



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ –
ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

Μελέτη της φαρμακοκινητικής της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση με τη μορφή του μεθανοσουλφονικού εστέρα (CMS) σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς στη μονάδα εντατικής θεραπείας.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

"ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ"

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΝΑΣΙΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ,

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2020

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα **Γεωργία Βαλσαμή**, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
καθηγήτρια:

Αριστείδης Δοκουμετζίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής,
ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Καραλής, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός των βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του μετά νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης. Για τη φαρμακοκινητική ανάλυση έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της κολιστίνης σε πλάσμα αιμοκαθαιρώμενων ασθενών στη μονάδα εντατικής θεραπείας, έπειτα από ενδοφλέβια χορήγηση της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης, που αποτελεί προφάρμακο της κολιστίνης και υδρολύεται στη δραστική μορφή στο αίμα. Το δοσολογικό σχήμα που ακολουθήθηκε, ήταν δόση φόρτισης 9 MIU και δόση συντήρησης 4,5 MIU κάθε 12 ώρες. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της κολιστίνης έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανίχνευση με φθορισμό (HPLC-Fluoresce detection). Για τη φαρμακοκινητική ανάλυση και την περιγραφή της κινητικής της κατανομής της κολιστίνης χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου. Οι υπολογιζόμενες τιμές της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη σταθεροποιημένη κατάσταση, έδειξαν ότι με το συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα επιτυγχάνονται οι κλινικοί στόχοι βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών του EMA και FDA (με εξαίρεση δύο). Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με την προσθήκη μεγαλύτερου αριθμού ασθενών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αντιβιοτικά

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ανθεκτικοί μικροοργανισμοί, αντιβιοτική αγωγή, ενόργανη ανάλυση, κολιστίνη, φαρμακοκινητική ανάλυση.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the determination of basic pharmacokinetic parameters of colistin after intravenous administration of colistin methanesulfonate (CMS). During the pharmacokinetic analysis, the plasma levels of colistin in hemodialysis patients in the intensive care unit were determined, after intravenous administration of CMS, a prodrug which is hydrolyzed in vivo to the active drug colistin. The dosing scheme was a loading dose of 9 MIU and a maintenance dose of 4,5 MIU every 12 hours. The bioanalytical method used to measure colistin in plasma was a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-Fluoresce detection). For the pharmacokinetic analysis, concentration - time data, were used. The calculated values of the drug's concentration at steady state, according to the above dosing scheme, achieved the clinical target according to EMA and FDA guidelines (except two). The study is ongoing with the addition of a larger number of patients.

SUBJECT AREA: Antibiotic therapy

KEYWORDS: antibiotic therapy, resistant microorganisms, instrumental analysis, colistin methyl sulfate, pharmacokinetic analysis.

Στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Βαλσαμή Γεωργία, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας για την ανάθεση του θέματος, τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση της. Ακόμη, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες γνώσεις καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Αριστείδη Δοκουμετζίδα και τον Επίκουρο Καθηγητή Ευάγγελο Καραλή, για τις εύστοχες υποδείξεις και παρατηρήσεις τους με σκοπό την ολοκλήρωση και αρτιότερη παρουσίαση της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου της Φαρμακοκινητικής Ανάλυσης του τμήματος Φαρμακευτικής, Παπακυριακοπούλου Ευαγγελία και Μαντά Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθεια τους και το ευχάριστο και κυρίως φιλικό κλίμα εντός του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους για όλη την βοήθεια και την συμπαράσταση τους όλο αυτό το διάστημα.

Περιεχόμενα

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1.1 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	12
1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	13
1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΥΜΙΞΙΝΕΣ.....	15
1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ.....	18
1.6 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ.....	20
1.6.1 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ.....	20
1.6.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	20
1.6.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ – ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ.....	21
1.6.4 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΕ ΒΑΡΙΑ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (CRITICALLY ILL PATIENTS).....	23
1.6.5 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ CRRT.....	28
1.7 ΦΑΣΜΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	30
1.8 INVITRO ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ.....	31
1.9 ΕΠΙΣΗΜΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ.....	32
1.10 ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	35
1.11 ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ.....	38
1.11.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ CMS.....	38
1.11.2 ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ.....	39
1.11.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΟΝΤΑΙ ΣΕ CRRT.....	42
1.11.3 ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ [104].....	45
1.11.4 ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΡΑΧΙΑΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ [1].....	45
1.12 ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	46

1.12.1. ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ.....	46
Α. Νεφροτοξικότητα.....	46
Β. Νευροτοξικότητα	49
1.12.2 ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ	50
1.13 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΣΟΥΛΦΟΝΙΚΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ	51
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ- ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	54
2.1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	54
2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	54
2.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΠΡΩΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	56
2.2.1 ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	56
2.2.2 ΠΡΩΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	56
2.2.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	56
2.2.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	56
2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ	57
2.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	58
2.3.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	58
2.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	62
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	64
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	67
3.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	68
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
4.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	80

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	81
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολυμυξίνες ανήκουν στην κατηγορία των πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών. Ανακαλύφθηκαν το 1947 και περιλαμβάνουν πέντε διαφορετικές ουσίες (πολυμυξίνη Α-Ε) [1,2]. Από τις ουσίες αυτές, στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται μόνο η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε, η οποία λέγεται και κολιστίνη. Η σύνθεσης της, γινόταν από το βακτήριο *Bacillus polymyxa* όταν πρωτοανακαλύφθηκε το 1949 [3-4]. Χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή του μετά Νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης στην Ιαπωνία και στην Ευρώπη κατά τη δεκαετία του 1950 και στις ΗΠΑ το 1959, ως θεραπευτικό μέσο [5]. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1970, η ενδοφλέβια χρήση των πολυμυξινών περιορίστηκε λόγω της μεγάλης νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας που εμφάνιζαν, οδηγώντας έτσι στην αντικατάστασή τους από άλλα αντιβιοτικά που εμφάνιζαν λιγότερη τοξικότητα, όπως οι αμινογλυκοσίδες και οι καρβαπενέμες [6-8].

Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα της θεραπευτικής, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που είναι απαραίτητο να αντιμετωπίσει η σύγχρονη ιατρική, είναι η θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει περιοριστεί σημαντικά η ανακάλυψη και η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων. Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη αντοχής από τους παθογόνους μικροοργανισμούς στα ήδη χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά οδηγεί στη δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών, κάνοντας έτσι την αντιμετώπιση τους ολοένα και πιο δύσκολη, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ξανά στο προσκήνιο οι πολυμυξίνες και ιδιαίτερα η κολιστίνη, ως θεραπευτική επιλογή τελευταίας γραμμής [8-10]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παθογόνων είναι τα Gram αρνητικά βακτήρια όπως τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* και *Klebsiella pneumoniae*.

Στο εμπόριο η κολιστίνη εμφανίζεται με δύο μορφές, τη θειική κολιστίνη και τη μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS), που είναι προφάρμακο της κολιστίνης. Η θειική κολιστίνη έχει τη μορφή θειικού άλατος και γίνεται είτε από του στόματος χρήση ως δισκίο ή σιρόπι, είτε τοπικά όπου χρησιμοποιείται με τη μορφή σκόνης. Η δεύτερη μορφή είναι το μετά Νατρίου άλας της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS), το οποίο εμφανίζει λιγότερες

παρενέργειες γι' αυτό χρησιμοποιείται παρεντερικά. Επίσης δύναται να χορηγηθούν και με τη μορφή αερολύματος [11].

Η συνδυασμένη χρήση της κολιστίνης με άλλα αντιβιοτικά, εμφανίζει αυξημένη αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα. Έτσι, σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων, η χρήση της κολιστίνης στην σύγχρονη κλινική πρακτική επανέρχεται ως μια θεραπεία «τελευταίας γραμμής» κατά των πολυανθεκτικών Gram (-) βακτηρίων (Multi-Drug-Resistant Bacteria-MDR).

