiv}$) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).

ID	Αρχική AUC_{total} ($\mu M \cdot min$)	$Dose_{indiv}$ (mg/kg)	AUC_{indiv} ($\mu M \cdot min$)		% μείωση της δόσης	% αύξηση της δόσης
			ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500		
Κατηγορία 1 SPC						
1	716.2	1.2	1406.4			20
2	935.0	-	-		-	-
3	892.4	1.2	1136.4			20
4	668.7	1.35	995.3			35
Εντός ΘΕ	1/4 (25.0%)		3/4 (75.0%)	4/4 (100%)		
Πάνω από το ΘΕ	0/4 (0.0%)		1/4 (25.0%)	0/4 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ	3/4 (75.0%)		0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο $AUC_{initial}$



Εικόνα 4.3: Κατηγορία 1 (χορηγούμενη δόση 1.0 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu M \cdot min$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu M \cdot min$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).

4.3.2. Δοσολογικό σχήμα 1.2 mg/kg

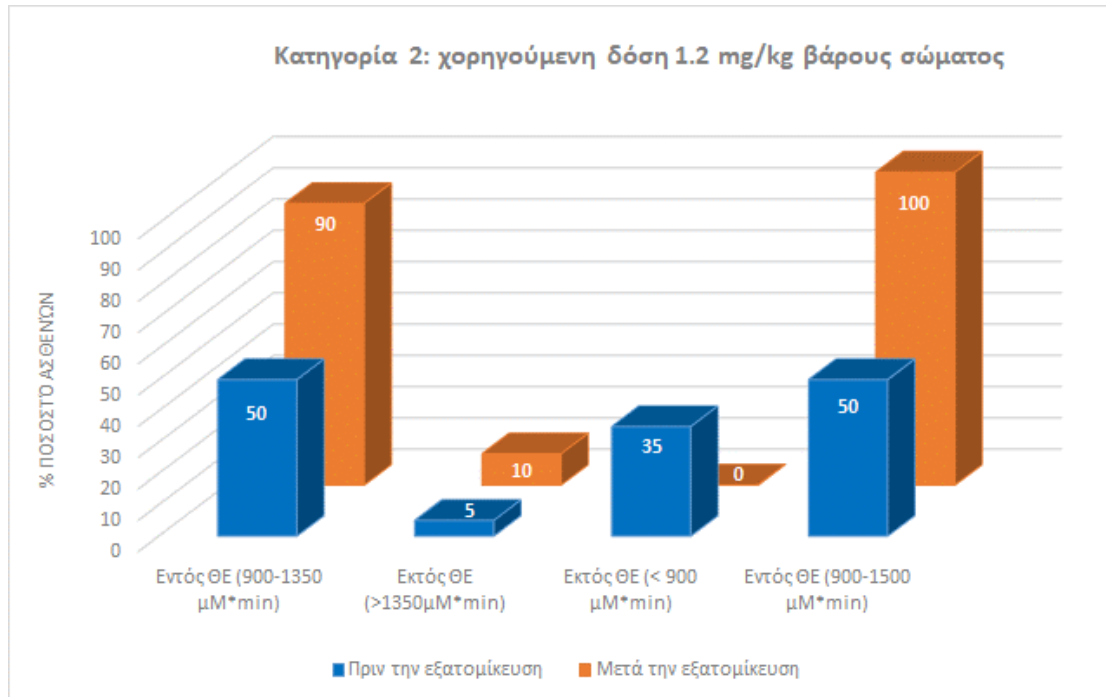
Συγκεκριμένα σε 20 ασθενείς από τους 76 χορηγήθηκε η δόση 1.2 mg/kg. Από τους 20 ασθενείς οι οκτώ (8) βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) συγκεκριμένα 1 ασθενής βρέθηκε να είναι πάνω από το ΘΕ και επτά (7) ασθενείς βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ. Ο ασθενείς που βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ έλαβαν μείωση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε να είναι εκτός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), ωστόσο ήταν εντός ΘΕ για το όριο (900.0-1500.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Για τους επτά ασθενείς που βρέθηκαν να είναι κάτω από το ΘΕ ακολούθησε αύξηση της δόσης και επαναπροσδιορισμός των επιπέδων BU. Από τους επτά ασθενείς ένας βρέθηκε να είναι οριακά εκτός ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) και οι έξι (6) να είναι εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Έτσι το σύνολο των 8 ασθενών που βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ, μετά την τροποποίηση της δόση δύο (2) ασθενείς βρέθηκαν να είναι οριακά πάνω από το ΘΕ 900.0-1350.0 και όλοι να είναι εντός του ΘΕ 900-1500.

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η έκταση της απορρόφησης (AUC) πριν και μετά την εξατομίκευση της δόση καθώς και τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω από και κάτω από το ΘΕ πριν και μετά την εξατομίκευση. Συνολικά, μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU μπορεί να θεωρηθεί ότι όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας 2 βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα.

Πίνακας 4.6: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.2 mg/kg, εξατομικευμένη δόση ($Δόση_{indiv}$) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).

ID	Αρχική AUC_{total} ($\mu M \cdot min$)	$Dose_{indiv}$ (mg/kg)*	AUC_{indiv} ($\mu M \cdot min$)		% μείωση της δόσης	% αύξηση της δόσης
			ΘΕ 900-1350	ΘΕ900-1500		
Κατηγορία 2 SPC						
5	1099.1	-	-	-	-	-
6	956.5	-	-	-	-	-
7	705.4	1.5	1308.3			25
8	901.7	-	-	-	-	-
9	1251.2	-	-	-	-	-
10	1105.0	-	-	-	-	-
11	1105.8	-	-	-	-	-
12	840.2	1.3	961.0			8.33
13	943.8	-	-	-	-	-
14	743.7	1.4	1228.6			16.7
15	954.9	-	-	-	-	-
16	812.3	1.5	1186.3			25
17	<i>1918.4</i>	<i>0.8</i>	<i>1375.9</i>		33.3	
18	681.1	1.6	1012.8			33.3
19	661.1	1.65	1412.3			37.5
20	1312.0	-	-	-	-	-
21	694.5	1.7	1140.5			41.7
22	1135.8	-	-	-	-	-
23	945.6	-	-	-	-	-
24	1306.0	-	-	-	-	-
Εντός ΘΕ	12/20 (60.0%)		18/20 (90.0%)	20/20 (100%)		
Πάνω από το ΘΕ	1/20 (5.0%)		2/20 (10.0%)	0/20 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ	7/20 (35.0%)		0/20 (0.0%)	0/20 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο $AUC_{initial}$



Εικόνα 4.4: Κατηγορία 2 (χορηγούμενη δόση 1.2 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 μΜ*min και εντός ΘΕ 900-1500 μΜ*min πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).

4.3.3. Δοσολογικό σχήμα 1.1 mg/kg

Σε 13 ασθενείς από τους 76 χορηγήθηκε η δόση 1.1 mg/kg. Από τους 13 ασθενείς οι 6 (5) βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ (900.0-1350.0 μΜ*min) συγκεκριμένα 2 ασθενείς βρέθηκε να είναι πάνω από το ΘΕ και τέσσερις (4) ασθενείς βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ. Ο ασθενείς που βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ έλαβαν μείωση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε ο ένας ασθενής συνέχισε να βρίσκεται εκτός ΘΕ με το όριο 900.0-1350.0 μΜ*min και οριακά εκτός ΘΕ με το όριο 900.0-1500.0 μΜ*min, ενώ ο δεύτερός ασθενής βρισκόταν εντός ΘΕ μόνο με το ΘΕ 900.0-1500.0 μΜ*min. Οι τέσσερις (4) ασθενείς που βρίσκονταν κάτω από το ΘΕ έλαβαν τροποποίηση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκαν να είναι εντός ΘΕ (900.0-1350.0 μΜ*min).

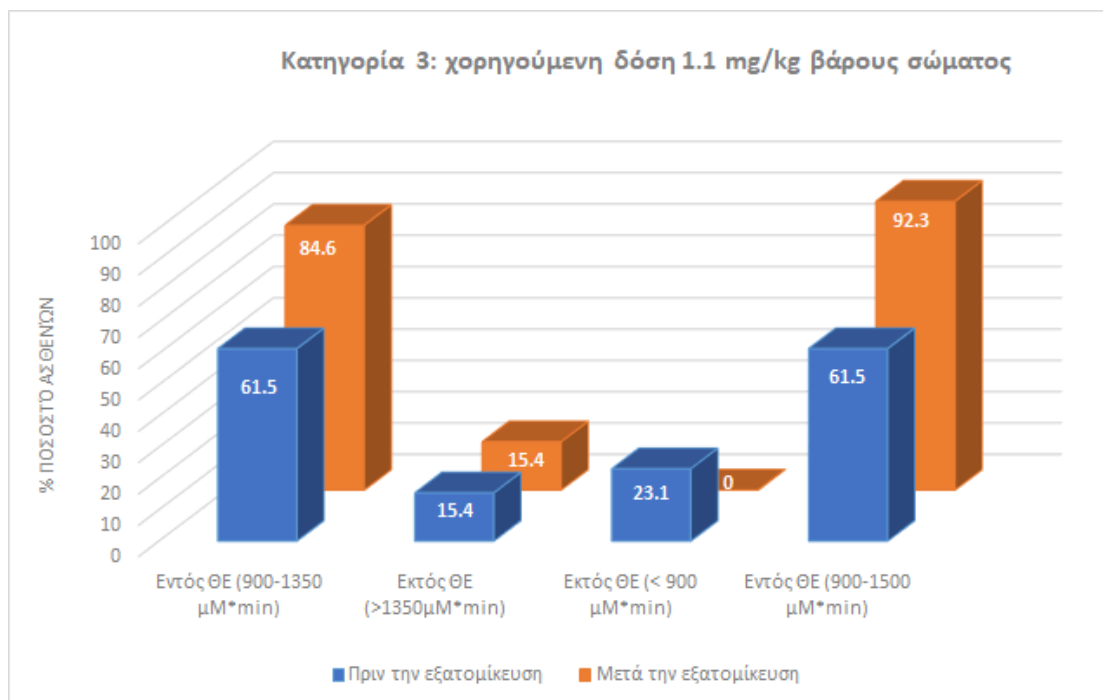
Στο Πίνακα 4.7 παρουσιάζεται η έκταση της απορρόφησης πριν και μετά την εξατομίκευση της δόσης για το ΘΕ 900.0-1350.0 μΜ*min και το ΘΕ 900.0-1500.0 μΜ*min στην περίπτωση της εξατομίκευσης, τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω από και κάτω από το ΘΕ πριν και μετά την εξατομίκευση.

Συνολικά, μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒU μπορεί να θεωρηθεί ότι οι ασθενείς της κατηγορίας 3 βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα σε ποσοστό 92.3%.

Πίνακας 4.7: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.1 mg/kg, εξατομικευμένη δόση ($Δόση_{indiv}$) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).

ID	Αρχική AUC_{total} ($\mu M \cdot min$)	$Dose_{indiv}$ (mg/kg)*	AUC_{indiv} ($\mu M \cdot min$)		% μείωση της δόσης	% αύξηση της δόσης
			ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500		
Κατηγορία 3 SPC						
25	1771.4	0.9	1463.1		18.2	
26	903.5	-	-		-	-
27	721.7	1.3	1120.5			18.2
28	1295.0	-	-			
29	600.2	1.5	1280.9			36.4
30	1222.5	-	-		-	-
31	1035.1	-	-		-	-
32	667.1	1.5	1177.1			36.4
33	1331.7	-	-		-	-
34	890.0	1.3	1082.2			18.2
35	1575.4	0.9	1505.3		18.2	
36	908.8	-	-		-	-
37	995.4	-	-		-	-
Εντός ΘΕ	7/13 (53.8%)		11/13 (84.6%)	12/13 (92.3%)		
Πάνω από το ΘΕ	2/13 (15.4%)		2/13 (15.4%)	1/13 (7.7%)		
Κάτω από το ΘΕ	4/13 (30.8%)		0/13 (0.0%)	0/13 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο $AUC_{initial}$



Εικόνα 4.5: Κατηγορία 3 (χορηγούμενη δόση 1.1 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).

4.3.4. Δοσολογικό σχήμα 0.95 mg/kg

Σε 16 ασθενείς από τους 76 χορηγήθηκε η δόση 0.95 mg/kg. Από τους 16 ασθενείς οι εννέα (9) βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Συγκεκριμένα 2 ασθενείς βρέθηκε να είναι πάνω από το ΘΕ και επτά (7) ασθενείς βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ. Οι ασθενείς που βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ έλαβαν μειωμένη δόση και στον επανέλεγχο που ακολούθησε μόνο ο ένας ασθενής συνέχισε να βρίσκεται οριακά πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ αλλά εντός του ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ με AUC = 1385.5 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Από τους επτά (7) ασθενείς που βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ ο ένας ασθενής διέκοψε την θεραπεία ενώ οι υπόλοιποι έξι (6) υποβλήθηκαν σε τροποποίηση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρίσκονταν εντός (3 ασθενείς) ή οριακά πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (3 ασθενείς) και όλοι εντός του ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$.

Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζεται η έκταση της απορρόφησης πριν και μετά την εξατομίκευση της δόσης, καθώς και τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω από και κάτω από το ΘΕ πριν και μετά την εξατομίκευση.

Συνολικά, μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒU μπορεί να θεωρηθεί ότι όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας 4 βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα.

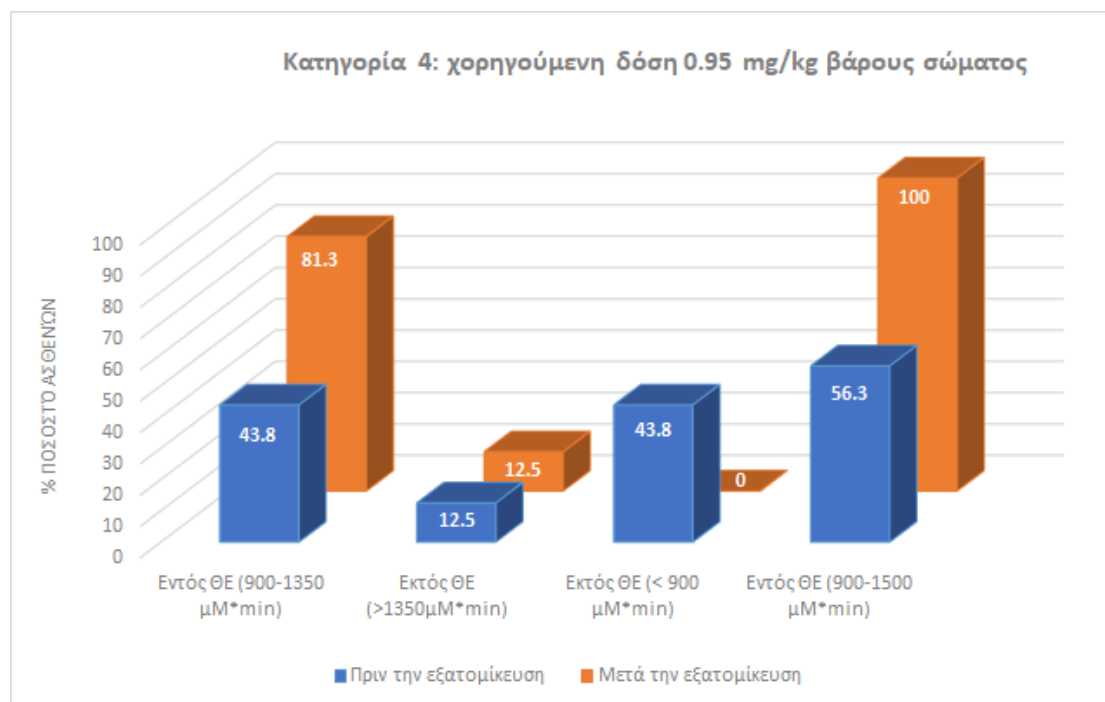
Πίνακας 4.8: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.95 mg/kg, εξατομικευμένη δόση ($\Delta\delta\sigma\eta_{indiv}$) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).

ID	Αρχική AUC_{total} ($\mu M * min$)	Dose _{indiv} (mg/kg)*	AUC _{indiv} ($\mu M * min$)		% μείωση της δόσης	% αύξηση της δόσης
			ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500		
Κατηγορία 4 SPC						
38	1829.0	0.7	1385.5		26.3	
39	565.2	2.0	1408.9			110.5
40	906.0	-	-		-	-
41	1124.1	-	-		-	-
42	602.3	1.8	1344.5			89.5
43	1166.9	-	-		-	-
44	913.3	-	-		-	-
45	593.4	-	Διέκοψε			
46	1212.8	-	-		-	-
47**	818.4	0.85	1386.4			
48	633.7	1.2	970.9			26.3
49	652.6	1.2	1134.3			26.3
50	763.6	1.2	1278.0			26.3
51	1286.2	-	-		-	-
52	1262.0	-	-		-	-
53***	1500.2	0.53	937.3		44.2	
Εντός ΘΕ	7/16 (43.8%)		13/16 (81.3%)	16/16 (100.0%)		
Πάνω από το ΘΕ	2/16 (12.5%)		3/16 (12.5%)	0/16 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ	7/16 (23.1%)		0/16 (0.0%)	0/16 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο $AUC_{initial}$

** Για τον ασθενή #47 αρχικά έγινε αύξηση της δόσης από 0.95 σε 1.1 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε να είναι εκτός ΘΕ με $AUC = 1598.0 \mu M * min$ και ακολούθησε μείωση της δόσης από 1.1 σε 0.85 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε η AUC βρέθηκε οριακά εκτός ΘΕ $1386.4 \mu M * min$.

***Για τον ασθενή #53 αρχικά έγινε μείωση της δόσης από 0.95 σε 0.75 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε η έκταση της απορρόφησης βρέθηκε να είναι $1648.0 \mu M * min$, έτσι ακολούθησε και δεύτερη μείωση της δόσης από 0.75 σε 0.53 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε να είναι εντός ΘΕ με $AUC = 937.3 \mu M * min$.



Εικόνα 4.6: Κατηγορία 4 (χορηγούμενη δόση 0.95 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 μM*min και εντός ΘΕ 900-1500 μM*min πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).

4.3.5. Δοσολογικό σχήμα 0.8 mg/kg

Σε 23 ασθενείς από τους 76 χορηγήθηκε η δόση 0.8 mg/kg. Από τους 23 ασθενείς οι πέντε (5) βρέθηκαν να είναι εκτός ΘΕ (900.0-1350.0 μM*min). Συγκεκριμένα ένας (1) ασθενής βρέθηκε να είναι πάνω από το ΘΕ και τέσσερις (4) ασθενείς βρέθηκαν κάτω από το ΘΕ. Ο ασθενής που βρισκόταν πάνω από το ΘΕ έλαβε μείωση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε εισήλθε εντός ΘΕ 900.0-1350.0 μM*min. Από τους τέσσερις (4) ασθενείς που βρίσκονταν κάτω από το ΘΕ οι δυο (2) ασθενείς διέκοψαν τη θεραπεία και στους υπόλοιπους δυο (2) έγινε αύξηση της δόσης και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκαν να είναι εντός ΘΕ 900-1350 μM*min.

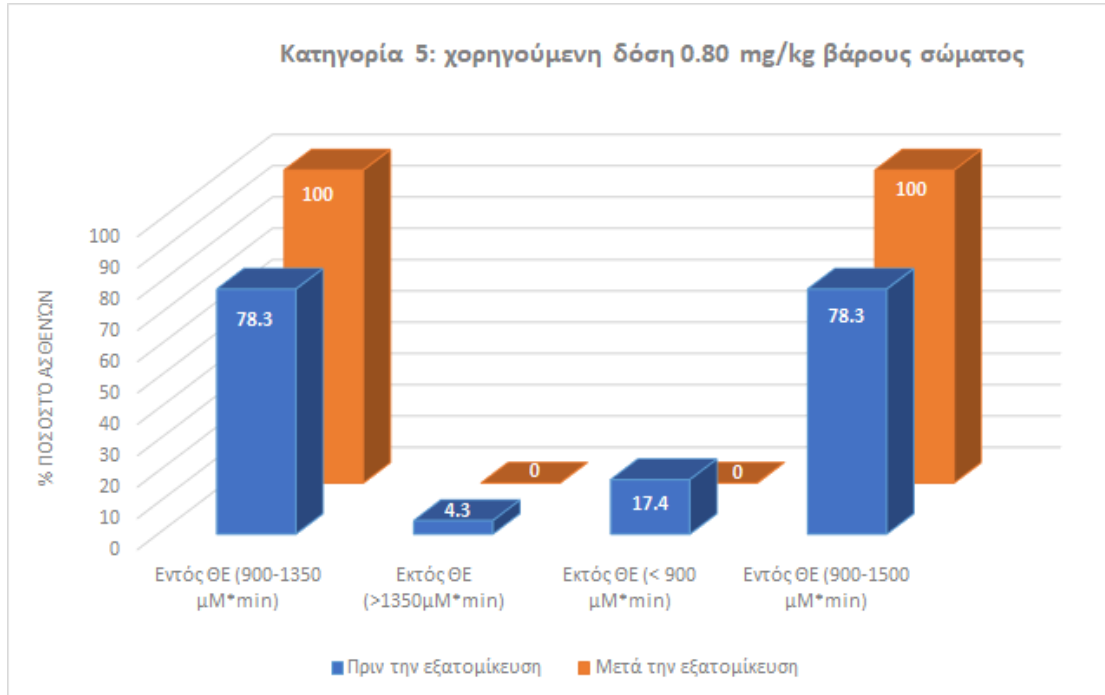
Στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζεται η έκταση της απορρόφησης (AUC) πριν και μετά την εξατομίκευση της δόσης, καθώς και τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω από και κάτω από το ΘΕ πριν και μετά την εξατομίκευση.

Συνολικά, μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU μπορεί να θεωρηθεί ότι όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας 2 βρίσκονται σε θεραπευτικά επίπεδα.

Πίνακας 4.9: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης (AUC_{total}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.8 mg/kg, εξατομικευμένη δόση ($Δόση_{indiv}$) και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης (AUC_{indiv}).

ID	Αρχική AUC_{total} ($\mu M \cdot \min$)	$Dose_{indiv}$ (mg/kg)*	AUC_{indiv} ($\mu M \cdot \min$)		% μείωση της δόσης	% αύξηση της δόσης
			ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500		
Κατηγορία 5 SPC						
54	1555.2	0.65	910.3		18.8	
55	1293.0	-	-	-	-	-
56	1001.9	-	-	-	-	-
57	913.1	-	-	-	-	-
58	947.8	-	-	-	-	-
59	1189.8	-	-	-	-	-
60	912.9	-	-	-	-	-
61	938.0	-	-	-	-	-
62	922.0	-	-	-	-	-
63	546.2	-	Διέκοψε			
64	1141.9	-	-	-	-	-
65	904.9	-	-	-	-	-
66	928.9	-	-	-	-	-
67	807.6	1.0	1104.6			25.0
68	1302.4	-	-	-	-	-
69	1208.7	-	-	-	-	-
70	1098.2	-	-	-	-	-
71	933.4	-	-	-	-	-
72	1009.2	-	-	-	-	-
73	636.6	1.1	987.6			37.5
74	1241.7	-	-	-	-	-
75	1348.7	-	-	-	-	-
76	880.9	-	Διέκοψε		-	-
Εντός ΘΕ	18/23 (78.3%)		23/23 (100%)	23/23 (100%)		
Πάνω από το ΘΕ	1/23 (4.3%)		0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ	4/23 (17.4%)		0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο $AUC_{initial}$



Εικόνα 4.7: Κατηγορία 5 (χορηγούμενη δόση 0.80 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 μΜ*min και εντός ΘΕ 900-1500 μΜ*min πριν την εξατομίκευση (μπλε), και μετά την εξατομίκευση (πορτοκαλί).

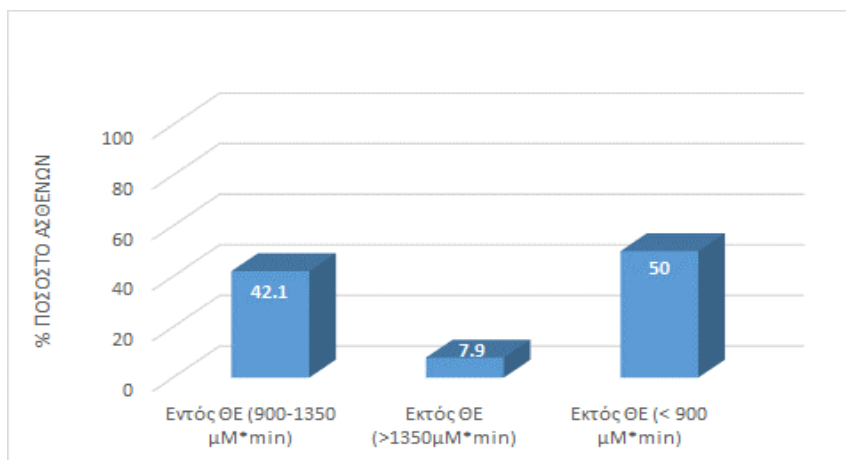
4.4. Εφαρμογή του χρόνου υστέρησης στον υπολογισμό του AUC – εξατομίκευση της δόσης

4.4.1. Υπολογισμός AUC λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο υστέρησης ανά δοσολογική κατηγορία

Λαμβάνοντας υπόψη το lag time που έχει προκύψει από την *in vitro* μελέτη (Πίνακας 3.22) υπολογίστηκε το AUC στους 76 παιδιατρικούς ασθενείς της μονάδας μεταμόσχευσης μυελού των οστών του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ (Πίνακας Δ.1) παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες τιμές AUC τόσο λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης έγχυσης (AUC_{lag}) όσο και χωρίς (AUC_{nolag}) για όλους τους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη ανά κατηγορία βάρους σώματος/δόσης σύμφωνα με το SPC του Busilvex®.

Σύμφωνα με το SPC ^[104] του Busilvex® και τη μονογραφία του φαρμάκου για παιδιατρική χρήση (Busilvex - Product Monograph in Children, January 2006), το ΘΕ με βάση τις υπολογιζόμενες τιμές AUC εκτείνεται από 900 έως 1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$ (περιορισμένο εύρος) ή από 900 έως 1500 $\mu\text{M}\times\text{min}$ (διευρυμένο εύρος) με μέση τιμή στόχο τα 1200 $\mu\text{M}\times\text{min}$.

Λαμβάνοντάς υπόψη το lag-time για τον υπολογισμό της AUC, στο σύνολό των 76 ασθενών παρατηρούμε ότι 32 ασθενείς βρίσκονται εντός του ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}\times\text{min}$ (42.1%), έξι (6) ασθενείς βρίσκονται να είναι πάνω από το ΘΕ (7.9%) και 38 ασθενείς βρίσκονται κάτω από το ΘΕ (50.0%). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$) όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

Για την κατηγορία 1 του SPC με δόση 1.0 mg/kg έχουμε 4 ασθενείς που παρουσιάζουν χρόνο υστέρησης 40 min. Όταν δεν λαμβάνεται υπόψη το lag time για τον υπολογισμό της AUC μόνο ένας ασθενής βρίσκεται εντός ΘΕ ενώ οι υπόλοιποι είναι σε υποθεραπευτικά επίπεδα. Όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη το lagtime κανένας ασθενής δεν είναι εντός ΘΕ και βρίσκονται όλοι σε υποθεραπευτικά επίπεδα.

Το ποσοστό δηλαδή των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ χωρίς το lagtime είναι 25% και μηδενίζεται λαμβάνοντας υπόψη το lagtime.

Για την κατηγορία 2 του SPC με δόση 1.2 mg/kg έχουμε 20 ασθενείς που παρουσιάζουν χρόνο υστέρησης 35-40 min. Όταν δεν λαμβάνεται υπόψη το lag time για τον υπολογισμό της AUC ($AUC_{\text{no lag}}$) 8 ασθενείς βρίσκονται εκτός ΘΕ οι 7 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#7, #12, #14, #16, #18, #19, #21) και ένας σε τοξικά επίπεδα (#17) τόσο με βάση το περιορισμένο όσο και με βάση το διευρυμένο ΘΕ. Όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη το lagtime (AUC_{lag}) 13 ασθενείς είναι εκτός ΘΕ, οι 12 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#6-8, #12-16, #18-19, #21, #23) και ένας (#17) σε τοξικά επίπεδα και πάλι τόσο με βάση το περιορισμένο όσο και με βάση το διευρυμένο ΘΕ.

Το ποσοστό δηλαδή των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ χωρίς το lagtime είναι 60.0% και γίνεται 35.0% λαμβάνοντας υπόψη το lagtime.

Για την κατηγορία 3 SPC με δόση 1.1 mg/kg έχουμε 13 ασθενείς που παρουσιάζουν χρόνο υστέρησης 25-35 min. Όταν δεν λαμβάνεται υπόψη το lag time για τον υπολογισμό της AUC ($AUC_{\text{no lag}}$), 5 ασθενείς βρίσκονται εκτός ΘΕ, οι 3 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#27, #29, #32) και 2 σε τοξικά επίπεδα (#25, #35) τόσο με βάση το περιορισμένο όσο και με βάση το διευρυμένο ΘΕ. Όταν λαμβάνεται υπόψη το lagtime για τον υπολογισμό της AUC (AUC_{lag}) 8 ασθενείς είναι εκτός ΘΕ, 6 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#26,27, #29, #32, #34, #36), ένας σε τοξικά επίπεδα τόσο με το περιορισμένο όσο και με το διευρυμένο ΘΕ (#25) και ένας σε τοξικά επίπεδα με βάση το περιορισμένο ΘΕ αλλά εντός ΘΕ με βάση το διευρυμένο ΘΕ (#35).

Το ποσοστό δηλαδή των ασθενών που βρίσκονται εντός του περιορισμένου ΘΕ με βάση το $AUC_{\text{no lag}}$ είναι 61.5% και μειώνεται στο 38.5% με βάση το AUC_{lag} .

Για την κατηγορία 4 SPC με δόση 0.95 mg/kg έχουμε 16 ασθενείς που παρουσιάζουν χρόνο υστέρησης 20-25 min. Σε περίπτωση που δεν λαμβάνεται υπόψη το lag time για τον υπολογισμό της AUC ($AUC_{\text{no lag}}$) 9 ασθενείς βρίσκονται εκτός ΘΕ,

7 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#39, #42, #45, #47-50) και 3 και τοξικά επίπεδα (#38, #53) τόσο με βάση το περιορισμένο όσο και με βάση το διευρυμένο ΘΕ (ο ασθενής #53 οριακά εκτός διευρυμένου ΘΕ). Στην περίπτωση που λαμβάνεται υπόψη το lagtime για τον υπολογισμό της AUC (AUC_{lag}) 11 ασθενείς είναι εκτός ΘΕ, 9 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#39,40, #42, #44,45, #47-50) και 2 σε τοξικά επίπεδα (#38, #53), ένας από τους οποίους εισέρχεται εντός ΘΕ με βάση τα διευρυμένα όρια (#53).

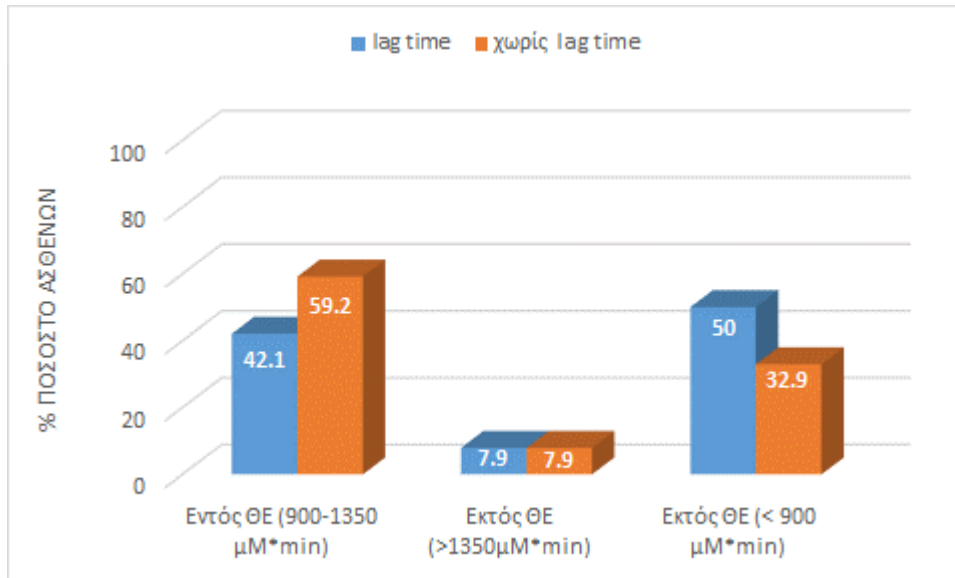
Το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ χωρίς το lagtime είναι 43.8% και μειώνεται στο 31.25% λαμβάνοντας υπόψη το lagtime.

Για την κατηγορία 5 SPC και έγχυση σε ασκό με δόση 0.8 mg/kg έχουμε 23 ασθενείς που παρουσιάζουν χρόνο υστέρησης 20-25 min. Όταν δεν λαμβάνεται υπόψη το lag time για τον υπολογισμό της AUC (AUC_{nolag}) 5 ασθενείς βρίσκονται εκτός ΘΕ, 4 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#63, #67, #73, #76) και 1 σε τοξικά επίπεδα (#54) τόσο με βάση τα περιορισμένα όσο και με βάση τα διευρυμένα όρια. Όταν λαμβάνεται υπόψη το lagtime για τον υπολογισμό της AUC (AUC_{lag}) 9 ασθενείς είναι εκτός ΘΕ, 7 σε υποθεραπευτικά επίπεδα (#60, #62, 63, #65, #67, #73, #76) και 2 σε τοξικά επίπεδα (#54) με βάση τα περιορισμένα όσο και με βάση τα διευρυμένα όρια.

Το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ με βάση το AUC_{nolag} είναι 78.3% και μειώνεται σε 62.5% με βάση το AUC_{lag} .

Έτσι συνολικά από τους 76 ασθενείς οι 31 βρίσκονται εκτός ΘΕ όταν υπολογίζεται η AUC χωρίς το lag time (AUC_{nolag}) (25 σε υποθεραπευτικά, και 6 σε τοξικά επίπεδα 2 από τους οποίους είναι οριακά στο άνω όριο του διευρυμένου ΘΕ), ενώ στη περίπτωση που λαμβάνεται υπόψη το lagtime (AUC_{lag}) 44 ασθενείς βρίσκονται εκτός ΘΕ (38 σε υποθεραπευτικά και 6 σε τοξικά επίπεδα 3 από τους οποίους είναι στο άνω όριο του διευρυμένου ΘΕ) (Εικόνα 4.9). Η υπολογιζόμενη μέση τιμή της $AUC_{lag} \pm SD$ είναι $1016.9 \pm 307.4 \mu M \times min$ (%CV=30.2) και η αντίστοιχη για την $AUC_{nolag} \pm SD$ είναι $968.5 \pm 299.2 \mu M \times min$ (%CV=30.9).

Το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ (περιορισμένου και διευρυμένου) με βάση το AUC_{nolag} είναι 59.2%, ενώ με βάση το AUC_{lag} 42.1% (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9: Συγκριτική ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ (ΘΕ: 900-1350 μΜ*min) πριν την εξατομίκευση της δόσης του ΒΥ, όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε) και δεν λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

Να σημειωθεί ότι ο ασθενής που βρίσκεται οριακά εκτός του διευρυμένου ΘΕ (1505.3 μΜ×min) σε τοξικά επίπεδα με βάση την τιμή της AUC_{nolag} (#53) μπαίνει εντός του διευρυμένου ΘΕ με βάση το AUC_{lag} , (αλλά παραμένει εκτός του περιορισμένου ΘΕ) ενώ αντίθετα οι ασθενείς που βρίσκονται οριακά εντός ΘΕ στο κάτω όριο με βάση το AUC_{nolag} (π.χ. #2, #15, #36), τίθενται εκτός ΘΕ σε υπο-θεραπευτικά επίπεδα με βάση το AUC_{lag} .

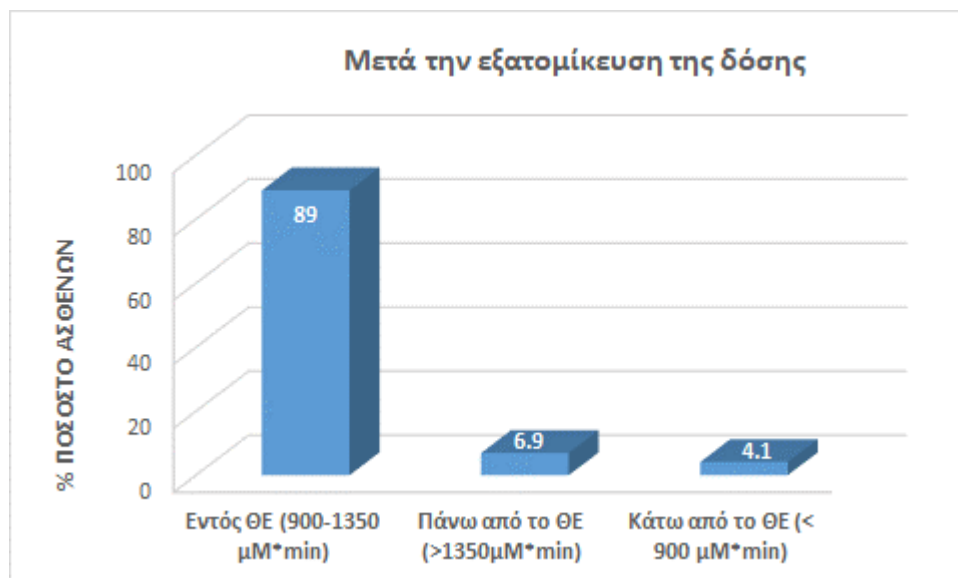
Συμπερασματικά, η χρήση του AUC_{lag} είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($AUC < 900 \mu\text{M}\cdot\text{min}$). Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η διόρθωση της δόσης με βάση το περιορισμένο ΘΕ ($900 < AUC < 1350 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) ώστε όλοι οι ασθενείς να βρίσκονται σε επίπεδα κατώτερα του μέγιστου επιτρεπόμενου τοξικού ορίου ($AUC < 1500 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC ($AUC_{\text{lag}} - AUC_{\text{nolag}}$).

4.4.2. Εξατομίκευση-τροποποίηση δοσολογίας στους ασθενείς εκτός ΘΕ λαμβάνοντας υπόψη το lag-time

Δεδομένου ότι η εξατομίκευση της δόσης σε πραγματικό χρόνο έγινε χωρίς να ληφθεί υπόψη ο υπολογιζόμενος χρόνος υστέρησης, υπάρχουν δεδομένα επαναπροσδιορισμού των επιπέδων ΒΥ στο αίμα των ασθενών μόνο για τους 28 από

τους 44 ασθενείς που προσδιορίζονται εκτός του ΘΕ. Για τους 28 ασθενείς που εφαρμόστηκε η εξατομίκευση της δόσης, μετά από εκ νέου υπολογισμό της AUC λαμβάνοντας υπόψη το lag time παρατηρήθηκε ότι 7 ασθενείς βρίσκονταν εκτός ΘΕ ενώ οι υπόλοιποι βρίσκονται εντός ΘΕ. Συγκεκριμένα τέσσερις ασθενείς (4) βρίσκονταν πάνω από το ΘΕ και 3 ασθενείς βρίσκονταν κάτω από το ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$).

Συνολικά τα αποτελέσματα που αφορούν στο ποσοστό των ασθενών εντός και εκτός ΘΕ ως προς το σύνολο των ασθενών της μελέτης (76), μετά την εξατομίκευση της δοσολογίας του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης, απεικονίζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10: Ποσοστιαία απεικόνιση ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ, κάτω από το ΘΕ και πάνω από το ΘΕ μετά την εξατομίκευση της δόσης (ΘΕ: 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

4.4.2.1. Δοσολογικό σχήμα 1.0 mg/kg

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.10) παρουσιάζονται τα δεδομένα εξατομίκευσης δοσολογίας για τους ασθενείς της κατηγορίας 1 SPC για τους οποίους κρίθηκε απαραίτητη η τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης Busilvex®.

Για τους 3 ασθενείς αυτής της κατηγορίας (σε σύνολο 4) που βρέθηκαν σε υποθεραπευτικά επίπεδα και έγινε τροποποίηση δόσης, η τροποποίηση σε πραγματικό χρόνο έγινε με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$ Μετά τη χορήγηση της

τροποποιημένης δόσης έγινε νέος προσδιορισμός των επιπέδων του BU στο αίμα και της AUC. Παρατηρούμε ότι μετά την κατά 20% αύξηση της χορηγούμενης δόσης ο ασθενής #3 είναι εντός ΘΕ ενώ ο ασθενής #1 είναι εκτός του περιορισμένου ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$) αλλά εντός του διευρυμένου ΘΕ (900-1500 $\mu\text{M}\times\text{min}$) και δεν έγινε νέα τροποποίηση.

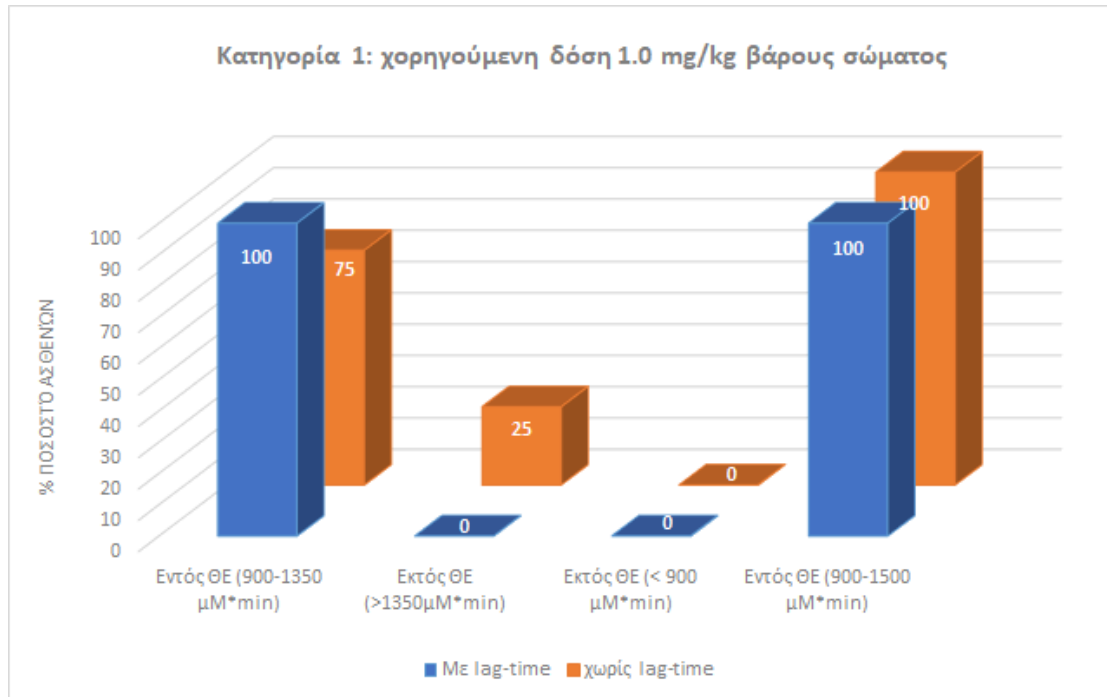
Παρατηρούμε ότι μετά την κατά 20% αύξηση της χορηγούμενης δόσης οι ασθενείς #3 και #4 βρίσκονται εντός του ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$) όταν για τον υπολογισμό της AUC δεν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης. Αντίθετα, ο ασθενής #1 είναι εκτός του ΘΕ (900-1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$) αλλά εντός του διευρυμένου ΘΕ (900-1500 $\mu\text{M}\times\text{min}$) (Πίνακας 4.10, Εικόνα 4.11).

Να σημειωθεί ότι όλοι οι ασθενείς είναι εντός ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\times\text{min}$ (ή οριακά εντός, ασθενής #3) όταν η AUC μετά την τροποποίηση της δόσης υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης (AUC_{lag}) (Πίνακας 4.10, Εικόνα 4.11).

Πίνακας 4.10: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{nolag}}$ και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.0 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{indiv-nolag}}$ και $\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$).

ID	Δόση _{indiv} (mg/kg)*	Αρχική $\text{AUC}_{\text{nolag}}$ ($\mu\text{M}\times\text{min}$)	Αρχική AUC_{lag} ($\mu\text{M}\times\text{min}$)	$\text{AUC}_{\text{indiv-nolag}}$ ($\mu\text{M}\times\text{min}$)		$\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$ ($\mu\text{M}\times\text{min}$)		Lag-time (min)
				ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	
Κατηγορία 1 SPC								
1	1.2	716.2	664.7	1406.4		1351.9		40
2	-	935.0	873.1	-		-		
3	1.2	892.4	822.8	1136.4		986.8		
4	1.35	668.7	611.3	995.3		913.10		
Εντός ΘΕ		1/4 (25.0%)	0/4 (0.0%)	3/4 (75.0%)	4/4 (100%)	3/4 (75.0%)	4/4 (100%)	
Πάνω από το ΘΕ		0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)	1/4 (25.0%)	0/4 (0.0%)	1/4 (25.0%)	0/4 (0.0%)	
Κάτω από το ΘΕ		3/4 (75.0%)	4/4 (100.0%)	0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)	

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο AUC χωρίς το lagtime ($\text{AUC}_{\text{nolag}}$)



Εικόνα 4.11: Κατηγορία 1 (χορηγούμενη δόση 1.0 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

4.4.2.2. Δοσολογικό σχήμα 1.2 mg/kg

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.11) παρουσιάζονται τα δεδομένα εξατομίκευσης δοσολογίας για τους ασθενείς της κατηγορίας 2 SPC για τους οποίους κρίθηκε απαραίτητη η τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης Busilvex®.

Για τους 8 ασθενείς αυτής της κατηγορίας (σε σύνολο 20) που χρειάστηκαν τροποποίηση δόσης η τροποποίηση σε πραγματικό χρόνο έγινε με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$. Παρατηρούμε (Πίνακας 4.11) ότι μετά την τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης κατά 8-40% όλοι οι ασθενείς είναι εντός ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (ο ασθενής #17 είναι οριακά εκτός του περιορισμένου ΘΕ και εντός του διευρυμένου ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Αν η τροποποίηση της δόσης γινόταν με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} ο ασθενής #12 θα βρισκόταν εκτός ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($AUC < 900 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) και θα έπρεπε να επαναξιολογηθεί.

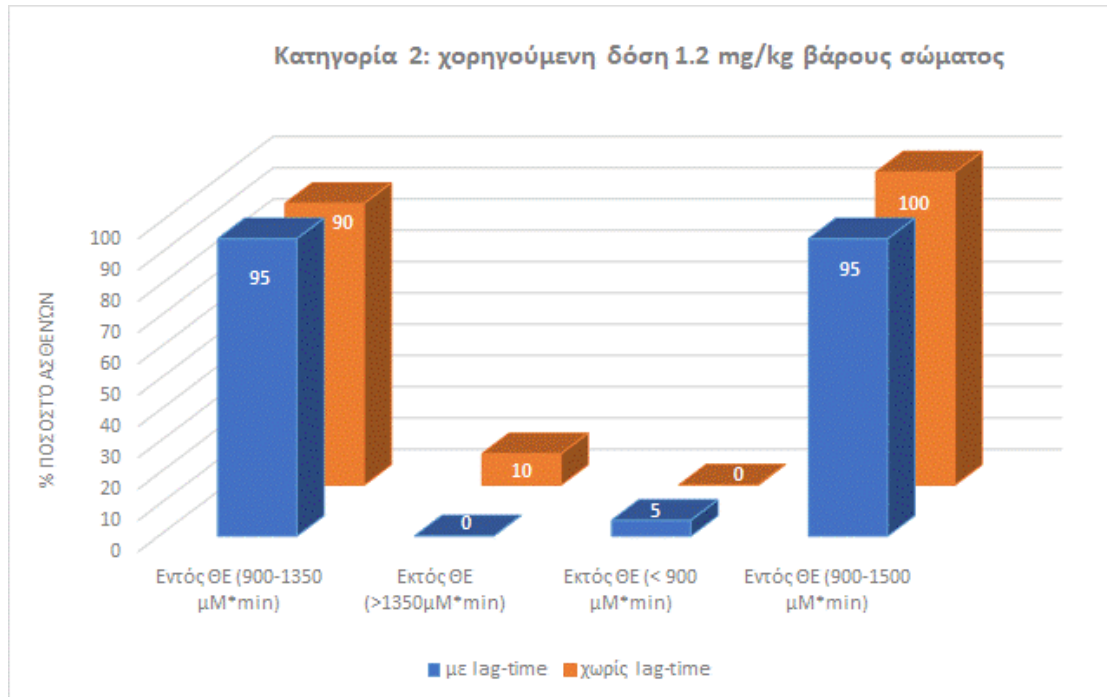
Συνολικά, το ποσοστό των ασθενών που είναι εντός ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ στην κατηγορία 2 SPC μετά την τροποποίηση της δόσης είναι 90% με βάση την

υπολογιζόμενη τιμή AUC_{nolag} (100% εντός του διευρυμένου ΘΕ 900-1500 $\mu M \times min$) και 95% με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} (Πίνακας 4.11, Εικόνα 4.12).

Πίνακας 4.11: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime (AUC_{nolag} και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.2 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-nolag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).

ID	Δόση _{indiv} (mg/kg)*	Αρχική AUC_{nolag} ($\mu M \times min$)	Αρχική AUC_{lag} ($\mu M \times min$)	$AUC_{indiv-nolag}$ ($\mu M \times min$)		$AUC_{indiv-lag}$ ($\mu M \times min$)		Lag-time (min)	
				ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	AUC_{int} ial	AUC_{int} ial
Κατηγορία 2 SPC									
5	-	1099.1	982.90	-	-	-	-	35	-
6	-	956.5	899.4	-	-	-	-	40	-
7	1.5	705.4	653.1	1308.3	-	1190.9	-	35	35
8	-	901.7	823.5	-	-	-	-	35	-
9	-	1251.2	1203.6	-	-	-	-	40	-
10	-	1105.0	1020.3	-	-	-	-	40	-
11	-	1105.8	1015.2	-	-	-	-	35	-
12	1.3	840.2	786.2	961.0	-	864.9	-	35	35
13	-	943.8	838.3	-	-	-	-	40	-
14	1.4	743.7	682.0	1228.6	-	1106.7	-	35	35
15	-	954.9	860.20	-	-	-	-	35	-
16	1.5	812.3	738.0	1186.3	-	1100.4	-	35	25
17	0.8	1918.4	1833.4	1375.9	-	1207.3	-	40	40
18	1.6	681.1	617.7	1012.8	-	911.6	-	35	35
19	1.65	661.1	612.8	1412.3	-	1251.2	-	40	35
20	-	1312.0	1235.5	-	-	-	-	40	-
21	1.7	694.5	639.8	1140.5	-	1028.4	-	40	35
22	-	1135.8	1009.5	-	-	-	-	40	-
23	-	945.6	871.5	-	-	-	-	40	-
24	-	1306.0	1224.9	-	-	-	-	35	-
Εντός ΘΕ		12/20 (60.0%)	7/20 (35.0%)	18/20 (90%)	20/20 (100%)	19/20 (95.0%)	19/20 (100%)		
Πάνω από το ΘΕ		1/20 (5.0%)	1/20 (5.0%)	2/20 (10.0%)	0/4 (0.0%)	0/20 (0.0%)	0/20 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ		7/20 (35.0%)	12/20 (60.0%)	0/20 (0.0%)	0/4 (0.0%)	1/20 (5.0%)	1/20 (5.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο AUC χωρίς το lagtime (AUC_{nolag})



Εικόνα 4.12: Κατηγορία 2 (χορηγούμενη δόση 1.2 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 μΜ*min και εντός ΘΕ 900-1500 μΜ*min μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

4.4.2.3. Δοσολογικό σχήμα 1.1mg/kg

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.12) παρουσιάζονται τα δεδομένα εξατομίκευσης δοσολογίας για τους ασθενείς της κατηγορίας 3 SPC για τους οποίους κρίθηκε απαραίτητη η τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης Busilvex®.

Για τους 6 ασθενείς αυτής της κατηγορίας (σε σύνολο 13) που χρειάστηκαν τροποποίηση δόσης παρατηρούμε ότι μετά την τροποποίηση κατά 18-36% της χορηγούμενης δόσης με βάση την υπολογιζόμενη τιμή της $AUC_{\text{no lag}}$ οι ασθενείς #25, #27, #29 και #32, #34 είναι εντός ΘΕ ενώ ο ασθενής #35 παραμένει σε τοξικά επίπεδα (Πίνακας 4.12). Στην περίπτωση που η εξατομίκευση είχε γίνει με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} ο ασθενής #35 παραμένει σε τοξικά επίπεδα θεωρώντας τα όρια του περιορισμένου ΘΕ (900-1350 μΜ*min) και εισέρχεται εντός ΘΕ με βάση τα όρια του διευρυμένου ΘΕ (900-1500 μΜ*min) (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.13).

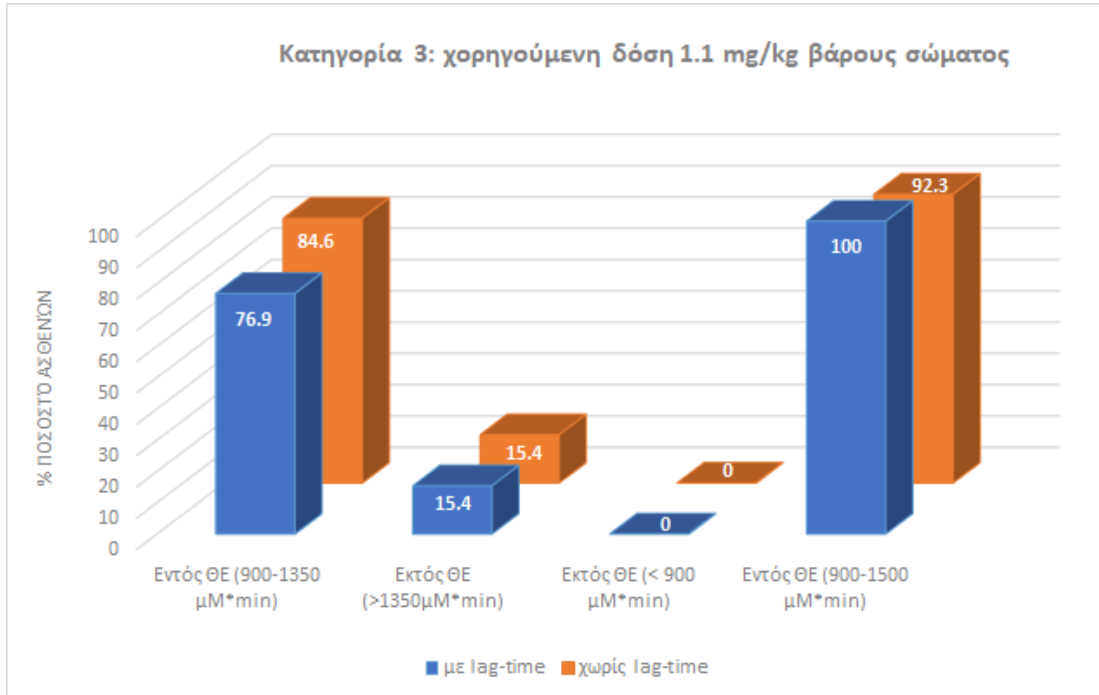
Το ποσοστό των ασθενών που είναι εντός ΘΕ στην κατηγορία 3 SPC μετά την τροποποίηση της δόσης είναι 84.6% με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$ και 76.9% με την AUC_{lag} λαμβάνοντάς υπόψη το περιορισμένο ΘΕ. Λαμβάνοντας υπόψη

το διευρυμένο ΘΕ (900-1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) όλοι οι ασθενείς βρίσκονται εντός ΘΕ με AUC_{lag} και 92.3% των ασθενών με $\text{AUC}_{\text{no lag}}$ (Πίνακας 4.12, Εικόνα 4.13)

Πίνακας 4.12: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{no lag}}$ και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 1.1 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{indiv-no lag}}$ και $\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$).

ID	Δόση _{indiv} (mg/kg)*	Αρχική $\text{AUC}_{\text{no lag}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	Αρχική AUC_{lag} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	$\text{AUC}_{\text{indiv-no lag}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)		$\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)		Lag-time (min)	
				ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	AUC_{int} ial	AUC_{int} ial
Κατηγορία 3 SPC									
25	0.9	1771.4	1709.7	1463.1		1359.6		25	25
26	-	903.5	862.4	-		-		25	-
27	1.3	721.7	689.6	1120.5		1061.1		25	20
28	-	1295.0	1218.3	-		-		25	-
29	1.5	600.2	565.7	1280.9		1201.8		25	20
30	-	1222.5	1160.7	-		-		35	-
31	-	1035.1	967.3	-		-		35	-
32	1.5	667.1	618.7	1177.1		1110.2		25	20
33	-	1331.7	1275.7	-		-		25	-
34	1.3	890.0	810.1	1082.2		1117.3		25	20
35	0.9	1575.4	1506.4	1505.3		1387.9		30	30
36	-	908.8	864.4	-		-		25	-
37	-	995.4	945.6	-		-		25	-
Εντός ΘΕ		8/13 (61.5%)	5/13 (38.5%)	11/13 (84.6%)	12/13 (92.3%)	11/13 (84.61%)	13/13 (100.0%)		
Πάνω από το ΘΕ		2/13 (15.4%)	2/13 (15.4%)	2/13 (15.4%)	1/13 (7.7%)	2/13 (15.4%)	2/13 (15.4%)		
Κάτω από το ΘΕ		3/13 (23.1%)	6/13 (46.2%)	0/13 (0.0%)	0/13 (0.0%)	0/13 (0.0%)	0/13 (0.0%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο AUC χωρίς το lagtime ($\text{AUC}_{\text{no lag}}$)



Εικόνα 4.13: Κατηγορία 3 (χορηγούμενη δόση 1.1 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 μΜ*min και εντός ΘΕ 900-1500 μΜ*min μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

4.4.2.4. Δοσολογικό σχήμα 0.95 mg/kg

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.13) παρουσιάζονται τα δεδομένα εξατομίκευσης δοσολογίας για τους ασθενείς της κατηγορίας 4 SPC για τους οποίους κρίθηκε απαραίτητη η τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης Busilvex®.

Για τους 8 ασθενείς αυτής της κατηγορίας (σε σύνολο 16) που χρειάστηκαν τροποποίηση δόσης παρατηρούμε ότι μετά την κατά 20-110% τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης σε πραγματικό χρόνο με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$, όλοι οι ασθενείς είναι εντός ΘΕ για τα διευρυμένα όρια (900.0-1500.0 μΜ*min) ενώ οι ασθενείς #38 και #39 βρίσκονται οριακά σε τοξικά επίπεδα με βάση τα όρια του περιορισμένου ΘΕ (900.0-1350.0 μΜ*min), γεγονός που οδήγησε στην απόφαση για μη περαιτέρω διόρθωση της δόσης. Στην περίπτωση που η εξατομίκευση είχε γίνει με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} ο ασθενής #39 θα ήταν εκτός ΘΕ με βάση τα περιορισμένα όρια (900.0-1350.0 μΜ*min) αλλά εντός ΘΕ με βάση τα διευρυμένα όρια (900.0-1500.0 μΜ*min) και ο ασθενής #53 θα ήταν σε υποθεραπευτικά επίπεδα.

Το ποσοστό των ασθενών που είναι εντός ΘΕ στην κατηγορία 4 SPC μετά την τροποποίηση της δόσης με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$ είναι 100% με βάση

τα όρια του διευρυμένου ΘΕ και 81.3% με βάση τα όρια του περιορισμένου ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$), ενώ με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} θα ήταν 93.75% με το διευρυμένο ΘΕ και 87.5% με τα περιορισμένο ΘΕ (Πίνακας 4.13, Εικόνα 4.14).

Πίνακας 4.13: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{nolag}}$ και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.95 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($\text{AUC}_{\text{indiv-nolag}}$ και $\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$).

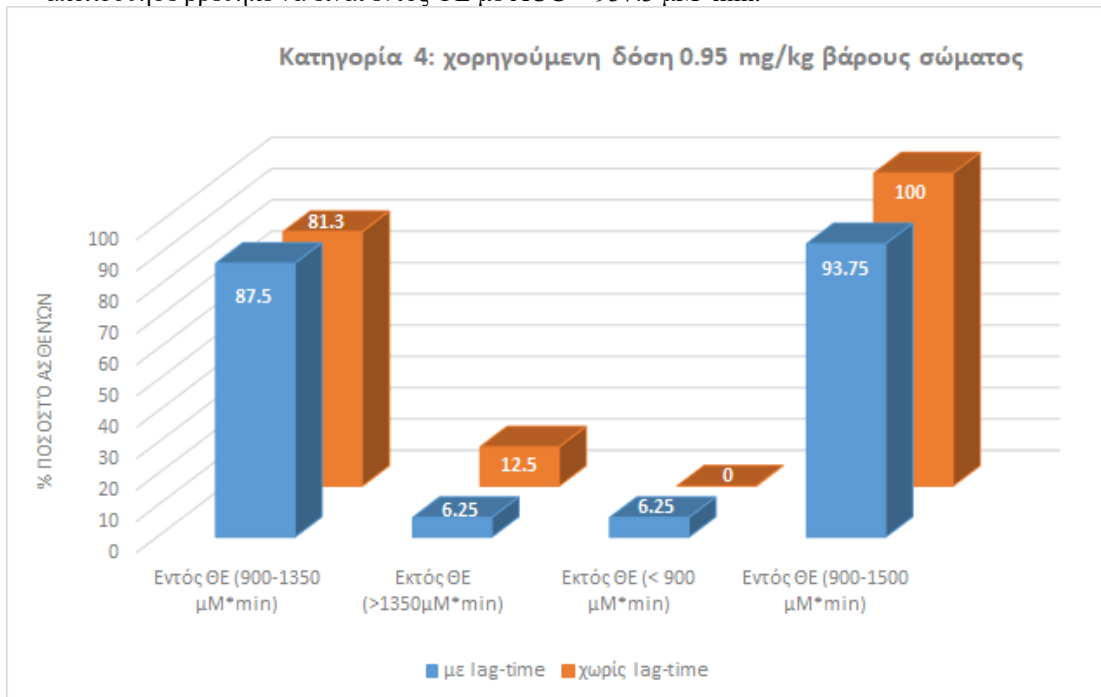
ID	$\Delta\delta\sigma\eta_{\text{indiv}}$ (mg/kg)*	Αρχική $\text{AUC}_{\text{nolag}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)	Αρχική AUC_{lag} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)	$\text{AUC}_{\text{indiv-nolag}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)		$\text{AUC}_{\text{indiv-lag}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)		Lag-time (min)	
				ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	AUC_{int} ial	AUC_{int} ial
Κατηγορία 4 SPC									
38	0.7	1829.0	1776.4	1385.5		1212.0		20	35
39	2.0	565.2	539.3	1408.9		1394.6		20	5
40	-	906.0	873.4	-		-		20	-
41	-	1124.1	1091.3	-		-		20	-
42	1.8	602.3	569.1	1344.5		1326.7		25	5
43	-	1166.9	1123.5	-		-		20	-
44	-	913.3	886.6	-		-		20	-
45	-	593.4	566.0	Διέκοψε		Διέκοψε		20	-
46	-	1212.8	1163.7	-		-		25	-
47**	0.85	818.4	777.8	1386.4		1284.3		20	25
48	1.1	633.7	602.3	970.9		911.4		25	20
49	1.2	652.6	615.0	1134.3		1070.8		25	20
50	1.2	763.6	733.9	1278.0		1206.2		20	20
51	-	1286.2	1207.2	-		-		20	-
52	-	1262.0	1224.5	-		-		20	-
53***	0.53	1500.2	1449.7	937.3		844.6		20	30
Εντός ΘΕ		7/16 (43.8%)	5/16 (31.25%)	13/16 (81.25%)	16/16 (100.0%)	14/16 (87.5%)	15/16 (93.75%)		
Πάνω από το ΘΕ		2/16 (12.5%)	2/16 (12.5%)	3/16 (18.75%)	0/16 (0.0%)	1/16 (6.25%)	0/16 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ		7/16 (43.8%)	9/16 (56.25%)	0/16 (0.0%)	0/16 (0.0%)	1/16 (6.25%)	1/16 (6.25%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο AUC χωρίς το lagtime ($\text{AUC}_{\text{nolag}}$)

**Για τον ασθενή #47 αρχικά έγινε αύξηση της δόσης από 0.95 σε 1.1 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε να είναι εκτός ΘΕ με $\text{AUC} = 1598.0 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ και ακολούθησε μείωση της δόσης από 1.1 σε 0.85 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε η AUC βρέθηκε οριακά εκτός ΘΕ $1386.4 \mu\text{M} \cdot \text{min}$.

***Για τον ασθενή #53 αρχικά έγινε μείωση της δόσης από 0.95 σε 0.75 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε η έκταση της απορρόφησης βρέθηκε να είναι $1648.0 \mu\text{M} \cdot \text{min}$, έτσι

ακολούθησε και δεύτερη μείωση της δόσης από 0.75 σε 0.53 mg/kg και στον επανέλεγχο που ακολούθησε βρέθηκε να είναι εντός ΘΕ με $AUC = 937.3 \mu M \cdot \text{min}$.



Εικόνα 4.14: Κατηγορία 4 (χορηγούμενη δόση 0.95 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu M \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu M \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒΥ όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

4.4.2.5. Δοσολογικό σχήμα 0.8 mg/kg

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.14) παρουσιάζονται τα δεδομένα εξατομίκευσης δοσολογίας για τους ασθενείς της κατηγορίας 5 SPC για τους οποίους κρίθηκε απαραίτητη η τροποποίηση της χορηγούμενης δόσης Busilvex.

Για τους 3 ασθενείς αυτής της κατηγορίας (σε σύνολο 23) που χρειάστηκαν τροποποίηση δόσης παρατηρούμε ότι μετά την τροποποίηση σε πραγματικό χρόνο της χορηγούμενης δόσης κατά 18-38% με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{\text{no lag}}$, όλοι βρίσκονται εντός τόσο του περιορισμένου όσο και του διευρυμένου ΘΕ (Πίνακας 4.14, Εικόνα 4.15). Στην περίπτωση που η εξατομίκευση είχε γίνει με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} ο ασθενής #54 θα ήταν σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($AUC_{\text{lag}} < 900 \mu M \cdot \text{min}$).

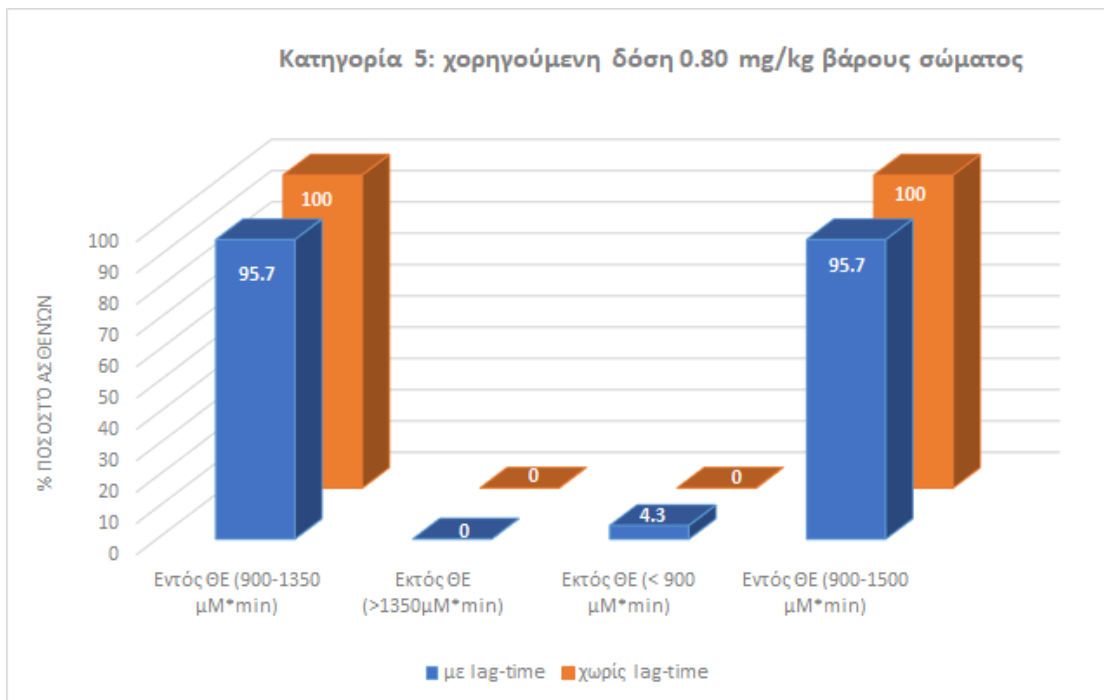
Συνολικά για την κατηγορία 5, το ποσοστό των ασθενών που είναι εντός ΘΕ (τόσο του περιορισμένου όσο και του διευρυμένου) μετά την τροποποίηση της δόσης

με βάση την υπολογιζόμενη τιμή $AUC_{no\ lag}$ είναι 100% ενώ με βάση την υπολογιζόμενη τιμή AUC_{lag} θα ήταν 95.7% (Πίνακας 4.14, Εικόνα 4.15)

Πίνακας 4.14: Υπολογιζόμενη αρχική έκταση της απορρόφησης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{no\ lag}$ και AUC_{lag}) για τους ασθενείς που τους χορηγήθηκε αρχική δόση 0.8 mg/kg, εξατομικευμένη δόση και έκταση της απορρόφησης μετά την τροποποίηση της δόσης χωρίς και με το lagtime ($AUC_{indiv-no\ lag}$ και $AUC_{indiv-lag}$).

ID	Δόση _{indiv} (mg/kg)*	Αρχική $AUC_{no\ lag}$ ($\mu M \cdot min$)	Αρχική AUC_{lag} ($\mu M \cdot min$)	$AUC_{indiv-no\ lag}$ ($\mu M \cdot min$)		$AUC_{indiv-lag}$ ($\mu M \cdot min$)		Lag-time (min)	
				ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	ΘΕ 900-1350	ΘΕ 900-1500	AUC_{int} ial	AUC_{int} ial
Κατηγορία 5 SPC									
54	0.65	1555.2	1534.2	910.3		897.3		5	5
55	-	1293.0	1208.9	-		-		5	-
56	-	1001.9	995.6	-		-		5	-
57	-	913.1	906.5	-		-		5	-
58	-	947.8	939.1	-		-		5	-
59	-	1189.8	1139.5	-		-		20	-
60	-	912.9	898.0	-		-		10	-
61	-	938.0	924.7	-		-		20	-
62	-	922.0	893.7	-		-		10	-
63	-	546.2	522.2	Διέκοψε		Διέκοψε		20	-
64	-	1141.9	1124.4	-		-		10	-
65	-	904.9	871.7	-		-		20	-
66	-	928.9	915.7	-		-		10	-
67	1.0	807.6	783.6	1104.6		1011.38		10	5
68	-	1302.4	1281.8	-		-		5	-
69	-	1208.7	1187.9	-		-		5	-
70	-	1098.2	1052.9	-		-		15	-
71	-	933.4	924.6	-		-		5	-
72	-	1009.2	1002.0	-		-		5	-
73	1.1	636.6	630.2	987.6		972.0		5	5
74	-	1241.7	1232.4	-		-		5	-
75	-	1348.7	1239.0	-		-		5	-
76	-	880.9	867.3	Διέκοψε		Διέκοψε		5	-
Εντός ΘΕ		18/23 (78.3%)	15/23 (65.2%)	23/23 (100.0%)	23/23 (100.0%)	22/23 (95.7%)	22/23 (95.7%)		
Πάνω από το ΘΕ		1/23 (4.3%)	1/23 (4.3%)	0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)		
Κάτω από το ΘΕ		4/23 (17.4%)	7/23 (30.4%)	0/23 (0.0%)	0/23 (0.0%)	1/23 (4.3%)	1/23 (4.3%)		

* Εξατομικευμένη δόση με βάση το υπολογιζόμενο AUC χωρίς το lagtime ($AUC_{no\ lag}$)



Εικόνα 4.15: Κατηγορία 5 (χορηγούμενη δόση 0.80 mg/kg): ποσοστό των ασθενών εντός, κάτω και πάνω από το ΘΕ 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ και εντός ΘΕ 900-1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την εξατομίκευση της δόσης του ΒU όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη (μπλε), και δε λαμβάνεται υπόψη (πορτοκαλί) ο χρόνος υστέρησης.

4.5. Συνολική συζήτηση - συμπεράσματα

Η παρακολούθηση των επιπέδων του ΒU (TDM, Therapeutic Drug Monitoring) με στόχο την φαρμακοκινητική εξατομίκευση της δοσολογίας του φαρμάκου είναι μια κλινική πρακτική που χρησιμοποιείται την τελευταία 15ετία τόσο στην Ευρώπη όσο και στις ΗΠΑ με αξιοσημείωτη διεθνή επιτυχία (π.χ. βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος, μείωση της συχνότητας εμφάνισης VOD, ανάπτυξη πιο ασφαλών στόχων βέλτιστης έκθεσης στο φάρμακο) σε διάφορες αιματολογικές κακοήθειες, διαφορετικά μυελοαφανιστικά σχήματα, διαφορετικές μεθοδολογίες HSCT και διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες ασθενών^[122-125]. Οι παιδιατρικοί ασθενείς, συγκρινόμενοι με τους ενήλικες, εμφανίζουν μεγαλύτερη δια-ατομική φαρμακοκινητική μεταβλητότητα και διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας και μειωμένης αποτελεσματικότητας. Κατά συνέπεια, η εφαρμογή TDM

σε αυτόν τον ειδικό πληθυσμό ασθενών είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον προσδιορισμό της βέλτιστης δόσης που πρέπει να χορηγηθεί σε κάθε ασθενή^[48,125,126].

Συνολικά στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα του busulfan στο αίμα 76 παιδιατρικών ασθενών που νοσηλεύτηκαν στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» στο διάστημα Ιούλιος 2014 – Ιανουάριος 2017. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 7.6 έτη (εύρος 0.5-19 έτη), 47 έπασχαν από αιματολογικές κακοήθειες, 16 από μη αιματολογικές κακοήθειες (συμπαγείς όγκοι) και 13 από γενετικό νόσημα και όλοι υποβλήθηκαν σε ΜΜΟ (60 αλλογενή, 16 αυτόλογη) μετά από τη χορήγηση του busulfan σε συνδυασμό με κατάλληλο χημειοθεραπευτικό σχήμα ύφεσης της νόσου. Σε όλες τις περιπτώσεις οι μετρούμενες συγκεντρώσεις του busulfan χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της παραμέτρου AUC και τη σύγκριση με το επίσημα αποδεκτό θεραπευτικό εύρος (ΘE $900.0 < AUC < 1350.0 \mu M * min$) με στόχο την εξατομίκευση της δοσολογίας σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στην Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος (SPC). Στις περιπτώσεις που η τιμή της AUC ήταν εκτός ΘE έγινε τροποποίηση της δόσης του busulfan και ακολούθησε επαναπροσδιορισμός επιπέδων μετά από τη χορήγηση της νέας δόσης. Υπολογίστηκαν τα ποσοστά των ασθενών εντός και εκτός ΘE πριν και μετά την εφαρμογή της εξατομίκευσης της δόσης ενώ έγινε επίσης σύγκριση των αντίστοιχων ποσοστών όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος λόγω της χρήσης αντλίας έγχυσης κατά τη χορήγηση.