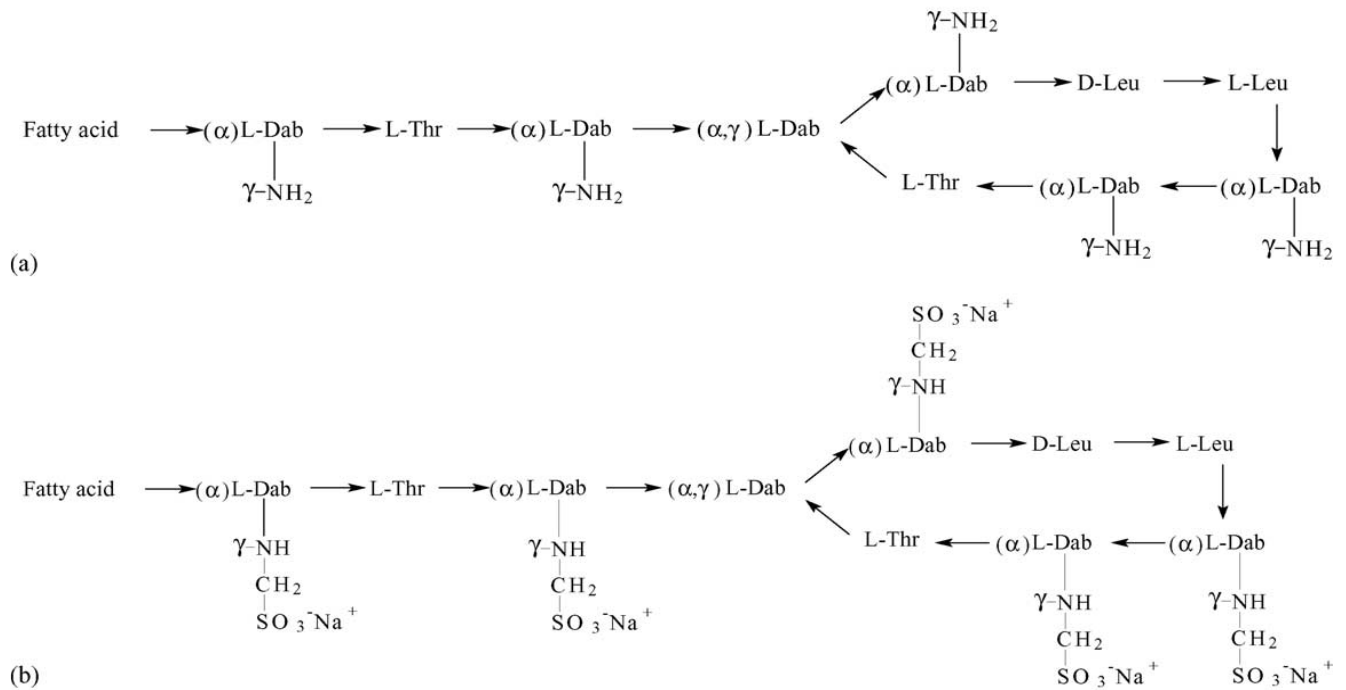
1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η κολιστίνη αποτελείται από δέκα πεπτίδια, ενωμένα μεταξύ τους σε κυκλική διαμόρφωση, εμφανίζει θετικό φορτίο και έχει μοριακό βάρος 1.155 Da. Πιο συγκεκριμένα, τα επτά από τα δέκα αμινοξέα, σχηματίζουν ένα επταπεπτιδικό δαχτυλίδι, ενώ τα άλλα τρία οδηγούν στον σχηματισμό μιας τριπεπτιδικής πλευρικής αλυσίδας, η οποία στο άμινο-τελικό άκρο της είναι ακυλιωμένη από ένα λιπαρό οξύ [9]. Το αμιδικό άκρο της κολιστίνης αποτελείται από D-λευκίνη, L-θρεονίνη και L-α-γ-διαμινοβουτυρικό οξύ (Dab), το οποίο συνδέεται με το λιπαρό οξύ. Η πολυμυξίνη Β έχει την ίδια δομή με την κολιστίνη αλλά αντί της D-λευκίνης περιέχει D-φαινυλαλανίνη [13].

Ανάλογα με το είδος του λιπαρού οξέος που συνδέεται με την πλευρική αλυσίδα του δεκαπεπτιδίου, καθορίζεται η μορφή της κολιστίνης σε Α ή Β. Η κολιστίνη Α προκύπτει από το 6-μεθυλ-οκτανοϊκό οξύ, ενώ η κολιστίνη Β από το 6-μεθυλ-επτανοϊκό οξύ. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά περιέχουν διαφορετική αναλογία κολιστίνης Α και Β [1,11,12].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κολιστίνη κυκλοφορεί ως θειικό άλας της κολιστίνης και ως μετά νατρίου άλας της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS). Το CMS προκύπτει από την αντίδραση της κολιστίνης με φορμαλδεΰδη και έπειτα με θειώδες νάτριο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη σουλφομεθυλομάδων στις πρωτοταγείς αμινομάδες της κολιστίνης που βρίσκονται πάνω στο Dab. Το CMS είναι πολικό μόριο και σε υδατικό

περιβάλλον υδρολύεται οδηγώντας έτσι σε σουλφομεθυλιωμένα παράγωγα και κολιστίνη. Χορηγείται παρεντερικά καθώς αποτελεί προφάρμακο της κολιστίνης [14].



Εικόνα 1.1: (α) Δομή για την κολιστίνη A και B, (b) Δομή της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης A και B. Fatty acid (λιπαρό οξύ): 6 -μεθυλοκτανοϊκό για την κολιστίνη A και 6-μεθυλεπτανοϊκό για την κολιστίνη B. Thr: threonine, Leu: leucine, Dab: α,γ-diaminobutyric όπου τα α και γ δείχνουν την αντίστοιχη αμινομάδα που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό. [12]

1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

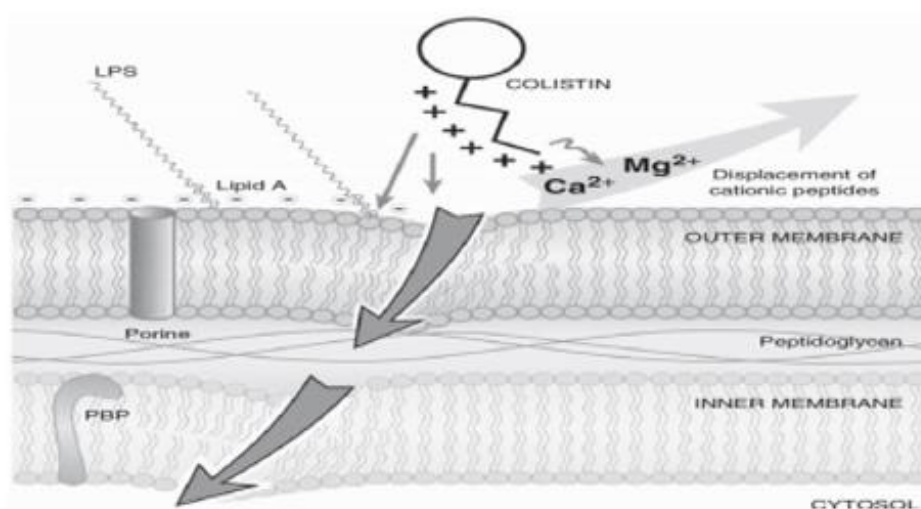
Ο μηχανισμός δράσης των πολυμυξινών περιλαμβάνει τη διάσπαση της ακεραιότητας της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα την ταχεία βακτηριοκτόνο δράση. Βάση αυτού του μηχανισμού μπορεί να δράσει συνεργατικά και με άλλα αντιβιοτικά ενισχύοντας τη δραστηριότητά τους και αναμένοντας έτσι καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα [15].

Μεταξύ του κατιονικού άκρου της κολιστίνης και των λιποπολυσακχαριτών (LPS), οι οποίοι είναι αρνητικά φορτισμένοι και βρίσκονται στην επιφάνεια των Gram(-) βακτηρίων, αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, επιτρέποντας έτσι στην κολιστίνη να

ασκήσει τη δράση της. Οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες που βρίσκονται στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ της κολιστίνης ανταγωνίζονται και εκτοπίζουν τα δισθενή κατιόντα Mg^{+2} και Ca^{+2} , τα οποία βρίσκονται στο αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό άκρο του λιπιδίου A του λιποπολυσακχαρίτη και σταθεροποιούν τη μεμβράνη. Η απομάκρυνσή τους οδηγεί στη διαταραχή της ακεραιότητας της μεμβράνης [8,16]. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η αύξηση στη διαπερατότητα της μεμβράνης, η εισροή μορίων του εξωτερικού περιβάλλοντος, η απώλεια των απαραίτητων συστατικών του κυττάρου και τέλος η ολική λύση του κυττάρου που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο [1,6,12,13,18,19]. Η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων δίνει τη δυνατότητα σε άλλα αντιβιοτικά να δρουν συνεργατικά με την κολιστίνη και να εμφανίζουν αποτελεσματικότερη αντιμικροβιακή δράση [13].

Ένας διαφορετικός μηχανισμός δράσης της κολιστίνης είναι η αντιενδοτοξινική της ιδιότητα. Πιο συγκεκριμένα, όταν το θετικά φορτισμένο μόριο της κολιστίνης συνδεθεί με το αρνητικά φορτισμένο τμήμα του λιπιδίου A (που δρα και ως ενδοτοξίνη) του LPS τότε το φορτίο εξουδετερώνεται, η ενδοτοξίνη αδρανοποιείται και τέλος χάνει την δυνατότητα απελευθέρωσης κυτταροκινών [1,12].

Έχουν αναφερθεί και άλλοι πιθανοί τρόποι δράσης της κολιστίνης που έχουν όμως ενδοκυτταρικό μηχανισμό όπως ο σχηματισμός ριζών υδροξυλίου και η αναστολή του ενζύμου NADH-κινόνη-οξυδορεντουκταση που εμποδίζουν με αυτό τον τρόπο την περαιτέρω επιβίωση του μικροοργανισμού [20,21].



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης της κολιστίνης.[22]

1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΥΜΙΞΙΝΕΣ

Η ανάπτυξη αντοχής των βακτηρίων στα χορηγούμενα αντιβιοτικά και ειδικά στις πολυμυξίνες είναι ένα ζήτημα που απασχολεί την ιατρική κοινότητα. Ταυτόχρονα, το γεγονός της αύξησης των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα *Providencia*, *Proteus*, *Serratia* και *Morganella*, βακτήρια που είναι εγγενώς ανθεκτικά στην κολιστίνη [23], συνεπάγεται πλήρη έλλειψη αντιβιοτικών για τη θεραπεία απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram (-) παθογόνα βακτήρια [17].