Πριν την εξατομίκευση της δόσης, στη περίπτωση που δεν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης, 45 ασθενείς (59.2%) βρίσκονται εντός ΘE 900.0-1350.0 $\mu M * min$, 6 ασθενείς (7.9%) βρίσκονται πάνω από το ΘE και 25 ασθενείς (32.9%) βρίσκονται κάτω από το ΘE . Όταν λαμβάνετε υπόψη ο lag time τότε 32 ασθενείς (42.1%) βρίσκονται εντός ΘE , 6 ασθενείς (7.9%) βρίσκονται πάνω από το ΘE και 38 ασθενείς (50.0%) βρίσκονται κάτω από αυτό. Συνολικά έγινε τροποποίηση της δόσης σε 28 ασθενείς (3 ασθενείς διέκοψαν τη θεραπεία). Μετά τον επαναπροσδιορισμό των επιπέδων του BU στο αίμα παρατηρείται ότι 8 ασθενείς βρίσκονται πάνω από το ΘE 900.0-1350.0 $\mu M * min$ όταν δεν λαμβάνεται υπόψη ο lag time (10.96%) και κανένας κάτω από το ΘE , ενώ όταν λαμβάνεται υπόψη ο lag time τότε τέσσερεις ασθενείς (6.9%) βρίσκονται πάνω από το ΘE και τρεις βρίσκονται κάτω από αυτό (4.1%) παρατήρηση που πιθανά να έχει κλινική σημασία δεδομένου ότι υποθεραπευτικά

επίπεδα BU είναι συνδεδεμένα με απόρριψη μοσχεύματος^[61-64]. Τα παραπάνω ποσοστά συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι σε κάθε περίπτωση μετά την εξατομίκευση της δόσης όλοι οι ασθενείς βρίσκονται κάτω από το ανώτερο τοξικό επίπεδο των 1500.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ με βάση το διευρυμένο ΘΕ 900.0-1500.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (με ή χωρίς τη συνεισφορά του lagtime). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι με βάση τη βιβλιογραφία οι υψηλές τιμές AUC (>1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) συνδέονται με μεγαλύτερη θνησιμότητα (σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση) καθώς και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης GvHD και VOD^[55,64, 127-129].

Πίνακας 4.15: Ποσοστιαίες αναλογίες των ασθενών που βρίσκονται πάνω, κάτω και εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) πριν και μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU χωρίς και με τη χρήση lagtime για τον υπολογισμό της AUC.

Εντός ΘΕ χωρίς lagtime	Εντός ΘΕ με lagtime	Πάνω από το ΘΕ χωρίς lagtime	Πάνω από το ΘΕ με lagtime	Κάτω από το ΘΕ χωρίς lagtime	Κάτω από το ΘΕ με lagtime
Πριν της εξατομίκευσης της δόσης του BU*					
59.2	42.1	7.9	7.9	32.9	50.0
Μετά την εξατομίκευση της δόσης του BU**					
89.04/71.4	89/75.0	10.96/28.6	6.9/14.3	0.0	4.1/10.7

* στο σύνολο των 76 ασθενών που έγινε μέτρηση επιπέδων BU μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης

** στο σύνολο των 73 ασθενών που ολοκλήρωσαν τη θεραπεία/στο σύνολο των 28 ασθενών που έγινε τροποποίηση δόσης

Αντίστοιχα ποσοστά με αυτά του Πίνακας 4.15 αναφέρονται στη βιβλιογραφία στον σχετικά περιορισμένο αριθμό μελετών παρακολούθησης επιπέδων και εξατομίκευσης δοσολογίας BU σε παιδιατρικούς ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Buffery et al. (2014)^[130] γίνεται καταγραφή και αξιολόγηση της 13χρονης εμπειρίας από την εφαρμογή της φαρμακοκινητικής παρακολούθησης και εξατομίκευσης της δοσολογίας της ενδοφλέβιας (i.v.) και από του στόματος (peros) χορήγησης BU σε παιδιατρικούς ασθενείς και σε ενήλικες. Για την IV χορήγηση σε παιδιατρικούς ασθενείς αναφέρεται ότι κατά την πρώτη μέτρηση μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης 33% των ασθενών ήταν εντός ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, 25% των ασθενών ήταν πάνω από το ΘΕ και 42% κάτω από το ΘΕ, στους τελευταίους έγινε αύξηση της δόσης και επανεκτίμηση των επιπέδων του BU στο αίμα των ασθενών. Η εξατομίκευση της χορηγούμενης δόσης οδήγησε σε μείωση των ασθενών εκτός ΘΕ. Στη μελέτη των Choong et al. (2018)^[131] 28% των παιδιατρικών ασθενών βρέθηκε εντός ΘΕ 900.0-

1350.0 $\mu\text{M}^* \text{min}$ κατά την πρώτη μέτρηση μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης ενώ στη διάρκεια των 4 ημερών χορήγησης και παρακολούθησης των επιπέδων του BU χρειάστηκε να τροποποιηθεί η δόση στο 83% των ασθενών. Η τροποποίηση της δόσης είχε ως αποτέλεσμα 75% των ασθενών να εισέλθουν εντός ΘΕ. Στη μελέτη των Janel Long-Boyle et al. (2015)^[132], σε σύνολο 79 παιδιατρικών ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε BU με δίωρη ενδοφλέβια έγχυση (συνολικά 16 δόσεις, 4 δόσεις/ημέρα x 4 ημέρες), το 52% των ασθενών βρέθηκε εντός ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}^* \text{min}$, το 33% κάτω από το ΘΕ και το 5% πάνω από αυτό, κατά τη μέτρηση των επιπέδων BU μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης. Μετά την τροποποίηση της δόσης το 100% βρέθηκε εντός ΘΕ. Αντίστοιχα, στη μελέτη των Hndie Tesfaye et al.^[133] εφαρμόστηκε η διαδικασία εξατομίκευσης της δόσης του BU σε 62 παιδιατρικούς ασθενείς (ηλικία 2 μηνών έως 18 ετών) και χρειάστηκε να γίνει τροποποίηση της δόσης σε ποσοστό 54 % των ασθενών ώστε τα μετρούμενα επίπεδα στο αίμα να βρίσκονται εντός ΘΕ. Στη μελέτη των Zao et al. 2015^[134] γίνεται σύγκριση 12 δοσολογικών σχημάτων και κατευθυντήριων οδηγιών για τη ενδοφλέβια χορήγηση BU σε παιδιατρικούς ασθενείς που προτείνονται στη βιβλιογραφία, ως προς την ικανότητά τους να επιτυγχάνουν τιμές AUC εντός του ΘΕ στόχου (900.0-1500.0 $\mu\text{M}^* \text{min}$). Μετά από προσομοίωση της δοσολογίας σύμφωνα με 12 κατευθυντήριες δοσολογικές οδηγίες χρησιμοποιώντας τις τιμές συνολικού βάρους σώματος (ΣΒΣ) από 97 μη υπέρβαρους παιδιατρικούς ασθενείς, το ποσοστό των ασθενών με AUC εντός του επιθυμητού ΘΕ (900.0-1500.0 $\mu\text{M}^* \text{min}$) κυμάνθηκε από 51% έως 74% και από 45% έως 64% στα νεογνά. Επισημαίνεται η υψηλή μεταβλητότητα στην αποτελεσματικότητα των διαφορετικών οδηγιών και επισημαίνεται η αναγκαιότητα της εξατομίκευσης της δοσολογίας με εφαρμογή TDM λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό βάρος σώματος (ΣΒΣ) και το ιδανικό βάρος σώματος (ΙΒΣ) ιδιαίτερα στα υπέρβαρα παιδιά.

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την αναγκαιότητα της εξατομίκευσης της δοσολογίας του BU σε παιδιατρικούς ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε ΜΜΟ. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της παρακολούθησης των επιπέδων για την εξατομίκευση της δόσης του BU σε παιδιατρικούς ασθενείς στην Ελλάδα.

Θα πρέπει να τονιστεί επίσης ότι με βάση τη μέχρι τώρα γνώση από τη βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται η χρήση του χρόνου υστέρησης άφιξης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος (lag-time) για τον υπολογισμό της AUC στο πλαίσιο της διαδικασίας εξατομίκευσης της δόσης του BU

σε παιδιατρικούς ασθενείς, όταν χρησιμοποιούνται αντλίες σύριγγας κατά την χορήγηση. Η σημασία του χρόνου υστέρησης έγχυσης κατά τη ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων σε παιδιατρικούς ασθενείς, έχει συζητηθεί στη βιβλιογραφία και έχουν γίνει προσπάθειες *in silico* και *in vitro* προσομοιώσεων ώστε να μπορέσει να μειωθεί η επίδρασή του στην άφιξη του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος^[135-144]. Σε όλες τις εργασίες επισημαίνεται ότι η χρήση των συμβατικών τεχνικών κατά τη ρύθμιση της παιδιατρικής περίθαλψης μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές και δυνητικά επικίνδυνες καθυστερήσεις στην επίτευξη της χορήγησης της επιδιωκόμενης δόσης του φαρμάκου στον ασθενή. Ο νεκρός όγκος της διαδρομής του υγρού και ο συνολικός ρυθμός ροής αναφέρονται να αποτελούν τους κύριους παράγοντες του συστήματος που συμβάλλουν στην καθυστέρηση της επίτευξης του επιθυμητού ρυθμού χορήγησης του φαρμάκου με την αύξηση του πρώτου να αυξάνει τον χρόνο υστέρησης και την αύξηση του δεύτερου να τον μειώνει. Παράλληλα, προτείνεται η ελεγχόμενη μέσω H/Y διαδικασία ενδοφλέβιας έγχυσης για τον έλεγχο της ροής έγχυσης όταν χρησιμοποιούνται αντλίες έγχυσης καθώς και η χρήση μικρού νεκρού όγκου^[143, 145-146].

Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης έγχυσης οι υπολογιζόμενες τιμές AUC είναι μικρότερες σε σύγκριση με αυτές που υπολογίζονται χωρίς το χρόνο υστέρησης ($960.4 \pm 292.1 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ και $1009.2 \pm 298.9 \mu\text{M} \cdot \text{min}$, αντίστοιχα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση του AUC_{lag} να είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε υποθεραπευτικά επίπεδα ($\text{AUC} < 900 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που βρίσκονται πάνω από ΘΕ ($\text{AUC} > 1350 \mu\text{M} \cdot \text{min}$). Πιο συγκεκριμένα, μετά την εξατομίκευση της δόσης όταν οι τιμές AUC υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη το lag-time ένα ποσοστό ασθενών ίσο με 4.1% παραμένει κάτω από το ΘΕ ενώ με τη συμβατική μέθοδο υπολογισμού χωρίς το lag-time όλοι οι ασθενείς βρίσκονται εντός ΘΕ. Αυτή η παρατήρηση είναι κλινικά σημαντική δεδομένου ότι υποθεραπευτικά επίπεδα BU είναι συνδεδεμένα με απόρριψη μοσχεύματος^[14,22]. Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η διόρθωση της δόσης με βάση το περιορισμένο ΘΕ ($900 < \text{AUC} < 1350 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) ώστε όλοι οι ασθενείς να βρίσκονται σε επίπεδα κατώτερα του μέγιστου επιτρεπόμενου τοξικού ορίου ($\text{AUC} < 1500 \text{mM} \cdot \text{min}$) ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (AUC_{lag} ή $\text{AUC}_{\text{no lag}}$).

Κεφάλαιο 5 – Ανάπτυξη Πληθυσμιακού Φαρμακοκινητικού Μοντέλου Βουσουλφάνης σε Παιδιατρικούς Ασθενείς

5. Πληθυσμιακή ΦΚ Μοντελοποίηση - Σύγκριση τρόπου εξατομίκευσης

Σε αυτή την ενότητα περιγράφεται η ανάπτυξη του πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου του i.v. χορηγούμενου Busilvex® με ενσωμάτωση του χρόνου υστέρησης έγχυσης όπως προσδιορίστηκε στο κεφάλαιο 4. Η εκτίμηση των ΦΚ παραμέτρων έγινε με τη χρήση του NONMEM 7.3. Ο τρόπος ανάπτυξης του ΦΚ μοντέλου περιγράφεται διεξοδικά στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου. Η μελέτη διήρκησε ~3 χρόνια (Ιούλιος 2014-Ιανουάριος 2017). Το πρωτόκολλο έλαβε έγκριση από την Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου (**Παράρτημα Ε**). Στην αναδρομική ανάλυση δεδομένων συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα συγκέντρωσης στο πλάσμα – χρόνου όλων των παιδιατρικών ασθενών στους οποίους μετρήθηκαν τα επίπεδα BU στο αίμα στο πλαίσιο της εξατομίκευσης της δόσης (βλ. Κεφάλαιο 4) στη μονάδα μεταμόσχευσης του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία». Συνολικά στη μελέτη συμμετείχαν 76 παιδιατρικοί ασθενείς (Κεφάλαιο 4).

5.1. Γενική Διαδικασία ανάπτυξης ΦΚ μοντέλου

5.1.1. Ανάπτυξη βασικού πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου

Τα δεδομένα αναλύθηκαν μέσω μη γραμμικού μοντέλου μικτών επιδράσεων. Η ανάλυση έγινε στο υπολογιστικό πρόγραμμα NONMEM® 7.3 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο FOCE (first-order conditional estimation) INTER (interaction).

5.1.1.1. Δομικό μοντέλο

Ως δομικά μοντέλα δοκιμάστηκαν το μονο- και το δι-διαμερισματικό μοντέλο με γραμμική κατανομή και απομάκρυνση, με μηδενοταξική είσοδο φαρμάκου με και χωρίς χρόνο υστέρησης που προσομοιάζει την έγχυση φαρμάκου με σταθερό ρυθμό. Οι βασικές παράμετροι ήταν η κάθαρση (CL) και ο όγκος κατανομής για το κεντρικό διαμέρισμα (V1) του μονοδιαμερισματικού μοντέλου και επιπρόσθετα η διαμερισματική κάθαρση (Q) και ο περιφερικός όγκος κατανομής (V2) για το δι-διαμερισματικό μοντέλο.

5.1.1.2. Στατιστικά μοντέλα

Επίσης, προσδιορίστηκε η δι-ατομική μεταβλητότητα (inter individual variability, IIV) η οποία εκφράζει την διακύμανση των ΦΚ παραμέτρων από τη μέση

πληθυσμιακή τιμή για κάθε ασθενή. Θεωρήθηκε ότι οι παράμετροι ακολουθούν λογαριθμοκανονική κατανομή.

Η έκφραση τη δι-ατομικής μεταβλητότητας γίνεται σύμφωνα με το παρακάτω μοντέλο:

$$\Phi_i = \theta * \exp(\eta_i)$$

Εξίσωση 5.1

Όπου θ ο γεωμετρικός μέσος της ΦΚ παραμέτρου Φ και τα η_i εκφράζουν την απόκλιση της ατομικής τιμής της ΦΚ παραμέτρου για τον ασθενή i από την τυπική πληθυσμιακή τιμή.

Επιπλέον ελέγχθηκε και η ενδο-ατομική μεταβλητότητα (inter occasion variability, IOV) η οποία εκφράζει τη διακύμανση μεταξύ των ΦΚ παραμέτρων για τον ίδιο ασθενή από δόση σε δόση.

$$\Phi_{ij} = \theta * \exp(\eta_i + k_{ij})$$

Εξίσωση 5.2

Όπου k_{ij} εκφράζει την απόκλιση της τιμής της ΦΚ παραμέτρου από τη μέση τιμή για τον ασθενή i κατά την περίοδο j . Τα η_i and k_{ij} θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και ότι ακολουθούν κανονική κατανομή με μέση τιμή 0 και διακύμανση ω^2 και π^2 , αντίστοιχα.

Τα μοντέλα που αξιολογήθηκαν για την υπολειπόμενη μεταβλητότητα ήταν το προσθετικό (additive), το αναλογικό (proportional) και το συνδυαστικό (combined) μοντέλο σφάλματος. Στο προσθετικό μοντέλο θεωρείται ότι το σφάλμα είναι σταθερό σε όλο το εύρος των προβλεπόμενων από το μοντέλο συγκεντρώσεων, έχει δηλαδή σταθερή διακύμανση και ονομάζεται ομοσκεδαστικό (homoscedastic). Στην περίπτωση αυτή, το υπολειμματικό σφάλμα προστίθεται στην προβλεπόμενη από το μοντέλο τιμή της συγκέντρωσης. Το προσθετικό μοντέλο μπορεί να περιγραφεί σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$y_{ij} = f(x_{ij}, \Theta_i) + \varepsilon_{ij}$$

Εξίσωση 5.3

όπου $f(x_{ij}, \Theta_i)$ είναι η προβλεπόμενη από το μοντέλο τιμή για την παρατήρηση j του ατόμου i μέσω μίας συνάρτησης (γραμμικής ή μη γραμμικής) με διάνυσμα παραμέτρων Θ_i (π.χ. κάθαρση, όγκος κατανομής), ανεξάρτητες μεταβλητές x_{ij} (π.χ. χρόνος) και υπολειμματικό σφάλμα ε_{ij} στην παρατήρηση j του ατόμου i .

Η χρήση του προσθετικού μοντέλου σε ΦΚ δεδομένα συγκέντρωσης – χρόνου, μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικές συγκεντρώσεις όταν η προβλεπόμενη τιμή f είναι

μικρή και το σφάλμα μεγάλο. Επίσης, συνήθως το σφάλμα αυξάνεται με την αύξηση της τιμής του δομικού μοντέλου $f(\chi_{ij}, \Theta_i)$. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται το αναλογικό μοντέλο στο οποίο το υπολειμματικό σφάλμα μεταβάλλεται με την προβλεπόμενη τιμή της συγκέντρωσης (ετεροσκεδαστικό υπολειμματικό σφάλμα). Είναι δηλαδή, ανάλογο της προβλεπόμενης από το μοντέλο τιμής της συγκέντρωσης και περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$y_{ij} = f(\chi_{ij}, \Theta_i) * (1 + \varepsilon_{ij})$$

Εξίσωση 5.4

Στο πολλαπλασιαστικό μοντέλο το βάρος που δίνεται στα δεδομένα κατά την προσαρμογή είναι αντιστρόφως ανάλογο της τιμής που προβλέπει το μοντέλο. Για μεγάλες τιμές του f επιτρέπεται μεγαλύτερο σφάλμα, ενώ για πολύ μικρές το σφάλμα τείνει στο 0. Στην περίπτωση αυτή, ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) είναι σταθερός.

Όταν θέλουμε το σφάλμα να είναι ανάλογο του μοντέλου f για μεγάλες τιμές, αλλά να μην μηδενίζεται για τις μικρές, χρησιμοποιείται το συνδυαστικό μοντέλο σφάλματος, το οποίο αποτελεί έναν συνδυασμό ετεροσκεδαστικού και ομοσκεδαστικού υπολειμματικού σφάλματος. Το μοντέλο αυτό είναι σύνηθες στη ΦΚ, έτσι ώστε το σφάλμα να μην μηδενίζεται σε χαμηλές τιμές γιατί ακόμη και αυτές μετρούνται με κάποια αβεβαιότητα, και να αυξάνεται με την αύξηση του μοντέλου f . Η εξίσωση που περιγράφει το συνδυαστικό μοντέλο είναι η εξής:

$$y_{ij} = f(\chi_{ij}, \Theta_i) * (1 + \varepsilon_{1ij}) + \varepsilon_{2ij}$$

Εξίσωση 5.5

5.1.1.3. Ανάπτυξη μοντέλου συμμεταβλητών

Συμμεταβλητές καλούνται εκείνοι οι παράγοντες που παρουσιάζουν μια σημαντική συσχέτιση με τις ΦΚ παραμέτρους και ερμηνεύουν μέρος της δι-ατομικής μεταβλητότητας. Ως συμμεταβλητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σωματομετρικοί (βάρος, ύψος), βιοχημικοί (συγκέντρωση κρεατινίνης, αιματοκρίτης), φυλετικοί κ.α. παράγοντες. Η έκφραση τη δι-ατομικής μεταβλητότητας γίνεται σύμφωνα με το παρακάτω μοντέλο:

$$\Phi_i = h(\theta, z_i) * \exp(\eta_i)$$

Εξίσωση 5.6

Όπου h είναι μια συνάρτηση που συνδέει τις συμμεταβλητές z και τις παραμέτρους σταθερών επιδράσεων θ με τις ΦΚ παραμέτρους φ και αντιστοιχεί στη

μέση τιμή της φαρμακοκινητικής παραμέτρου για τον πληθυσμό, και τα η_i εκφράζουν την απόκλιση της ατομικής τιμής της ΦΚ παραμέτρου για τον ασθενή i από τη μέση τιμή.

Η διαδικασία ανάπτυξης ενός μοντέλου συμμεταβλητών περιλαμβάνει:

- 1) τη δημιουργία ενός βασικού μοντέλου, δηλαδή ενός δομικού και στατιστικού μοντέλου που δεν περιέχει σχέσεις συμμεταβλητών-παραμέτρων
- 2) την ανίχνευση πιθανών σχέσεων συμμεταβλητών-παραμέτρων
- 3) την είσοδο και εξέταση της κάθε σχέσης συμμεταβλητής-παραμέτρου ξεχωριστά στο βασικό μοντέλο
- 4) τον έλεγχο σημαντικότητας των εξεταζόμενων συμμεταβλητών για τις παραμέτρους του μοντέλου και
- 5) την ένταξη μόνο των σημαντικών σχέσεων συμμεταβλητών-παραμέτρων στο τελικό μοντέλο.

Η ανίχνευση των πιθανών σχέσεων μεταξύ διαφόρων συμμεταβλητών και παραμέτρων του βασικού μοντέλου πραγματοποιείται με την εφαρμογή γραφικών μεθόδων, αυτοματοποιημένων διαδικασιών ή της εμπειρικής μεθόδου δοκιμής και σφάλματος.

Η γραφική αξιολόγηση των δεδομένων βασίζεται στην παραδοχή ότι μία σχέση, εφόσον είναι σημαντική, θα είναι σαφώς ευδιάκριτη με γραφική απεικόνιση. Συνήθως, ελέγχεται το διάγραμμα των εμπειρικών Μπασσιανών εκτιμήσεων έναντι των συμμεταβλητών. Τα διαγράμματα αυτά δίνουν πληροφορίες και ως προς τη μορφή της παρατηρούμενης σχέσης.

Επίσης, εξετάζεται η επίδραση της εισαγωγής μιας παραμέτρου ως συμμεταβλητή στη δι-ατομική μεταβλητότητα και η στατιστική σημαντικότητα. Εφόσον μια πιθανή συμμεταβλητή έχει επίδραση σε μια φαρμακοκινητική παράμετρο και άρα επηρεάζει τη δι-ατομική μεταβλητότητα, η εισαγωγή της ως συμμεταβλητή θα επιφέρει μείωση της σε σχέση με αυτή που υπολογίζεται στο βασικό μοντέλο. Ενδεικτικό κριτήριο είναι η μείωση του ΔOFV συγκριτικά με το βασικό μοντέλο, το οποίο δεν περιέχει καμία συμμεταβλητή, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Η επιλογή του τελικού μοντέλου βασίστηκε σε γραφικό έλεγχο καλής προσαρμογής (goodness of fit) και σε κριτήρια στατιστικής σημαντικότητας.

5.1.1.4. Γραφικός έλεγχος καλής προσαρμογής μοντέλου

Τα βασικά διαγράμματα που περιγράφουν την προσαρμογή του μοντέλου στα ΦΚ δεδομένα είναι τα εξής:

1. παρατηρήσεις (OBS) έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο πληθυσμιακών συγκεντρώσεων (PRED)
2. OBS έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών συγκεντρώσεων (IPRED)
3. Η τιμή των ατομικών σταθμισμένων υπολοίπων (IWRES) έναντι των PRED και
4. CWRES έναντι PRED.
5. CWRES έναντι χρόνου

Αν στο διάγραμμα OBS έναντι PRED παρατηρούνται αποκλίσεις από την ευθεία $\psi=\chi$, τότε ίσως υπάρχει κάποιο πρόβλημα με το δομικό ή στατιστικό μοντέλο. Αν στο διάγραμμα OBS έναντι IPRED παρατηρούνται αποκλίσεις από την ευθεία $\psi=\chi$, τότε ίσως το δομικό μοντέλο που έχει επιλεγεί δεν είναι το κατάλληλο. Τα ατομικά υπόλοιπα (IRES) και τα ατομικά σταθμισμένα υπόλοιπα (IWRES) υπολογίζονται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\mathbf{IRES} = \mathbf{OBS} - \mathbf{IPRED} \quad \text{Εξίσωση 5.7}$$

$$\mathbf{IWRES} = \mathbf{IRES}/\sigma \quad \text{Εξίσωση 5.8}$$

όπου σ είναι το μέγεθος σφάλματος που υπολογίζεται από το μοντέλο υπολειμματικής μεταβλητότητας. Το διάγραμμα $|\mathbf{IWRES}|$ έναντι IPRED βοηθάει στην αξιολόγηση του στατιστικού μοντέλου και ειδικότερα, του μοντέλου υπολειμματικής μεταβλητότητας. Αν στο διάγραμμα WRES έναντι χρόνου, τα WRES κατανέμονται ομοιόμορφα γύρω από το μηδέν και βρίσκονται σε απόσταση δύο τυπικών αποκλίσεων από το μηδέν ($\pm 2SD$), τότε το δομικό μοντέλο θεωρείται επαρκές ^[150-151]. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιείται η μέθοδος FOCE για την προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το CWRES (Conditional WRES) στη θέση του WRES.

Κατά τον γραφικό έλεγχο προσαρμογής, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το φαινόμενο της συρρίκνωσης (shrinkage). Υπάρχουν δύο τύποι συρρίκνωσης: η η-συρρίκνωση (η-sh,) και η ε-συρρίκνωση (ε-sh). Όταν τα δεδομένα είναι σποραδικά και δεν περιέχουν πληροφορίες για τις ατομικές τιμές των παραμέτρων, οι προβλεπόμενες από το μοντέλο ατομικές τιμές των παραμέτρων θα τείνουν προς τις πληθυσμιακές

τιμές των παραμέτρων. Έτσι, η διακύμανση της κατανομής των ατομικών εμπειρικών Μπαεσιανών εκτιμήσεων της δια-ατομικής μεταβλητότητας (η -EBE, empirical Bayes estimate) (**Ενότητα 1.2.2.4**) θα «συρρικνώνεται» ή τείνει στο μηδέν. Το φαινόμενο αυτό καλείται η -*συρρίκνωση*. Ιδιαίτερη προσοχή στην η -συρρίκνωση πρέπει να δίνεται στη φάση ανάπτυξης του μοντέλου συμμεταβλητών, κυρίως κατά την αξιολόγηση των διαγραμμάτων των η -EBE έναντι συμμεταβλητών. Η η -sh υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$sh\eta = 1 - SD(\eta EBE)/\omega \quad \text{Εξίσωση 5.9}$$

όπου ω είναι η πληθυσμιακή τιμή της τυπικής απόκλισης της δια-ατομικής μεταβλητότητας και SD η τυπική απόκλιση. Όταν η τιμή της η -sh πλησιάζει τη μονάδα, σημαίνει ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την εκτίμηση των ατομικών τιμών των παραμέτρων. Με τον όρο ε -*συρρίκνωση* ή «τέλεια προσαρμογή» καλείται το φαινόμενο της υπερβολικής προσαρμογής των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών παρατηρήσεων στις πραγματικές παρατηρήσεις. Η ε -sh παρουσιάζεται όταν οι παρατηρήσεις από κάθε άτομο είναι σποραδικές ή μη πληροφοριακές και υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$sh\varepsilon = 1 - SD(IWRES) \quad \text{Εξίσωση 5.10}$$

Η κατανομή των IWRES θεωρείται κανονική με μέση τιμή μηδέν και διακύμανση ίση με τη μονάδα, όταν τα δεδομένα είναι επαρκή για την εκτίμηση των ατομικών παρατηρήσεων. Στην αντίθετη περίπτωση, η διακύμανση των IWRES τείνει στο μηδέν και η ε -sh πλησιάζει τη μονάδα. Ιδιαίτερη έμφαση στην ε -sh πρέπει να δίνεται κατά την αξιολόγηση των διαγραμμάτων OBS έναντι IPRED και |IWRES| έναντι IPRED^[147].

Υπάρχουν δύο στατιστικοί έλεγχοι καλής προσαρμογής του μοντέλου που χρησιμοποιούν την τιμή της αντικειμενικής συνάρτησης (objective function value-OFV), ο λόγος πιθανοφάνειας (LR) και το Akaike κριτήριο πληροφορίας (AIC). Ο στατιστικός έλεγχος με τον LR ενδείκνυται για τη σύγκριση ιεραρχικών μοντέλων. Δύο μοντέλα καλούνται ιεραρχικά όταν το μοντέλο δοκιμής (πλήρες μοντέλο), το οποίο περιέχει περισσότερες παραμέτρους από το μοντέλο αναφοράς (βασικό μοντέλο), καταλήγει στο μοντέλο αναφοράς με την αντικατάσταση των τιμών μίας ή περισσότερων παραμέτρων με σταθερές τιμές. Η στατιστική δοκιμή LR εξετάζει αν η διαφορά στην OFV (Δ OFV) μεταξύ του μοντέλου αναφοράς και του μοντέλου δοκιμής,

η οποία ακολουθεί περίπου χ^2 κατανομή, είναι στατιστικά σημαντική. Η κρίσιμη τιμή της ΔΟFV εξαρτάται από το επίπεδο σημαντικότητας α και τους βαθμούς ελευθερίας df (αριθμός διαφοράς παραμέτρων μεταξύ των συγκρινόμενων μοντέλων).

Αν η ΔΟFV μεταξύ του μοντέλου αναφοράς και του μοντέλου δοκιμής είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή π.χ. $\Delta OFV > 3.841$ για $\alpha = 0.05$ και $df = 1$, τότε η μηδενική υπόθεση ότι την καλύτερη προσαρμογή παρουσιάζει το μοντέλο αναφοράς απορρίπτεται στο συγκεκριμένο επίπεδο σημαντικότητας^[147-150].

Το AIC αποτελεί ένα στατιστικό εργαλείο για τη σύγκριση της προσαρμογής διαφόρων μη ιεραρχικών μοντέλων στα ΦΚ δεδομένα. Το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή AIC θεωρείται ότι παρουσιάζει την καλύτερη προσαρμογή. Η γενική μορφή του AIC είναι:

$$AIC = 2p - 2\ln(L) \quad \text{Εξίσωση 5.11}$$

όπου p ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου και L η μέγιστη τιμή της συνάρτησης πιθανοφάνειας για κάθε υποψήφιο μοντέλο.

5.1.1.5. Ακρίβεια εκτιμώμενων παραμέτρων μοντέλου

Κατά την προσαρμογή ενός μοντέλου στα ΦΚ δεδομένα οι παράμετροι εκτιμώνται με συγκεκριμένη ακρίβεια. Μέτρα της ακρίβειας με την οποία πραγματοποιείται μια εκτίμηση αποτελούν το σφάλμα (τυπικό σφάλμα, SE), και το διάστημα εμπιστοσύνης (CI). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του SE, τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η ακρίβεια μίας εκτίμησης. Ο υπολογισμός των SE των παραμέτρων του μοντέλου στηρίζεται στη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, θεωρώντας ότι ο υπό διερεύνηση πληθυσμός είναι μεγάλος και η παρατηρούμενη μεταβλητότητα (δια- και ενδο-ατομική) ακολουθεί κανονική κατανομή. Δηλαδή, τα SE θεωρείται ότι ακολουθούν ασυμπτωτικά κανονική κατανομή.

Στο NONMEM, τα SE υπολογίζονται ως η τετραγωνική ρίζα των διαγωνίων του πίνακα συνδιασποράς, ο οποίος είναι συνάρτηση του πίνακα Hessian^[148,151]. Πολλές φορές, υπολογίζεται το σχετικό τυπικό σφάλμα (RSE) αντί του SE, το οποίο εκφράζει (ως ποσοστό %) το SE της εκτιμώμενης τιμής μίας παραμέτρου ($\hat{\theta}$) σε σχέση με την αντίστοιχη εκτιμώμενη τιμή θ ^[152]. Ο υπολογισμός του %RSE γίνεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\%RSE = SE_{\theta} / \hat{\theta} * 100 \quad \text{Εξίσωση 5.12}$$

Ο βαθμός ακρίβειας των εκτιμώμενων παραμέτρων του μοντέλου εξαρτάται από το μέγεθος του υπό διερεύνηση πληθυσμού και από την πυκνότητα του δειγματοληπτικού σχήματος. Έτσι, για τις περισσότερες ΦΚ αναλύσεις τα αποδεκτά SE για τις παραμέτρους των σταθερών και τυχαίων επιδράσεων είναι συνήθως μικρότερα του 30% και 50%, αντιστοίχως.

Ο παραπάνω υπολογισμός βασίζεται στην υπόθεση ότι οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή. Σε περίπτωση που δεν ισχύει η παραπάνω υπόθεση εφαρμόζεται η τεχνική του bootstrap (χρησιμοποιείται και για την επικύρωση του μοντέλου), η οποία είναι ανεξάρτητη των στατιστικών κατανομών που ακολουθούν οι παράμετροι. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ένα νέο σετ δεδομένων ίσου μεγέθους με το πραγματικό δημιουργείται με τυχαία επιλογή με επανάθεση από το πραγματικό σετ δεδομένων, και το πληθυσμιακό μοντέλο προσαρμόζεται στο νέο σετ δεδομένων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τυπικά 1000 φορές. Από τη μέθοδο αυτή προκύπτει ένα σύνολο 1000 εκτιμήσεων της κάθε παραμέτρου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται στατιστική επεξεργασία και εκτιμώνται η μέση τιμή, η διάμεσος, το SE μέσω της τυπική απόκλιση SE, το σχετικό τυπικό σφάλμα και το διάστημα εμπιστοσύνης (CI).

5.1.1.6. Προβλεπτικές ικανότητες μοντέλου

Η αξιολόγηση των προβλεπτικών ικανοτήτων του μοντέλου είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν το μοντέλο προορίζεται για προσομοιώσεις. Ο οπτικός έλεγχος προβλεπτικής ικανότητας (VPC) αποτελεί έναν εσωτερικό έλεγχο αξιολόγησης της ικανότητας ενός μοντέλου να περιγράφει τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξή του.

Η μέθοδος VPC περιλαμβάνει τα εξής στάδια και έγινε με τη βοήθεια του Perl-speaks-NONMEM (PsN):

1. Χρησιμοποιώντας το τελικό μοντέλο και τις τιμές των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν, προσομοιώνονται 1000 σετ δεδομένων ίδιας δομής με το πραγματικό.
2. Για το κάθε προσομοιωμένο σετ δεδομένων υπολογίζεται μη παραμετρικά το 5°, 50° και 95° εκατοστημόριο.
3. Από τα 1000 σετ δεδομένων υπολογίζονται και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τα τρία εκατοστημόρια.
4. Υπολογίζεται μη παραμετρικά το 5°, 50° και 95° εκατοστημόριο για το πραγματικό σετ δεδομένων.

5. Γίνεται γραφική απεικόνιση των διαστημάτων εμπιστοσύνης για τα εκατοστημόρια πρόβλεψης και των εκατοστημορίων των πραγματικών δεδομένων.

Η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου αξιολογείται συγκρίνοντας το διάστημα πρόβλεψης από τα προσομοιωμένα δεδομένα με τα πραγματικά. Πρέπει το κάθε εκατοστημόριο από τα πραγματικά δεδομένα να περιέχεται στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης του αντίστοιχου εκατοστημορίου πρόβλεψης.

5.2. Σύνοψη πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής μοντελοποίησης

Η πληθυσμιακή ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μη γραμμικής μικτών επιδράσεων μοντελοποίησης με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος NONMEM® 7.3 (Icon Development Solutions, Ellicott City, MD, USA). Ο αλγόριθμος FOCE επιλέχθηκε στο NONMEM® 7.3 για την εκτίμηση των πληθυσμιακών τιμών των παραμέτρων.

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή της δια-ατομικής μεταβλητότητας ήταν το εκθετικό. Για την έκφραση της υπολειπόμενης μεταβλητότητας δοκιμάστηκαν το προσθετικό, το αναλογικό και το συνδυαστικό μοντέλο σφάλματος σε μη λογαριθμοποιημένα δεδομένα.

Η επιλογή μεταξύ δύο μοντέλων βασίστηκε στην ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς των αντικειμενικών συναρτήσεων η οποία θεωρείται ότι ακολουθεί περίπου χ^2 κατανομή, και ελέγχθηκε με τη στατιστική δοκιμή Likelihood ratio test (LRT). Η επιλογή του μοντέλου με την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα βασίστηκε επίσης σε βασικά διαγράμματα καλής προσαρμογής, στο φαινόμενο της συρρίκνωσης (εάν παρατηρούνταν) και στην ακρίβεια των εκτιμώμενων παραμέτρων.

Οι συμμεταβλητές που ελέγχθηκαν ήταν το βάρος, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, η κάθαρση κρεατινίνης (CKPD-EPI). Η αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ συμμεταβλητών και παραμέτρων του μοντέλου έγινε με οπτικό έλεγχο των διαγραμμάτων των ατομικών εμπειρικών Μπαεσιανών εκτιμήσεων (post hoc εκτιμήσεων) των παραμέτρων του μοντέλου έναντι των συμμεταβλητών. Επίσης, εξετάστηκε η στατιστική σημαντικότητα της εισαγωγής μιας παραμέτρου στην ελάττωση της OFV. Για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ μια παράμετρος θεωρήθηκε σημαντική όταν η ελάττωση της OFV ήταν τουλάχιστον 3.841 μονάδες συγκριτικά με το πιο απλό μοντέλο.

Η αξιολόγηση του κάθε μοντέλου έγινε χρησιμοποιώντας τα διαγράμματα καλής προσαρμογής και με οπτικό έλεγχο της προβλεπτικής ικανότητας (VPC).

Η επικύρωση του τελικού μοντέλου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο bootstrap χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα wings for NONMEM (wfn). Η τιμές που υπολογίστηκαν από το Bootstrap συγκρίθηκαν με τις εκτιμήσεις από το πραγματικό set δεδομένων.

5.2.1. Διερεύνηση του καλύτερου δειγματοληπτικού σχήματος

Μετά την επικύρωση του τελικού μοντέλου ακολούθησαν οι post hoc εκτιμήσεις των εξατομικευμένων ΦΚ παραμέτρων για κάθε ασθενή και χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του AUC_{NONMEM} . Έτσι, έγινε η σύγκριση των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο των τραπεζίων λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης και με αυτό της Μπαεσιανής εξατομίκευσης. Στη συνέχεια ακολούθησε η διερεύνηση της επίδρασης του αριθμού των δειγμάτων αίματος στην εκτίμηση της AUC και του ποσοστού των ασθενών εντός ΘΕ. Έτσι, ακολούθησε η σύγκριση του ποσοστού των ασθενών που είναι εντός ΘΕ ($900.0-1350.0\mu M \cdot \text{min}$) με βάση την Μπαεσιανή εξατομίκευση λαμβάνοντας υπόψη το δειγματοληπτικό σχήμα της μελέτης, σε χρόνο 0 (πριν την έναρξη της έγχυσης), στις 2-3 h στο τέλος της έγχυσης), στις 2.5 ή 3.5- h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης), στις 4 και 6 ώρες, σε σχέση με τα ακόλουθα δειγματοληπτικά σχήματα στα οποία έχουν αφαιρεθεί κάποια ενδιάμεσα δείγματα, όπως αναφέρεται και στον Πίνακας 5.1.

Πίνακας 5.1: Δειγματοληπτικά σχήματα που εφαρμόστηκαν για την εξέταση της επίδοσης του μοντέλου αν χρησιμοποιούσαμε λιγότερα σημεία.

Δειγματοληπτικό σχήμα	Χρόνος Δειγματοληψίας (h)				
	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	2-3 h (στο τέλος της έγχυσης)	2.5 - 3.5 h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης)	4 h	6 h
1	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	2-3 h (στο τέλος της έγχυσης)	2.5 - 3.5 h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης)	4 h	6 h
2	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	2-3 h (στο τέλος της έγχυσης)	-	4 h	6 h
3	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	-	2.5 - 3.5 h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης)	4 h	6 h
4	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	-	2.5 - 3.5 h (μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης)	-	6 h
5	0 h (πριν την έναρξη της έγχυσης)	-	-	-	6 h

5.3. Αποτελέσματα

Η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση για το Busilvex® εφαρμόστηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς που συμμετείχαν στη κλινική μελέτη. Τα δεδομένα, αποτελούνταν από 596 συγκεντρώσεις πλάσματος από 76 παιδιατρικούς ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε i.v. Busilvex®. Η χορηγούμενη δόση κυμαίνεται από 0.8-1.2 mg/kg ανά κατηγορία βάρους σώματος 4 φορές/ημέρα για 2-4 ημέρες ανάλογα το θεραπευτικό σχήμα. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο αριθμός των ασθενών ανά δοσολογικό σχήμα και το εύρος των βαρών το ύψος και το φύλο.

Πίνακας 5.2: Δημογραφικά χαρακτηριστικά ανά κατηγορία ΒΣ.

Αριθμός ασθενών (N)	Μέσο βάρος kg (εύρος)	Μέση Ηλικία έτη (εύρος)	Μέση τιμή Ύψους cm (εύρος)	Άρρεν	Θήλυ
ΒΣ <9 kg Δόση 1.0 mg/kg					
4	8.02 (7.4-8.7)	0.7 (0.58-0.75)	71.9 (66.0-76.0)	2	2
ΒΣ 9-16 kg Δόση 1.2 mg/kg					
20	12.31 (9.2-15.0)	3.1 (0.5-7.0)	92.2 (70.0-108.0)	11	9
ΒΣ 16-23 kg Δόση 1.1 mg/kg					
13	19.35 (16.0-66.7)	5.23 (3.0-7.0)	104.4 (0.71-126)	10	3
ΒΣ 23-34 kg Δόση 0.95 mg/kg					
16	28.7 (25.0-34.0)	7.9 (5.0-12.0)	129.8 (113.5-151.0)	11	5
ΒΣ >34 kg Δόση 0.8 mg/kg					
23	58.1 (34.5-104.0)	13.9 (6.0-19.0)	163.1 (130.0-207.1)	15	8

Οι δειγματοληψίες έγιναν εφαρμόζοντας το πρωτόκολλό το οποίο έχει αναφερθεί στο **Κεφάλαιο 4**. Κατά το δειγματοληπτικό σχήμα υπήρχαν μικρές αποκλίσεις στους χρόνους οι οποίες καταγράφονταν με λεπτομέρεια και ελήφθησαν υπόψη κατά την καταχώρηση των δεδομένων στο dataset. Κανένα δεδομένο ασθενή δεν εξαιρέθηκε από τη μελέτη καθώς τα στοιχεία των ασθενών ήταν πλήρως καταγεγραμμένα σε ειδικές φόρμες που παρείχαν όλη τη πληροφορία σχετικά με τα δεδομένα του κάθε ασθενή.

5.3.1. Σχεδιασμός και ανάπτυξη δομικού μοντέλου

Η ανάπτυξη του μοντέλου άρχισε λαμβάνοντας υπόψη το σχεδιασμό της μελέτης και βιβλιογραφικά στοιχεία.. Το Busilvex® παρουσιάζει γραμμική ΦΚ και με βάση τη βιβλιογραφία τόσο το μονοδιαμερισματικό όσο και το διδιαμερισματικό μοντέλο έχουν

χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της κατανομής του^[153,154]. Κατά την εύρεση του δομικού μοντέλου, το μονοδιαμερισματικό μοντέλο, το οποίο προϋποθέτει την ταχεία και ομοιογενή κατανομή του φαρμάκου σε όλους τους ιστούς του σώματος, απορρίφθηκε γιατί δεν παρατηρήθηκε καλή προσαρμογή στα δεδομένα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ένα βασικό διδιαμερισματικό μοντέλο με το οποίο επιτεύχθηκε καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα και μεγαλύτερη πτώση του OFV. Επακολούθως, λήφθηκε υπόψη ο χρόνος υστέρησης που έχει διερευνηθεί στο **Κεφάλαιο 3** και παρατηρήθηκε καλύτερη προσαρμογή των δεδομένων τόσο στο μονοδιαμερισματικό όσο και στο διδιαμερισματικό. Ως χρόνος υστέρησης για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκε η τιμή που έχει υπολογιστεί στο **Κεφάλαιο 3 (Πίνακας 3.22)**. Μεταξύ αυτών η προσαρμογή των δεδομένων στο διδιαμερισματικό μοντέλο ήταν η καλύτερη και είχε και τη μεγαλύτερη πτώση στο OFV. Οι τιμές για το OFV για τα μοντέλα που δοκιμάστηκαν δίνονται στον **Πίνακας 5.3**. Το διδιαμερισματικό μοντέλο με σταθερό ρυθμό έγχυσης και χρόνο υστέρησης (όπως διερευνήθηκε στο κεφάλαιο 4) με πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης βρέθηκε ως καταλληλότερο για να περιγράψει τα δεδομένα και η παραμετροποίηση έγινε ως προς την κάθαρση του φαρμάκου (CL), τον όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος (V_c), τον όγκο κατανομής του περιφερικού διαμερίσματος (V_p), και τη διδιαμερισματική κάθαρση (Q). Η δι-ατομική μεταβλητότητα (inter individual variability, IIV) εκφράστηκε καλύτερα με το εκθετικό μοντέλο και εκτιμήθηκε για τις παραπάνω παραμέτρους της κάθαρσης (CL) και του όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος (V_c). Επίσης, ελέγχθηκε και η ενδο-ατομική μεταβλητότητα (inter occasion variability, IOV) καθώς υπήρχαν δειγματοληψίες από πολλαπλές χορηγήσεις ανά ασθενή, η οποία οδήγησε σε σημαντική πτώση του OFV. Επιπλέον, υπολογίστηκε η συνδιακύμανση μεταξύ της δι-ατομικής μεταβλητότητας της κάθαρσης και του όγκου κατανομής του κύριου διαμερίσματος η οποία έδειξε υψηλή συσχέτιση. Τέλος, για την εύρεση του μοντέλου βάσης ελέγχθηκαν τέσσερα μοντέλα σφάλματος, το πολλαπλασιαστικό, το προσθετικό, το συνδυαστικό (πολλαπλασιαστικό και προσθετικό) και το εκθετικό, εκ των οποίων το συνδυαστικό σφάλμα οδήγησε στην καλύτερη προσαρμογή των δεδομένων.

Η δήλωση του μοντέλου στο control file έγινε με την επιλογή ADVAN3 TRANS4, στην παράγραφο \$SUBROUTINE, η οποία σημαίνει Διδιαμερισματικό Γραμμικό Μοντέλο με ΦΚ παραμέτρους CL, V_c , V_p και Q προς εκτίμηση. Οι εκτιμήσεις έγιναν με τη μέθοδο FOCE με INERACTION και POSTHOC εκτίμηση των

conditional estimates όπως δηλώθηκε στην παράγραφο \$ESTIMATION. Η ενδο-ατομική μεταβλητότητα εκφράστηκε εισάγοντας επιπλέον παραμέτρους ETA. Επιπλέον, στην παράγραφο \$OMEGA χρησιμοποιήθηκε η επιλογή Block (2) για να εκτιμηθεί η συνδιακύμανση μεταξύ της δι-ατομικής μεταβλητότητας της κάθαρσής και του όγκου κατανομής του κύριου διαμερίσματος. Τέλος δηλώθηκε το \$COVARIANCE ώστε να γίνεται η εκτίμηση των σφαλμάτων για τις αντίστοιχες παραμέτρους.

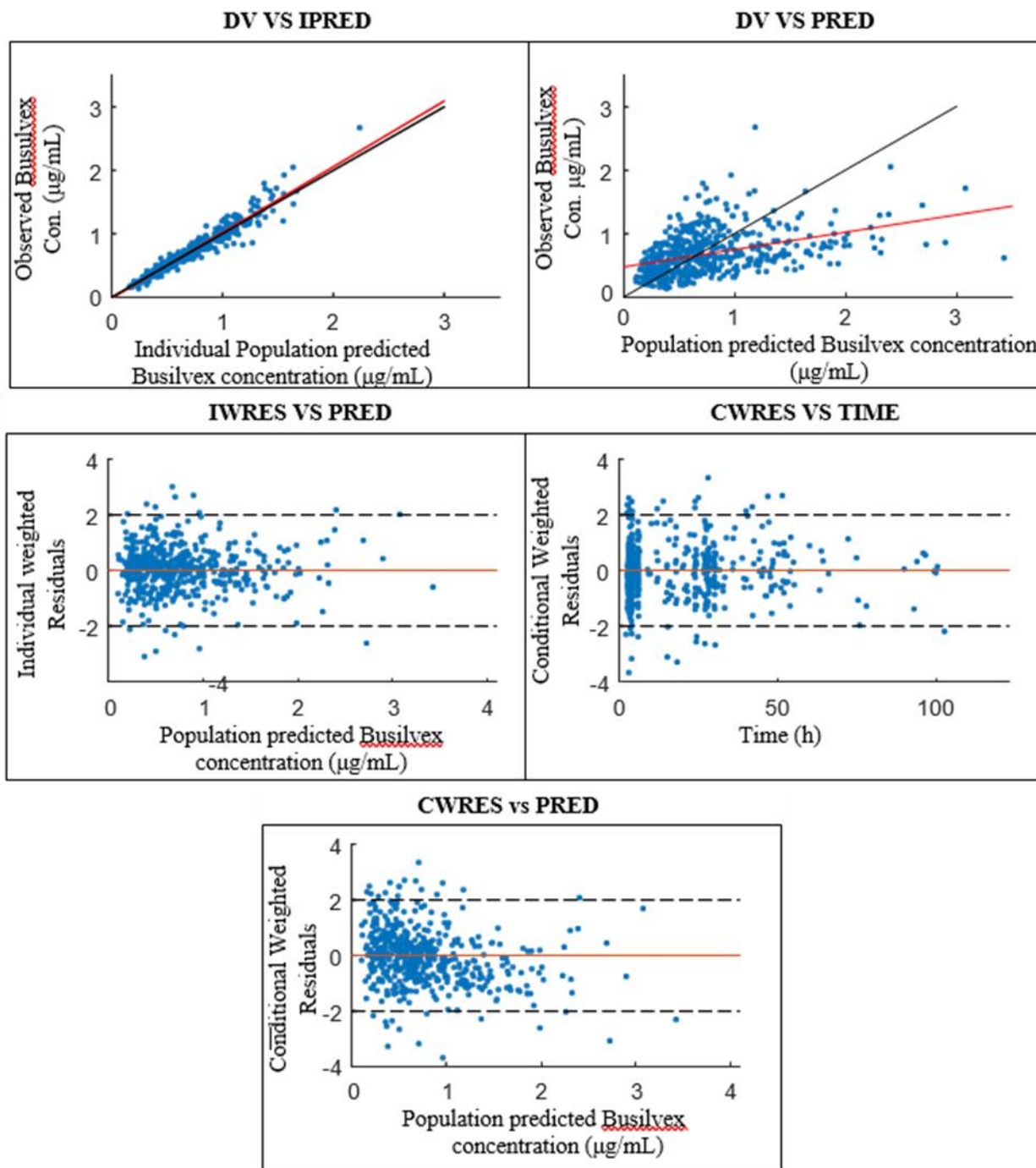
Το control file παρουσιάζεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων του βασικού ΦΚ μοντέλου και η εκτίμηση των παραμέτρων από το bootstrap (Πίνακας 5.4) και τα διαγράμματα καλής προσαρμογής Εικόνα 5.1.

Πίνακας 5.3: Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των OFV για ενδεικτικές δοκιμές.

	Πολλαπλασιαστικό Σφάλμα	Προσθετικό σφάλμα	Συνδυαστικό Σφάλμα	ΠV	IOV	TLAG	One-Comp OFV	Two-Comp OFV
1	✓	-	-	-	-	-	-910.589	-1320.235
2	-	✓	-	-	-	-	-817.789	-1205.732
3	-	-	✓	-	-	-	-999.020	-1401.095
4	-	-	✓	✓	-	-	-1202.981	-1483.305
5	-	-	✓	✓	✓	-	-1530.786	-1542.865
6	-	-	✓	✓	✓	✓	-1536.823	-1594.222

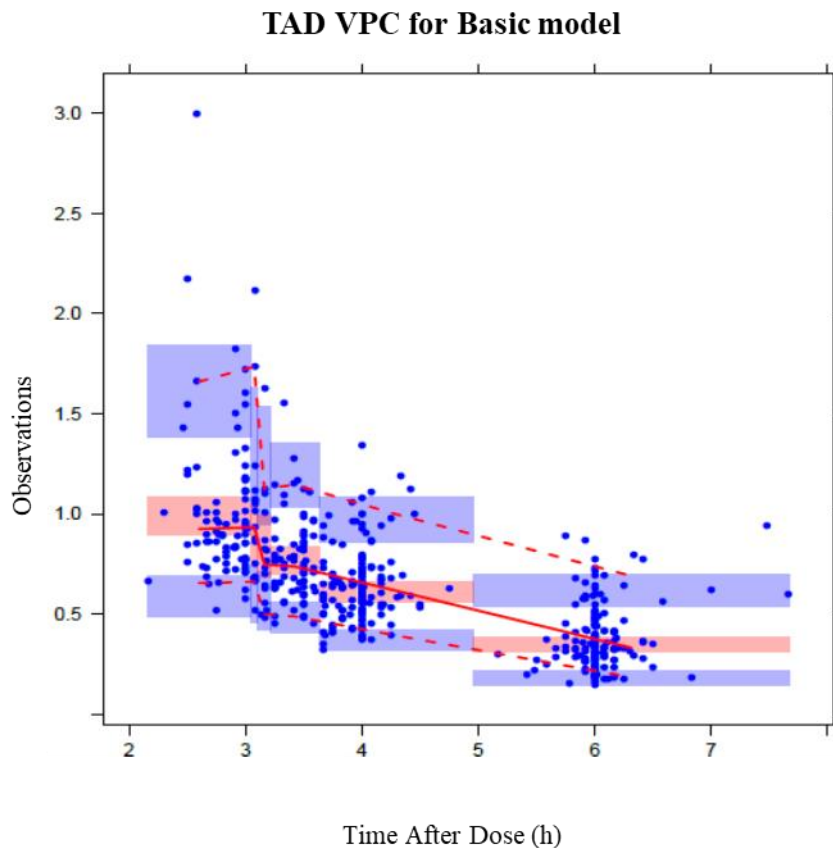
Πίνακας 5.4: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εκτιμήσεων του βασικού μοντέλου.

Παράμετρος	Εκτίμηση NONMEM			Εκτίμηση bootstrap			
	Εκτίμηση (θ)	SE	%RSE	Μέση τιμή	SD	CV%	CI (2.5%-97.5%)
CL (L/h)	4.99	0.348	6.97	4.94	0.365	7.38	4.35-5.69
V _c (L)	13.9	1.37	9.86	13.98	1.48	10.57	11.3-17.18
V _p (L)	3.69	0.466	12.63	3.88	0.71	18.24	2.95-5.88
Q (L/h)	1.55	0.130	8.39	1.51	0.16	10.56	1.19-1.80
Proportional (%)	11.4	0.00977	8.57	0.11	11.2	9.73	0.08-0.13
Additive (mg/L)	0.0229	0.011	48.03	0.03	0.01	35.52	0.01-0.04
CL ΠV (%)	60.0	0.0358	5.97	59.2	0.03	5.68	0.53-0.65
V _c ΠV (%)	67.0	0.0703	10.49	77.5	0.08	9.90	0.63-0.91
Correlation	0.94	0.0268	2.85	0.94	0.03	2.68	0.89-0.99
CL IOV (%)	11.0	0.0150	13.64	11.5	0.01	12.99	0.09-0.14
V _c IOV (%)	18.0	0.0648	36.00	17.9	0.06	32.77	0.07-0.29



Εικόνα 5.1: Διαγράμματα καλής προσαρμογής δομικού μοντέλου. Το DV VS IPRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulvex, observations, OBS) έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών τιμών (IPRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης. Το διάγραμμά DV VS PRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulvex, observations, OBS) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης. Μέση Δεξιά: Ατομικά σταθμισμένα υπόλοιπα (IWRES) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED) (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως). Εξαρτημένα σταθμισμένα υπόλοιπα (CWRES) έναντι του χρόνου (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως).

Εξαρτημένα σταθμισμένα υπόλοιπα (CWRES) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED) χρόνου (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως).



Εικόνα 5.2: Γράφημα VPC δομικού μοντέλου (TAD). Οι κόκκινες γραμμές αποτελούν τα 5, 50 και 95% ποσοστά πρόβλεψης (prediction interval). Οι σκιαγραφημένες επιφάνειες αποτελούν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τα ποσοστά πρόβλεψης (confidence interval, CI).

5.3.2. Ανάπτυξη μοντέλου συμμεταβλητών

Η ανάπτυξη και η ωρίμανση είναι δύο σημαντικές πτυχές των παιδιών που δεν είναι άμεσα εμφανείς στους ενήλικες. Η κάθαρση στον παιδιατρικό πληθυσμό πρέπει να διερευνηθεί χρησιμοποιώντας μοντέλα που περιγράφουν το μέγεθος, την ωρίμανση και τις επιδράσεις των οργάνων. Το BW είναι η κύρια συμμεταβλητή, η οποία υψωμένη στον εκθέτη $3/4$ έχει δειχθεί να ερμηνεύει καλύτερα τη μεταβολή της κάθαρσης από το

BSA και το BW υψωμένα σε οποιονδήποτε εκθέτη^[155]. Η αλλομετρική σχέση αυτή υποστηρίζεται και με θεωρητικά επιχειρήματα^[155].

Για την ανάπτυξη του τελικού μοντέλου, οι ατομικές εμπειρικές Μπαεσιανές εκτιμήσεις (EBE) του βασικού μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές για την ανάπτυξη του μοντέλου συμμεταβλητών. Το βάρος, το ύψος, η ηλικία, ο συνδυασμός ηλικίας και βάρους σώματος, η χρήση του βάρους αλλομετρικά, το BSA, το BSA σε συνδυασμό με το ύψος, και η κάθαρση της κρεατινίνης αξιολογήθηκαν ως συμμεταβλητές. Η αξιολόγηση έγινε με γραφική απεικόνιση των EBE με τις αντίστοιχες τιμές των συμμεταβλητών και την αξιολόγηση της OFV. Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι εξισώσεις για κάποιες δοκιμές και τα αντίστοιχα OFV.

Πίνακας 5.5: Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι διάφορες οι εξισώσεις για τις διάφορες δοκιμές.

Περίπτωση	Μοντέλο συμμεταβλητών	OFV
0	$CL = \theta_1 * e^{\eta_1}$ $V_c = \theta_2 * e^{\eta_2}$	-1591.275
1	$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_5} * e^{\eta_1}$	-1621.186
2	$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_5} * e^{\eta_1}$ $V_c = \theta_3 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_6} * e^{\eta_2}$	-1713.474
3	$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{0.75} * e^{\eta_1}$ $V_c = \theta_2 * \left(\frac{wt}{26}\right) * e^{\eta_2}$	-1713.470
4	$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{0.75} * \left(\frac{AGE^{\theta_5}}{\theta_6^{\theta_5} + AGE^{\theta_5}}\right) * e^{\eta_1}$ $V_c = \theta_2 * \left(\frac{wt}{26}\right) * e^{\eta_2}$	-1717.493
5	$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_5} * \left(\frac{CKPD}{176.48}\right)^{\theta_6} * e^{\eta_1}$ $V_c = \theta_2 * \left(\frac{wt}{26}\right) * e^{\eta_2}$	-1665.754

Αρχικά δοκιμάστηκε η συνάρτηση του κανονικοποιημένου βάρους, δηλαδή του βάρους διαιρεμένου με τη διάμεσο του πληθυσμού (median), υψωμένο σε μια δύναμη θ_2 , η οποία αποτελεί παράμετρο προς εκτίμηση.

$$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_5} * e^{\eta_1}$$

Εξίσωση 5.13

Η πτώση του OFV ήταν 29.911 μονάδες με επιθυμητή πτώση τουλάχιστον 3.841 για την προσθήκη μιας παραμέτρου και άρα ένα βαθμό ελευθερίας σε επίπεδο

σημαντικότητας $\alpha=0.005$. Επομένως, το βάρος θεωρήθηκε σημαντική συμμεταβλητή και διατηρήθηκε στη συνέχεια. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση του βάρους στον όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος με μείωση του OFV κατά 122.199 μονάδες από το βασικό μοντέλο. Η εξίσωση περιγράφεται παρακάτω:

$$V_c = \theta_2 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{\theta_6} * e^{\eta_2} \quad \text{Εξίσωση 5.14}$$

Λαμβάνοντας υπόψη τις εκτιμήσεις των θ παρατηρήθηκε ότι ο εκθέτης του βάρους στον όγκο κατανομής είναι ίσος με 1. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκε μοντέλο στο οποίο η επίδραση του βάρους στην κάθαρση εκφράστηκε αλλομετρικά, δηλαδή η τιμή του εκθέτη ήταν σταθερή και ίση με 0.75.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε και η επίδραση της ηλικίας στην κάθαρση και στον όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος. Η επίδραση της ηλικίας εκφράστηκε με την εξίσωση Hill η οποία περιγράφει τη σταδιακή μεταβολή της κάθαρσης από τη γέννηση μέχρι την πλήρη ωρίμανση που επιτυγχάνεται σε μεγαλύτερη ηλικία^[155]. Οι αντίστοιχες εξισώσεις παρουσιάζονται παρακάτω:

$$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{0.75} * \left(\frac{AGE^{\theta_5}}{\theta_6^{\theta_5} + AGE^{\theta_5}}\right) * e^{\eta_1} \quad \text{Εξίσωση 5.15}$$

Στην περίπτωση που το βάρος και η ηλικία χρησιμοποιήθηκαν στην εξίσωση της κάθαρσης (περίπτωση 3) παρατηρήθηκε πτώση της OFV κατά 4.023 μονάδες συγκριτικά με το μοντέλο που είχε το βάρος ως συμμεταβλητή στην κάθαρση και τον όγκο του κεντρικού διαμερίσματος η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική καθώς αφορά 2 επιπλέον παραμέτρους. Ωστόσο, συναρτησιακή σχέση μεταξύ κάθαρσης και ηλικίας επιλέχτηκε βάση της βιβλιογραφίας^[155], ώστε να περιγράφεται η ωρίμανση της κάθαρσης, με ένα μηχανιστικό τρόπο καθώς τα δεδομένα προέρχονται από παιδιατρικό πληθυσμό και δεδομένου ότι οι παράμετροι έχουν εκτιμηθεί με καλή ακρίβεια, η οποία επιβεβαιώνεται και από το bootstrap, και οι τιμές τους είναι λογικές ως προς τη φυσική τους σημασία. Η τιμή της OFV ήταν χαμηλότερη για το συγκεκριμένο μοντέλο συγκριτικά με το μοντέλο στο οποίο η κάθαρση και ο όγκος κατανομής συνδέονται μόνο με το βάρος με το εκθετικό μοντέλο, -1717.493 έναντι -1713.470. Επομένως, το τελικό μοντέλο που επιλέχτηκε καθώς βρέθηκε να περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα και βασίζεται στα ευρήματα της παραπάνω βιβλιογραφίας, περιγράφεται στις παρακάτω εξισώσεις^[155].

$$CL = \theta_1 * \left(\frac{wt}{26}\right)^{0.75} * \left(\frac{AGE^{\theta_5}}{\theta_6^{\theta_5} + AGE^{\theta_5}}\right) * e^{\eta_1} \quad \text{Εξίσωση 5.16}$$

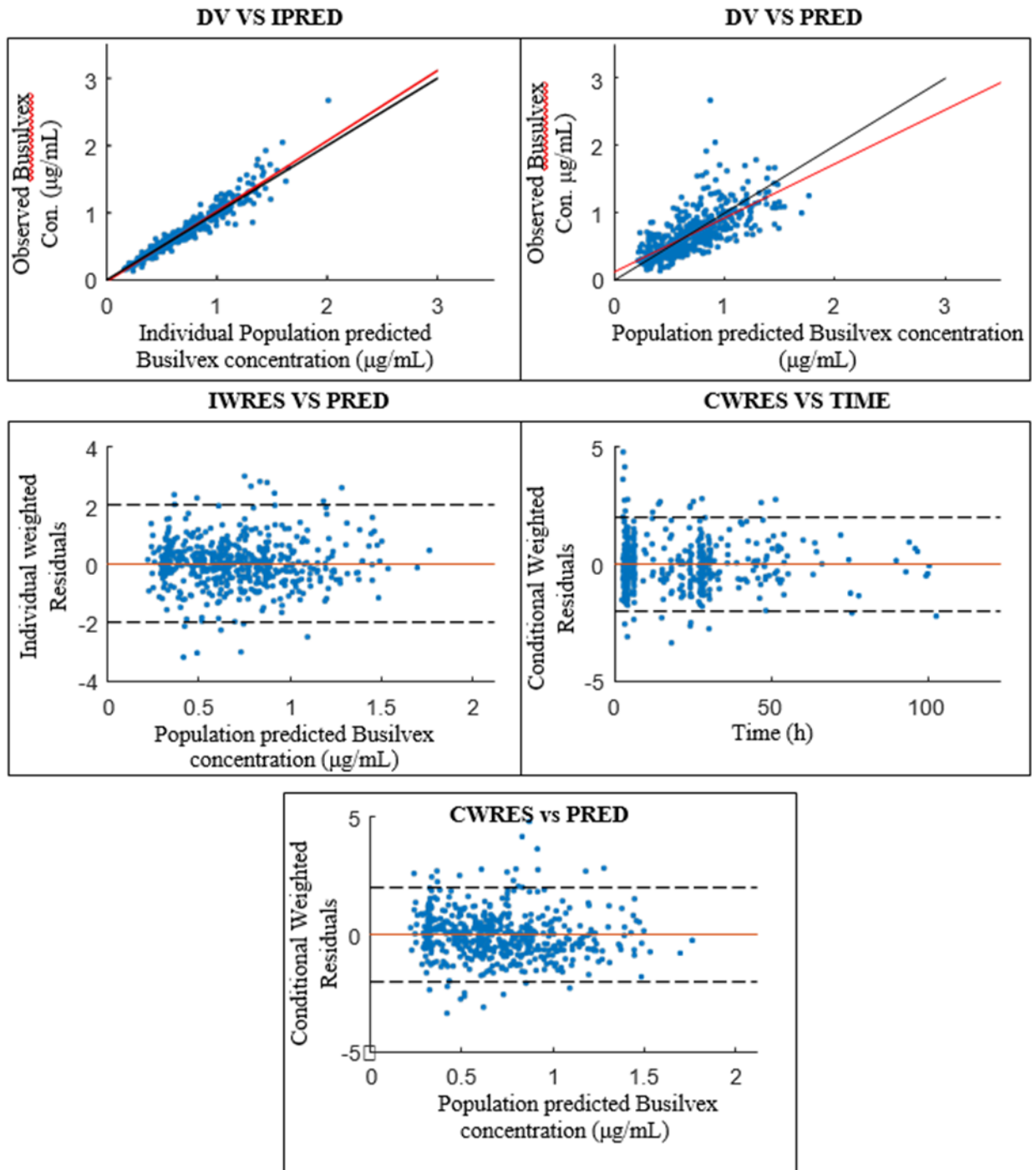
$$V_c = \theta_2 * \left(\frac{wt}{26}\right) * e^{\eta_2} \quad \text{Εξίσωση 5.17}$$

Στις εξισώσεις αυτές wt είναι το βάρος του ασθενούς, το AGE η ηλικία εκφρασμένη σε PMA (post-menstrual age) και το 26 αποτελεί τη διάμεσο του πληθυσμιακού βάρους. Το BSA και η κάθαρση κρεατινίνης δεν βρέθηκε να βελτιώνουν την προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Το control file παρουσιάζεται στο **Παράρτημα Ε** Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων. Το τελικό μοντέλο υποστηρίχτηκε από τα διαγράμματα καλής προσαρμογής (goodness of fit) του μοντέλου. Τα η-shrinkage για το τελικό μοντέλο που αφορούσαν την διατομική μεταβλητότητα της CL και του V_c ήταν 26.4% και 32.6% αντίστοιχα. Το ε-shrinkage ήταν 18.3% αντίστοιχα.

Πίνακας 5.6: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εκτιμήσεων του τελικού μοντέλου.

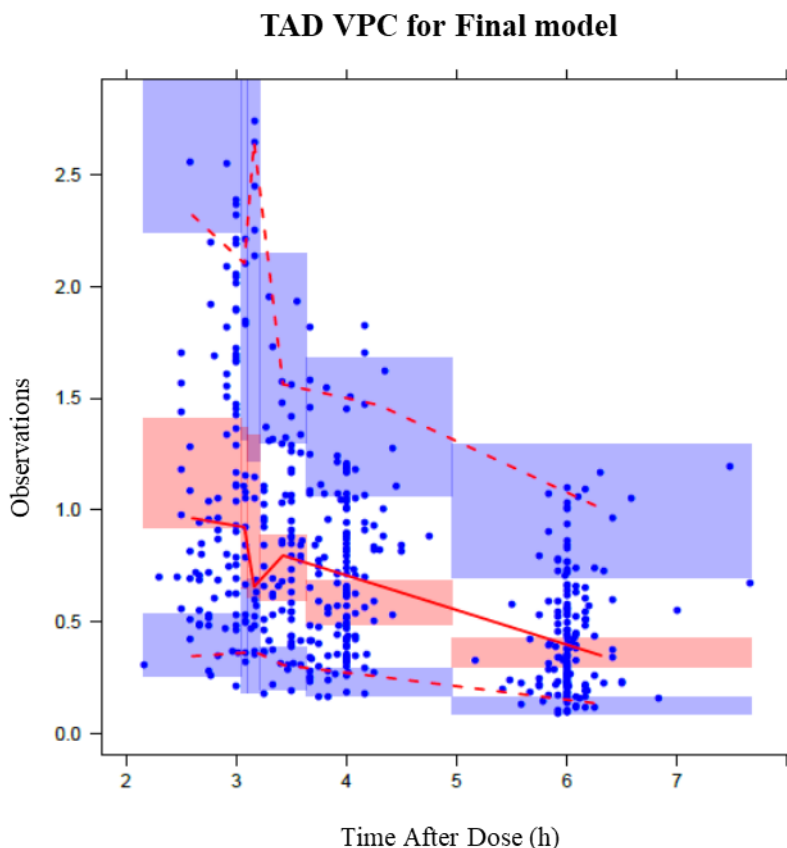
Παράμετρος	Εκτίμηση NONMEM			Εκτίμηση bootstrap			
	Εκτίμηση (θ)	SE	%RSE	Εκτίμηση (θ)	SD	CV%	CI (2.5%-97.5%)
CL (L/h)	5.1	0.199	3.90	5.1	0.192	3.77	4.94-5.44
V_c (L)	14.4	1.010	7.01	14.38	1.01	7.02	13.73-16.22
V_p (L)	3.77	0.522	13.85	3.91	0.66	16.91	3.48-5.72
Q (L/h)	1.49	0.197	13.22	1.48	0.196	13.23	1.35-1.83
CL age expon Θ_5	14.5	1.450	10.00	15.8	3.6	22.77	13.5-25.95
Θ_6 (PMA)	64.6	0.499	0.77	65.14	1.2	1.84	64.30-68.66
Proportional (%)	11.9	0.0291	24.45	11.95	0.046	38.74	0.11-0.13
Additive (mg/L) (0.0192	0.00815	42.45	0.021	0.07	33.79	0.016-0.033
CL IV (%)	26.4	0.014	5.30	26.55	0.03	10.04	0.244-0.314
V_c IV (%)	32.6	0.0697	21.38	33.4	0.0995	29.79	0.251-0.562
Correlation	0.769	0.0232	3.02	0.79	0.101	12.79	0.71-0.97
CL IOV (%)	11.2	0.00346	3.09	11.2	0.015	13.32	0.099-0.136
V_c IOV (%)	19.2	0.0289	15.05	17.54	0.057	32.78	0.133-0.280



Εικόνα 5.3: Διαγράμματα καλής προσαρμογής τελικού μοντέλου. Το DV VS IPRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulvex, observations, OBS) έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο ατομικών τιμών (IPRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης. Το διάγραμμα DV VS PRED είναι το διάγραμμα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων (συγκέντρωσης Buisulvex, observations, OBS) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED). Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία $y=x$ και η κόκκινη τη γραμμή τάσης.

Μέση Δεξιά: Ατομικά σταθμισμένα υπόλοιπα (IWRES) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED) (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως). Εξαρτημένα σταθμισμένα υπόλοιπα (CWRES) έναντι του χρόνου (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως).

Εξαρτημένα σταθμισμένα υπόλοιπα (CWRES) έναντι των πληθυσμιακών προβλέψεων (PRED) χρόνου (λεπτή γραμμή, γραμμή $y = 0$, Οι δύο διακεκομμένες μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις ευθείες $\psi = 2$ και $\psi = -2$, αντιστοίχως).



Εικόνα 5.4: Γράφημα VPC τελικού μοντέλου (TAD). Οι κόκκινες γραμμές αποτελούν τα 5, 50 και 95% ποσοστά πρόβλεψης (prediction interval). Οι σκιαγραφημένες επιφάνειες αποτελούν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τα ποσοστά πρόβλεψης (confidence interval, CI).

5.3.3. Εφαρμογή του πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου

Οι post hoc εκτιμήσεις των εξατομικευμένων ΦΚ παραμέτρων για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του AUC και στη συνέχεια για την εξατομίκευση της δόσης. Στη συνέχεια μελετήθηκε το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονταν εντός ΘΕ με τη μέθοδο των τραπεζίων και το ποσοστό των ασθενών με τη χρήση της πληθυσμιακής μοντελοποίησης (AUC_{Bayesian}).

Από τους 76 ασθενείς, 45 βρέθηκε ότι ήταν εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) υπολογίζοντας το AUC με τη μέθοδο των τραπεζίων χωρίς να ληφθεί υπόψη ο χρόνος υστέρησης(59.2%). Λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης, 32 ασθενείς βρέθηκε

ότι ήταν εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) (42.1%). Λαμβάνοντάς υπόψη τον υπολογισμό του $\text{AUC}_{\text{Baeyesian}}$ χρησιμοποιώντας την post hoc εκτίμηση της κάθαρσης για τον κάθε ασθενή, βρέθηκε ότι 34 από τους 76 ασθενείς ήταν εντός ΘΕ (44.7%). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ποσοστών.