Σχετικά με τα ποσοστά εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών πρέπει να αναφερθεί ότι στην Ελλάδα απομονώθηκαν στελέχη που παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό αντίστασης στην κολιστίνη (56,8%), ακολουθούμενα από απομονωμένα στελέχη από την Ιταλία (42,9%) και την Ισπανία (28,6%) [24].

Η ανάπτυξη αντοχής των Gram(-) παθογόνων στην κολιστίνη δύναται να συμβεί με δύο τρόπους, είτε μέσω μεταλλάξεων είτε με την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής από τα ίδια τα παθογόνα [25]. Η κολιστίνη εμφανίζει διασταυρούμενη αντοχή με την πολυμυξίνη Β. Η εμφάνιση μεταλλάξεων, είναι λιγότερο συνηθισμένη, και αφορά την εμφάνιση αλλαγών στο DNA των παθογόνων οι οποίες μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην άλλη και δεν εξαρτάται από την έκθεση του παθογόνου στο αντιβιοτικό. Αντιθέτως, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί πιο συχνά χρησιμοποιούν μηχανισμούς προσαρμογής με σκοπό την επιβίωσή τους έναντι την έκθεση τους στο αντιβιοτικό [1].

Αντίσταση στην κολιστίνη, εκτός των χρωμοσωμικών μεταλλάξεων, μπορεί να προκύψει εξαιτίας των γονιδίων που μεταφέρονται με τη βοήθεια των πλασμιδίων. Το πρώτο γονίδιο αντίστασης στην κολιστίνη με τη μεσολάβηση πλασμιδίου ανιχνεύθηκε το 2015, και ονομάστηκε *mcr-1* [26]. Έκτοτε το γονίδιο *mcr-1* έχει ανιχνευθεί σε δείγματα τόσο ανθρώπινης όσο και ζωικής προέλευσης. Το *mcr-1* εμφανίζει υψηλό βαθμό αντοχής στη βακτηριοκτόνο δράση (λύση του κυττάρου) της κολιστίνης, ενώ συμβάλλει ελάχιστα στη προστασία της εξωτερικής μεμβράνης κατά το στάδιο διαταραχής/αλλοίωσης της [27]. Αυτό οδήγησε στη περιγραφή και άλλων γονιδίων όπως τα *mcr-2* έως *mcr-8* [28]. Η έκφραση αυτών των γονιδίων συμβάλλει στη ταχεία διάδοση αντίστασης στην κολιστίνη. Ιδιαίτερα ανησυχητικά είναι τα στελέχη που εκφράζουν το *mcr-1* μαζί με β-λακταμάση και γονίδια

ανθεκτικότητας σε καρβαπενεμάση [27]. Η ταυτόχρονη ύπαρξη δύο γονιδίων αντοχής (εξαιτίας των πλασμιδίων) σε βακτήρια, είναι ασυνήθιστο φαινόμενο, αλλά έχει αναφερθεί η συνύπαρξη των *mcr-1* και *mcr-3* μαζί με το γονίδιο της καρβαπενεμάσης *blaNDM-5* σε κλινικό στέλεχος *E. coli* [29].

Στις περισσότερες των περιπτώσεων όμως η αντίσταση στην κολιστίνη εκδηλώνεται με αλλαγές στους λιποπολυσακχαρήτες (LPSs) που αποτελεί και τη βασική θέση δράσης της κολιστίνης [1,12,13,19,30]. Τέτοιες αλλαγές επιτυγχάνονται με τροποποιήσεις του τμήματος του λιπιδίου A του LPS μέσω της προσθήκης φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) και 4-αμινο-4-δεοξυ-L-αραβινόζη (L-Ara4N), απακυλίωσης και υδροξυλίωσης από την *ragP*. Άλλες στρατηγικές είναι ο σχηματισμός ανθεκτικής κάψας, η χρήση της αντλίας εκροής και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης OmpH της εξωτερικής μεμβράνης [23].

Η πιο κοινή τροποποίηση του LPS είναι η κατιονική υποκατάσταση των φωσφορικών ομάδων από L-Ara4N, και το δεύτερο πιο συνηθισμένο είναι η τροποποίηση από PEtN, με αποτέλεσμα το LPS να γίνεται λιγότερο αρνητικά φορτισμένο. Η τροποποίηση που επιτυγχάνεται με την L-Ara4N έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα λόγω της φύσης της μεταβολής του φορτίου. Το προκύπτον καθαρό θετικό φορτίο του τροποποιημένου LPS μειώνει τη δέσμευσή του στις πολυμυξίνες, οδηγώντας σε αντοχή [23].

Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσω της ενεργοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα σημαντικά για τη βιοσύνθεση των παραπάνω μορίων όπως είναι η UDP-εξαρτώμενη από τη γλυκόζη δεϋδρογονάση για τη Ara4N και η φωσφοαιθανολαμινική τρανσφεράση για τη φωσφοαιθανολαμίνη [31].

Σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία παίζουν επίσης τα δυαδικά ρυθμιστικά πρωτεϊνικά συστήματα των PhoPQ και του PmrAB, τα οποία αποτελούν οικογένειες πρωτεϊνών που τροποποιούν κατάλληλα την έκφραση διαφόρων γονιδίων που έχουν τα βακτήρια, με ερέθισμα τις αλλαγές του περιβάλλοντος τους, προκειμένου να επιβιώσουν [32]. Αυτά τα δυαδικά συστήματα περιλαμβάνουν μια κινάση ιστιδίνης η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και παίζει το ρόλο του αισθητήρα καθώς και μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία έχει το ρόλο του ρυθμιστή. Ο τρόπος με τον οποίο δουλεύουν αυτά τα δυαδικά συστήματα είναι ο εξής: όταν η κινάση ιστιδίνης λαμβάνει ένα ερέθισμα αυτοφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική

πρωτεΐνη ρυθμιστή η οποία με τη σειρά της επάγει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων [33].

Resistance mechanism	Genes involved	Bacteria	References
Modification of the lipid A or Kdo with aminoarabinose	<i>arnBCADTEF operon and pmrE</i>	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteaeae</i> bacteria, <i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cepacia</i> complex	Vaara et al., 1981; Boll et al., 1994; Nummila et al., 1995; Helander et al., 1996; Rozalski et al., 1997; Trent et al., 2001b; Moskowitz et al., 2004; Yan et al., 2007; Loutet and Valvano, 2011; Lin et al., 2014
Modification of the lipid A with phosphoethanolamine	<i>pmrC</i>	<i>S. enterica</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	Zhou et al., 2001; Lee et al., 2004; Kim et al., 2006; Arroyo et al., 2011; Beceiro et al., 2011; Jayol et al., 2014
Activation of LPS-modifying operon by mutations in TCSs	<i>pmrA/pmrB</i> and/or <i>phoP/phoQ</i>	<i>S. enterica</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>A. baumannii</i>	Roland et al., 1993; Sun et al., 2009; Arroyo et al., 2011; Owusu-Anim and Kwon, 2012; Cannatelli et al., 2014b; Jayol et al., 2014
Inactivation of <i>phoP/phoQ</i> negative feedback regulator	<i>mgrB</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Cannatelli et al., 2013; López-Camacho et al., 2013; Gaibani et al., 2014; Olaitan et al., 2014b
Modification of the Kdo with phosphoethanolamine	<i>eptB</i> , <i>phoP/phoQ</i> and <i>mgrR</i>	<i>E. coli</i>	Reynolds et al., 2005; Moon and Gottesman, 2009
Increased acylation of lipid A enhancing its modification with aminoarabinose	<i>lpxM</i>	<i>S. enterica</i> , <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i>	Tran et al., 2005; Clements et al., 2007; Murray et al., 2007; Velkov et al., 2013b
Trapping of polymyxins by capsule		<i>K. pneumoniae</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Campos et al., 2004; Llobet et al., 2008
Efflux pump	<i>acrAB</i> and <i>kpnEF</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Padilla et al., 2010; Srinivasan and
Loss of LPS	<i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> and <i>lpxD</i>	<i>A. baumannii</i>	Moffatt et al., 2010, 2011
Glycosylation of lipid A with hexosamine		<i>A. baumannii</i>	Pelletier et al., 2013
Acquired/adaptive resistance to polymyxins through LPS modification with aminoarabinose	<i>colR/colS</i> , <i>cprR/cprS</i> and <i>parR/parS</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Fernández et al., 2010; Muller et al., 2011; Fernandez et al., 2012; Gutu et al., 2013
Overexpression of outer membrane protein OprH	<i>oprH</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Young et al., 1992

Εικόνα 1.3: Μηχανισμοί αντοχής στην κολιστίνη διαφόρων βακτηρίων [23].

1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

Η κολιστίνη, όσο και η πολυμυξίνη Β, είναι ένα αντιβιοτικό που έχει δοσοεξαρτώμενη, βακτηριοκτόνο δράση κατά των στελεχών του *Pseudomonas Aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, και *Klebsiella Pneumoniae*. Η *in vitro* φαρμακοδυναμική δραστηριότητα της όμως είναι δύσκολο να προσδιοριστεί [15,34-36].

Για να εμφανιστεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα της κολιστίνης, ο στόχος είναι η συγκέντρωση που θα επιτευχθεί στο πλάσμα να είναι πάνω από την MIC του αντίστοιχου παθογόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαιρετικά γρήγορη αρχική θανάτωση των μικροβίων που εμφανίζεται ήδη στα πρώτα 5 λεπτά μετά από την έκθεση στο φάρμακο. Ένα μέτριο *postantibiotic effect* (PAE) είναι εμφανές για υψηλές συγκεντρώσεις κολιστίνης, που δεν είναι εφικτές στην κλινική πράξη [15,37].