Πίνακας 5.7: Ο αριθμός και το ποσοστό των ασθενών εντός ΘΕ ανά τρόπο υπολογισμού.

	$\text{AUC}_{\text{trapezoidal}}$	$\text{AUC}_{\text{trapezoidal lag time}}$	$\text{AUC}_{\text{Baeyesian}}$
% ασθενών εντός ΘΕ	59.2	42.1	44.7

Με βάση τα παραπάνω ποσοστά και δεδομένου ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε εμπεριέχει το χρόνο υστέρησης, παρατηρούμε ότι τα ποσοστά των ασθενών με την μέθοδο των τραπεζίων που έχει ληφθεί υπόψη ο χρόνος υστέρησης (42.1%) διαφέρει λίγο από αυτή της Μπαεσιανής μεθόδου (44.7%). Με τη Μπαεσιανή εξατομίκευση μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών είναι εντός ΘΕ (44.7%) μετά την πρώτη έγχυση, σε σχέση με αυτό των τραπεζίων που εμπεριέχει το lagtime και είναι 42.1%.

Έτσι, εφαρμόζοντας τα δειγματοληπτικά σχήματα που αναφέρεται στην **ενότητα 5.2.1** στα δεδομένα των ασθενών και εφαρμόζοντας την rosthoc εντολή ακολούθησε η εκτίμηση των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός, πάνω και κάτω από το ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$.

Πίνακας 5.8: Εκτίμηση του ποσοστού ασθενών εντός ΘΕ, πάνω και κάτω από το ΘΕ όταν εφαρμόζονται τα δειγματοληπτικά σχήματα του Πίνακας 5.1.

	Τραπέζια Λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης	Δειγματοληπτικό σχήμα 1	Δειγματοληπτικό σχήμα 2	Δειγματοληπτικό σχήμα 3	Δειγματοληπτικό σχήμα 4	Δειγματοληπτικό σχήμα 5
Εντός ΘΕ (900.0-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	42.1	44.7	50.0	46.1	63.2	72.4
Πάνω από το ΘΕ (900.0-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	7.9	9.2	21.1	6.6	19.7	22.4
Κάτω από το ΘΕ (900.0-1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	50.0	46.1	28.9	47.4	17.1	5.3
Εκτός ΘΕ	57.9	55.3	50.0	53.9	36.8	27.6

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, τα ποσοστά των ασθενών με τη μέθοδο των τραπεζίων που βρίσκονται εντός (42.1%), πάνω (7.9%) και κάτω (50.0%)

από το ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), δεν διαφέρουν σε σχέση με αυτά της Μπαεσιανής εκτίμησης όταν εφαρμόζεται το **δειγματοληπτικό σχήμα 1**, (44.7%), (9.2%) και (55.3%), αντίστοιχά.

Στη συνέχεια ακολουθήσε η σύγκριση του **δειγματοληπτικού σχήματος 1** με το **δειγματοληπτικό σχήμα 2** στο οποίο έχει αφαιρεθεί το ενδιάμεσο σημείο (2.5 - 3.5 h, μισή ώρα μετά το τέλος της έγχυσης). Η εκτίμηση, των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ (50.0%), πάνω (21.1%) και κάτω (28.9%) μετά την πρώτη χορήγηση φαίνεται να διαφέρουν σε σύγκριση με αυτό του **δειγματοληπτικού σχήματος 1**, και συγκεκριμένα φαίνεται να υπερεκτιμά το AUC.

Στη σύγκριση του **δειγματοληπτικού σχήματος 1** με το **δειγματοληπτικό σχήμα 3** στο οποίο έχει αφαιρεθεί η δειγματοληψία αμέσως μετά την έγχυση (2-3 h, στο τέλος της έγχυσης), η εκτίμηση, των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ (46.1%), πάνω (6.6%) και κάτω (47.7%) μετά την πρώτη χορήγηση φαίνεται να μην διαφέρουν σε σύγκριση με αυτό του **δειγματοληπτικού σχήματος 1** και η εκτίμηση της AUC πολύ κοντά σε αυτή της μεθόδου των τραπέζιων όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

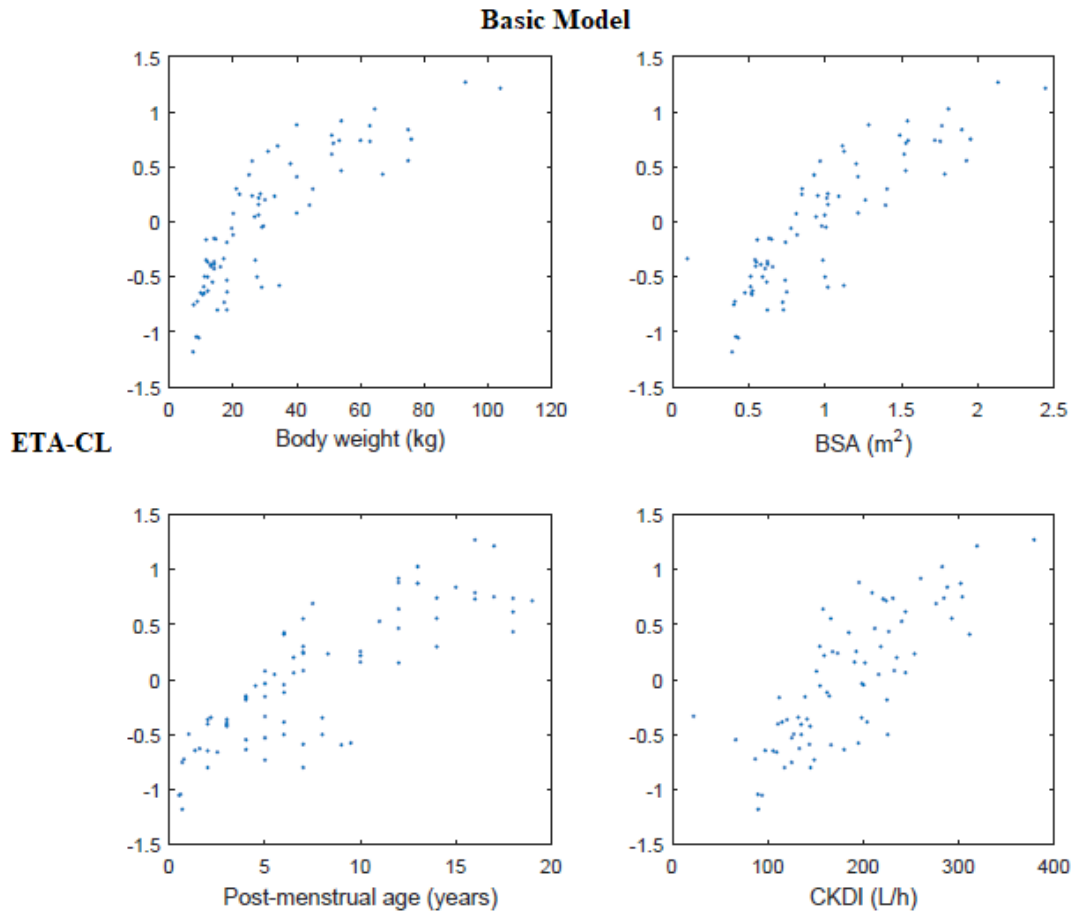
Στη σύγκριση που ακολούθησε μεταξύ του **δειγματοληπτικού σχήματος 1** με το **δειγματοληπτικό σχήμα 4** στο οποίο έχει αφαιρεθεί η δειγματοληψία αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης (2-3 h, στο τέλος της έγχυσης) και η δειγματοληψία στις 4 h, η εκτίμηση, των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ (63.2%), πάνω (19.7%) και κάτω (17.1%) μετά την πρώτη χορήγηση φαίνεται να διαφέρουν σε σύγκριση με αυτό του **δειγματοληπτικού σχήματος 1**, και συγκεκριμένα φαίνεται να υπερεκτιμά το AUC. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση όπου το δειγματοληπτικό σχήμα αποτελείται μόνο από το τελευταίο σημείο 6 h, όπου η εκτίμηση, των ποσοστών των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ (72.4%), πάνω (22.4%) και κάτω (5.3%) μετά την πρώτη χορήγηση φαίνεται να διαφέρουν σε σύγκριση με αυτό του **δειγματοληπτικού σχήματος 1**, και συγκεκριμένα φαίνεται να υπερεκτιμά αρκετά την AUC.

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι το μοντέλο θα μπορούσε να εκτιμήσει σωστά την AUC με την *posthoc* μέθοδο στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπέζιων όταν λαμβάνεται ο χρόνος υστέρησης και με αυτό δειγματοληπτικού σχήματος 1 μετά από *posthoc* εκτίμηση.

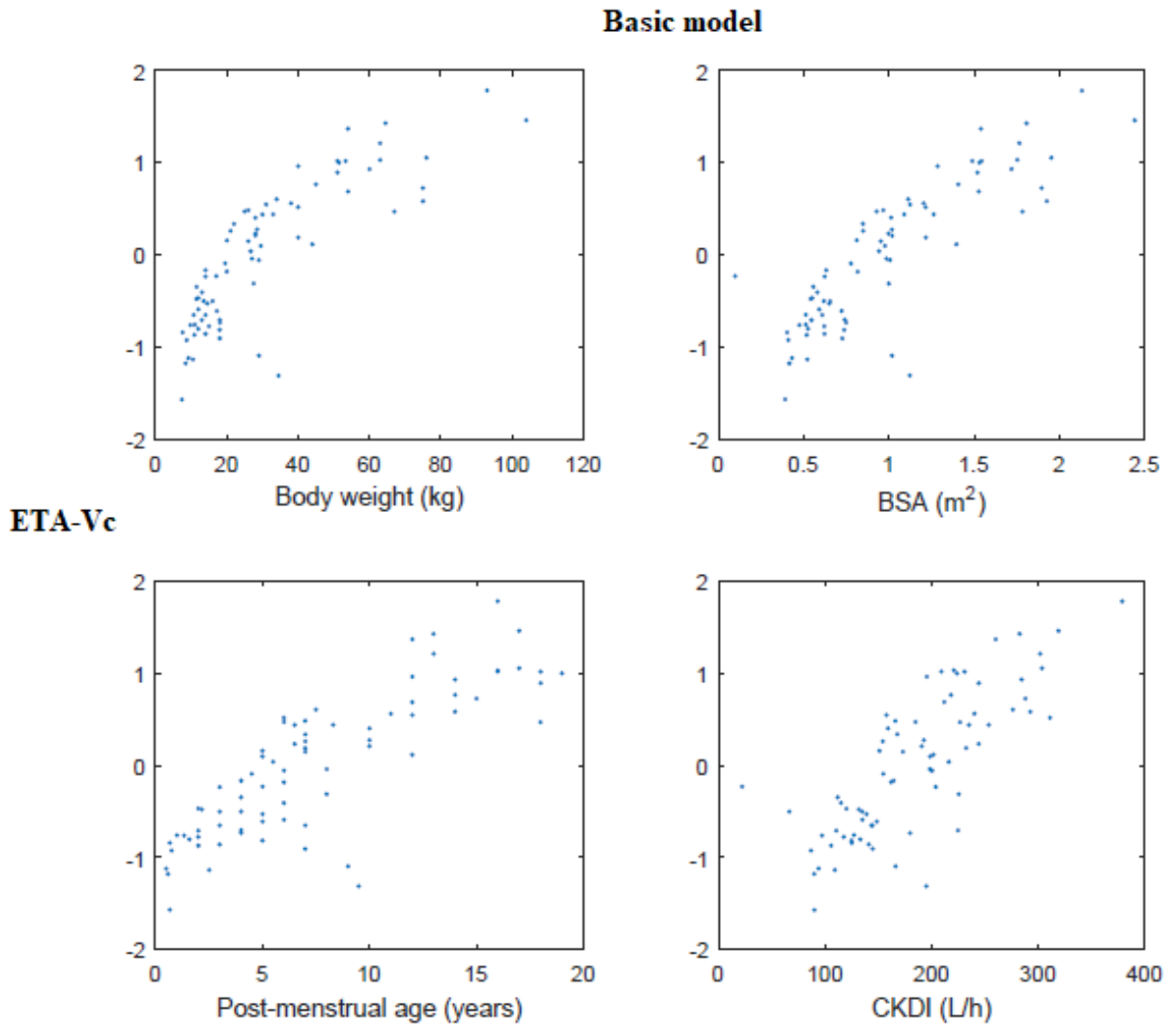
5.4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν φαρμακοκινητικά δεδομένα Busilvex από 76 παιδιατρικούς ασθενείς με σκοπό να προσδιοριστεί το πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο που προσαρμόζεται καλύτερα στα δεδομένα. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού NONMEM 7.3.

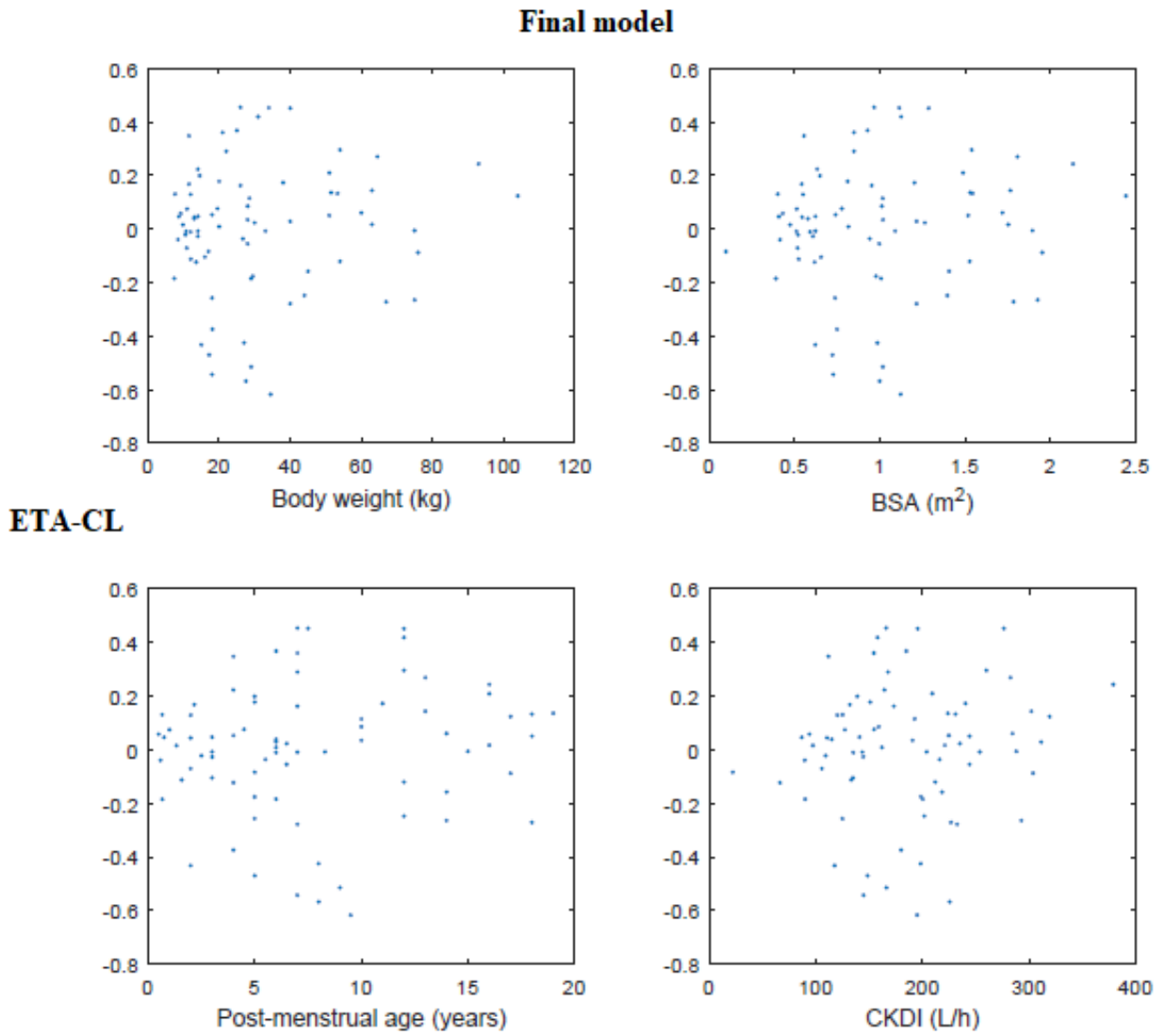
Το μοντέλο που περιέγραψε καλύτερα τα δεδομένα ήταν το διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωταξική κινητική απομάκρυνσης. Οι ΦΚ παράμετροι προς εκτίμηση ήταν η CL, V_c , V_p και Q. Η διατομική μεταβλητότητα εκτιμήθηκε για τις 2 πρώτες παραμέτρους, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης και του όγκου κατανομής στο κεντρικό διαμέρισμα. Το μοντέλο σφάλματος ήταν το συνδυαστικό. Σημαντική επίδραση στην καλή προσαρμογή των δεδομένων είχε ο συνδυασμός του βάρους και της ηλικίας ως συμμεταβλητές στη κάθαρση και το βάρος στον όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος. Επίσης τα διαγράμματα του η -CL και του η - V_c σε σχέση με το βάρος, την ηλικία το BSA, και την κάθαρση κρεατινίνης εκφρασμένη σε CKPD-EPI για το βασικό μοντέλο έδειξαν ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων παραμέτρων και συμμεταβλητών και όσο αυξάνονται οι τιμές των συμμεταβλητών τόσο αυξάνονται και τα αντίστοιχα η -CL και του η - V_c , όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.6**. Για το τελικό μοντέλο τα αντίστοιχα διαγράμματα, δείχνουν ότι η παραπάνω συσχέτιση έχει χαθεί, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5.8**.



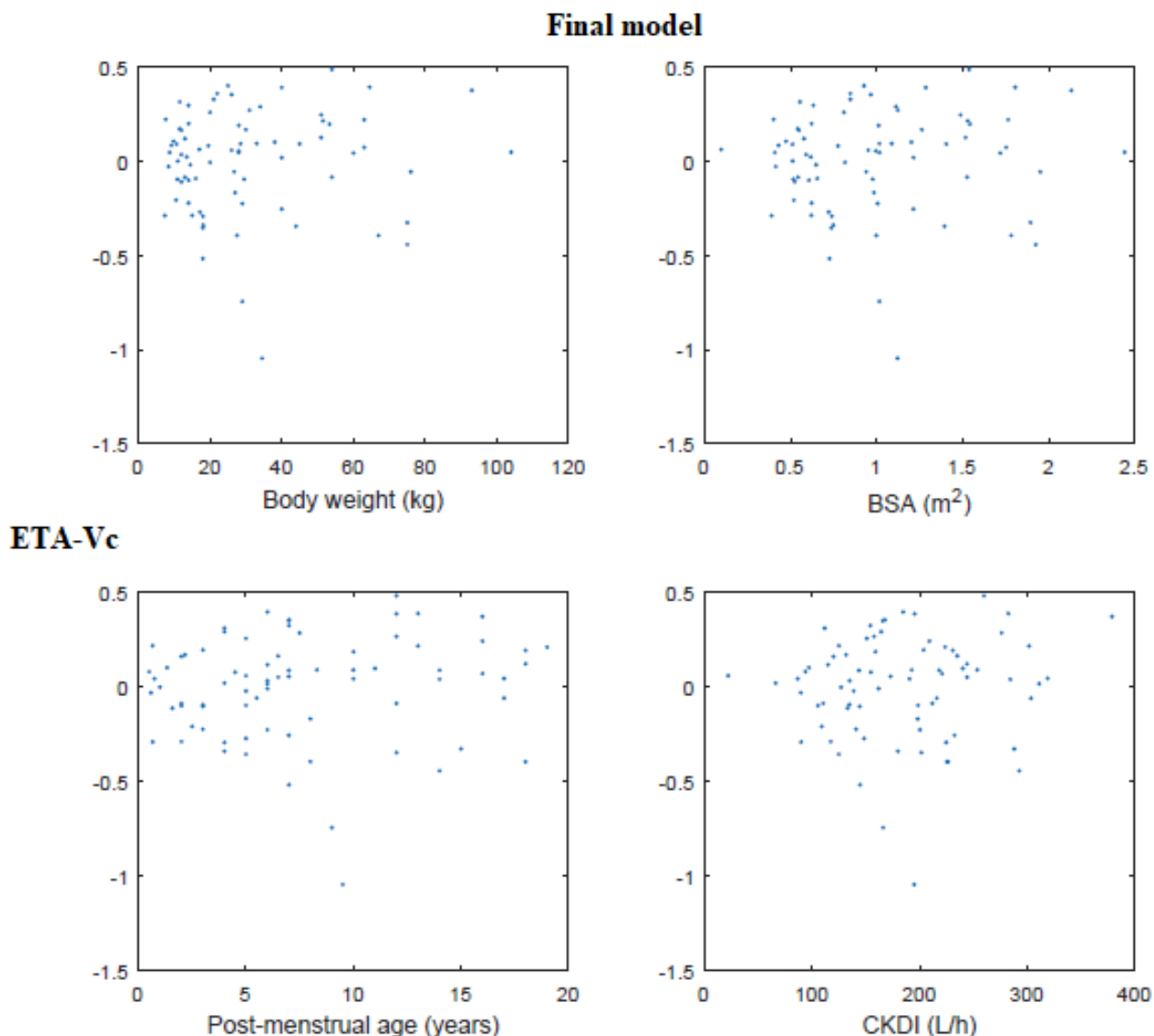
Εικόνα 5.5: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για την κάθαρση συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης και των συμμεταβλητών.



Εικόνα 5.6: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για τον όγκο του κεντρικού διαμερίσματος συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του όγκου του κεντρικού διαμερίσματος και των συμμεταβλητών.



Εικόνα 5.7: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για την κάθαρση συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι η κάθαρση μεταβάλλεται ανεξάρτητα των συμμεταβλητών.



Εικόνα 5.8: Τυχαίες επιδράσεις διατομικής μεταβλητότητας για τον όγκο του κεντρικού διαμερίσματος συναρτήσει α) του σωματικού βάρους, β) της επιφάνειας σώματος, γ) της ηλικίας, δ) της κάθαρσης κρεατινίνης. Παρατηρείται ότι ο όγκος του κεντρικού διαμερίσματος μεταβάλλεται ανεξάρτητα των συμμεταβλητών.

Το μοντέλο αξιολογήθηκε ως προς την προσαρμογή του στα δεδομένα (διαγράμματα καλής προσαρμογής), της σταθερότητας του (bootstrap) και τις προβλεπτικές του δυνατότητες (VPC plot) και θεωρήθηκε κατάλληλο για την περιγραφή της ΦΚ του Busilvex στους παιδιατρικούς ασθενείς.

Το διδιαμερισματικό μοντέλο βρέθηκε να εκφράζει καλύτερα τα δεδομένα μας και έρχεται σε συμφωνία με την πρόσφατη αναδρομική μελέτη σε 790 παιδιατρικούς ασθενείς με διάμεση ηλικία 4.5 χρόνια και διάμεσο βάρος 15.3kg που πραγματοποιήθηκε από τους Baterlik et al. [64]. Στην μελέτη των Nava et al. [156] που

πραγματοποιήθηκε σε 112 παιδιατρικούς ασθενείς με δειγματοληπτικό σχήμα πριν τη χορήγηση, 120, 135, 150, 180, 240, 300 και 360 min, με διάμεση ηλικία 5.4 (εύρος 0.1-20 έτη) και διάμεσο βάρος 70 kg βρέθηκε ότι τα δεδομένα συγκεντρώσεις χρόνου εκφράζονται καλύτερα με το αλλομετρικό διδιαμερισματικό μοντέλο. Επιπλέον στην πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση των Kawazoe et al. ^[157] σε 54 παιδιατρικούς ασθενείς με διάμεση με δειγματοληψία πριν τη έναρξη της χορήγησης, 0.25, 0.5, 0.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 4, 5, και 6 hours, ηλικία 7.2 έτη (0.3-17.7 έτη) και βάρος 8 – 67.3 kg το διδιαμερισματικό μοντέλο και συγκριμένα η αλλομετρική ωρίμαση της κάθαρσής εκφράζει καλύτερα τα δεδομένα. Επιπλέον, στη μελέτη των Janel Long-Boyle et al. (2015)^[132], σε σύνολο 79 ασθενών με δειγματοληπτικό σχήμα πριν την χορήγηση, 2 4 και 6 h, με διάμεσο βάρος 22 kg (εύρος 3-101kg), διάμεση ηλικία 7 (0.1- 22 έτη) βρέθηκε ότι το μονοδιαμερισματικό αλλομετρικό μοντέλο εκφράζει καλύτερα τα δεδομένα.

Συμφωνά με τα παραπάνω παρατηρούμε ότι, όταν το δειγματοληπτικό σχήμα αποτελείται από τα σημεία που ορίζονται στο SPC τα δεδομένα εκφράζονται καλύτερά από το μονοδιαμερισματικό μοντέλο, σε αντίθεση όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα σημεία από αυτά που ορίζονται στο SPC τα δεδομένα εκφράζονται καλύτερα από το διδιαμερισματικό μοντέλο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πυκνές δειγματοληψίες παρέχουν περισσότερη πληροφορία σχετικά με την κινητική του φαρμάκου.

Επιπλέον, παρατηρούμε ότι με την εφαρμογή της Μπαεσιανής εξατομίκευσης το μοντέλο μπορεί να εκτιμήσει με ακρίβεια τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός 44.7%, πάνω 9.2% και κάτω 46.1% από το ΘΕ και δεν διαφέρουν από αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης που υπολογίζονται 42.1% εντός ΘΕ, 7.9% πάνω από το ΘΕ και 50.0% κάτω από το ΘΕ.

Τέλος από τη διερεύνηση του καλύτερου δειγματοληπτικού σχήματος προέκυψε ότι το μοντέλο θα μπορούσε να εκτιμήσει σωστά την AUC με την *posthoc* μέθοδο στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης.

Κεφάλαιο 6 – Συνολική συζήτηση- Συμπεράσματα

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η παρακολούθηση των επιπέδων του BU (TDM, Therapeutic Drug Monitoring) με στόχο την φαρμακοκινητική εξατομίκευση της δοσολογίας του φαρμάκου είναι μια κλινική πρακτική που χρησιμοποιείται τόσο στην Ευρώπη όσο και στις ΗΠΑ με στόχο τη βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος, τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης VOD και την ανάπτυξη πιο ασφαλών στόχων βέλτιστης έκθεσης στο φάρμακο, σε διάφορες αιματολογικές κακοήθειες, με διαφορετικά μυελοαφανιστικά σχήματα, διαφορετικές μεθοδολογίες HSCT και διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες ασθενών^[122-125]. Η εφαρμογή TDM για BU σε παιδιατρικούς ασθενείς περιγράφεται στο SPC του φαρμάκου και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον προσδιορισμό της βέλτιστης δόσης που πρέπει να χορηγηθεί σε κάθε ασθενή,^[48,125,126] δεδομένου ότι συγκρινόμενοι με τους ενήλικες, εμφανίζουν μεγαλύτερη δια-ατομική φαρμακοκινητική μεταβλητότητα και διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας και μειωμένης αποτελεσματικότητας.

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή σε πραγματικό χρόνο μιας αξιόπιστης και επαναλήψιμης μεθοδολογίας εξατομίκευσης της δοσολογίας της βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε αλλογενή HSCT.

Στο πλαίσιο αυτό αρχικά αναπτύχθηκε/βελτιστοποιήθηκε βιοαναλυτική μέθοδος προσδιορισμού της βουσουλφάνης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως βάση η μέθοδος HPLC-UV, που αναφέρεται από τον Haggie et al^[1140] και προσαρμόστηκε κατάλληλα ώστε να αποτελεί γρήγορη και πλήρως εφαρμόσιμη μέθοδο στο TDM σε παιδιατρικό πληθυσμό που απαιτεί ποσοτικοποίηση σε μικρούς όγκος πλάσματος με χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης, η οποία παράλληλα να χαρακτηρίζεται από υψηλή πιστότητα και ακρίβεια. Η νέα μέθοδος που αναπτύχθηκε επικυρώθηκε πλήρως σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες που έχουν εκδώσει ο FDA και ο EMA σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων^[116,117]. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν χαρακτηριστικά ποιότητας όπως η εκλεκτικότητα/ειδικότητα, η ανιχνευσιμότητα (η οποία περιλαμβάνει το όριο ανίχνευσης και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης), η καμπύλη βαθμονόμησης-γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα, η ανάκτηση, η σταθερότητα και η ανθεκτικότητα. Η μέθοδος αποδείχθηκε:

- Πλήρως εκλεκτική και ακριβής με τις τιμές τις εντός- και μεταξύ- εργαστηριακών ημερών ακρίβειας και πιστότητας να μην ξεπερνούν το 6.3%.

- Ταχεία, επαναλήψιμη, με όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων της βουσουλφάνης στο αίμα και σχετικά μικρό κόστος.
- Μετά την επικύρωσή της, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση και την ποσοτικοποίηση δειγμάτων πλάσματος σε παιδιατρικούς ασθενείς, που είχαν λάβει i.v. Bu και εφαρμόστηκε TDM και όλες οι μετρούμενες συγκεντρώσεις, για όλους τους ασθενείς βρίσκονταν εντός του εύρους της καμπύλης.

Στη συνέχεια, για την επίτευξη του πρωταρχικού στόχου της μελέτης ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός του χρόνου υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος και επίτευξης σταθερών επιπέδων έγχυσης, που προκαλείται από τη χρήση αντλίας σύριγγας για τη χορήγηση της δόσης "μικροέγχυσης" BU στους παιδιατρικούς ασθενείς (δόση από 0.8 -1.2 mg/kg ανάλογα με το σωματικό βάρος). Ο χρόνος υστέρησης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό της AUC και της εξατομικευμένης δόσης στη διαδικασία εφαρμογής TDM. Για την μελέτη του χρόνου υστέρησης προσομοιώθηκαν εγχύσεις Busilvex® με αντλία σύριγγας για κάθε κατηγορία βάρους ασθενούς (**Κεφάλαιο 3, Πίνακας 3.5**), καθώς και εγχύσεις όπου το φάρμακο ήταν τοποθετημένο σε ασκό όπως γίνεται στις περιπτώσεις έγχυσης διαλύματος φαρμάκου όγκου μεγαλύτερου από 50 mL.

Με βάση τα αποτελέσματα των in vitro προσομοιώσεων των εγχύσεων που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του χρόνου υστέρησης, είναι εμφανές ότι:

- Όσο αυξάνει το βάρος σώματος του ασθενούς ο παρατηρούμενος χρόνος υστέρησης στην εμφάνιση της βουσουλφάνης στη γενική κυκλοφορία του αίματος μειώνεται σημαντικά από 40 min (κατηγορία βάρους σώματος 1 και 2 SPC, ΒΣ <9kg – 16kg) στα 5 min (κατηγορία βάρους σώματος 5 SPC, έγχυση με ασκό ΒΣ>34kg)
- Συνεπώς αναμένεται να έχει μειωμένη επίδραση στις μετρούμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, στον υπολογισμό της AUC και τελικά στον υπολογισμό της εξατομικευμένης δόσης για τον ασθενή. Η μεγαλύτερη επίδραση αναμένεται να παρατηρηθεί στους ασθενείς με βάρος σώματος <9 kg έως 16 kg (κατηγορίες 1 και 2 SPC).

Η παρακολούθηση των επιπέδων της βουσουλφάνης στο αίμα και η εξατομίκευση της δοσολογίας σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε σε 76 παιδιατρικούς ασθενείς της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» (Ιούλιος 2014 - Ιανουάριος 2017) στους οποίους χορηγήθηκε Busilvex® ως μυελοαφανιστικός παράγοντας, σε συνδυασμό με κατάλληλο χημικοθεραπευτικό σχήμα ανά νόσημα. Πριν από την έναρξη της μελέτης και με στόχο τον έλεγχο της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της διαδικασίας και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας λάθους κατά την εφαρμογή της εξατομίκευσης της δόσης BU, αναπτύχθηκε γραπτή οδηγία (SOP, Standard Operating Procedure, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ) συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων αίματος από κάθε ασθενή στο νοσοκομειακό περιβάλλον μέχρι την παράδοση στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ, για την ανάλυση των δειγμάτων και τον υπολογισμό της εξατομικευμένης δόσης.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της βουσουλφάνης (BU) στο αίμα των ασθενών έγινε με την βιοαναλυτική μέθοδο που αναπτύχθηκε/βελτιστοποιήθηκε στο πλαίσιο της μελέτης ενώ η διαδικασία εξατομίκευσης της δοσολογίας έγινε αρχικά χωρίς και στη συνέχεια λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο υστέρησης έγχυσης, για λόγους σύγκρισης.

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 7.6 έτη (εύρος 0.5-19 έτη), 47 έπασχαν από αιματολογικές κακοήθειες, 16 από μη αιματολογικές κακοήθειες (συμπαγείς όγκοι) και 13 από γενετικό νόσημα και όλοι υποβλήθηκαν σε MMO (60 αλλογενή, 16 αυτόλογη) μετά από τη χορήγηση του busulfan σε συνδυασμό με κατάλληλο χημειοθεραπευτικό σχήμα ύφεσης της νόσου. Σε όλες τις περιπτώσεις οι μετρούμενες συγκεντρώσεις του busulfan χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της παραμέτρου AUC και τη σύγκριση με το επίσημα αποδεκτό θεραπευτικό εύρος ($900.0 < AUC < 1350.0 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) με στόχο την εξατομίκευση της δοσολογίας σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στο SPC του προϊόντος. Στις περιπτώσεις που η τιμή της AUC ήταν εκτός ΘΕ έγινε τροποποίηση της δόσης του busulfan και ακολούθησε επαναπροσδιορισμός επιπέδων μετά από τη χορήγηση της νέας δόσης. Υπολογίστηκαν τα ποσοστά των ασθενών εντός και εκτός ΘΕ πριν και μετά την εφαρμογή της εξατομίκευσης της δόσης ενώ έγινε επίσης σύγκριση των αντίστοιχων ποσοστών όταν για τον υπολογισμό της AUC λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος λόγω της χρήσης αντλίας έγχυσης κατά τη χορήγηση.

- Πριν την εξατομίκευση της δόσης, στη περίπτωση που δεν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης, 45 ασθενείς (59.2%) βρίσκονται εντός ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, 6 ασθενείς (7.9%) βρίσκονται πάνω από το ΘΕ και 25 ασθενείς (32.9%) βρίσκονται κάτω από το ΘΕ.
- Όταν λαμβάνετε υπόψη ο lag time τότε 32 ασθενείς (42.1%) βρίσκονται εντός ΘΕ, 6 ασθενείς (7.9%) βρίσκονται πάνω από το ΘΕ και 38 ασθενείς (50.0%) βρίσκονται κάτω από αυτό.
- Συνολικά έγινε τροποποίηση της δόσης σε 28 ασθενείς (3 ασθενείς διέκοψαν τη θεραπεία).
- Μετά τον επαναπροσδιορισμό των επιπέδων του BU στο αίμα παρατηρείται ότι 8 ασθενείς βρίσκονται πάνω από το ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ όταν δεν λαμβάνεται υπόψη ο lag time (10.96% στο σύνολο των 73 ασθενών που ολοκλήρωσαν τη θεραπεία, 28.6% στο σύνολο των 28 ασθενών που έγινε τροποποίηση δόσης),
- Μετά την εξατομίκευση της δόσης όταν οι τιμές AUC υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη το lag-time ένα ποσοστό ασθενών ίσο με 4.1% παραμένει κάτω από το ΘΕ ενώ με τη συμβατική μέθοδο υπολογισμού χωρίς το lag-time όλοι οι ασθενείς βρίσκονται εντός ΘΕ. Αυτή η παρατήρηση είναι κλινικά σημαντική δεδομένου ότι υποθεραπευτικά επίπεδα BU είναι συνδεδεμένα με απόρριψη μοσχεύματος^[61-64].
- Επιπλέον, τέσσερις ασθενείς βρίσκονται πάνω από το ΘΕ 900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ (6.9% στο σύνολο των 73 ασθενών που ολοκλήρωσαν τη θεραπεία, 14.3% στο σύνολο των 28 ασθενών που έγινε τροποποίηση δόσης).
- Σε κάθε περίπτωση μετά την εξατομίκευση της δόσης όλοι οι ασθενείς βρίσκονται κάτω από το ανώτερο τοξικό επίπεδο των 1500.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ με βάση το διευρυμένο ΘΕ 900.0-1500.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (με ή χωρίς τη συνεισφορά του lagtime).
- Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι με βάση τη βιβλιογραφία οι υψηλές τιμές AUC (>1500 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) συνδέονται με μεγαλύτερη θνησιμότητα (σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση) καθώς και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης GvHD και VOD^[55,64,127-129].
- Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίστοιχα με προηγούμενα στη βιβλιογραφία^[132-135] και καταδεικνύουν την αναγκαιότητα της εξατομίκευσης της δοσολογίας του BU σε παιδιατρικούς ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε ΜΜΟ.

- Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της παρακολούθησης των επιπέδων για την εξατομίκευση της δόσης του BU σε παιδιατρικούς ασθενείς στην Ελλάδα.
- Με βάση τη μέχρι τώρα γνώση από τη βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται η χρήση του χρόνου υστέρησης άφιξης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος (lag-time) για τον υπολογισμό της AUC στο πλαίσιο της διαδικασίας εξατομίκευσης της δόσης του BU σε παιδιατρικούς ασθενείς, όταν χρησιμοποιούνται αντλίες σύριγγας κατά την χορήγηση.
- Η σημασία του χρόνου υστέρησης έγχυσης κατά τη ενδοφλέβια έγχυση φαρμάκων σε παιδιατρικούς ασθενείς, έχει συζητηθεί στη βιβλιογραφία και έχουν γίνει προσπάθειες *in silico* και *in vitro* προσομοιώσεων ώστε να μπορέσει να μειωθεί η επίδρασή του στην άφιξη του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος^[135-144].

Τελικός στόχος της μελέτης ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση ενός πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου για το BU σε παιδιατρικούς ασθενείς που να λαμβάνει υπόψη τον χρόνο υστέρησης έγχυσης και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξατομίκευση της δοσολογίας του φαρμάκου, Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα συγκέντρωσης – χρόνου, λαμβάνοντάς υπόψη το χρόνο υστέρησης, και η ανάπτυξη του πληθυσμιακού ΦΚ μοντέλου έγινε με τη χρήση των μοντέλων μεικτών επιδράσεων (NONMEM). Το μοντέλο που περιέγραψε καλύτερα τα δεδομένα ήταν το διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωταξική κινητική απομάκρυνσης. Οι ΦΚ παράμετροι προς εκτίμηση ήταν η CL, Vc, Vr και Q. Η διατομική μεταβλητότητα εκτιμήθηκε για τις 2 πρώτες παραμέτρους, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κάθαρσης (CL) και του όγκου κατανομής στο κεντρικό διαμέρισμα (Vc). Το μοντέλο σφάλματος ήταν το συνδυαστικό. Σημαντική επίδραση στην καλή προσαρμογή των δεδομένων είχε ο συνδυασμός του βάρους και της ηλικίας ως συμμεταβλητές στη κάθαρση CL και το βάρος στον όγκο κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος Vc. Το μοντέλο αξιολογήθηκε ως προς την προσαρμογή του στα δεδομένα (διαγράμματα καλής προσαρμογής), της σταθερότητας του (bootstrap) και τις προβλεπτικές του δυνατότητες (VPC plot) και θεωρήθηκε κατάλληλο για την περιγραφή της ΦΚ του Busilvex BU στους παιδιατρικούς ασθενείς.

Οι post hoc εκτιμήσεις των εξατομικευμένων ΦΚ παραμέτρων για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του της παραμέτρου AUC και στη συνέχεια για την εξατομίκευση της δόσης. Στη συνέχεια μελετήθηκε συγκρίθηκε το ποσοστό των ασθενών που βρίσκονταν εντός ΘΕ όταν η AUC υπολογίζεται με τη μέθοδο των τραπεζίων ($AUC_{\text{trapezoidal-lagtime}}$) και το ποσοστό των ασθενών με τη χρήση της πληθυσμιακής μοντελοποίησης ($AUC_{\text{Baeyesian}}$). Τα ποσοστά των ασθενών εντός ΘΕ όπως υπολογίζεται με την μέθοδο των τραπεζίων που έχει ληφθεί υπόψη ο χρόνος υστέρησης διαφέρει λίγο από αυτή της Μπαεσιανής μεθόδου, και πιο συγκεκριμένα, με τη Μπαεσιανή εξατομίκευση μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών είναι εντός ΘΕ (44.7%) μετά την πρώτη έγχυση, σε σχέση με αυτό των τραπεζίων που εμπεριέχει το lagtime και είναι 42.1%.

Στη συνέχεια, και για την διερεύνηση του καλύτερου δειγματοληπτικού σχήματος (λιγότερα σημεία δειγματοληψίας), ακολούθησε η σύγκριση του ποσοστού των ασθενών που είναι εντός ΘΕ (900.0-1350.0 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) με βάση την Μπαεσιανή εξατομίκευση λαμβάνοντας υπόψη το δειγματοληπτικό σχήμα της μελέτης, σε σχέση με μικρότερα δειγματοληπτικά σχήματα όπου έχει αφαιρεθεί 1, 2 και 3 δείγματα από το αρχικό δειγματοληπτικό σχήμα. Από τη σύγκριση προέκυψε ότι το πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να εκτιμήσει σωστά την AUC με την posthoc μέθοδο στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘΕ δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται ο χρόνος υστέρησης και με αυτό δειγματοληπτικού σχήματος 1 μετά από posthoc εκτίμηση.

Συμπερασματικά από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι:

- Η βιο-αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι πλήρως εκλεκτική και ακριβής με τις τιμές τις εντός- και μεταξύ- εργαστηριακών ημερών ακρίβειας και πιστότητας να μην ξεπερνούν το 6.3%. Ταχεία, επαναλήψιμη, με όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων της βουσουλφάνης στο αίμα και σχετικά μικρό κόστος.
- Κατά την εφαρμογή θεραπευτικής παρακολούθησης και εξατομίκευσης της δοσολογίας της BU σε παιδιατρικούς ασθενείς όταν λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος υστέρησης έγχυσης οι υπολογιζόμενες τιμές AUC είναι μικρότερες σε σύγκριση με αυτές που υπολογίζονται χωρίς το χρόνο υστέρησης, και η χρήση του AUC_{lag} είναι πιο ευαίσθητη στον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε υποθεραπευτικά

επίπεδα ($AUC < 900 \mu M \cdot \min$) ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά ο αριθμός των ασθενών που βρίσκονται πάνω από ΘE ($AUC > 1350 \mu M \cdot \min$).

- Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η διόρθωση της δόσης με βάση το περιορισμένο ΘE ($900 < AUC < 1350 \mu M \cdot \min$) ώστε όλοι οι ασθενείς να βρίσκονται σε επίπεδα κατώτερα του μέγιστου επιτρεπόμενου τοξικού ορίου ($AUC < 1500 \mu M \cdot \min$) ανεξάρτητα από τον τρόπο υπολογισμού της AUC (AUC_{lag} ή AUC_{nolag}).
- Το πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο που αναπτύχθηκε εκτιμά σωστά τα ποσοστά των ασθενών εντός, πάνω και κάτω από το ΘE 900-1350 $\mu M \cdot \min$ σε σύγκριση με την προτεινόμενη στο SPC μέθοδο των τραπεζίων.
- Επιπλέον ο πληθυσμιακό ΦΚ μοντέλο με την posthoc μέθοδο μπορεί να εκτιμήσει σωστά την AUC στην περίπτωση που έχει αφαιρεθεί το σημείο αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης καθώς τα ποσοστά των ασθενών που βρίσκονται εντός ΘE δεν διαφέρουν συγκριτικά με αυτά της μεθόδου των τραπεζίων όταν λαμβάνεται ο χρόνος υστέρησης και με αυτό του αρχικού δειγματοληπτικού σχήματος μετά από posthoc εκτίμηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Birkett DJ. Pharmacokinetics made easy: therapeutic drug monitoring. *Aust Prescr* 1997;20:9-11
2. Touw DJ, Neef C, Thomson AH, Vinks AA. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: a systemic review. *Ther Drug Monit* 2005;27:10-17
3. Tange SM, Grey VL, Senecal PE. Therapeutic drug monitoring in pediatrics: a need for improvement. *J Clin Pharmacol* 1994; 34:200-214. 4. Reed MD, Blumer JL. Therapeutic drug monitoring in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Clin North Am* 1994;41: 1227-1243. 5.
4. Kearns GL, Moss MM, Clayton BD, Hewett DD. Pharmacokinetics and efficacy of digoxin specific Fab fragments in a child following massive digoxin overdose. *J Clin Pharmacol* 1989;29:901-908.
5. Ohning BL. Neonatal pharmacodynamics-basic principles: I. drug delivery. *Neonatal Netw* 1995;14:7-12.
6. Hallworth MJ, Capps NE, editors. Therapeutic drug monitoring and clinical biochemistry. London: ACB Venture Publications; 1993. pp. 1–28
7. Duhme DW, Greenblatt DJ, Koch-Weser J. Reduction of digoxin toxicity associated with measurement of serum levels: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance program. *Ann Intern Med* 1974;80:516-519. 9
8. Atkinson AJ Jr, Nordstorm K. The challenge of in-hospital medication use: an opportunity for clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:363-367
9. Ensom MH, Davis GA, Cropp CD, Ensom RJ. Clinical pharmacokinetics in the 21st century: does the evidence support definitive outcomes? *Clin Pharmacokinet* 1998;34:265-279.
10. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(Suppl 1):5S-10S.
11. Dipiro JT, Spruill WJ, Blouin RA, et al. Lesson 1: introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Dipiro JT, ed. *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. 3rd ed. Bethesda: ASPS, 2002:1-11
12. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental analysis. *Methods Mol Biol*. 2012;929:377-89. PubMed PMID: 23007438.

13. Peter L. Bonate, Danny R. Howard. Pharmacokinetics in Drug Development: Clinical Study Design and Analysis, 2005
14. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental analysis. *Methods Mol Biol.* 2012;929:377-89. PubMed PMID: 23007438.
15. Peter L. Bonate. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation 2nd ed. 2011.
16. Tatarinova, T., Neely, M., Bartroff, J., van Guilder, M., Yamada, W., Bayard, D., Jelliffe, R., Leary, R., Chubatiuk, A., Schumitzky, A., Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian., *J Pharmacokinet Pharmacodyn.*, 2013 Apr, 40(2):189-99.
17. Δοκουμετζίδης, Α., Πληθυσμιακή Φαρμακοκινητική, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, Βιομηχανική Φαρμακευτική, Αθήνα, 2014-2015.
18. Guidance for Industry, Population Pharmacokinetics, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Rockville, 1999
19. Beal, S., Sheiner, L., Nonlinear mixed effects models for repeated measures. University of California; San Francisco: 1992. NONMEM User's Guide
20. Gelman, A., Chew, G.L., Shnaidman, M., Bayesian analysis of serial dilution assays., *Biometrics.*, 2004 Jun, 60(2):407-17.
21. Haddow A, Timmis GM. Myleran in chronic myeloid leukemia. Chemical constitution and biological action. *Lancet.* 1953;31:207-208.
22. Santos GW, Tutschka PJ. Marrow transplantation in the busulfan-treated rat: preclinical model of aplastic anemia. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53:1781-1785.
23. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med.* 1983; 309:1347-1353.
24. Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for acute leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood.* 1987;70:1382-1388.
25. Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulphan and cyclophosphamide. *Blood.* 1994;84:2036-2043

26. Socie G, Clift RA, Blaise D, et al. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*. 2001;98:3569-3574.
27. Van Leeuwen FE, Klokmann WJ, Hagenbeek A, et al. Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol*. 1994;12:312-325.
28. Metayer C, Lynch CF, Clarke EA, et al. Second cancers among long-term survivors of Hodgkin's disease diagnosed in childhood or adolescence. *J Clin Oncol*. 2000;18:2435-2443.
29. Bhatia S, Yasui Y, Robinson LL, et al. High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol*. 2003;21:4386-4394.
30. Jones RJ, Lee KS, Beschorner WE, et al. Venooclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1987;44:778-783.
31. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LB, et al. Venooclusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med*. 1993;118:255-267.
32. Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood*. 1995;85:3005-3020.
33. Peters WP, Henner WD, Grochow LB, et al. Clinical and pharmacologic effects of high dose single agent busulfan with autologous bone marrow support in the treatment of solid tumors. *Cancer Res*. 1987;47:6402-6406.
34. Hassan M, Ljungman P, Ringden O, et al. The effect of busulfan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:915-924.
35. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, et al. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;101:2043-2048.
36. Przepiorka D, Khouri I, Thall P, et al. Thiotepa, busulfan and cyclophosphamide as a preparative regimen for allogeneic transplantation for advanced chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:977-981.

37. Deeg HJ, Schuler US, Schulman H, et al. Myeloablation by intravenous busulfan and hematopoietic reconstitution with autologous marrow in a canine model. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5:316-321.
38. Marcus RE, Goldman JM. Convulsions due to high-dose busulphan. *Lancet.* 1984;2:1463. 37
39. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res.* 1990;50: 6203-6207.
40. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, Pico JL, Lemerle J. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24:386-390.
41. Hassan M, Oberg G, Ehrsson H, et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;36:525-530
42. Meloni G, Raucci U, Pinto RM, Spalice A, Vignetti M, Iannetti P. Pretransplant conditioning with busulfan and cyclophosphamide in acute leukemia patients: neurological and electroencephalographic prospective study. *Ann Oncol.* 1992;3: 145-148.
43. Kobayashi R, Watanabe N, Iguchi A, et al. Electroencephalogram abnormality and high-dose busulfan in conditioning regimens for stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:217-220.
44. Martell RW, Sher C, Jacobs P, Monteagudo F. High-dose busulfan and myoclonic epilepsy. *Ann Intern Med.* 1987;106:173.
45. Sureda A, Perez deOteyza J, Garcia Larana J, Odriozola J. Highdose busulfan and seizures. *Ann Intern Med.* 1989;111:543-544.
46. Bhagwatwar HP, Phadungpojna S, Chow DS, Andersson BS. Formulation and stability of busulfan for intravenous administration in high-dose chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;37:401-408.
47. Andersson BS, Madden T, Tran HT, et al. Acute safety and pharmacokinetics of intravenous busulfan when used with oral busulfan and cyclophosphamide as pretransplant conditioning therapy: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6:548-554.
48. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. *Blood.* 1994;84:2144-2150.
49. Schuler US, Ehrsam M, Schneider A, Schmidt H, Deeg J, Ehninger G. Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of

- the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:241-244.
50. Andersson BS, Kashyap A, Gian V, et al. Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:145-154.
51. Madden T, de Lima M, Thapar N, et al. Pharmacokinetics of once-daily IV busulfan as part of pretransplantation preparative regimens: a comparison with an every 6-hour dosing schedule. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:56-64.
52. Vaughan WP, Cagnoni P, Fernandez H, et al. Decreased incidence of and risk factors for hepatic veno-occlusive disease with an intravenous busulfan (BU) containing preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Blood.* 1998;92(Suppl. 1):516a.
53. Russell JA, Tran HT, Quinlan D, et al. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8: 468-477.
54. De Lima M, Couriel Thall PF, et al. Once-daily intravenous busulfan and fludarabine: clinical and pharmacokinetic results of a myeloablative, reduced-toxicity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood.* 2004;104:857-864.
55. Geddes M, Kangaroo BS, Naveed F, et al. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:220-228.
56. Nath CE, Earl JW, Pati N, Stephen K, Shaw PJ. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to paediatric blood or marrow transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66:50-59.
57. Hassan Z, Ljungman P, Ringden O, et al. Pharmacokinetics of liposomal busulphan in man. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27: 479-485.
58. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/ efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:979-987.
59. Russell JA, Savoie ML, Balogh A, et al. Allogeneic transplantation for adult acute leukemia in first and second remission with a novel regimen incorporating daily

- intravenous busulfan, fludarabine, 400 cGy total-body irradiation, and thymoglobulin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13: 814-821.
60. McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, et al. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 167–73
61. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 1997; 89: 3055–60.
62. Bartelink IH, Bredius RGM, Belitser SV, et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 231–41.
63. Gungor T, Teira P, Slatter M, et al. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet* 2014; 383: 436–48.
64. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EM, Dvorak CC, Savic RM, Zwaveling J, Bredius RG, Egberts AC, Bierings M, Kletzel M, Shaw PJ, Nath CE, Hempel G, Ansari M, Krajcinovic M, Théorêt Y, Duval M, Keizer RJ, Bittencourt H, Hassan M, Güngör T, Wynn RF, Veys P, Cuvelier GD, Markt S, Chiesa R, Cowan MJ, Slatter MA, Stricherz MK, Jennissen C, Long-Boyle JR, Boelens JJ. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2016 Nov;3(11):e526-e536.
65. Palmer J, McCune JS, Perales MA, Marks D, Bubalo J, Mohty M, Wingard JR, Paci A, Hassan M, Bredeson C, Pidala J, Shah N, Shaughnessy P, Majhail N, Schriber J, Savani BN, Carpenter PA. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Nov;22(11):1915-1925.
66. Philippe M, Goutelle S, Guitton J, Fonrose X, Bergeron C, Girard P, Bertrand Y, Bleyzac N. Should busulfan therapeutic range be narrowed in pediatrics? Experience from a large cohort of hematopoietic stem cell transplant children. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Jan;51(1):72-8.

67. Lovich MA, Peterfreund GL, Sims NM, Peterfreund RA: Central venous catheter infusions: A laboratory model shows large differences in drug delivery dynamics related to catheter dead volume. *Crit Care Med* 2007; 35:2792–8
68. Moss DR, 69K, Peterfreund GL, Lovich MA, Sims NM, Peterfreund RA: An in vitro analysis of central venous drug delivery by continuous infusion: The effect of manifold design and port selection. *Anesth Analg* 2009; 109:1524–9
69. Bartels K, Moss DR, Peterfreund RA: An analysis of drug delivery dynamics via a pediatric central venous infusion system: Quantification of delays in achieving intended doses. *Anesth Analg* 2009; 109:1156–61
70. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/GeneralHospitalDevicesandSupplies/InfusionPumps/ucm202495.htm>
71. FDA Guidance Document Comments, Total Product Life Cycle: Infusion Pumps – Premarket Notification [510(k)] Submission 07/09/2010.
72. Anne C. van der Eijk^{1,2}, Roland M.F.P.T. van Rens², Jenny Dankelman¹ & Bert J. Smit³. A literature review on flow-rate variability in neonatal IV Therapy. *Pediatric Anesthesia* 23 (2013) 9–21
73. Loisel DB, Smith MM, MacDonald MG et al. Intravenous access in newborn infants: impact of extended umbilical venous catheter use on requirement for peripheral venous lines. *J Perinatol* 1996; 16: 461–466.
74. Hermansen MC, Goetz Hermansen M. Intravascular catheter complications in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2005; 32: 141–156.
75. Neff SB, Neff TA, Gerber S et al. Flow rate, syringe size and architecture are critical to start-up performance of syringe pumps. *Eur J Anaesthesiol* 2007; 24: 602–608.
76. Lovich M, Doles J, Peterfreund R. The impact of carrier flow rate and infusion set dead-volume on the dynamics of intravenous drug delivery. *Anesth Analg* 2005; 100: 1048–1055.
77. Lovich M, Kinnealley M, Sims N et al. The delivery of drugs to patients by continuous intravenous infusion: modeling predicts potential dose fluctuations depending on flow rates and infusion system dead volume.
78. Bell E, Acarregui M. Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; CD000503.

79. Lönnqvist PA, Löfqvist B. Design flaw can convert commercially available continuous syringe pumps to intermittent bolus injectors. *Intensive Care Med* 1997; 23: 998–1001.
80. Neff TA, Fischer JE, Schulz G et al. Infusion pump performance with vertical displacement: effect of syringe pump and assembly type. *Intensive Care Med* 2001; 27: 287–291.
81. Kern H, Kuring A, Redlich U et al. Downward movement of syringe pumps reduces syringe output. *Br J Anaesth* 2001; 86: 828–831.
82. Donald AI, Chinthamunedi MP, Spearritt D. Effect of changes in syringe driver height on flow: a small quantitative study. *Crit Care Resusc* 2007; 9: 143–147.
83. Igarashi H, Obata Y, Nakajima Y et al. Syringe pump displacement alters line internal pressure and flow. *Can J Anesth* 2005; 52: 685–69.
84. Doñmez A, Araz C, Kayhan Z. Syringe pumps take too long to give occlusion alarm. *Pediatr Anesth* 2005; 15: 293–296.
85. Neal DA, Lin JA. The effect of syringe size on reliability and safety of low-flow infusions. *Pediatr Crit Care Med* 2009; 10: 592–596.
86. Kim DW, Steward DJ. The effect of syringe size on the performance of an infusion pump. *Pediatr Anesth* 1999; 9: 335–337.
87. Capes DF, Dunster KR, Sunderland VB et al. Fluctuations in syringe-pump infusions: association with blood pressure variations in infants. *Am J Health Syst Pharm* 1995; 52: 1646–1653.
88. Weiss M, Neff T, Gerber A et al. Impact of infusion line compliance on syringe pump performance. *Pediatr Anesth* 2000c; 10: 595–599.
89. Weiss M, Bänziger O, Neff T et al. Influence of infusion line compliance on drug delivery rate during acute line loop formation. *Intensive Care Med* 2000d; 26: 776–779.
90. Angle JF, Matsumoto AH, Skalak TC et al. Flow characteristics of peripherally inserted central catheters. *J Vasc Interv Radiol* 1997; 8: 569–577.
91. Lovich MA, Peterfreund GL, Sims NM et al. Central venous catheter infusions: a laboratory model shows large differences in drug delivery dynamics related to catheter dead volume. *Crit Care Med* 2007; 35: 2792–2798.
92. Bartels K, Moss DR, Peterfreund RA. An analysis of drug delivery dynamics via a pediatric central venous infusion system: quantification of delays in achieving intended doses. *Anesth Analg* 2009; 109: 1156–1161.

93. Puntis J, Wilkins K, Ball P et al. Hazards of parenteral treatment: do particles count?. *Arch Dis Child* 1992; 67: 1475–1477.
94. Lehr HA, Brunner J, Rangoonwala R et al. Particulate matter contamination of intravenous antibiotics aggravates loss of functional capillary density in postischemic striated muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 514–520.
95. Cant A, Lenney W, Kirkham N. Plastic material from a syringe causing fatal bowel necrosis in a neonate. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296: 968–969.
96. Nazeravich DR, Otten NH. Effect of inline filtration on delivery of gentamicin at a slow infusion rate. *Am J Hosp Pharm* 1983; 40: 1961–1964.
97. Levi DS, Peterson N, Shah SD et al. Connecting multiple low-flow intravenous infusions in the newborn: problems and possible solutions. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11: 275–281.
98. Southern DA, Read MS. Lesson of the week: overdosage of opiate from patient controlled analgesia devices. *Br Med J* 1994; 309: 1002.
99. McCarroll C, McAtamney D, Taylor R. Alteration in flow delivery with antisiphon devices. *Anaesthesia* 2000; 55: 355–357
100. Weiss M, Fischer J, Neff T et al. Do antisiphon valves reduce flow irregularities during vertical displacement of infusion pump systems? *Anaesth Intensive Care* 2000; 28: 680–683.
101. Ma H, Lovich MA, Peterfreund RA. Quantitative analysis of continuous intravenous infusions in pediatric anesthesia: safety implications of dead volume, flow rates, and fluid delivery. *Pediatr Anesth* 2011; 21: 78–86.
102. Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relationship to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16:31-42.
103. Bollinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:1013–1018
104. Busilvex User guide Product Monograph in Children
105. Tian-Ling Chen Louise. B. Grochow Lisa, A. Hurowitz Robert B. Brundrett. Determination of busulfan in human plasma by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988, Pages 303-309.

106. José-Esteban, Peris José-Antonio, Latorre VictoriaCastel, Amparo Verdeguer, Sara Esteve, FranciscaTorres-Molina. Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999, 33-40
107. MoustaphaHassan, HansEhrsson. Gas chromatographic determination of busulfan in plasma with electron-capture detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1983, 374-380.
108. Ederson Oliveira dos Reis, Rosane Vianna-Jorge, Guilherme Suarez-Kurtz, Edson Luiz da Silva Lima, Débora de Almeida Azevedo. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005 1666–1674
109. G.VassalM.ReA.Gouyette Gas chromatographic—mass spectrometric assay for busulfan in biological fluids using a deuterated internal standard. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988, Pages 357-361.
110. Quanyun Alan Xu, Reza Kazerooni, Jay K.Thapar , Borje D. Andersson, Timothy L. Madden. Quantitative Determination of Busulfan in Human Plasma by UPLC. *Chromatographia*. 2009, 70:1505.
111. Juenke JM, Miller KA, McMillin GA, Johnson-Davis KL. An automated method for supporting busulfan therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2011 Jun;33(3):315-20.
112. Courtney JB, Harney R, Li Y, Lundell G, McMillin GA, Agarwal G, Juenke JM, Mathew A, Gonzalez-Espinoza R, Fleisher M, Salamone SJ. Determination of busulfan in human plasma using an ELISA format. *Ther Drug Monit*. 2009 Aug;31(4):489-94.
113. Ialongo C, Mozzi AF, Bernardini S. An LC-MS Assay with Isocratic Separation and On-line Solid Phase Extraction to Improve the Routine Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Plasma. *J Med Biochem*. 2017 Apr 22;36(2):113-121.
114. Jean R. Haggie, Mark Wu, Robbin B. Burns, Carol S. Ng, Henry C. Fung, Gregory Knight, Michael J Banett, John J Spineli, Leanne Embree. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997 May, 692(2) 437-444.

- 115.Ειρήνη Παναγοπουλου (2012), Βελτιστοποίηση και Επικύρωση Μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό φαρμάκου Busulfan σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος Τμήμα χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 116.Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001
- 117.European Medicines Agency Guideline on bioanalytical method validation European Medicines Agency (2011)
- 118.Chiesa R, Cappelli B, Crocchiolo R, Frugnoli I, Biral E, Noè A, Evangelio C, Fossati M, Roccia T, Biffi A, Finizio V, Aiuti A, Broglia M, Bartoli A, Ciceri F, Roncarolo MG, Markt S. Unpredictability of intravenous busulfan pharmacokinetics in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation for advanced beta thalassemia: limited toxicity with a dose-adjustment policy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 May;16(5):622-8.
- 119.Schechter T, Finkelstein Y, Doyle J, Verjee Z, Moretti M, Koren G, Dupuis LL. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Mar;13(3):307-14.
- 120.Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, Glidden D, DeSantes K, Heyn L, Risler LJ, Bostrom B, Cowan MJ. An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant.* 2000 May;25(9):925-30.
- 121.Zwaveling J, Bredius RG, Cremers SC, Ball LM, Lankester AC, Teepe-Twiss IM, Egeler RM, den Hartigh J, Vossen JM. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Jan;35(1):17-23.
- 122.Andersson BS, Thall PF, Valdez BC, et al. Fludarabine with pharmacokinetically-guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. *Bone Marrow Transplant.* 2017; 52:580–587.
- 123.Bartelink IH, Bredius RG, Ververs TT, et al. Once-daily intravenous busulfan with therapeutic drug monitoring compared to conventional oral busulfan improves survival and engraftment in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14:88–98

124. Grochow LB. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol.* 1993; 20:18–25
125. Alan L Myers, Jitesh D Kawedia, Richard E Champlin et al., Clarifying Busulfan Metabolism and Drug Interactions to Support New Therapeutic Drug Monitoring Strategies: A Comprehensive Review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017 September ; 13(9): 901–923
126. Bostrom B, Enockson K, Johnson A, et al. Plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan in children and adults undergoing bone marrow transplantation. *Pediatric transplantation.* 2003; 7(Suppl 3):12–18
127. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 225–30.
128. Ljungman P, Hassan M, Bekassy AN, Ringden O, Oberg G. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 909–13.
129. Andersson BS, Thall PF, Madden T, et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 477–85.
130. Pamela J. Buffery, Kirstie M. Allen et al. Thirteen Years' Experience of Pharmacokinetic Monitoring and Dosing of Busulfan: Can the Strategy be Improved? *Ther Drug Monit* 2014;36:86–92
131. Choong Eva, Uppugunduri Chakradhara Rao Satyanarayana, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan for the Management of Pediatric Patients: Cross-Validation of Methods and Long-Term Performance. *Ther Drug Monit* 2018;40:84–92
132. Janel Long-Boyle, PharmD, PhD1, Rada Savic, PhD2, Shirley Yan, PharmD3, Imke Bartelink, PharmD, PhD2, Lisa Musick, PharmD4, Deborah French, PhD5, Jason Law, MD6, Biljana Horn, MD7, Morton J. Cowan, MD7, and Christopher C. Dvorak, MD7 1Department. Population Pharmacokinetics of Busulfan in Pediatric and Young Adult Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplant: A Model-Based Dosing Algorithm for Personalized Therapy and Implementation into Routine Clinical Use. *Ther Drug Monit.* 2015 April ; 37(2): 236–245

133. Hndie Tesfaye, Romana Branova, Eva Klapko, Richard Prusa, Daniela Janeckov, Petr Riha, Petr Sedlacek, Petra Keslova, Josef Malis. The importance of Therapeutic Drug Monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant*, 2014; 19: 214-224
134. Jamie H. Zao, Tal Schechter, Wenchao Jessica Liu et al. Performance of Busulfan Dosing Guidelines for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 21 (2015) 1471e1478
135. Mark A. Lovich, Jason Doles, and Robert A. Peterfreund. The Impact of Carrier Flow Rate and Infusion Set Dead-Volume on the Dynamics of Intravenous Drug Delivery. *Anesth Analg* 2005;100:1048–55
136. Mark A. Lovich, M. Ellen Kinnealley, and Robert A. Peterfreund. The Delivery of Drugs to Patients by Continuous Intravenous Infusion: Modeling Predicts Potential Dose Fluctuations Depending on Flow Rates and Infusion System Dead Volume. *Anesth Analg* 2006;102:1147–53
137. Mark A. Lovich, Gregory L. Peterfreund, Nathaniel M. Sims, Robert A. Peterfreund. Central venous catheter infusions: A laboratory model shows large differences in drug delivery dynamics related to catheter dead volume. *Crit Care Med* 2007 Vol. 35, No. 12, 2792-2798.
138. Mark A. Lovich, Matthew G. Wakim, Abraham Wei, Michael J. Parker et al., Drug Infusion System Manifold Dead-Volume Impacts the Delivery Response Time to Changes in Infused Medication Doses In Vitro and Also In Vivo in Anesthetized Swine. *Anesth Analg* 2013;117:1313–8.
139. David R. Moss, Karsten Bartels, Gregory L. Peterfreund, Mark A. Lovich, Nathaniel M. Sims, Robert A. Peterfreund. An In Vitro Analysis of Central Venous Drug Delivery by Continuous Infusion: The Effect of Manifold Design and Port Selection. *Anesth Analg* 2009;109:1524 –9
140. Ma H, Lovich MA, Peterfreund RA. Quantitative analysis of continuous intravenous infusions in pediatric anesthesia: safety implications of dead volume, flow rates, and fluid delivery. *Paediatr Anaesth*. 2011 Jan;21(1):78-86
141. Damien Lannoy, Bertrand Decaudin, Nicolas Simon, Christine Barthelemy, Bertrand Debaene, and Pascal Odou. The Impact on Drug Mass Flow Rate of Interrupting and Resuming Carrier Fluid Flow: An In Vitro Study on a Very Low Dead-Space Volume Infusion Set. *Anesth Analg* 2012;114:328–32

142. Mark A. Lovich, Matthew G. Wakim, Abraham Wei et al., Drug Infusion System Manifold Dead-Volume Impacts the Delivery Response Time to Changes in Infused Medication Doses In Vitro and Also In Vivo in Anesthetized Swine. *Anesth Analg.* 2013;117:1313–8
143. Mark A. Lovich, Matthew J. Pezone, Mikhail Y. Maslov, Michael R. Murray, Matthew G. Wakim, and Robert A. Peterfreund. Infusion System Carrier Flow Perturbations and Dead-Volume: Large Effects on Drug Delivery In Vitro and Hemodynamic Responses in a Swine Model. *Anesth Analg* 2015;120:1255–63.
144. Amy C. Tsao, Mark A. Lovich, Michael J. Parker, Hui Zheng & Robert A. Peterfreund. Delivery interaction between co-infused medications: an in vitro modeling study of microinfusion. *Pediatric Anesthesia* 23 (2013) 33–39.
145. Michael J. Parker, Mark A. Lovich, Amy C. Tsao, Abraham E. Wei et al., Computer Control of Drug Delivery by Continuous Intravenous Infusion. *Anesthesiology* 2015; 122:647-58.
146. Michael J. Parker, Mark A. Lovich, Amy C. Tsao, et al., Novel Pump Control Technology Accelerates Drug Delivery Onset in a Model of Pediatric Drug Infusion. *Anesth Analg* 2017;124:1129–34.
147. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical Bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J.* 2009;11:558-569.
148. 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;2:e38. doi: 10.1038/psp.2013.14
149. Νικηφορίδης Γ. Μέθοδοι στατιστικής συμπερασματολογίας. Στο: Βασικές αρχές και μέθοδοι υπολογισμού της βιοστατιστικής. Πάτρα: Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών; 2000. σελ. 108-157.
150. Gallant AR. The power of the likelihood ratio test of location in nonlinear regression models. *J Am Statist Assoc.* 1975;70:198-203.
151. Bonate PL. Nonlinear mixed effects models: Theory. Bonate PL, Edition: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation. New York: Springer Science+Business Media, Inc.; 2006.. 205-265.
152. Owen JS, Fiedler-Kelly J. Model building: typical process. Introduction to population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. 90-177.

153. Serge Cremers. Rik Schoemaker. Robbert Bredius, Jan den Hartigh, Lynne Ball. Irene Twiss. Pieter Vermeij. Jaak Vossen. Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Apr; 53(4): 386–389.
154. Jeannine S. McCune. Meagan J. Bemer. Jeffrey S. Barrett. K. Scott Baker. Alan S. Gamis. Nicholas H.G. Holford. Busulfan in infants to adult hematopoietic cell transplant recipients: A population pharmacokinetic model for initial and Bayesian dose personalization. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 1; 20(3): 754–763.
155. Brian J. ANDERSON¹ Nick H. G. HOLFORD². Mechanistic Basis of Using Body Size and Maturation to Predict Clearance in Humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (1): 25–36 (2009).
156. Nava T, Kassir N, Rezgui MA, Uppugunduri CRS, Huezo-Diaz Curtis P, Duval M, Théoret Y, Daudt LE, Litalien C, Ansari M, Krajinovic M, Bittencourt H. Incorporation of GSTA1 genetic variations into a population pharmacokinetic model for IV busulfan in paediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol.* 2018 Jul;84(7):1494-1504.
157. Kawazoe A, Funaki T, Kim S. Population Pharmacokinetic Analysis of Busulfan in Japanese Pediatric and Adult HCT Patients. *J Clin Pharmacol.* 2018 Sep;58(9):1196-1204. doi: 10.1002/jcph.1120. Epub 2018 Apr 17.

A. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Βάρος (ABW) (kg)	Δόση Busulviex (mg/kg)	Όγκος Busulviex $A = \frac{ABW \times Dose}{6 \text{ mg/mL}}$	Όγκος διάλυσης $B = 10 * A \text{ (mL)}$	Όγκος προς έγχυση $A+B \text{ (mL)}$
Body weight < 9 kg, Busilvex® dosage = 1.0 mg/kg				
5.0	1.0	0.83	8.3	9.13
5.1	1.0	0.85	8.5	9.35
5.2	1.0	0.87	8.7	9.57
5.3	1.0	0.88	8.8	9.68
5.4	1.0	0.90	9.0	9.90
5.5	1.0	0.92	9.2	10.12
5.6	1.0	0.93	9.3	10.23
5.7	1.0	0.95	9.5	10.45
5.8	1.0	0.97	9.7	10.67
5.9	1.0	0.98	9.8	10.78
6.0	1.0	1.00	10.0	11.00
6.1	1.0	1.02	10.2	11.22
6.2	1.0	1.03	10.3	11.33
6.3	1.0	1.05	10.5	11.55
6.4	1.0	1.07	10.7	11.77
6.5	1.0	1.08	10.8	11.88
6.6	1.0	1.10	11.0	12.10
6.7	1.0	1.12	11.2	12.32
6.8	1.0	1.13	11.3	12.43
6.9	1.0	1.15	11.5	12.65
7.0	1.0	1.17	11.7	12.87
7.1	1.0	1.18	11.8	12.98
7.2	1.0	1.20	12.0	13.20
7.3	1.0	1.22	12.2	13.42
7.4	1.0	1.23	12.3	13.53
7.5	1.0	1.25	12.5	13.75
7.6	1.0	1.27	12.7	13.97
7.7	1.0	1.28	12.8	14.08
7.8	1.0	1.30	13.0	14.30
7.9	1.0	1.32	13.2	14.52
8.0	1.0	1.33	13.3	14.63
8.1	1.0	1.35	13.5	14.85
8.2	1.0	1.37	13.7	15.07
8.3	1.0	1.38	13.8	15.18
8.4	1.0	1.40	14.0	15.40
8.5	1.0	1.42	14.2	15.62
8.6	1.0	1.43	14.3	15.73
8.7	1.0	1.45	14.5	15.95
8.8	1.0	1.47	14.7	16.17
8.9	1.0	1.48	14.8	16.28

Βάρος (ABW) (kg)	Δόση Busulviex (mg/kg)	Όγκος Busulviex $A = \frac{ABW \times Dose}{6 \text{ mg/mL}}$	Όγκος διάλυσης $B = 10 * A \text{ (mL)}$	Όγκος προς έγχυση A+B (mL)
Body weight 9-16 kg, Busilvex® dosage = 1.2 mg/kg				
9.0	1.2	1.80	18.00	19.80
9.5	1.2	1.90	19.00	20.90
10.0	1.2	2.00	20.00	22.00
10.5	1.2	2.10	21.00	23.10
11.0	1.2	2.20	22.00	24.20
11.5	1.2	2.30	23.00	25.30
12.0	1.2	2.40	24.00	26.40
12.5	1.2	2.50	25.00	27.50
13.0	1.2	2.60	26.00	28.60
13.5	1.2	2.70	27.00	29.70
14.0	1.2	2.80	28.00	30.80
14.5	1.2	2.90	29.00	31.90
15.0	1.2	3.00	30.00	33.00
15.5	1.2	3.10	31.00	34.10
Body weight ≤ 23 kg, Busilvex® dosage = 1.1 mg/kg				
16.0	1.1	2.93	29.3	32.23
16.5	1.1	3.03	30.3	33.33
17.0	1.1	3.12	31.2	34.32
17.5	1.1	3.21	32.1	35.31
18.0	1.1	3.30	33.0	36.30
18.5	1.1	3.39	33.9	37.29
19.0	1.1	3.48	34.8	38.28
19.5	1.1	3.58	35.8	39.38
20.0	1.1	3.67	36.7	40.37
20.5	1.1	3.76	37.6	41.36
21.0	1.1	3.85	38.5	42.35
21.5	1.1	3.94	39.4	43.34
22.0	1.1	4.03	40.3	44.33
22.5	1.1	4.13	41.3	45.43
23.0	1.1	4.22	42.2	46.42
23 < body weight ≤ 34 kg, Busilvex® dosage = 0.95 mg/kg				
23.5	0.95	3.72	37.2	40.92
24.0	0.95	3.80	38.0	41.80
24.5	0.95	3.88	38.8	42.68
25.0	0.95	3.96	39.6	43.56
25.5	0.95	4.04	40.4	44.44
26.0	0.95	4.12	41.2	45.32
26.5	0.95	4.20	42.0	46.20
27.0	0.95	4.28	42.8	47.08
27.5	0.95	4.35	43.5	47.85
28.0	0.95	4.43	44.3	48.73
28.5	0.95	4.51	45.1	49.61
29.0	0.95	4.59	45.9	50.49
29.5	0.95	4.67	46.7	51.37
30.0	0.95	4.75	47.5	52.25
30.5	0.95	4.83	48.3	53.13
31.0	0.95	4.91	49.1	54.01
31.5	0.95	4.99	49.9	54.89
32.0	0.95	5.07	50.7	55.77
32.5	0.95	5.15	51.5	56.65
33.0	0.95	5.23	52.3	57.53
33.5	0.95	5.30	53.0	58.30
34.0	0.95	5.38	53.8	59.18
For children >34 kg ABW Busilvex® dosage = 0.8 mg/kg				

B. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΥ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

B.1 Διάφορα όργανα και υλικά

Για τις ανάγκες της ανάλυσης και της προετοιμασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακόμη: δοκιμαστικοί σωλήνες, ογκομετρικές φιάλες 5mL, 25 mL κατηγορίας A, ογκομετρικός κύλινδρος 1L, αυτόματες πιπέτες με εύρος όγκων 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L και 0,5 -5 mL για τη λήψη των επιθυμητών όγκων των δειγμάτων και γυάλινα φιαλίδια HPLC με insert 200 μ L HPLC.