Για την κολιστίνη θεωρείται ότι ο λόγος της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης ελεύθερου φαρμάκου-χρόνου προς το MIC (fAUC:MIC) είναι ο δείκτης PK/PD που συσχετίζεται καλύτερα με την αποτελεσματικότητα της κολιστίνης, όπως επιβεβαιώνεται από *in vitro* μελέτες [38,39] αλλά και μελέτες σε ζώα [40,41]. Παρ' όλα αυτά η ακριβής τιμή του λόγου fAUC:MIC δεν έχει καθοριστεί. Έχει όμως παρατηρηθεί σε μελέτες [41] μετά από συστηματικά χορηγούμενη κολιστίνη εναντίον των *A. baumannii* και *P. aeruginosa* σε μοντέλα λοίμωξης μηρού και πνεύμονα ποντικού ότι οι τιμές του λόγου fAUC:MIC για τη θανάτωση βακτηρίων στο μοντέλο μόλυνσης των πνευμόνων ήταν σημαντικά υψηλότερες. Ταυτόχρονα, στη λοίμωξη του αναπνευστικού από *A. Baumannii*, δεν ήταν δυνατή η βακτηριόσταση ακόμα και στη μέγιστη ανεκτή δοσολογία [41].

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ότι όσο υψηλότερο είναι το MIC των βακτηρίων που προκαλούν την λοίμωξη, τόσο υψηλότερη είναι η fAUC που απαιτείται για να επιτευχθεί η βέλτιστη δράση. Έχει προταθεί από κάποιες μελέτες μοντέλων μόλυνσης, ότι ο λόγος fAUC/MIC που απαιτείται ώστε να επιτυγχάνεται η βακτηριοκτόνος δράση της κολιστίνης πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με 20 [38,42-43].

Σύμφωνα με τη μελέτη των Natio et al. [47], συνιστάται η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου, για 24 ώρες στη σταθεροποιημένη κατάσταση (AUC_{0-24h}) να είναι ~ 50 mg*h/L που ισοδυναμεί με μέση συγκέντρωση- στόχο στη σταθεροποιημένη

κατάσταση ($C_{ss, avg}$) ~ 2 mg/L μετά από συστηματική χορήγηση CMS. Αυτός ο στόχος τέθηκε έπειτα από αξιολόγηση φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών μελετών σε μοντέλο λοίμωξης μηρού ποντικού [41], λαμβάνοντας υπόψιν τις διαφορές στην πρωτεϊνική σύνδεση ανάμεσα σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση και σε ποντίκια, αλλά και φαρμακοκινητικών /τοξικοδυναμικών αναλύσεων (PK/ TD) σε ασθενείς που έδειξαν ότι συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2 mg/L, αυξάνουν τόσο τη συχνότητα όσο και σοβαρότητα της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας [44-46], υποδηλώνοντας έτσι το στενό θεραπευτικό εύρος της κολιστίνης [49].

Κατά την έναρξη της θεραπείας, η ευαισθησία του οργανισμού συνήθως δεν είναι γνωστή γι' αυτό, η συγκέντρωση-στόχος 2 mg/L μπορεί να είναι η κατάλληλη για τη θεραπεία με CMS για μικροβιαμίες αλλά και σε κάποιες λοιμώξεις όταν το MIC κολιστίνης είναι ≤ 2 mg/L. Επίσης, η $C_{ss, avg} \leq 2$ mg/L μπορεί να είναι επαρκής για ένα στέλεχος με χαμηλό MIC [47].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η $C_{ss, avg} = 2$ mg/L δεν είναι κατάλληλη για λοιμώξεις στις οποίες το MIC είναι >2 mg/L και μπορεί να είναι ανεπαρκές για πνευμονικές λοιμώξεις ακόμη και με MIC <1 mg/L εκτός εάν έχουν πραγματοποιηθεί άλλες προσεγγίσεις (π.χ. συνδυασμός με άλλα αντιβιοτικά, εισπνεόμενη κολιστίνη) [41, 47] .

Τέλος, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η αναγκαιότητα για επιπλέον έρευνα για τον προσδιορισμό των βέλτιστων φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών στόχων έκθεσης σε κολιστίνη σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση για να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ της έκθεσης σε πολυμυξίνη σε σχέση με την κλινική επιτυχία και την αποτυχία σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών. Το υψηλό ποσοστό των ασθενών που αποτυγχάνουν στη θεραπεία με πολυμυξίνη, όσο και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, καθιστούν περίπλοκο τον προσδιορισμό των φαρμακοδυναμικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων σε αυτούς τους ασθενείς. Οι στόχοι PK / PD των πολυμυξινών θα πρέπει επίσης να μελετηθούν στο πλαίσιο της συνδυαστικής θεραπείας, καθώς όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι οι στόχοι PK/ PD όπως έχουν προκύψει από μελέτες που αφορούν τη μονοθεραπεία με κολιστίνη [15].

1.6 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

1.6.1 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα που αφορούν στη χρήση της κολιστίνης είναι περιορισμένα. Η κολιστίνη όταν χορηγείται ενδοφλέβια δίνεται με τη μορφή του CMS, το οποίο είναι ένα ανενεργό προφάρμακο που μετατρέπεται γρήγορα με υδρόλυση μέσα στον οργανισμό στην ενεργή μορφή της κολιστίνης. Η απορρόφηση τόσο της θειικής κολιστίνης όσο και του CMS, από το γαστρεντερικό σωλήνα είναι αμελητέα. Η εισπνεόμενη κολιστίνη χρησιμοποιείται ως αερόλυμα, με εκνεφωτή για τοπική δράση στους πνεύμονες, επιτυγχάνοντας παράλληλα και μικρή συστηματική απορρόφηση, η οποία εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων, το σύστημα του εκνεφωτή και την κατάσταση των πνευμόνων [48]. Για παράδειγμα σε ασθενείς με κυστική ίνωση ένα μέρος του φαρμάκου παγιδεύεται στις παχύρρευστες εκκρίσεις του πνεύμονα, καθυστερώντας έτσι την απορρόφηση του [49].

1.6.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Η κολιστίνη προσδέεται με τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών διαφόρων ιστών του ανθρωπίνου σώματος συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των πνευμόνων, των νεφρών, της καρδιάς, του εγκεφάλου και των μυών. Η αποδέσμευση του φαρμάκου είναι αρκετά αργή και μπορεί να διαρκέσει συνολικά ακόμα και πέντε ημέρες [1].

Τόσο το CMS όσο και η κολιστίνη διαπερνούν δύσκολα τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους και του ηλεκτρικού φορτίου τους (πολυανιονικό για το CMS και πολυκατιονικό για την κολιστίνη) σε φυσιολογικό pH. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον μικρό όγκο κατανομής που παρουσιάζει η κολιστίνη σε υγιείς εθελοντές και αντιστοιχεί προσεγγιστικά στο εξωκυττάριο υγρό (ECF), περίπου 12,4 L και 14,0 L για το CMS [50,51]. Ωστόσο, παρατηρείται ότι ο όγκος κατανομής σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση είναι σχετικά αυξημένος.

Όσον αφορά τη σύνδεση της κολιστίνης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, η κολιστίνη συνδέεται με μια α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP), ενώ η σύνδεση της με άλλα συστατικά του

πλάσματος όπως αλβουμίνη, λιποπρωτεΐνες ή σφαιρίνες δεν έχει διευκρινιστεί [50,52]. Όμως, η σύνδεση της κολιστίνης με την AGP παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια από ότι με το βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη LPS, που είναι η θέση δράσης της, υποδηλώνοντας ότι *in vivo*, η σύνδεση με το LPS είναι αρκετά ισχυρή για να διαχωριστεί και να απομακρυνθεί η κολιστίνη από το AGP [52]. Το ποσοστό της σύνδεσης με τις πρωτεΐνες όμως είναι σχετικά μικρό (~ 50%) και η σύνδεση αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη, δηλαδή μειώνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Η διείσδυση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) είναι ελάχιστη, αλλά αυξάνει παρουσία μηνιγγικής φλεγμονής. Επίσης, η κατανομή της στο πνευμονικό παρέγχυμα, στο χολικό σύστημα, στο αρθρικό, στο πλευριτικό και στο περικαρδιακό υγρό είναι μειωμένη [53,54].

Στην μελέτη των Couet et al. [51] μετά από 1 ώρα ενδοφλέβιας (IV) έγχυσης 1 MIU CMS σε υγιείς εθελοντές, οι συγκεντρώσεις του CMS στο πλάσμα έφτασαν τη μέση μέγιστη τιμή 4,8 mg/L στο τέλος της χορήγησης. Βρέθηκε επίσης ότι σε υγιή εθελοντές, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι του CMS και της κολιστίνης έχουν ως εξής: ολική CL 148 και 48,7 mL/min και Vd 14 και 12,4 L, αντίστοιχα. Ο χρόνος ημιζωής της κολιστίνης βρέθηκε να είναι 3 ώρες. Ο χρόνος για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα (C_{max}) της κολιστίνης ήταν 2 ώρες μετά την έναρξη της έγχυσης (1 ώρα μετά τη διακοπή της έγχυσης) και η μέση μέγιστη συγκέντρωση κολιστίνης C_{max} ήταν 0,83 mg/L [50].