B.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Πρότυπες ουσίες

Διαλύτες:

- Ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC (Macron Fine Chemicals-Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland).
- Νερό (H₂O) βαθμού καθαρότητας HPLC (Carlo Erba Reagents S.A.S.-Dasit Group, Val de Reuil, Γαλλία).
- Μεθανόλη (CH₃OH) βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer Chemical-Fischer Scientific, Loughborough, UK).
- Οξικός εθυλεστέρας (CH₃COOCH₂CH₃) βαθμού καθαρότητας HPLC (Fischer Chemical-Fischer Scientific, Loughborough, UK).

Αντιδραστήρια – Πρότυπες ουσίες:

- Βου σουλφάνη (Busulfan), πρότυπη ουσία της Sigma Aldrich, Austria, Lot No BCBF0893V, CAS No 55-98-1.
- Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DDTC) της Sigma Aldrich, Cas No: 20624-25-3.
- 1,6-δισ(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξάνιο [1,6 bis(methanosulffinoxy)hexane] το οποίο αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο (internal standard IS) και παρασκευάστηκε από το τμήμα χημείας κατά την εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας Ειρήνης Παναγοπούλου και ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος

έγινε με ανακρυστάλλωση με τη χρήση EtOH το τελικό προϊόν ήταν καθαρότητας 99.99%^[216].

B.3 Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης Bu (Stock solution Bu SS1 και SS2)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης SS1 και SS2 ζυγίζονται 15 mg πρότυπης ουσίας και ακολουθεί αραιώση στα 25 mL με ACN ώστε να προκύψουν διαλύματα τελικής συγκέντρωσης 600 ppm. Τα διαλύματα SS1 και SS2 φυλάσσονται στους -20 °C και χρησιμοποιούνται για τη παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας και διαλυμάτων ελέγχου (Quality Controls, QC, διαλύματα που χρησιμοποιούνται για να εκλέξουν την καμπύλη αναφοράς), αντίστοιχα.

Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης IS (stock solution SS IS)

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης του IS ζυγίζονται 15 mg πρότυπης ουσίας και ακολουθεί αραιώση στα 25 mL με ACN ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 600 ppm. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Παρασκευή αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (DDTC 0.4%)

Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 400 mg DDTC και ακολουθεί προσθήκη 10 mL H₂O ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα 0.4% (% W/V). Το διάλυμα παρασκευάζεται κάθε μέρα και δεν αποθηκεύεται.

Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας και διαλυμάτων ελέγχου - κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Από το διάλυμα *SSI* παρασκευάζονται κάθε φορά 8 διαλύματα εργασίας με μεταφορά 10, 20, 60, 130, 200, 300, 400 500 και 1200 μ L σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL και ακολουθεί αραιώση με ACN ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 1.2, 7.2, 15.6, 24.0, 36.0, 48.0, 60.0, 120.0 ppm. Από το διάλυμα *SS2* παρασκευάζονται κάθε φορά 2 διαλύματα ελέγχου, QC, με μεταφορά 60, και 500 μ L σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και ακολουθεί αραιώση με ACN ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 7.2 και 60.0 ppm. Από το διάλυμα του *SS IS* μεταφέρονται 130 μ L σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και ακολουθεί αραιώση με ACN ώστε να προκύψει συγκέντρωση 15.6 ppm.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 20 μ L από το κάθε διάλυμα εργασίας ή ελέγχου, ακολουθεί προσθήκη 20 μ L από το διάλυμα εργασίας του IS (15.6 ppm) και 100 μ L αντιδραστηρίου

παραγωγοποίησης. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ήπια ανάδευση σε Vortex και προσυγκέντρωση σε ρεύμα αζώτου στους 60 °C, μέχρι ξηρού. Τέλος, γίνεται ανάκτηση με 100 µL MeOH.

B.3 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

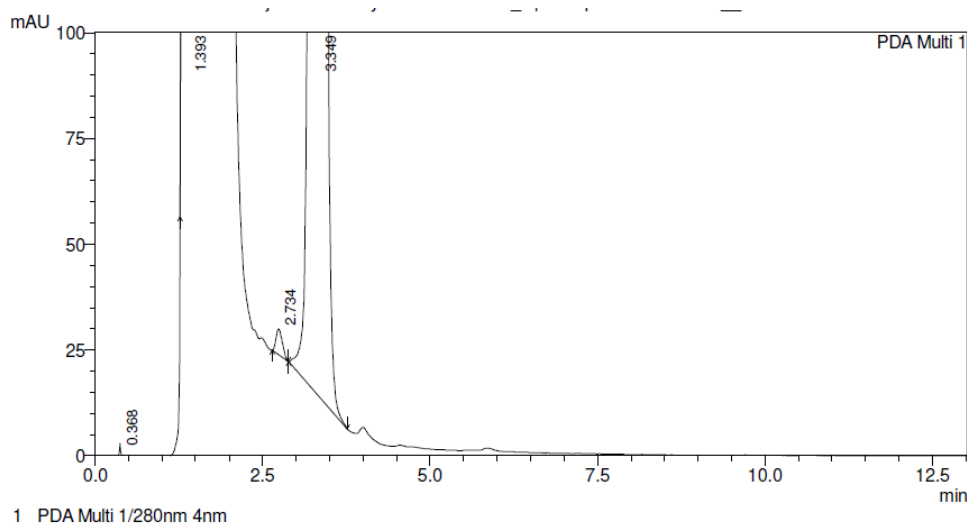
B.3.1 Εκλεκτικότητα

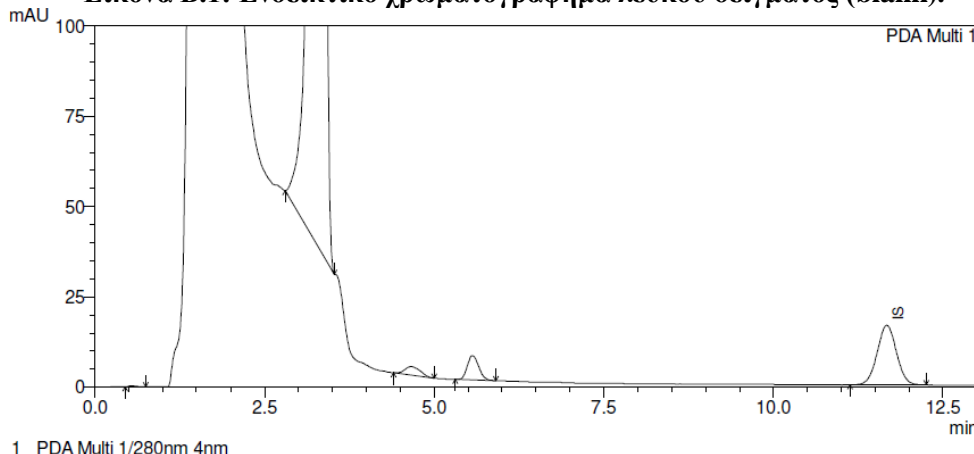
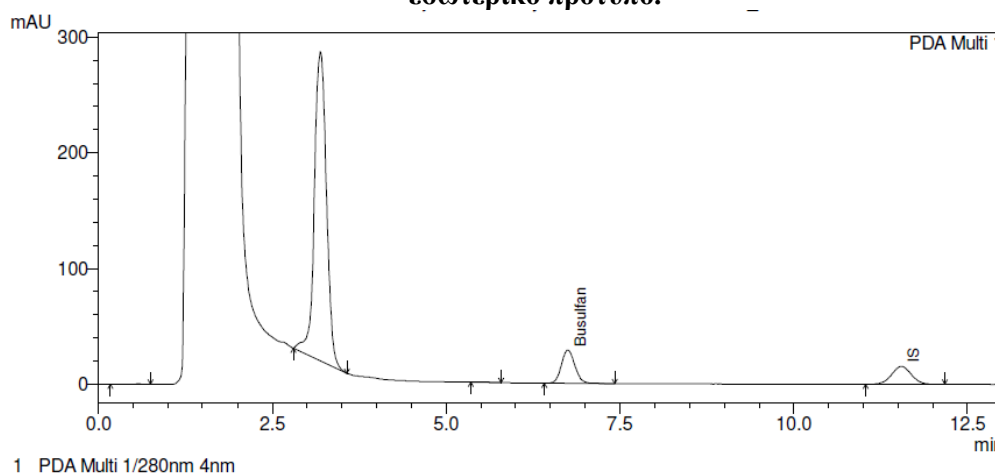
Για την εκλεκτικότητα του συστήματος μελετήθηκε υπό κανονικές συνθήκες χρωματογραφίας η διαχωριστική ικανότητα, ο παράγοντας συγκράτησης και το Tailing factor για το Busilvex® και το IS. Οι χρωματογραφικές παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.1.

Πίνακας Β.1.: Χαρακτηρίστηκα ποιότητας χρωματογραφίας.

Χρωματογραφική Παράμετρος	Χρόνος ανάλυσης (t _R) min	Διαχωριστική ικανότητα (R _s)	Παράγοντας συγκράτησης (k')	Tailing factor (T _F)
Busilvex®	6.85 RSD 0.37%	10.49	1.2	1.04
IS	11.74 RSD 0.43%	3.5	1.1	1.1
Αποδεκτό/ Απορρίπτεται (✓/✗)	✓	✓	✓	✓
Κριτήρια αποδοχής	Repeatable RSD ≤ 0.5 %	≥ 2.0	Repeatable	≤ 2.0

Επιπλέον καμία παρεμπόδιση από άλλα συστατικά δεν φάνηκε να επηρεάζει τις κορυφές του Busilvex® και του IS. Στην Εικόνα Β.1 – Β.3 παρουσιάζεται ένα λευκό (Blank) ένα μηδενικό (Zero) και ένα χρωματογράφημα συγκέντρωσης 20 µg/mL.



Εικόνα Β.1: Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος (blank).**Εικόνα Β.2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μηδενικού (zero) δείγματος που περιέχει μόνο εσωτερικό πρότυπο.****Εικόνα Β.3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα διαλύματος Busilvex® συγκέντρωσης 20 mg/mL.**

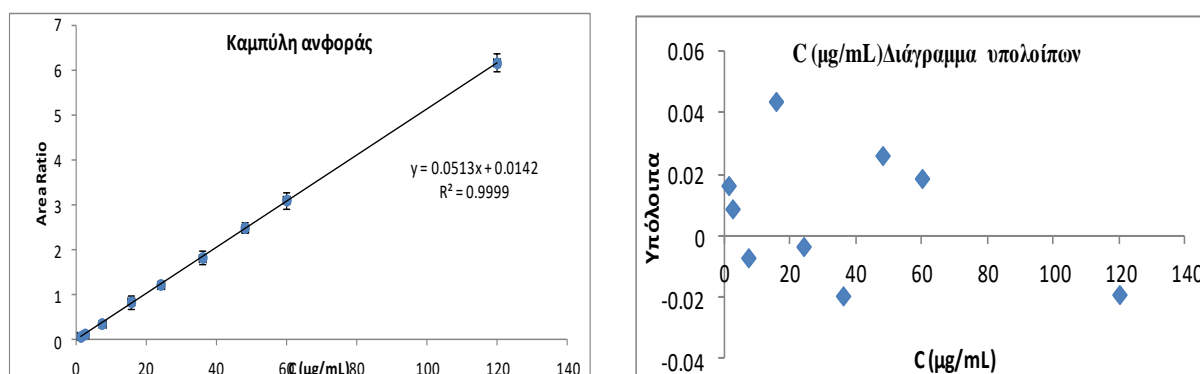
B.3.2 Γραμμικότητα- Καμπύλες Βαθμονόμησης

Η καμπύλη βαθμονόμησης μαζί με το διάγραμμα υπολοίπων παρουσιάζεται στην Εικόνα Β.2 και αποτελεί αντιπροσωπευτική καμπύλη αναφοράς 9 επιπέδων συγκέντρωσης 1.2, 2.4, 7.2, 15.6, 24, 36, 48, 60, 120 $\mu\text{g/mL}$ με δεδομένα 4 καμπύλων βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν εις τριπλούν σε διάστημα 4 ημερών (υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας). Το μοντέλο της γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης αναπτύχθηκε με βάση την μέση τιμή των λόγων απόκρισης σήματος αναλύτη προς IS όλων των επιπέδων σε συνάρτηση της συγκέντρωσης. Στον Πίνακα Β.2 παρουσιάζεται ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 , η κλίση και η τομή με τα αντίστοιχα % σφάλματα

για το σύνολο των καμπυλών αναφοράς για 4 διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Στην Εικόνα Β.2 παρουσιάζεται η πρώτη καμπύλη βαθμονόμησης του Πίνακα Β.2 με το αντίστοιχο διάγραμμα υπολοίπων.

Πίνακας Β.2: Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς.

Καμπύλη Βαθμονόμησης	Κλίση (b)	S _b	Τομή (a)	S _a	R ²
	0.05131	0.00020	0.01419	0.00993	0.9999



Εικόνα Β.2: Ενδεικτική καμπύλη βαθμονόμησης και Διάγραμμα υπολοίπων

B.3.3 Έλεγχος της ακρίβειας / Πιστότητας

Η ακρίβεια μελετήθηκε μέσω των προτύπων διαλυμάτων ελέγχου, QC. Για κάθε καμπύλη αναφοράς, παρασκευάστηκαν 2 δείγματα εις τριπλούν, με εμβολιασμό 60, και, 500 μL από ένα διάλυμα 600 ppm και ακολούθησε αραιώση στα 5 mL με φυσιολογικό ορό ώστε να προκύψουν δείγματα τελικής συγκέντρωσης 7.2 και 60 $\mu\text{g/mL}$. Για την ακρίβεια μεταξύ ημέρας χρησιμοποιηθήκαν τα δεδομένα από την μέρα που ήταν πιο ψηλά ενώ στην περίπτωση της ακρίβειας μεταξύ διαφορετικών ημερών υπολογίστηκε με ανάλυση της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα. Επιπλέον η % ανάκτηση εκφράστηκε από το 100- Er%, για το κάθε QC και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.3.

Η πιστότητα εκφράζει τη συμφωνία του μέσου όρου των πειραματικών τιμών μετά από πολλαπλή ανάλυση του ίδιου δείγματος και εκφράζεται με τον όρο % τυπική απόκλιση (CV% ή RSD%), σύμφωνα με την παρακάτω εήισηση.

$$\%RSD = \frac{\text{standard deviation of the concentration}}{\text{average concentration}} \times 100$$

Έτσι, η πιστότητα εκφράστηκε από % RSD για κάθε δείγμα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη της ακρίβειας για τα 2 δείγματα ελέγχου QC. Για την μεταξύ της ίδιας μέρας πιστότητα χρησιμοποιήθηκαν οι υψηλότερες τιμές των QC και για τη μεταξύ ημερών πιστότητα χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά 2 παράγοντες. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα Β.3.

Πίνακας Β.3: Μεταξύ της ίδιας ημέρας και διαφορετικών ημερών ακρίβεια και πιστότητα και ανάκτηση της μεθόδου προσδιορισμού της βου σουλφάνης σε υδατικά διαλύματα.

	QC (7.2 µg/mL)	QC1 (60 µg/mL)
Intraday accuracy (Er%)	-5.4	-4.5
Inter day accuracy (Er%)	1.2	-0.55
Recovery	105.4	104.5
Intraday precision RSD (%)	2.6	1.8
Inter day precision (RSD (%)	5.7	4.5

Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Πίνακας Γ.1: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ < 9 kg.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	0.00	0.00	25	0.00	0.00	25	0.00	0.00
30	0.00	0.00	30	0.00	0.00	30	0.00	0.00
40	0.00	0.00	40	0.00	0.00	40	0.00	0.00
50	6.2	1.5	50	27.1	6.8	50	38.6	9.66
60	52.7	13.2	60	75.6	18.9	60	83.5	20.87
70	103.9	26.0	70	90.8	22.7	70	104.3	26.07
80	105.9	26.5	80	105.3	26.3	80	106.4	26.60
90	110.6	27.7	90	112.4	28.1	90	106.9	26.72
100	114.9	28.7	100	113.9	28.5	100	115.1	28.78
110	115.3	28.8	110	112.2	28.1	110	114.8	28.71
120	113.3	28.3	120	111.1	27.8	120	113.9	28.48
130	114.6	28.6	130	103.0	25.7	130	115.9	28.98
134	109.4	27.3	134	104.9	26.2	134	115.3	28.82
144	108.4	27.1	144	109.4	27.3	144	118.8	29.70
154	108.4	27.1	154	110.8	27.7	154	112.6	28.16
164	93.1	23.3	164	97.3	24.3	164	112.8	28.20
174	92.8	23.2	174	97.7	24.4	174	92.3	23.07
184	78.2	19.6	184	84.0	21.0	184	47.0	11.74
194	37.6	9.4	194	20.5	5.1	194	21.0	5.25
199	17.7	4.4	199	6.6	1.6	199	7.3	1.82
204	9.3	2.3	204	3.1	0.8	204	2.7	0.68
209	8.3	2.1	209	0.00	0.00	209	0.8	0.20
214	2.5	0.6	214	0.00	0.00	214	0.00	0.00
219	0.00	0.00	219	0.00	0.00	219	0.00	0.00

Πίνακας Γ.2: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ < 9 kg.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50	23.99	16.46	68.61	6.00	4.11	68.61
60	70.59	15.98	22.64	17.65	4.00	22.64
70	99.63	7.69	7.72	24.91	1.92	7.72
80	105.88	0.58	0.54	26.47	0.14	0.54
90	109.96	2.81	2.56	27.49	0.70	2.56
100	114.65	0.65	0.57	28.66	0.16	0.57
110	114.10	1.65	1.45	28.53	0.41	1.45
120	112.78	1.48	1.31	28.19	0.37	1.31
130	111.16	7.12	6.40	27.79	1.78	6.40
134	109.87	5.19	4.72	27.47	1.30	4.72
144	112.20	5.74	5.11	28.05	1.43	5.11
154	110.60	2.11	1.91	27.65	0.53	1.91
164	101.06	10.39	10.28	25.26	2.60	10.28
174	94.25	3.00	3.19	23.56	0.75	3.19
184	69.75	19.94	28.58	17.44	4.98	28.58
194	26.35	9.74	36.95	6.59	2.43	36.95
199	10.51	6.24	59.43	2.63	1.56	59.43
204	5.05	3.72	73.59	1.26	0.93	73.59
209	3.02	4.56	151.07	0.75	1.14	151.07
214	0.83	1.45	173.21	0.21	0.36	173.21
219	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.3: εδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ 9-16 kg .

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	0.00	0.00	25	0.00	0.00	25	0.00	0.00
30	0.00	0.00	30	0.00	0.00	30	0.00	0.00
40	0.00	0.00	40	0.00	0.00	40	0.00	0.00
50	43.84	10.96	50	38.50	9.62	50	72.54	18.14
60	186.89	46.72	60	202.05	50.51	60	217.10	54.27
70	288.99	72.25	70	276.89	69.22	70	270.38	67.59
80	300.16	75.04	80	297.13	74.28	80	289.13	72.28
90	296.32	74.08	90	303.40	75.85	90	304.76	76.19
100	293.00	73.25	100	296.44	74.11	100	305.43	76.36
110	298.15	74.54	110	291.14	72.79	110	304.43	76.11
114	293.09	73.27	114	290.00	72.50	114	303.67	75.92
124	297.56	74.39	124	297.89	74.47	124	317.88	79.47
134	301.22	75.30	134	306.01	76.50	134	315.08	78.77
144	302.42	75.61	144	299.25	74.81	144	298.97	74.74
154	297.99	74.50	154	294.86	73.72	154	296.06	74.01
164	104.00	26.00	164	200.48	50.12	164	223.92	55.98
174	38.40	9.60	174	72.10	18.02	174	68.80	17.20
179	15.82	3.96	179	39.39	9.85	179	39.55	9.89
184	13.38	3.34	184	20.78	5.19	184	22.37	5.59
189	1.53	0.38	189	11.97	2.99	189	10.78	2.70
194	0.90	0.23	194	6.38	1.59	194	5.07	1.27
199	0.00	0.00	199	0.00	0.00	199	0.00	0.00

Πίνακας Γ.4: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ 9-16 kg.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50	51.63	18.31	35.46	12.91	4.58	35.46
60	202.01	15.11	7.48	50.50	3.78	7.48
70	278.75	9.44	3.39	69.69	2.36	3.39
80	295.47	5.70	1.93	73.87	1.42	1.93
90	301.49	4.53	1.50	75.37	1.13	1.50
100	298.29	6.42	2.15	74.57	1.60	2.15
110	297.91	6.65	2.23	74.48	1.66	2.23
114	295.59	7.17	2.43	73.90	1.79	2.43
124	304.44	11.64	3.82	76.11	2.91	3.82
134	307.44	7.04	2.29	76.86	1.76	2.29
144	300.21	1.92	0.64	75.05	0.48	0.64
154	296.30	1.58	0.53	74.08	0.39	0.53
164	176.13	63.56	36.09	44.03	15.89	36.09
174	59.77	18.58	31.08	14.94	4.64	31.08
179	31.59	13.65	43.22	7.90	3.41	43.22
184	18.84	4.80	25.47	4.71	1.20	25.47
189	8.10	5.71	70.58	2.02	1.43	70.58
194	4.12	2.86	69.50	1.03	0.72	69.50
199	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.5.α: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για το διάλυμα όγκου 30 ml.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	0.00	0.00	25	0.00	0.00	25	0.00	0.00
30	0.00	0.00	30	0.00	0.00	30	0.00	0.00
35	0.00	0.00	35	0.00	0.00	35	0.00	0.00
40	19.89	6.63	40	13.64	3.41	40	6.65	2.22
50	43.53	14.51	50	41.58	10.39	50	51.74	17.25
60	88.34	29.45	60	113.03	28.26	60	130.76	43.59
70	180.49	60.16	70	182.13	45.53	70	201.55	67.18
80	212.34	70.78	80	216.13	54.03	80	214.42	71.47
90	213.51	71.17	90	220.50	55.12	90	219.54	73.18
100	223.65	74.55	100	205.20	51.30	100	213.81	71.27
110	202.15	67.38	110	209.02	52.26	110	208.37	69.46
120	212.60	70.87	120	222.31	55.58	120	222.34	74.11
130	210.05	70.02	130	208.22	52.05	130	206.25	68.75
140	213.04	71.01	140	211.04	52.76	140	203.14	67.71
150	202.57	67.52	150	206.05	51.51	150	202.09	67.36
160	183.08	61.03	160	181.74	45.44	160	217.32	72.44
170	169.81	56.60	170	157.74	39.44	170	219.55	73.18
180	75.25	25.08	180	101.66	25.41	180	56.59	18.86
185	69.58	23.19	185	44.33	11.08	185	38.53	12.84
190	29.43	9.81	190	26.76	6.69	190	21.28	7.09
195	21.72	7.24	195	12.73	3.18	195	4.54	1.51
200	9.96	3.32	200	8.32	2.08	200	1.89	0.63
205	2.58	0.86	205	3.08	0.77	205	0.62	0.21

Πίνακας Γ.5.β: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για το διάλυμα όγκου 40 mL.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	0.00	0.00	25	0.00	0.00	25	0.00	0.00
30	5.40	1.80	30	1.31	0.44	30	1.02	0.34
40	88.49	29.50	40	58.46	19.49	40	80.61	26.87
50	131.55	43.85	50	125.07	41.69	50	141.86	47.29
60	171.03	57.01	60	163.89	54.63	60	186.09	62.03
70	180.47	60.16	70	171.11	57.04	70	178.34	59.45
80	180.62	60.21	80	175.44	58.48	80	178.12	59.37
90	177.26	59.09	90	182.13	60.71	90	189.41	63.14
100	178.07	59.36	100	192.69	64.23	100	189.64	63.21
110	176.89	58.96	110	193.82	64.61	110	183.28	61.09
115	176.32	58.77	115	189.91	63.30	115	181.02	60.34
125	177.41	59.14	125	183.96	61.32	125	175.78	58.59
135	181.23	60.41	135	184.44	61.48	135	178.43	59.48
145	171.62	57.21	145	169.61	56.54	145	178.43	59.48
155	171.44	57.15	155	109.01	36.34	155	129.74	43.25
165	160.55	53.52	165	41.35	13.78	165	41.55	13.85
170	8.85	2.95	170	14.92	4.97	170	19.14	6.38
175	1.90	0.63	175	10.61	3.54	175	8.96	2.99
180	0.41	0.14	180	4.02	1.34	180	2.26	0.75
185	0.00	0.00	185	0.00	0.00	185	0.00	0.00

Πίνακας Γ.6.α: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg) για διάλυμα όγκου 30 mL.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Flow (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
40	13.39	6.62	49.45	4.09	2.28	55.88
50	45.62	5.39	11.82	14.05	3.45	24.55
60	110.71	21.30	19.24	33.76	8.53	25.26
70	188.06	11.71	6.23	57.63	11.05	19.17
80	214.29	1.89	0.88	65.43	9.88	15.09
90	217.85	3.79	1.74	66.49	9.90	14.88
100	214.22	9.23	4.31	65.71	12.58	19.15
110	206.51	3.79	1.84	63.03	9.39	14.90
120	219.08	5.61	2.56	66.85	9.90	14.81
130	208.17	1.90	0.91	63.61	10.03	15.76
140	209.07	5.23	2.50	63.83	9.73	15.24
150	203.57	2.16	1.06	62.13	9.20	14.80
160	194.05	20.17	10.39	59.63	13.56	22.73
170	182.37	32.76	17.96	56.41	16.87	29.92
180	77.83	22.65	29.10	23.12	3.69	15.97
185	50.81	16.51	32.49	15.71	6.54	41.66
190	25.82	4.15	16.08	7.86	1.70	21.58
195	13.00	8.59	66.09	3.98	2.94	74.00
200	6.72	4.26	63.45	2.01	1.35	67.00
205	2.09	1.30	62.21	0.61	0.35	57.92

Πίνακας Γ.6.β: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg για διάλυμα όγκου 40 mL.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30	2.58	2.45	95.20	0.86	0.82	95.20
40	75.85	15.57	20.53	25.28	5.19	20.53
50	132.83	8.47	6.37	44.28	2.82	6.37
60	173.67	11.33	6.53	57.89	3.78	6.53
70	176.64	4.90	2.78	58.88	1.63	2.78
80	178.06	2.59	1.45	59.35	0.86	1.45
90	182.93	6.11	3.34	60.98	2.04	3.34
100	186.80	7.71	4.13	62.27	2.57	4.13
110	184.66	8.55	4.63	61.55	2.85	4.63
115	182.41	6.90	3.78	60.80	2.30	3.78
125	179.05	4.33	2.42	59.68	1.44	2.42
135	181.37	3.01	1.66	60.46	1.00	1.66
145	173.22	4.62	2.67	57.74	1.54	2.67
155	136.73	31.79	23.25	45.58	10.60	23.25
165	81.15	68.76	84.74	27.05	22.92	84.74
170	14.30	5.17	36.17	4.77	1.72	36.17
175	7.15	4.62	64.62	2.38	1.54	64.62
180	2.23	1.81	80.99	0.74	0.60	80.99
185	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.7: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ 23-34 kg.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	9.33	3.90	25	18.17	7.87	25	10.31	4.47
30	20.53	8.90	30	109.58	47.49	30	81.73	35.42
40	95.69	41.47	40	248.66	107.75	40	179.60	77.83
50	250.65	108.61	50	251.74	109.09	50	209.83	90.93
60	256.22	111.03	60	263.58	114.22	60	275.76	119.49
70	278.64	120.75	70	278.84	120.83	70	277.04	120.05
80	273.22	118.40	80	283.66	122.92	80	280.32	121.47
90	274.40	118.91	90	280.29	121.46	90	279.56	121.14
100	277.87	120.41	100	284.13	123.12	100	280.15	121.40
110	281.67	122.06	110	282.17	122.27	110	283.04	122.65
120	284.77	123.40	120	272.69	118.17	120	267.85	116.07
130	258.05	111.82	130	250.23	108.43	130	246.66	106.89
140	224.67	97.36	140	233.69	101.27	140	238.92	103.53
150	198.88	86.18	150	182.87	79.24	150	233.34	101.12
156	87.20	37.79	156	62.70	27.17	156	63.88	27.68
161	39.11	16.95	161	29.88	12.95	161	29.62	12.84
166	16.79	7.28	166	16.63	7.21	166	12.50	5.42
171	9.67	4.19	171	6.50	2.81	171	2.31	1.00
176	8.65	3.75	176	1.36	0.59	176	0.42	0.18
181	0.00	0.00	181	0.00	0.00	181	0.00	0.00
186	0.00	0.00	186	0.00	0.00	186	0.00	0.00

Πίνακας Γ.8: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ 16-23 kg

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	9.49	9.11	95.99	4.11	3.95	95.99
30	70.61	45.56	64.51	30.60	19.74	64.51
40	174.65	76.60	43.86	75.68	33.19	43.86
50	237.40	23.88	10.06	102.88	10.35	10.06
60	265.19	9.87	3.72	114.91	4.28	3.72
70	278.17	0.99	0.36	120.54	0.43	0.36
80	279.07	5.33	1.91	120.93	2.31	1.91
90	278.08	3.21	1.15	120.50	1.39	1.15
100	280.71	3.17	1.13	121.64	1.37	1.13
110	282.29	0.69	0.25	122.33	0.30	0.25
120	275.10	8.72	3.17	119.21	3.78	3.17
130	251.64	5.83	2.31	109.05	2.52	2.31
140	232.43	7.21	3.10	100.72	3.12	3.10
150	205.03	25.80	12.58	88.85	11.18	12.58
156	71.26	13.82	19.39	30.88	5.99	19.39
161	32.87	5.40	16.44	14.24	2.34	16.44
166	15.31	2.43	15.88	6.63	1.05	15.88
171	6.16	3.69	59.99	2.67	1.60	59.99
176	3.48	4.50	129.60	1.51	1.95	129.60
181	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
186	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.9: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας ΒΣ >34 kg.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	26.10	11.31	25	11.19	4.85	25	6.33	2.74
30	101.21	43.86	30	78.92	34.20	30	75.35	32.65
40	181.17	78.51	40	175.37	75.99	40	165.59	71.75
50	193.71	83.94	50	204.33	88.54	50	205.86	89.21
60	214.97	93.16	60	211.44	91.62	60	213.98	92.72
70	220.47	95.54	70	211.61	91.70	70	213.48	92.51
80	221.46	95.97	80	222.11	96.25	80	219.49	95.11
90	219.35	95.05	90	221.98	96.19	90	218.04	94.49
100	213.28	92.42	100	224.37	97.23	100	222.60	96.46
110	211.08	91.47	110	218.73	94.78	110	216.16	93.67
120	204.73	88.72	120	207.70	90.00	120	208.81	90.48
130	202.20	87.62	130	203.00	87.97	130	202.54	87.77
140	191.61	83.03	140	197.79	85.71	140	192.30	83.33
150	101.00	43.77	150	117.24	50.80	150	132.43	57.39
154	34.73	15.05	154	41.45	17.96	154	41.35	17.92
159	10.13	4.39	159	17.44	7.56	159	29.90	12.95
164	2.32	1.00	164	8.68	3.76	164	7.54	3.27
169	0.11	0.05	169	1.87	0.81	169	1.54	0.67
174	0.00	0.00	174	0.00	0.00	174	0.00	0.00
179	0.00	0.00	179	0.00	0.00	179	0.00	0.00
184	0.00	0.00	184	0.00	0.00	184	0.00	0.00

Πίνακας Γ.10: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας ΒΣ >34 kg.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	14.54	10.30	70.84	6.30	4.46	70.84
30	85.16	14.02	16.46	36.90	6.07	16.46
40	174.04	7.88	4.53	75.42	3.41	4.53
50	201.30	6.62	3.29	87.23	2.87	3.29
60	213.46	1.82	0.85	92.50	0.79	0.85
70	215.19	4.67	2.17	93.25	2.02	2.17
80	221.02	1.37	0.62	95.77	0.59	0.62
90	219.79	2.01	0.91	95.24	0.87	0.91
100	220.09	5.96	2.71	95.37	2.58	2.71
110	215.32	3.89	1.81	93.31	1.69	1.81
120	207.08	2.10	1.02	89.73	0.91	1.02
130	202.58	0.40	0.20	87.78	0.17	0.20
140	193.90	3.38	1.74	84.02	1.47	1.74
150	116.89	15.72	13.45	50.65	6.81	13.45
154	39.18	3.85	9.82	16.98	1.67	9.82
159	19.16	9.99	52.16	8.30	4.33	52.16
164	6.18	3.40	54.95	2.68	1.47	54.95
169	1.17	0.93	79.75	0.51	0.41	79.75
174	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
179	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
184	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.10.α: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού για διάλυμα όγκου 50 mL.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	0.92	0.38	25	0.92	0.38	25	1.93	0.81
30	29.51	12.30	30	57.57	23.99	30	55.22	23.01
40	206.56	86.06	40	135.41	56.42	40	165.48	68.95
50	232.36	96.82	50	212.02	88.34	50	224.98	93.74
60	238.33	99.31	60	240.75	100.31	60	241.15	100.48
70	245.73	102.39	70	235.11	97.96	70	235.78	98.24
80	244.15	101.73	80	236.49	98.54	80	238.03	99.18
90	244.17	101.74	90	242.61	101.09	90	238.36	99.32
100	245.65	102.35	100	232.23	96.76	100	243.17	101.32
110	243.48	101.45	110	233.35	97.23	110	246.79	102.83
120	244.50	101.87	120	239.77	99.90	120	245.65	102.35
130	232.54	96.89	130	225.39	93.91	130	238.89	99.54
140	221.53	92.31	140	229.53	95.64	140	245.47	102.28
150	221.53	92.31	150	227.23	94.68	150	223.52	93.13
160	184.45	76.85	160	139.02	57.93	160	114.35	47.65
168	78.79	32.83	168	47.20	19.67	168	38.20	15.92
173	51.04	21.27	173	21.00	8.75	173	19.59	8.16
178	30.09	12.54	178	19.77	8.24	178	13.18	5.49
183	17.83	7.43	183	10.46	4.36	183	8.83	3.68
188	14.22	5.92	188	9.08	3.78	188	8.55	3.56
193	0.00	0.00	193	0.00	0.00	193	0.00	0.00
198	0.00	0.00	198	0.00	0.00	198	0.00	0.00

Πίνακας Γ.10.β: Δεδομένα της συγκέντρωσης (C, $\mu\text{g/mL}$) και του amount per min (ρυθμός εξόδου, $\mu\text{g/min}$) της βουσουλφάνης για τους χρόνους που λήφθηκαν δείγματα στις τρεις εγχύσεις της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού για διάλυμα όγκου 60 mL.

Run 1			Run 2			Run 3		
TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	TIME (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)
5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00
10	0.00	0.00	10	0.00	0.00	10	0.00	0.00
15	0.00	0.00	15	0.00	0.00	15	0.00	0.00
20	0.00	0.00	20	0.00	0.00	20	0.00	0.00
25	9.97	4.99	25	6.04	3.02	25	8.41	4.20
30	46.62	23.31	30	39.61	19.80	30	67.69	33.85
40	118.28	59.14	40	148.53	74.26	40	139.02	69.51
50	139.40	69.70	50	182.59	91.30	50	188.43	94.22
60	199.38	99.69	60	199.71	99.86	60	196.61	98.31
70	192.84	96.42	70	207.92	103.96	70	210.35	105.18
80	199.93	99.97	80	207.68	103.84	80	212.60	106.30
90	195.67	97.83	90	206.97	103.48	90	212.44	106.22
100	192.14	96.07	100	208.78	104.39	100	209.11	104.56
110	197.02	98.51	110	211.89	105.94	110	204.30	102.15
120	199.07	99.54	120	191.84	95.92	120	197.33	98.67
130	189.10	94.55	130	190.84	95.42	130	114.34	57.17
140	190.48	95.24	140	167.38	83.69	140	38.74	19.37
150	171.87	85.93	150	139.94	69.97	150	19.58	9.79
160	47.90	23.95	160	38.21	19.10	160	13.25	6.63
165	23.39	11.70	165	15.48	7.74	165	8.85	4.43
170	13.18	6.59	170	9.14	4.57	170	8.61	4.31
175	16.19	8.10	175	7.48	3.74	175	7.44	3.72
180	14.76	7.38	180	6.77	3.38	180	6.70	3.35
185	0.00	0.00	185	0.00	0.00	185	0.00	0.00
190	0.00	0.00	190	0.00	0.00	190	0.00	0.00

Πίνακας Γ.11.α: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$) και το ρυθμό εξόδου ($\mu\text{g/min}$) της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού για το διάλυμα όγκου 50 mL.

Time (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου ($\mu\text{g/min}$)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	1.26	0.59	46.69	0.52	0.24	46.69
30	47.43	15.56	32.81	19.76	6.48	32.81
40	169.15	35.72	21.11	70.48	14.88	21.11
50	223.12	10.30	4.62	92.97	4.29	4.62
60	240.08	1.53	0.64	100.03	0.64	0.64
70	238.87	5.95	2.49	99.53	2.48	2.49
80	239.56	4.05	1.69	99.82	1.69	1.69
90	241.71	3.01	1.24	100.71	1.25	1.24
100	240.35	7.14	2.97	100.14	2.98	2.97
110	241.21	7.00	2.90	100.50	2.92	2.90
120	243.30	3.12	1.28	101.38	1.30	1.28
130	232.27	6.76	2.91	96.78	2.82	2.91
140	232.18	12.18	5.25	96.74	5.08	5.25
150	224.09	2.89	1.29	93.37	1.20	1.29
160	145.94	35.55	24.36	60.81	14.81	24.36
168	54.73	21.32	38.95	22.80	8.88	38.95
173	30.54	17.76	58.15	12.73	7.40	58.15
178	21.01	8.52	40.55	8.76	3.55	40.55
183	12.37	4.80	38.79	5.15	2.00	38.79
188	10.62	3.13	29.47	4.42	1.30	29.47
193	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
198	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.11.β: Μέση τιμή, τυπική απόκλιση και σχετική τυπική απόκλιση για την συγκέντρωση (μg/ml) και το ρυθμό εξόδου (μg/min) της κατηγορίας έγχυσης μέσω ασκού για το διάλυμα όγκου 60 mL.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Ρυθμός εξόδου(μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	8.14	1.98	24.31	4.07	0.99	24.31
30	51.31	14.62	28.49	25.65	7.31	28.49
40	135.28	15.47	11.44	67.64	7.73	11.44
50	170.14	26.78	15.74	85.07	13.39	15.74
60	198.57	1.70	0.86	99.28	0.85	0.86
70	203.70	9.48	4.66	101.85	4.74	4.66
80	206.74	6.39	3.09	103.37	3.19	3.09
90	205.03	8.55	4.17	102.51	4.28	4.17
100	203.35	9.70	4.77	101.67	4.85	4.77
110	204.40	7.43	3.64	102.20	3.72	3.64
120	196.08	3.78	1.93	98.04	1.89	1.93
130	164.76	43.67	26.51	82.38	21.84	26.51
140	132.20	81.76	61.84	66.10	40.88	61.84
150	110.46	80.31	72.71	55.23	40.16	72.71
160	33.12	17.87	53.96	16.56	8.94	53.96
165	15.91	7.28	45.77	7.95	3.64	45.77
170	10.31	2.50	24.21	5.16	1.25	24.21
175	10.37	5.04	48.62	5.19	2.52	48.62
180	9.41	4.63	0.00	4.71	2.32	0.00
185	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
190	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.12: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για την συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{min}$) και το ρυθμό ($\mu\text{g}/\text{min}$) για το διάλυμα των 70 mL.

Time (min)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SD	RSD%	Flow ($\mu\text{g}/\text{min}$)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.44	0.24	0.00	0.26	0.14	53.67
20	1.91	1.79	0.00	1.11	1.04	93.63
25	31.01	14.68	0.00	18.09	8.56	47.34
30	135.20	32.01	0.00	78.87	18.67	23.68
40	204.97	20.92	0.00	119.57	12.20	10.20
50	222.65	2.53	1.14	129.88	1.48	1.14
60	222.24	3.88	1.75	129.64	2.26	1.75
70	217.77	1.01	0.46	127.03	0.59	0.46
80	217.07	4.05	1.87	126.62	2.37	1.87
90	219.07	4.40	2.01	127.79	2.57	2.01
100	222.06	3.02	1.36	129.54	1.76	1.36
110	218.81	3.39	1.55	127.64	1.98	1.55
120	219.64	4.34	1.97	128.13	2.53	1.97
130	215.38	5.32	2.47	125.64	3.10	2.47
140	197.10	25.06	12.72	114.97	14.62	12.72
150	170.43	36.83	21.61	99.42	21.48	21.61
155	45.78	7.64	16.70	26.70	4.46	16.70
160	26.63	3.14	11.78	15.53	1.83	11.78
165	19.58	6.16	31.47	11.42	3.60	31.47
170	15.63	0.31	2.00	9.12	0.18	2.00
175	10.31	5.37	52.05	6.02	3.13	52.05
180	7.06	3.62	51.26	4.12	2.11	51.26
185	3.04	2.02	66.57	1.77	1.18	66.57

Πίνακας Γ.13: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για την συγκέντρωση (μg/min) και το ρυθμό (μg/min) για το διάλυμα των 80 mL.

Time (min)	C (μg/mL)	SD	RSD%	Flow (μg/min)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.55	0.41	74.27	0.36	0.27	74.27
20	54.75	38.26	69.88	36.50	25.51	69.88
25	245.16	25.76	10.51	163.44	17.17	10.51
35	252.38	24.49	9.70	168.25	16.33	9.70
45	254.81	36.58	14.35	169.87	24.38	14.35
55	265.49	17.53	6.60	176.99	11.69	6.60
65	270.30	20.91	7.74	180.20	13.94	7.74
75	259.26	27.81	10.73	172.84	18.54	10.73
85	258.73	13.12	5.07	172.49	8.75	5.07
95	266.06	20.92	7.86	177.38	13.95	7.86
105	266.96	11.77	4.41	177.97	7.85	4.41
115	272.89	10.86	3.98	181.92	7.24	3.98
118	273.16	13.88	5.08	182.11	9.26	5.08
128	284.28	2.76	0.97	189.52	1.84	0.97
138	187.43	9.93	5.30	124.95	6.62	5.30
148	64.81	28.89	44.58	43.20	19.26	44.58
153	20.97	10.65	50.81	13.98	7.10	50.81
158	14.35	4.13	28.76	9.57	2.75	28.76
163	12.92	3.99	30.87	8.61	2.66	30.87
168	7.99	0.66	8.22	5.33	0.44	8.22
173	5.83	2.11	36.15	3.89	1.41	36.15
178	3.39	4.97	146.78	2.26	3.31	146.78
183	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Πίνακας Γ.14: Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέσης τιμής, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για την συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{min}$) και το ρυθμό ($\mu\text{g}/\text{min}$) για το διάλυμα των 90 mL.

Time (min)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SD	RSD%	Flow ($\mu\text{g}/\text{min}$)	SD	RSD %
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	3.99	2.46	61.80	2.32	1.44	61.80
15	16.05	3.06	19.08	9.36	1.79	19.08
20	20.96	4.93	23.53	12.23	2.88	23.53
25	114.75	12.98	11.31	66.94	7.574	11.31
35	170.61	26.24	15.38	99.52	15.31	15.38
45	176.36	6.02	0.00	102.87	3.51	3.41
55	189.48	14.64	7.72	110.53	8.54	7.72
65	206.08	4.73	2.30	120.21	2.76	2.30
75	203.71	4.03	1.98	118.83	2.35	1.98
85	204.76	2.19	1.07	119.44	1.28	1.07
95	206.58	6.40	3.10	120.51	3.73	3.10
105	203.62	2.59	1.27	118.78	1.51	1.27
115	202.27	3.56	1.76	117.99	2.08	1.76
118	202.49	2.14	1.06	118.12	1.25	1.06
128	212.50	7.78	3.66	123.96	4.54	3.66
138	120.20	81.27	67.61	70.12	47.41	67.61
148	41.11	32.19	78.31	23.98	18.78	78.31
153	22.52	14.28	63.40	13.14	8.33	63.40
158	18.81	6.59	35.05	10.98	3.85	35.05
163	15.06	7.18	47.69	8.79	4.19	47.69
168	6.44	2.86	44.42	3.76	1.67	44.42
173	0.00	2.65	0.00	0.00	0.00	0.00

Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής

Τίτλος SOP	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ BUSULFAN
Συγγραφείς	Νερούτσος Ε., Δοκουμετζίδης Α. Βαλσαμή Γ.
Ημερομηνία	05/06/2014
Έκδοση	1.1



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής

1	ΣΚΟΠΟΣ.....	3
2	ΠΛΑΙΣΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ.....	3
3	Διαδικασία.....	3
4	Διαδικασία Συλλογής Καταγραφής- Δειγμάτων.....	3
5	Επεξεργασία Δειγμάτων.....	3
6	Διαδικασία Αποστολής.....	4
7	Ανάλυση δειγμάτων – επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	4
8	Αποστολή Αποτελεσμάτων.....	5



1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εφαρμογής είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων Busilvex στον ορό και η τροποποίηση της δόσης σε παιδιατρικούς ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (AMMO).

1 ΠΛΑΙΣΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η παρούσα εφαρμογή πραγματοποιείται στη Μονάδα Μεταμόσχευση Μυελού των οστών στο παιδιατρικό ογκολογικό Νοσοκομείο « Η Αγία Σοφία» σε ασθενείς που υποβάλλονται σε AMMO και λαμβάνουν θεραπεία με Busilvex.

2 Διαδικασία

Το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής ενημερώνεται μια εβδομάδα πριν με επικοινωνία με τον κ Νερούτσο Τηλ. 210727419, 6974218795, ή με τον κ. Δοκουμετζήδη 2107274122, ή με την κ. Βαλασμή 2107274022.

Τρεις ημέρες πριν την αποστολή των δειγμάτων θα υπάρξει γραπτή επικοινωνία με μήνυμα ηλεκτρονικού ταχυδρομείου **E-mail: enerouts@pharm.uoa.gr** που θα επιβεβαιώνεται η αποστολή των δειγμάτων.

3 Διαδικασία Συλλογής Καταγραφής- Δειγμάτων

Στο **ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN (Παράρτημα Α)** συμπληρώνονται τα μέρη: **Α. Στοιχεία Ασθενούς (πεδία 1-6)** και **Β. Χορήγηση Busulfan (πεδία 7-9 και με το τέλος της έγχυσης συμπληρώνεται το πεδίο 10)**

Λαμβάνονται 7-8 cc αίματος σε φιαλίδια ηπαρίνης, από περιφερική φλέβα.

Στο **ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN (Παράρτημα Α)** συμπληρώνεται το μέρος **Γ Πίνακας Δειγματοληψίας Busulfan** ως εξής: Το πρώτο δείγμα παραλαμβάνεται αμέσως πριν την έγχυση της busulfan, συμπληρώνεται το **πεδίο 11**.

Το δεύτερο δείγμα παραλαμβάνεται αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης (3 ώρες μετά την έναρξη) συμπληρώνεται το **πεδίο 12**

Το τρίτο δείγμα παραλαμβάνεται 1 ώρα μετά από το τέλος της έγχυσης (4 ώρες μετά την έναρξη) συμπληρώνεται το **πεδίο 13**

Το τελευταίο δείγμα παραλαμβάνεται 3 ώρες μετά το τέλος της έγχυσης (6 ώρες μετά την έναρξη) συμπληρώνεται το **πεδίο 14**

4 Επεξεργασία Δειγμάτων

Κάθε φιαλίδιο δείγματος αίματος φυγοκεντρείται αμέσως μετά την αιμοληψία στις 4000rpm για 10 min και παραλαμβάνεται το πλάσμα το οποίο τοποθετείται σε 2 erpendorf (~2cc/ erpendorf).



Το πλάσμα φυλάσσεται σε ψυγείο στους -20 °C μέχρι την ώρα αποστολής

5 Διαδικασία Αποστολής

Αποστέλλονται στο , Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Ταχ. Δ/ση: Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου 157 71, Αθήνα, Τηλ: 2107274198, Κινητό Τηλ: 6974218795 υπόψη κ. Νερούτσου.

Μόλις παραληφθούν τα δείγματα από την εταιρία ταχυμεταφοράς ενημερώνεται το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής για την προβλεπόμενη ώρα άφιξής τους.

Σε κάθε αποστολή θα επισυνάπτονται σε φάκελο τα αποτελέσματα από τον τελευταίο πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο του ασθενούς, καθώς και η συμπληρωμένη φόρμα ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN παράρτημα Α.

6 Ανάλυση δειγμάτων – επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση γίνεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.

Ο πραγματικός χρόνος δειγματοληψίας και οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις Busulfan εισάγονται στο Microsoft Office Excel και υπολογίζεται το AUC_{trap} με τον κανόνα των τραπεζών σε μονάδες $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ μέχρι το τελευταίο σημείο δειγματοληψίας σε χρόνο 6 h και συγκέντρωση C_6 . Στη συνέχεια εκτιμάται με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης από τα 3 τελευταία (λογαριθμίζοντας τις συγκεντρώσεις (ln)) η τελική κλίση η οποία αντιστοιχεί στη σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης k_{el} (1/h). Το ολικό AUC_{total} ($\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$AUC_{total} = AUC_{trap} + \frac{C_6}{k_{el}}$$

και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μονάδες $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ πολλαπλασιαζόμενο με τον συντελεστή 243.6.

Η Κάθαρση (L/h/Kg) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Κάθαρση = \frac{Δόση}{AUC_{total}}$$

Εάν το υπολογιζόμενο AUC δεν βρίσκεται εντός του θεραπευτικού εύρους 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ γίνεται τροποποίηση της δόσης με θεραπευτικό στόχο $AUC = 1150 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ σύμφωνα με τον τύπο:

$$DOSE_{adjusted} = \frac{DOSE_{initial} \times 1500}{AUC_{total}}$$



Όπου, $DOSE_{adjusted}$: Διορθωμένη δόση

$DOSE_{initial}$: αρχική δόση

AUC_{total} : το υπολογιζόμενο AUC σε μονάδες $\mu M \cdot \min$

7 Αποστολή Αποτελεσμάτων

Στη φόρμα **Αποτελέσματα Ανάλυσης Busulfan (Παράρτημα Β)** συμπληρώνονται τα μέρη:

Α. Στοιχεία Ασθενούς: Όνομα (ID) ασθενούς, Ημερομηνία δόσης, Αρχική δόση busulfan (Πεδία 1-3),

Β. Μετρήσεις busulfan: ο πραγματικός χρόνος (Πεδίο 4), οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις Busulfan (Πεδίο 5) με τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα (Πεδίο 6).

Γ. Υπολογισμός ΦΚ παραμέτρων: η υπολογιζόμενη τιμή AUC σε μονάδες $\mu g/ml \cdot h$ (Πεδίο 7), η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης k_{el} (1/h) (Πεδίο 8) και η **Κάθαρση (L/h/Kg)** (Πεδίο 9), η υπολογιζόμενη τιμή **Total AUC** σε μονάδες $\mu g/ml \cdot h$ (Πεδίο 10) και σε μονάδες $\mu M \cdot \min$ (Πεδίο 11).

Δ. Διόρθωση δόσης busulfan: Στο πεδίο 12 συμπληρώνεται η νέα εξατομικευμένη δόση Busulfan για τον ασθενή.

Η φόρμα υπογράφεται από τον υπεύθυνο ανάλυσης/εξατομίκευσης

Η συμπληρωμένη φόρμα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN (Παράρτημα Β) αποστέλλεται με e-mail στον Υπεύθυνο Μονάδας Μεταμόσχευσης κ. Γραφάκο πριν τα μεσάνυχτα.



Το πλάσμα φυλάσσεται σε ψυγείο στους -20 °C μέχρι την ώρα αποστολής

5 Διαδικασία Αποστολής

Αποστέλλονται στο , Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Ταχ. Δ/ση: Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου 157 71, Αθήνα, Τηλ: 2107274198, Κινητό Τηλ: 6974218795 υπόψη κ. Νερούτσου.

Μόλις παραληφθούν τα δείγματα από την εταιρία ταχυμεταφοράς ενημερώνεται το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής για την προβλεπόμενη ώρα άφιξης τους.

Σε κάθε αποστολή θα επισυνάπτονται σε φάκελο τα αποτελέσματα από τον τελευταίο **πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο του ασθενούς**, καθώς και η συμπληρωμένη φόρμα **ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN παράρτημα Α**.

6 Ανάλυση δειγμάτων – επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση γίνεται με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.

Ο πραγματικός χρόνος δειγματοληψίας και οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις Busulfan εισάγονται στο Microsoft Office Excel και υπολογίζεται το **AUC_{trap}** με τον κανόνα των τραπεζίων σε μονάδες $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ μέχρι το τελευταίο σημείο δειγματοληψίας σε χρόνο 6 h και συγκέντρωση C_6 . Στη συνέχεια εκτιμάται με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης από τα 3 τελευταία (λογαριθμίζοντας τις συγκεντρώσεις (ln)) η τελική κλίση η οποία αντιστοιχεί στη σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης **k_{el} (1/h)**. Το ολικό **AUC_{total} ($\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$)** υπολογίζεται από τον τύπο:

$$AUC_{total} = AUC_{trap} + \frac{C_6}{k_{el}}$$

και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μονάδες **$\mu\text{M} \cdot \text{min}$** πολλαπλασιαζόμενο με τον συντελεστή **243.6**.

Η **Κάθαρση (L/h/Kg)** υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Κάθαρση} = \frac{\text{Δόση}}{AUC_{total}}$$

Εάν το υπολογιζόμενο **AUC** δεν βρίσκεται εντός του θεραπευτικού εύρους 900-1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ γίνεται τροποποίηση της δόσης με θεραπευτικό στόχο **AUC= 1125 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$** σύμφωνα με τον τύπο:

$$Dose_{adjusted} = \frac{Dose_{initial} \times 1125}{AUC_{total}}$$



Παράρτημα Α. ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN

Α. Στοιχεία Ασθενούς

Όνομα (ID) ασθενούς	1
Βάρος	2
IBW	
Ύψος	3
Ηλικία	4
Φύλο	5
Συγχωρηγούμενα φάρμακα	6
Ασθένεια	

Β. Χορήγηση Busulfan

Δόση busulfan IV (μονάδες)	7	mg/kg		mg
Ημερομηνία Έγχυσης	8	(_____)		
Έναρξη έγχυσης	9	(____ : ____ π.μ./μ.μ.)		
Τέλος έγχυσης	10	(____ : ____ π.μ./μ.μ.)		
Ώρα Ξεπλύματος				

Γ. Πίνακας Δειγματοληψίας Busulfan

	Θεωρητικός δειγματοληψίας	χρόνος	Ακριβής δειγματοληψίας (Ω Ω:Λ Λ π.μ./μ.μ.)	χρόνος
1 ^η αιμοληψία	Πριν την χορήγηση Busulfan	(0 h)	11(____ : ____ π.μ./μ.μ.)	
2 ^η αιμοληψία	Αμέσως μετά το τέλος της έγχυσης Busulfan (~2-3h από την έναρξη της χορήγησης συμπεριλαμβανομένου και του ξεπλύματος)		12(____ : ____ π.μ./μ.μ.)	
3 ^η αιμοληψία	3 0min μετά το τέλος της έγχυσης (2h και 30min από την έναρξη της χορήγησης)		13(____ : ____ π.μ./μ.μ.)	
4 ^η αιμοληψία	1h μετά το τέλος της έγχυσης (4h από την έναρξη της χορήγησης)		14(____ : ____ π.μ./μ.μ.)	
5 ^η αιμοληψία	3h μετά το τέλος της έγχυσης (6h από την έναρξη της χορήγησης)		15(____ : ____ π.μ./μ.μ.)	

Υπεύθυνος αποστολή



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικών και Καποδιστριακών
Πανεπιστημίων Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής

Παράρτημα Β. ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικών και Καποδιστριακών
Πανεπιστημίων Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής
- Φαρμακοκινητικής

ΠΡΟΣ : Σ. Γραφάκος ΜΜΟ ΠΓΝ Παιδών «Αγία Σοφία» s.graphakos@paidon-agiasofia.gr

ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ: Γ. Βαλαμή, Α. Δοκουμετζιδης

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: 22/10/2015

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ BUSULFAN

Α. Στοιχεία Ασθενή

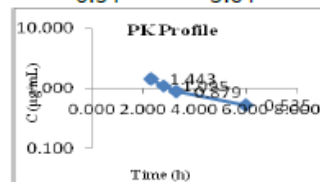
Όνομα (ID)	Παπαδοπούλου Μαρία		
ασθενούς	22/10/2015		
Ημερομηνία δόσης	22/10/2015		
Αρχική δόση busulfan	1 mg/kg	ή	51.5 mg
Βάρος	51.5 kg		

Β. Μετρήσεις επιπέδων busulfan στο πλάσμα

Ώρα λήψης	Πραγματικός χρόνος (h)	Συγκέντρωση (μg/mL)	RSD %
19:15	0.00	0.56	0.84
21:33	2.30	1.44	3.40
22:03	2.80	1.09	2.72
22:33	3.30	0.88	9.91
1:15	6.00	0.54	3.64

Γ. Υπολογισμός ΦΚ παραμέτρων

ΦΚ παράμετρος	Τιμή
AUC _{0-6h} (από εμβαδό) (μg/ml • h)	5.35
kel (1/h)	0.25
t _{1/2} (h)	2.8
Κάθαρση (L/h)	9.63
Ολικό AUC _{total} (μg/ml • h)	5.35
Ολικό AUC _{total} (μM • min)	1302.4



TR : 900-1350 μM • min

Δ. Διόρθωση Δόσης Busulfan

Εξατομικευμένη δόση busulfan	0.86 mg/kg	ή	44.5 mg
Προτεινόμενη δόση	1.0 mg/kg	ή	51.5 mg

Παρατηρήσεις

- Η ασθενής βρίσκεται εντός θεραπευτικού εύρους με AUC=1302.4 μM*min.
- Κατά συνέπεια δεν προτείνεται τροποποίηση της δόσης.

Υπογραφή

Νερούτσος Ευθύμιος

Πίνακας Δ.1: Υπολογισμένες τιμές AUC με και χωρίς χρόνο υστέρησης ανά κατηγορία βάρους σώματος/δόσης σύμφωνα με το SPC του Busilvex®.

Κατηγορία SPC	ID	Dose mg/kg	WT (kg)	Volume (mL)	Flow (mL/h)	AUC _{no-lag} (μM*min)	AUC _{lag} (μM*min)	AUC _{no-lag} -AUC _{lag}	(AUC _{no-lag} -AUC _{lag})/AUC _{no-lag} %	T lag (min)
1	1	1	7.6	13.93	6.97	716.2	664.7	51.5	7.2	40
	2	1	8.4	15.4	7.7	935.0	873.1	61.9	6.6	40
	3	1	7.38	13.53	6.765	892.4	822.8	69.6	7.8	40
	4	1	8.7	15.95	7.975	668.7	611.3	57.4	8.6	40
2	5	1.2	12	26	13	1099.1	982.9	116.2	10.6	40
	6	1.2	13	29	14	956.5	899.4	57.1	6.0	35
	7	1.2	11	24	12	705.4	653.1	52.3	7.4	40
	8	1.2	14	31	15	901.7	823.5	78.2	8.7	35
	9	1.2	14	31	15	1251.2	1203.6	47.6	3.8	35
	10	1.2	10.7	24	12	1105.0	1020.3	84.7	7.7	40
	11	1.2	12	26	13	1105.8	1015.2	90.6	8.2	40
	12	1.2	14	31	15	840.2	786.2	54.0	6.4	35
	13	1.2	13	29	14	943.8	838.3	105.5	11.2	35
	14	1.2	12	26	13	743.7	682.0	61.7	8.3	40
	15	1.2	14	28	14	954.9	860.2	94.7	9.9	35
	16	1.2	14.5	32	16	812.3	738.0	74.3	9.1	35
	17	1.2	15	33	17	1918.4	1833.4	85.0	4.4	35
	18	1.2	11.5	25	13	681.1	617.7	63.3	9.3	40
	19	1.2	10.5	31	15	661.1	612.8	48.3	7.3	35
	20	1.2	9.2	20	10	1312.0	1235.5	76.6	5.8	40
	21	1.2	11.5	25	13	694.5	639.8	54.7	7.9	40
	22	1.2	10.9	24	12	1135.8	1009.5	126.2	11.1	40
	23	1.2	9.8	22	11	945.6	871.5	74.1	7.8	40
	24	1.2	13.5	30	15	1306.0	1224.9	81.1	6.2	40
3	25	1.1	18	36	18	1771.4	1709.7	61.6	3.5	25
	26	1.1	20	40	20	903.5	862.4	41.1	4.5	25
	27	1.1	22	44	22	721.7	689.6	32.0	4.4	25
	28	1.1	18	36	18	1295.0	1218.3	76.6	5.9	25
	29	1.1	18	36	18	600.2	565.7	34.5	5.8	25
	30	1.1	17	34	17	1222.5	1160.7	61.8	5.1	35
	31	1.1	16	32	16	1035.1	967.3	67.8	6.5	35
	32	1.1	21	42	21	667.1	618.7	48.4	7.3	25
	33	1.1	18.1	37	18	1331.7	1275.7	56.0	4.2	25
	34	1.1	26.7	54	27	890.0	810.1	79.9	9.0	25
	35	1.1	17.2	35	17	1575.4	1506.4	69.0	4.4	30
	36	1.1	19.5	39	20	908.8	864.4	44.4	4.9	25
	37	1.1	20	40	20	995.4	945.6	49.8	5.0	25

Κατηγορία SPC	ID	Dose mg/kg	WT (kg)	Volume (mL)	Flow (mL/h)	AUC _{no lag} (μM*min)	AUC _{lag} (μM*min)	AUC _{no lag} / AUC _{lag}	(AUC _{no lag} / AUC _{lag}) / AUC _{no lag} %	T lag (min)
4	38	0.95	27.5	48	24	1829.0	1776.4	52.7	2.9	20
	39	0.95	34	59	30	565.2	539.3	25.8	4.6	20
	40	0.95	28	49	24	906.0	873.4	32.6	3.6	20
	41	0.95	33	57	29	1124.1	1091.3	32.8	2.9	20
	42	0.95	26	45	23	602.3	569.1	33.2	5.5	25
	43	0.95	28	49	24	1166.9	1123.5	43.4	3.7	20
	44	0.95	28	49	24	913.3	886.6	26.8	2.9	20
	45	0.95	31	54	27	593.4	566.0	27.4	4.6	20
	46	0.95	28	49	24	1212.8	1163.7	49.2	4.1	25
	47	0.95	29	51	25	818.4	777.8	40.6	5.0	20
	48	0.95	25	44	22	633.7	602.3	31.4	5.0	25
	49	0.95	26	45	23	652.6	615.0	37.6	5.8	25
	50	0.95	28.5	50	25	763.6	733.9	29.7	3.9	20
	51	0.95	29	51	25	1286.2	1207.2	79.0	6.1	20
52	0.95	29.5	51	26	1262.0	1224.5	37.5	3.0	20	
53	0.95	27	47	24	1500.2	1449.7	50.5	3.4	20	
5	54	0.8	75	110	55	1555.2	1534.2	21.0	1.4	5
	55	0.8	67	98	49	1293.0	1208.9	84.1	6.5	5
	56	0.8	93	136	68	1001.9	995.6	6.3	0.6	5
	57	0.8	63	92	46	913.1	906.5	6.6	0.7	5
	58	0.8	60	88	44	947.8	939.1	8.7	0.9	5
	59	0.8	44	65	32	1189.8	1139.5	50.3	4.2	20
	60	0.8	53	78	39	912.9	898.0	14.9	1.6	10
	61	0.8	51	75	37	938.0	924.7	13.3	1.4	20
	62	0.8	46	67	34	922.0	893.7	28.3	3.1	10
	63	0.8	40	59	29	546.2	522.2	23.9	4.4	20
	64	0.8	54	79	40	1141.9	1124.4	17.5	1.5	10
	65	0.8	40	59	29	904.9	871.7	33.2	3.7	20
	66	0.8	51	75	37	928.9	915.7	13.2	1.4	10
	67	0.8	51	75	37	807.6	783.6	24.0	3.0	10
68	0.8	51.5	94	47	1302.4	1281.8	20.6	1.6	5	
69	0.8	75	110	55	1208.7	1187.9	20.8	1.7	5	
70	0.8	45	66	33	1098.2	1052.9	45.3	4.1	15	
71	0.8	63	92	46	933.4	924.6	8.8	0.9	5	
72	0.8	63	92	46	1009.2	1002.0	7.2	0.7	5	
73	0.8	38	56	28	636.6	630.2	6.5	1.0	5	
74	0.8	76	111	56	1241.7	1232.4	9.3	0.7	5	
75	0.8	34.5	51	25	1348.7	1239.0	109.7	8.1	5	
76	0.8	65	95	48	880.9	867.3	13.6	1.5	5	

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε

ΕΘΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΓΕΙΑΣ
Α' ΔΙΟΙΚΗΣΗ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ « Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ »

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

ΠΡΟΣ κ. . ΣΤΕΛΙΟ ΓΡΑΦΑΚΟ, Διευθυντή Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών

ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ ΠΡΑΚΤΙΚΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΕΩΣ 20-10-14**ΠΑΡΟΝΤΕΣ :**

Π. ΜΑΜΜΗ ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ, Συντονίστρια Δ/ντρια Αναισθησιολογικού τμήματος
Β. ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ, Διευθυντής ΕΣΥ, Παιδίατρος- Αιματολόγος, Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας- Ογκολογίας
Φ. ΧΑΛΙΩΤΗΣ ΜΕΛΟΣ, Αναπληρωτής Διευθυντής Β' Παιδιατρικού τμήματος
Π. ΚΑΡΡΑ ΜΕΛΟΣ, Επιμελήτρια Β' Ακτινοδιαγνωστικού τμήματος
Ι. ΠΑΠΑΣΩΤΗΡΙΟΥ ΜΕΛΟΣ, Δ/ντής Βιοχημικού Εργαστηρίου
Α. ΓΙΑΓΤΣΙΔΟΥ ΜΕΛΟΣ, ΤΕ Νοσηλευτριών

ΘΕΜΑ : Έγκριση συμμετοχής της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, ως εκπρόσωπος της Ελλάδος, να συμμετέχει στο Πανευρωπαϊκό Πρωτόκολλο ALL SETred 2012 FORUM NOR, που αφορά την μεταμόσχευση Αιμοποιητικών κυττάρων(ΜΑΚ) παιδιών με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία με σχήμα προετοιμασίας που χρησιμοποιεί μόνο χημειοθεραπεία (BUSULPHAN iv+FLUDARABINE+THIOTERA) αποφεύγοντας την ολόσωμη ακτινοβολία(TBI).
Επιστημονικά Υπεύθυνος: κ. ΣΤΕΛΙΟΣ ΓΡΑΦΑΚΟΣ, Διευθυντής Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών

ΣΧΕΤ. : Αρ.πρωτ. 22050/29-09-14

Το Επιστημονικό Συμβούλιο κατά την συνεδρίασή του στις 20 Οκτωβρίου 2014 έλαβε υπόψη του την ανωτέρω αίτηση του κ. Στ. Γραφάκου, Διευθυντού της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών (ΜΜΜΟ), που αφορά στην έγκριση συμμετοχής της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, ως εκπρόσωπος της Ελλάδος, να συμμετέχει στο Πανευρωπαϊκό Πρωτόκολλο ALL SETred 2012 FORUM NOR, που αφορά την μεταμόσχευση Αιμοποιητικών κυττάρων(ΜΑΚ) παιδιών με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία με σχήμα προετοιμασίας που χρησιμοποιεί μόνο χημειοθεραπεία (BUSULPHAN iv+FLUDARABINE+THIOTERA) αποφεύγοντας την ολόσωμη ακτινοβολία(TBI).

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η διαπίστωση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας της ΜΑΚ με ποη-TBI σχήματα προετοιμασίας και η αποφυγή των σοβαρών επιπλοκών της ακτινοβολίας στα παιδιά.

Ύστερα από μελέτη και αναλυτική συζήτηση, διαπιστώθηκε ότι το ανωτέρω πρωτόκολλο, πληροί όλες τις προϋποθέσεις για τη διεξαγωγή του.

Κατόπιν τούτων, ομόφωνα το Επιστημονικό Συμβούλιο εισηγείται την έγκριση συμμετοχής της ΜΜΜΟ στο ανωτέρω πρωτόκολλο.

Η ΠΡΟΕΔΡΟΣ
ΤΟΥ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

ΜΑΜΜΗ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Βασικό μοντέλο

```

$PROBLEM Busulfan
$INPUT ID TIME DV EVID AMT TLAG RATE BW HT AGE SEX MDV OCC BSA CKD

$DATA Copy_of_Busilvex_data_set_new_060317_2.csv IGNORE=#
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4

$PK

      OC1 = 0
      OC2 = 0
      OC3 = 0
      OC4 = 0
      OC5 = 0
      IF (OCC.EQ.1) OC1=1
      IF (OCC.EQ.2) OC2=1
      IF (OCC.EQ.3) OC3=1
      IF (OCC.EQ.4) OC4=1
      OCC1 = OC1*ETA(3) + OC2*ETA(4) + OC3*ETA(5)
      OCC2 = OC1*ETA(6) + OC2*ETA(7) + OC3*ETA(8)

CL=THETA(1)*EXP(ETA(1))* EXP(OCC1)
V1=THETA(2)*EXP(ETA(2))* EXP(OCC2)
V2=THETA(3)
Q=THETA(4)
ALAG1=Tlag
S1=V1

$THETA (0 4.5 )
      (0 14)
      (0 2.5 )
      (0 1)
      (0 0.01)
      (0 0.01 )

$OMEGA BLOCK(2) 0.038809 0.023970 0.024336

$OMEGA BLOCK(1) 0.0121 ;CL
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;CL
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;CL

$OMEGA BLOCK(1) 0.0484 ;V
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;V
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;V

$SIGMA 1 fix

$ERROR

```

```
IPRED=F ; individual-specific prediction
W=SQRT(THETA(5)**2*IPRED**2+ THETA(6)**2) ; W:weighted, Theta(5): sigma https://sourceforge.net/p/psn/mailman/message/23779917/
Y=F+W*EPS(1) ; ERROR OF model
IRES=DV-IPRED ; individual-specific residual
IWRES=IRES/W ; Weighted Individual residual

; $SIM ONLY SIM (5435)

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 PRINT=2
$COV

$TABLE ID TIME DV IPRED PRED EVID IRES IWRES WRES CWRES ONEHEADER NOAPPEND FILE=TAB01.txt
$TABLE ID CL V1 ETA1 BW BSA CKD AGE ONEHEADER FIRSONLY FILE=TAB02.txt
```

Τελικό μοντέλο

```

$PROBLEM Busulfan
$INPUT ID TIME DV EVID AMT TLAG RATE BW HT AGE PMA SEX MDV OCC BSA CKD

$DATA Copy_of_Busilvex_data_set_new_060317_2.csv IGNORE=#
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS4
$PK
    OC1 = 0
    OC2 = 0
    OC3 = 0
    OC4 = 0
    OC5 = 0
    IF (OCC.EQ.1) OC1=1
    IF (OCC.EQ.2) OC2=1
    IF (OCC.EQ.3) OC3=1
    IF (OCC.EQ.4) OC4=1
    OCC1 = OC1*ETA(3) + OC2*ETA(4) + OC3*ETA(5)
    OCC2 = OC1*ETA(6) + OC2*ETA(7) + OC3*ETA(8)

TCL=THETA(1)
A=(BW/26)**THETA(7)*(PMA**THETA(8))/(THETA(9)**THETA(8)+PMA**THETA(8))
CL=TCL* A* EXP(ETA(1))* EXP(OCC1)
TV1=THETA(2)*(BW/26)
V1=TV1*EXP(ETA(2))* EXP(OCC2)
V2=THETA(3)
Q=THETA(4)
ALAG1=Tlag
S1=V1

$THETA (0 5.1)
        (0 14.4)
        (0 3.77)
        (0 1.49)
        (0 0.142)
        (0 0.0192)
        (0 0.75) FIX
        (0 14.5)
        (0 64.6)

$OMEGA BLOCK(2) 0.0695 0.0658 0.162

$OMEGA BLOCK(1) 0.0125 ;CL
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;CL
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;CL

$OMEGA BLOCK(1) 0.0374 ;V
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;V
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;V

```

```
$SIGMA 1 fix
```

```
$ERROR
```

```
IPRED=F ; individual-specific prediction
```

```
W=SQRT(THETA(5)**2*IPRED**2+ THETA(6)**2) ; W:weighted, Theta(5): sigma https://sourceforge.net/p/psn/mailman/message/23779917/
```

```
Y=F+W*EPS(1) ; ERROR OF model
```

```
IRES=DV-IPRED ; individual-specific residual
```

```
IWRES=IRES/W ; Weighted Individual residual
```

```
;$SIM ONLYSIM (5435)
```

```
$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 PRINT=2
```

```
$COV
```

```
$TABLE ID TIME DV IPRED PRED EVID IRES IWRES WRES CWRES ONEHEADER NOAPPEND FILE=TAB01.txt
```

```
$TABLE ID ETA1 ETA2 BW BSA CKD AGE HT ONEHEADER FIRSONLY FILE=TAB02.txt
```