1.6.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ – ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ

Το CMS απομακρύνεται κατά τα δύο τρίτα με νεφρική απέκκριση σε υγιείς εθελοντές. Η νεφρική κάθαρση είναι περίπου 100 mL/min [50,51] και η κύρια οδός απέκκρισης του είναι η σπειραματική διήθηση [56,57].

Προσεγγιστικά το 60% του CMS απεκκρίνεται ως αμετάβλητο φάρμακο στα ούρα κατά τις πρώτες 24 ώρες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση. Ωστόσο, καθώς το μη δεσμευμένο κλάσμα (fu) του CMS στο πλάσμα είναι άγνωστο, δεν είναι δυνατή η εκτίμηση της σωληναριακής επαναπορρόφησης και της έκκρισης του CMS [50].

Η μη νεφρική κάθαρση του CMS σε υγιείς εθελοντές ήταν περίπου 50 mL / min [50,51]. Μία από τις μη νεφρικές οδούς κάθαρσης του CMS είναι η μετατροπή του σε κολιστίνη με υδρόλυση, όπου απομακρύνονται 5 σουλφομεθυλομάδες από τις πρωτοταγείς αμινομάδες

του CMS που βρίσκονται πάνω στο L-α-γ-διαμινοβουτυρικό οξύ (Dab). Από την υδρόλυση προκύπτουν μια σειρά διαφορετικών σουλφομεθυλιωμένων παραγώγων και η δραστική μορφή της κολιστίνης. Άλλες μη νεφρικές οδοί, όπως υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών, είναι δυνατόν να συμβαίνουν αλλά δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί [50].

Το ποσοστό του CMS που υδρολύεται σε κολιστίνη εκτιμάται κατά προσέγγιση ότι είναι το 30% σε υγιή άτομα [60]. Αυτό βέβαια προϋποθέτει ότι οι μόνες οδοί απέκκρισης για το CMS είναι η μετατροπή του in vivo σε κολιστίνη και η νεφρική απέκκριση. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση σχεδόν σίγουρα υπερεκτιμά την ποσοστιαία μετατροπή του προφαρμάκου [55]. Εφόσον όμως αποβάλλεται κυρίως νεφρικά, η κάθαρσή του εξαρτάται από την κάθαρση κρεατινίνης και σε περίπτωση μειωμένης νεφρικής λειτουργίας, μεγαλύτερο ποσοστό του μετατρέπεται σε κολιστίνη, γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση της ενεργής μορφής του φαρμάκου. Το ποσοστό της μετατροπής αυτής μπορεί να φτάσει το 60 έως 70% σε ασθενείς με κάθαρση κρεατινίνης <30 ml/min.

Το γεγονός ότι η νεφρική απομάκρυνση του CMS επηρεάζει το ποσοστό μετατροπής του σε κολιστίνη και επομένως την τελική συγκέντρωση της στο αίμα, παρότι η ίδια αποβάλλεται κυρίως μη νεφρικά, επιβεβαιώνεται από την αδυναμία επίτευξης της μέσης συγκέντρωση – στόχου της κολιστίνης στο πλάσμα στη σταθεροποιημένη κατάσταση ($C_{ss,avg}$), που θεωρούνται τα 2 mg/L, σε ασθενείς με $Cl_{cr} > 80$ ml/min [97,98,106].

Η μέγιστη συγκέντρωση του CMS που επιτυγχάνεται στο πλάσμα και εμφανίζεται στο τέλος της έγχυσης του είναι μεγαλύτερη από αυτή της κολιστίνης η οποία καθυστερεί από 1 έως 3 ώρες. Ο χρόνος ημιζωής της σχηματισμένης κολιστίνης είναι μεγαλύτερος από αυτόν του προφαρμάκου, υποδηλώνοντας ότι η διάθεση της κολιστίνης στο πλάσμα καθορίζεται από τον δικό της ρυθμό αποβολής. Επιπλέον, η νεφρική κάθαρση του CMS (84-103 mL / min) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της κολιστίνης (1,9-10,5 mL / min) [55].

Σε αντίθεση, η νεφρική κάθαρση της κολιστίνης είναι πολύ χαμηλή σε υγιείς εθελοντές (1,9mL/min) εξαιτίας της εκτεταμένης σωληναριακής επαναρρόφησης [51]. Η νεφρική επαναρρόφηση της κολιστίνης μπορεί να περιλαμβάνει οργανικούς κατιονικούς μεταφορείς (OCTN1), πεπτιδικούς μεταφορείς (PEPT2) και μεγαλίνη, που είναι ένας υποδοχέας λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας.

Αν και η νεφρική απέκκριση της κολιστίνης είναι πολύ χαμηλή, οι συγκεντρώσεις κολιστίνης στα ούρα μετά τη χορήγηση του CMS μπορεί να είναι υψηλές λόγω της υδρόλυσης του CMS σε κολιστίνη μετά την απέκκριση του, εντός του ουροποιητικού συστήματος.

Οι οδοί μη νεφρικής απομάκρυνσης της κολιστίνης είναι ως επί το πλείστον άγνωστες. Λαμβάνοντας υπόψιν την πεπτιδική δομή της, η κολιστίνη θα μπορούσε να απομακρυνθεί μέσω υδρόλυσης, αλλά τα ένζυμα που εμπλέκονται και ο εντοπισμός τους παραμένουν άγνωστα. Το αίμα, το συκώτι και τα νεφρά είναι πιθανότατα σημαντικά σημεία για την αποβολή της κολιστίνης επειδή περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεασών και πεπτιδασών. Ωστόσο, εξαιτίας της πληθώρας αυτών των ενζύμων σε όλο το σώμα, η πρωτεολυτική αποδόμηση της κολιστίνης δεν πρέπει να περιορίζεται στα κλασικά όργανα αποβολής [58].

Σημειώνεται ότι η κυκλική δομή της κολιστίνης βοηθά στην προστασία της από πρωτεολυτικές ενδοπεπτιδάσες και η υδρόφοβη ακυλική αλυσίδα βοηθά στην προστασία από εξωπεπτιδάσες, εξηγώντας έτσι ότι ο χρόνος ημιζωής της κολιστίνης ($t_{1/2}$) είναι μεγαλύτερος από άλλων πεπτιδίων [58].

1.6.4 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΕ ΒΑΡΙΑ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (CRITICALLY ILL PATIENTS)

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη φαρμακοκινητική της κολιστίνης είναι σχετικά περιορισμένα, παρότι η γνώση της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής του φαρμάκου θα συμβάλει στον προσδιορισμό της κατάλληλη δόση για να επιτυγχάνεται τόσο το καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα όσο και να αποφεύγεται η εμφάνιση αντίστασης των βακτηρίων σε αυτή. Η φαρμακοκινητική της κολιστίνης σε ασθενείς που βρίσκονται σε κρίσιμη κατάσταση και νοσηλεύονται στη μονάδα εντατικής θεραπείας διαφέρει από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Σε αυτούς τους ασθενείς σημαντικό ρόλο κατέχει η κατάσταση της νεφρικής τους λειτουργίας αλλά και το αν υποβάλλονται σε συνεχή νεφρική υποκατάσταση, καθώς έχει βρεθεί ότι το CMS και η κολιστίνη απομακρύνονται από τα φίλτρα της συνεχούς αιμοδιαδιήθησης.

Στις φαρμακοκινητικές μελέτες που ακολουθούν, έπειτα από ενδοφλέβια χορηγούμενη μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS) σε ασθενείς που ήταν σε κρίσιμη κατάσταση βρέθηκε ότι και η μεθανοσουλφονική κολιστίνη και η κολιστίνη (βάση) ακολουθούν γραμμική φαρμακοκινητική. Επιπλέον, το δι-διαμερισματικό μοντέλο

περιγράφει καλύτερα την κατανομή του CMS, ενώ η κολιστίνη ακολουθεί μονο-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής.

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες πληθυσμιακές φαρμακοκινητικές μελέτες της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης και της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε ασθενείς στη μονάδα εντατικής θεραπείας.

Στη μελέτη του Markou et al.[152], δόθηκαν ενδοφλεβίως 3 MU CMS (~100 mg CBA) κάθε 8 ώρες, σε ασθενείς με κάθαρση κρεατινίνης 46–200 mL/min. Στη μελέτη αυτή οι συγγραφείς εξέφρασαν την ανησυχία τους για τις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις κολιστίνης (C_{max} 2.93 ± 1.24 mg/L και C_{min} 1.03 ± 0.44 mg/L) που επιτεύχθηκαν στο πλάσμα στους ασθενείς τους, οι οποίοι είχαν κάθαρση κρεατινίνης μεγαλύτερη από 50 mL/min.

Από τη άλλη, στη μελέτη Karnik et al. [160] οι μέγιστες συγκεντρώσεις κολιστίνης που βρέθηκαν στο πλάσμα ήταν αρκετά υψηλές 22-23 mg/L και εμφανίστηκαν στο τέλος της έγχυσης των 30 λεπτών του CMS, ενώ ο μέσος χρόνος ημιζωής της κολιστίνης μετά την πρώτη δόση ήταν 2,7 ώρες (με εύρος 1,1-4,6 ώρες) αλλά και μετά την 3–4 δόση ήταν 3,3 ώρες (με εύρος 1,2– 5,4 ώρες). Ο χρόνος αυτός ήταν πολύ μικρός σε σχέση με τις μελέτες του Plachouras et al.(14,4h) [109], Markou et al.(7.4h) [152] και Mohamed et al.(18,5h) [110], που θα αναφερθούν παρακάτω. Φαίνεται πιθανό ότι αυτά τα ευρήματα είναι εν μέρει αποτέλεσμα της μετατροπή του CMS ex vivo σε κολιστίνη, αυξάνοντας τεχνητά τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις κολιστίνης στο πλάσμα σε πρώιμα χρονικά σημεία μετά τη χορήγηση μιας δόσης.

Άλλη μια βασική πληθυσμιακή φαρμακοκινητική μελέτη της κολιστίνης σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς ήταν η μελέτη των Plachouras et al. [109], όπου χορηγήθηκε στους ασθενείς δόση συντήρησης 3 MU ή 2 MU κάθε 8 ώρες, χωρίς δόση φόρτισης. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν μια πολύ σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεων κολιστίνης στο πλάσμα για αρκετές ώρες μετά την αρχική δόση. Πράγματι, η εκτίμηση του χρόνου ημιζωής της κολιστίνης στους ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση ήταν περίπου 14 ώρες. Έτσι, απουσία δόσης φόρτισης, οι συγκεντρώσεις κολιστίνης σε σταθεροποιημένη κατάσταση στο πλάσμα δεν θα επιτευχθούν πριν από περίπου 2 ημέρες θεραπείας. Η τελευταία παρατήρηση έχει μεγάλη σημασία, καθώς η καθυστερημένη έναρξη κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς [162]. Οι συγγραφείς

λοιπόν προτείνουν ως δοσολογικό σχήμα μια δόση φόρτισης κολιστίνης 9 ή 12MU μαζί με δόση συντήρησης 4,5 MU που χορηγούνται κάθε 12 ώρες.

Όταν όμως στη μελέτη των Mohamed et al.[110], σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς δόθηκε δόση φόρτισης 6MU, όπως ήταν αναμενόμενο, οι συγκεντρώσεις της κολιστίνης στο πλάσμα τις πρώτες 8 ώρες μετά από αυτή τη δόση φόρτισης ήταν υψηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν στην προηγούμενη μελέτη [109]. Ωστόσο, ακόμη και με δόση φόρτισης 6MU, μόνο τρεις από τους δέκα ασθενείς είχαν επιτύχει συγκέντρωση κολιστίνης στο πλάσμα 2 mg/L στις 8 ώρες.

Στη μελέτη των Garonzik et al. [106], αποδείχθηκε ότι η κάθαρση της κρεατινίνης ήταν μια σημαντική συμμεταβλητή στην κάθαρση τόσο του CMS όσο και της κολιστίνης, μέσω της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής ανάλυσης που πραγματοποίησαν. Είναι εύκολα κατανοητή η εξάρτηση της ολικής κάθαρσης του CMS από την κάθαρση της κρεατινίνης επειδή σε ανθρώπους με καλή νεφρική λειτουργία, το προφάρμακο CMS απομακρύνεται κυρίως με νεφρική απέκκριση, με αποτέλεσμα μόνο ένα σχετικά μικρό κλάσμα CMS να μετατρέπεται σε κολιστίνη. Σαν αποτέλεσμα, όταν μειώνεται η κάθαρση κρεατινίνης να μειώνεται και η συνολική κάθαρση του CMS και έτσι ένα προοδευτικά μεγαλύτερο κλάσμα κάθε δόσης CMS να μετατρέπεται σε κολιστίνη. Έτσι, η κάθαρση της κολιστίνης μειώνεται με τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας.

Σε αντίθεση με αυτή τη μελέτη έρχεται η μελέτη του Plachouras [109] που θεωρεί ότι η κάθαρση της κολιστίνης δεν εξαρτάται από την κάθαρση της κρεατινίνης. Η μελέτη Garonzik αιτιολογεί το συμπέρασμα της μελέτης Plagouchas στο γεγονός ότι οι ασθενείς της δεύτερης μελέτης είχαν ένα μικρό εύρος τιμών κάθαρσης κρεατινίνης, το οποίο μάλιστα πλησίαζε τις φυσιολογικές τιμές.

Στη μελέτη αυτή βρέθηκε επίσης ότι το βάρος σώματος αποτελεί συμμεταβλητή στον υπολογιζόμενο όγκο κατανομή του CMS στο κεντρικό διαμέρισμα, όπως επιβεβαιώθηκε αργότερα και από μια άλλη μελέτη [113].

Στη μελέτη των Karaiskos et al. [105], σε ασθενείς με κάθαρση κρεατινίνης από 29 έως 220 mL/min δόθηκε δόση φόρτισης 9MU και δόση συντήρησης 4,5 MU κάθε 12ώρες. Η μέση μέγιστη συγκέντρωση της κολιστίνης που υπολογίστηκε στο πλάσμα 8 ώρες μετά τη δόση φόρτισης(9MU) ήταν 2,65 mg/L, με ένα μεγάλο εύρος τιμών.

Οι συγγραφείς αυτών των μελετών [105,106,109,110], συγκλίνουν στην άποψη ότι τα δασολογικά σχήματα του CMS πρέπει να ξεκινούν με μια δόση φόρτισης. Ακόμη όμως και όταν χορηγείται δόση φόρτισης, υπάρχει καθυστέρηση, αρκετών ωρών, στην επίτευξη συγκεντρώσεων κολιστίνη στο πλάσμα μεγαλύτερες από 2 mg/L. Πιθανώς οι διαφορές στη χημική σύνθεση (βαθμός μεθανοσουλφονίωσης) του CMS από μάρκα σε μάρκα ή από παρτίδα σε παρτίδα να οδηγεί σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να επηρεάζει το ποσοστό της *in vivo* μετατροπής του CMS σε κολιστίνη, όπως έχει παρατηρηθεί σε αρουραίους που τους χορηγούνται διαφορετικές μάρκες παρεντερικού CMS [116] και πράγματι αυτό μπορεί να εξηγεί την ευρεία μεταβλητότητα στις συγκεντρώσεις πλάσματος της κολιστίνης μεταξύ των ασθενών που παρατηρούνται τόσο μετά από μια δόση φόρτισης όσο και σε σταθεροποιημένη κατάσταση [105,106].

Μια ακόμη φαρμακοκινητική μελέτη ήταν των Gregoire et al.[159], όπου σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς δόθηκαν 2MU CMS ημερησίως. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της κολιστίνης που υπολογίστηκε σε αυτή τη μελέτη ήταν μικρότερος (3,1 ώρες) από της μελέτη του Karaiskos [105], όπου εκτιμήθηκε ότι ήταν 11,2 ώρες για έναν τυπικό ασθενή αλλά και από προηγούμενες μελέτες όπου έχουν αναφέρει χρόνους ημίσειας ζωής κολιστίνης από 9 έως 18 ώρες [106,109,110]. Η διαφορά στο χρόνο ημιζωής φαίνεται κυρίως να προκύπτει από τη διαφορά στον εκτιμώμενο φαινομενικό όγκο κατανομής (V_d). Ο Grégoire [159] ανέφερε V_d 26 λίτρων, ενώ προηγούμενες μελέτες ασθενών ανέφεραν τιμές από 165 έως 218 λίτρα [106,109,110].

Επιπλέον, ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών αλλαγών συμβαίνει σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, με αποτέλεσμα μεταβολές στον όγκο κατανομής και στην κάθαρση των αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, τα Gram αρνητικά βακτήρια παράγουν ενδοτοξίνες προκαλώντας μια συστηματική φλεγμονώδη απόκριση που επηρεάζει το αγγειακό ενδοθήλιο, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδικών αγγείων και κατά συνέπεια σε αύξηση του όγκου κατανομής [161]. Αναφέρεται επίσης ότι οι αυξημένοι όγκοι κατανομής που παρατηρούνται στους ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση είναι υπεύθυνοι και για τους αυξημένους χρόνους ημιζωής.

Στη μελέτη του Karaiskos et al. [105] η CL_{CR} βρέθηκε να είναι μια χρονοεξαρτώμενη μεταβλητή για την CL του CMS και των παραγώγων του (CMS1 και CMS2), όπως παρατηρήθηκε και από άλλες μελέτες [106]. Ένα επιπλέον στοιχείο που προκύπτει από αυτή

τη μελέτη, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [106], είναι ότι οι ασθενείς με κάθαρση κρεατινίνης $>80 \text{ ml/min/1,73 m}^3$ έχουν χαμηλότερη ικανότητα επίτευξης συγκεντρώσεων κολλιστίνης άνω των 2 mg/l με συνολικές ημερήσιες δόσεις συντήρησης 9 MU . Επίσης ένα σημαντικό ζήτημα που προκύπτει είναι η μεγάλη διακύμανση μεταξύ των συγκεντρώσεων κολλιστίνης στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων κολλιστίνης ήταν μεγάλες, με τιμές που κυμαίνονταν από $0,95$ έως $5,1 \text{ mg/L}$ και $0,68$ έως $8,72 \text{ mg/L}$ μετά τη δόση φόρτισης 9 MU και τη σταθεροποιημένη κατάσταση, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας έτσι μεγάλη μεταβλητότητα των επιπέδων C_{max} κολλιστίνης μεταξύ ασθενών, σε συσχέτιση με προηγούμενες μελέτες που απεικόνιζαν επίσης μια μεγάλη μεταβλητότητα με μόνο ένα μικρό τμήμα να εξηγείται από διατομικές διαφορές στην CL_{CR} . [106,110,159]. Η ανεξήγητη διατομική μεταβλητότητα της κάθαρσης της κολλιστίνης ήταν επίσης αισθητή, με τιμές σε προηγούμενες μελέτες να κυμαίνονται μεταξύ 37 έως 76% , ενώ στην τρέχουσα μελέτη εκτιμήθηκε μια τιμή 71% .

Η πιο πρόσφατη πληθυσμιακή φαρμακοκινητική μελέτη για το CMS και την κολλιστίνη που πραγματοποιήθηκε από τους Kristoffersson et al. [163] το 2020 περιλάμβανε 349 ασθενείς (319 ασθενείς που δεν ήταν σε CRRT), με ένα μεγάλο εύρος νεφρικής λειτουργίας (αφορά τους ασθενείς που δεν ήταν σε νεφρική υποκατάσταση), με διάμεση τιμή $CrCL$ 70 mL/min και εύρος $9-658 \text{ mL/min}$. Το εφαρμοζόμενο δοσολογικό σχήμα, με δόση φόρτισης 9 MU ακολουθούμενη από δόση συντήρησης $4,5 \text{ MU}$ κάθε 12 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις της κολλιστίνης στο πλάσμα να είναι πάνω από το προτεινόμενο στόχο των 2 mg/l .

Για έναν ασθενή με $CrCL$ 80 mL/min , η συγκεκριμένη μελέτη προβλέπει μέση συγκέντρωση κολλιστίνης σε σταθεροποιημένη κατάσταση $4,4 \text{ mg/L}$, για συνολικά 9 MU την ημέρα, η οποία είναι υψηλότερη από τις μελέτες του Gregoire $3,4 \text{ mg/L}$ [159] και Karaiskos $2,7 \text{ mg/L}$ [105]. Η διαφορά μεταξύ των μελετών μπορεί επίσης να σχετίζεται με την κατάσταση του ασθενούς, αν και στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η $CrCL$ ήταν καλύτερη συμμεταβλητή από τη βαθμολογία SOFA για την κάθαρση της κολλιστίνης. Οι συγγραφείς έτσι οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η κάθαρση του CMS και της κολλιστίνης συσχετίστηκαν με την κάθαρση της κρεατινίνης, εξηγώντας έτσι ένα μέρος της διατομικής μεταβλητότητας.

Από τις παραπάνω φαρμακοκινητικές μελέτες γίνεται αντιληπτή η μεγάλη μεταβλητότητα στη φαρμακοκινητική της κολλιστίνης ανάμεσα σε ασθενείς στη ΜΕΘ. Η

παράμετρος PK / PD που περιγράφει καλύτερα την επιτυχία της θεραπείας και την πιθανότητα καταστολής της εμφάνισης αντίστασης στην κολιστίνη είναι ο λόγος AUC / MIC [16]. Μια δόση φόρτισης του προφαρμάκου φαίνεται να είναι η κατάλληλη στρατηγική για να αποφευχθούν οι υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Το σκεπτικό αυτής της προσέγγισης βασίζεται στην αργή αύξηση των συγκεντρώσεων της κολιστίνης στο πλάσμα (από πολλές ώρες έως ημέρες) όταν δεν χορηγείται δόση φόρτισης. Ωστόσο, σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη οι δόσεις φόρτισης συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο νεφρικής ανεπάρκειας [165].

1.6.5 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ CRRT

Οι ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση μπορεί να αναπτύξουν οξεία ή οξεία επί χρόνιας νεφρική ανεπάρκεια με αποτέλεσμα να υποβάλλονται σε θεραπεία συνεχούς νεφρικής υποκατάστασης (CRRT: continuous renal replacement therapy). Παρόλο που υπάρχουν φαρμακοκινητικές μελέτες και συνιστώμενη δοσολογία για το CMS σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση με φυσιολογική ή μειωμένη νεφρική λειτουργία, υπάρχουν μόνο μερικές μελέτες φαρμακοκινητικής του CMS και της κολιστίνης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε CRRT [114, 118-120, 158].

Το CMS και η κολιστίνη έχουν μοριακά βάρη 1.750 και 1.155 Da, αντίστοιχα, που σημαίνει ότι είναι αρκετά μικρά για να διαπερνούν τις μεμβράνες της αιμοδιήθησης. Επίσης, η πρωτεϊνική δέσμευση της κολιστίνης κυμαίνεται μεταξύ 10 και 50% σε μελέτες σε ζώα [42], γεγονός που επιτρέπει περαιτέρω την απομάκρυνση του φαρμάκου από τα φίλτρα. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε CRRT, επειδή δεν πραγματοποιείται σωληναριακή επαναρόφηση, η κάθαρση της κολιστίνης είναι, όπως αναμενόταν, υψηλότερη από εκείνη που επιτεύχθηκε από έναν υγιή νεφρό, παρόλο που οι ρυθμοί διήθησης που εφαρμόζονται είναι συνήθως λιγότερο από το μισό του φυσιολογικού ρυθμού σπειραματικής διήθησης [114]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν σημαντική εξωσωματική κάθαρση κολιστίνης και CMS από το CRRT.

Στην πρόσφατη μελέτη των Leuppi-Taegtmeyer et al. [158] χορηγήθηκε σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε CRRT (συγκεκριμένα CVVHD: Continuous Venovenous HemoDialysis),

ενδοφλέβια δόση φόρτισης CMS 9 εκατομμυρίων διεθνών μονάδων (MU) (ή 6 MU εάν το σωματικό βάρος ήταν <60 kg) και δόση συντήρησης 3 MU (ή αντίστοιχα, 2 MU) κάθε 8 ώρες.

Σε αντιστοιχία με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, το CMS είχε αυξημένη διαπερατότητα από τα φίλτρα και μικρότερο όγκο κατανομής από το κολιστίνη (V_d 12,1 L και 70,1L αντίστοιχα). Ταυτόχρονα, το CMS είχε μεγαλύτερη κάθαρση (τόσο ολική όσο και μέσω CVVHD) από την κολιστίνη, με επακόλουθο μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$ περίπου 2 ώρες και 17,5 ώρες αντίστοιχα) και υψηλότερες συγκεντρώσεις στην κατάσταση ισορροπίας για την κολιστίνη. Η αποτελεσματικότερη μεταφορά του CMS διαμέσου των φίλτρων αντικατοπτρίζεται στο ποσοστό κάθαρσης μέσω CRRT που αντιπροσωπεύει, κατά μέσο όρο, το 41% του συνολικού CMS και το 28% της συνολικής κάθαρσης κολιστίνης.

Μέσα από αυτή την πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση προέκυψε διατομική μεταβλητότητα στις παραμέτρους του όγκου κατανομής και της κάθαρσης ($V_{d_{CMS}}$, $V_{d_{Col}}$, CLM_{CMS} και CLM_{Col}), την οποία οι συγγραφείς θεώρησαν αναμενόμενη. Ωστόσο, αυτή η μεταβλητότητα δεν ερμηνεύτηκε από την ηλικία, το σωματικό βάρος, το φύλο ή τη συγκέντρωση λευκωματίνης στον ορό, καθώς αυτές οι συμμεταβλητές δε βελτίωσαν την απόδοση του μοντέλου. Ο αιματοκρίτης όμως αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του φαρμάκου από το σώμα του ασθενούς στο φίλτρο της CRRT.

Ο στόχος της κολιστίνης στο πλάσμα C_{ssavg} 2,5 mg/l, για ευαίσθητα βακτήρια με $MIC < 0,5$ mg/l [110] επιτεύχθηκε σε όλους τους ασθενείς της μελέτης που έλαβαν δόση συντήρησης 3 MU κάθε 8 ώρες αλλά σε κανέναν από τους ασθενείς που έλαβαν δόση συντήρησης 2 MU κάθε 8 ώρες.

Στη μελέτη των Karaiskos et al. [114] στην οποία χορηγήθηκαν 4,5 MU κάθε 12 ώρες, 24 ώρες μετά τη λήψη μιας δόσης φόρτισης 9 MU, σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε CVVHDF, η μέση μέγιστη συγκέντρωση κολιστίνης μετά τη δόση φόρτισης και μετά τη δόση συντήρησης (6 ώρες μετά από τη δόση) ήταν 1,55 mg/L και 1,72 mg/L, αντίστοιχα. Οι μη βέλτιστες συγκεντρώσεις κολιστίνης σε αυτούς τους ασθενείς συσχετίστηκαν με την αυξημένη εξωσωματική κάθαρση που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή, δηλαδή την έντονη απομάκρυνση του CMS και της κολιστίνης μέσω CVVHDF, υπολογιζόμενη περίπου στο 60% και 62% της συνολικής κάθαρσης του CMS και της κολιστίνης, αντίστοιχα.

Σε μια μελέτη των Nation et al.[113], η οποία περιλάμβανε δεδομένα από 9 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε CRRT (μέση ροή αίματος, 160 ml/min), η κάθαρση του CMS λόγω CRRT ήταν 1,57 λίτρα/ώρα, που ήταν πανομοιότυπο με της μελέτης του Leurri (μέση ροή αίματος 100 έως 127 ml/min) που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η κάθαρση της κολιστίνης μέσω CRRT, ωστόσο, ήταν υψηλότερη (2,68 λίτρα/ώρα στη μελέτη του Nation, σε σύγκριση με 0,796 λίτρα/ώρα στη μελέτη Leurri). Στην προαναφερθείσα μελέτη από τον Karaikos et al. [114], με ροή αίματος 100 έως 180 ml/min η κάθαρση CMS και κολιστίνης μέσω CRRT ήταν 1,17 λίτρα/ώρα και 2,09 λίτρα/ώρα, αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κάθαρση της κολιστίνης μέσω CRRT εξαρτάται από τη ροή του αίματος και είναι αυξημένη σε σχέση με τη φυσιολογική νεφρική κάθαρση, υποδηλώνοντας έτσι την ανάγκη για αυξημένη δοσολογία σε αυτούς τους ασθενείς.

1.7 ΦΑΣΜΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η κολιστίνη έχει ταχεία βακτηριοκτόνο δραστηριότητα *in vitro*, ενώ ταυτόχρονα διαθέτει και αντιενδοτοξινική δραστηριότητα. Το αντιμικροβιακό φάσμα της κολιστίνης περιλαμβάνει Gram αρνητικά αερόβια βακτήρια όπως *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp* και *Stenotrophomonas maltophilia*, στα οποία περιλαμβάνονται και πολυανθεκτικά στελέχη, καθώς και *Haemophilus influenzae*, *Salmonella spp*, *Pasteurella spp* και *Shigella spp*. Επίσης, η κολιστίνη παρουσιάζει δραστηριότητα έναντι ορισμένων μυκοβακτηριδίων, όπως είναι το *Mycobacterium xenopi*, το *Mycobacterium intracellulare* και το *Mycobacterium tuberculosis* [1, 59,60].

Ανθεκτικοί στη δράση της είναι οι Gram(+) και Gram(-) αερόβιοι κόκκοι, οι Gram(+) αερόβιοι βάκιλλοι, τα παράσιτα, οι μύκητες και όλα τα αναερόβια βακτήρια. Επιπλέον, όλα τα στελέχη *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Serratia spp*, *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis*, *Brucella*, *Burkholderia cepacia* και *Edwardsiella spp* εμφανίζουν αντίσταση στην κολιστίνη [12].

1.8 INVITRO ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

Η μέθοδος αναφοράς για τη δοκιμασία εύρεσης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) της κολιστίνης όπως προτείνεται από την European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) και το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) είναι η αραίωση σε ζωμό (BMD- standard broth microdilution, ISO-74 2077610) [61]. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται η χρήση του Mueller Hinton ζωμού (προσαρμοσμένος για κατιόντα), με θειικά άλατα κολιστίνης σε δίσκους από πολυστυρένιο χωρίς πρόσθετα όπως το πολυσορβικό-80 (λόγω πιθανής συνέργειας μεταξύ του P-80 και των πολυμυξινών) [15,63].

Επίσης, σύμφωνα με τις οδηγίες των CLSI και EUCAST δε συνιστώνται ως τεχνικές η καλλιέργεια σε άγαρ και η μέθοδος διάχυσης σε δίσκο (disk diffusion) καθώς εμφανίζουν υψηλά ποσοστά σφάλματος (κίνδυνος ψευδώς ευαίσθητων στελεχών) σε σύγκριση με τη μέθοδο αραίωσης σε ζωμό. Για τη διαδικασία αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται το θειικό άλας της κολιστίνης, καθώς το μεθανοσουλφονικό παράγωγο της είναι ένα ανενεργό προφάρμακο που υδρολύεται μέσα στο διάλυμα [15]. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται κατά τη διαδικασία καθώς η κολιστίνη προσροφάται σε αρνητικά φορτισμένα πλαστικά, εξαιτίας της θετικά φορτισμένης δομής της [64].

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα όρια ευαισθησίας της κολιστίνης για τα κυριότερα παθογόνα, όπως αυτά προσδιορίστηκαν στις πρόσφατες οδηγίες των CLSI- EUCAST [61].

Organism	Colistin MIC, mg/L		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
CLSI^a			
<i>Acinetobacter</i> sp	≤ 2	–	≥ 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤ 2	–	≥ 4
EUCAST			
<i>Acinetobacter</i> sp	≤ 2		> 2
<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2		> 2
Enterobacteriaceae	≤ 2		> 2

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute;
EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; MIC = minimum inhibitory concentration.

Εικόνα 1.4: Όρια ευαισθησίας σύμφωνα με τις CLSI-EUCAST. [15]

Όπως φαίνεται το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI) έχει δημοσιεύσει τα όρια ευαισθησίας της κολιστίνης για το *Pseudomonas aeruginosa* και το *Acinetobacter spp.*[62], όμως προς το παρόν δεν έχει προτείνει όρια ευαισθησίας για *Enterobacteriaceae* λόγω ανεπαρκών δεδομένων, αλλά έχει δημοσιεύσει επιδημιολογικές τιμές αποκοπής (ECV: epidemiological cut-off value) για τα είδη *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella aerogenes* και *Enterobacter cloacae* [15]. Οι τιμές ECVs πρέπει να εφαρμόζονται μόνο σε αυτά τα είδη, επειδή οι «wild-type» MIC κατανομές μπορεί να είναι διαφορετικές για άλλα γένη και είδη *Enterobacteriaceae* [15].

1.9 ΕΠΙΣΗΜΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Η κολιστίνη μπορεί να χορηγηθεί είτε με τη μορφή της θειικής κολιστίνης είτε με τη μορφή του προφαρμάκου της, το CMS. Σε ότι αφορά τη θειική κολιστίνη αυτή έχει κλινική εφαρμογή στην από του στόματος χορήγηση, με τη μορφή δισκίων ή σιροπιού, για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων της γαστρεντερικής οδού, καθώς έχει μειωμένη έως ελάχιστη απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα, δρώντας έτσι ως τοπικός-αντισηπτικός παράγοντας και η χρήση της περιορίζεται στη θεραπεία της διάρροιας σε παιδιά και σε βρέφη. Λαμβάνοντας υπόψιν την πιθανότητα για τοπικό ερεθισμό έπειτα την ροσ αγωγή, πρέπει να γίνεται στενή παρακολούθηση της κλινικής κατάστασης, ενώ δεν ενδείκνυται η εμπειρική χορήγηση [1]. Τέλος, η θειική κολιστίνη μπορεί να χορηγηθεί τοπικά με τη μορφή σκόνης για λοιμώξεις δέρματος [1,8].

Με τη μορφή του CMS, η κολιστίνη χρησιμοποιείται παρεντερικά και χορηγείται ενδοφλεβίως, ενδομυϊκώς ή μέσω της αναπνευστικής οδού. Η ενδοφλέβια κολιστίνη, είναι ένας αποτελεσματικός και ασφαλής αντιμικροβιακός παράγοντας, που χορηγείται στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) έναντι Gram (-) παθογόνων που προκαλούν λοιμώξεων όπως η νοσοκομειακή πνευμονία, η πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα (VAP), η σήψη, η βακτηριαιμία, η μηνιγγίτιδα, η οστεομυελίτιδα αλλά και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος [65]. Η κολιστίνη θα πρέπει να αποτελεί θεραπεία τελευταίας γραμμής για την αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων για να μπορέσει να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητά της και να μειωθεί η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών.

Η θεραπεία με εισπνεόμενη κολιστίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, εξαιτίας της μειωμένης διεισδυτικής ικανότητας που παρατηρείται στον πνευμονικό ιστό έπειτα από ενδοφλέβια χορήγηση, ενώ η εισπνεόμενη θεραπεία μπορεί να επιτύχει υψηλότερες συγκεντρώσεις στους πνεύμονες. Σε μια μελέτη χορηγήθηκαν 60 mg εισπνεόμενης κολιστίνης μία φορά, ακολουθούμενη από 60 mg ενδοφλεβίως (IV) κάθε 8 ώρες. Μετά την εισπνοή, οι συγκεντρώσεις στο υγρό των πνευμόνων ήταν υψηλότερες από τις συστηματικές συγκεντρώσεις (9,53-1137 mg/L έναντι 0,15-0,73 mg/L) [66]. Για την αντιμετώπιση λοιπόν της νοσοκομειακής πνευμονίας ή της πνευμονίας σχετιζόμενης με αναπνευστήρα που προκαλούνται από XDR Gram (-) παθογόνους μικροοργανισμούς που χρήζουν αγωγής με κολιστίνη, μπορεί να δοθεί συμπληρωματικά εισπνεόμενη δόση είτε κολιστίνης είτε πολυμυξίνης Β. Εξαιτίας όμως της έλλειψης ισχυρών κλινικών ενδείξεων αλλά και της αναφοράς στη βιβλιογραφία αντικρουόμενων στοιχείων η επιλογή αυτής της συνδυαστικής θεραπείας είναι στην κρίση του θεράποντα ιατρού [15].

Όσον αφορά την εισπνεόμενη κολιστίνη βρίσκει επίσης εφαρμογή και στην αντιμετώπιση των εξάρσεων των ασθενών που πάσχουν από κυστική ίνωση. Οι εξάρσεις αυτές σχετίζονται με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος που προκαλούνται κυρίως από το *P. Aeruginosa* [67]. Ο ρυθμός ανάπτυξης αντοχής στην κολιστίνη ήταν βραδύτερος από αυτόν στην τομπραμυκίνη, που επίσης χορηγείται σε αυτούς τους ασθενείς [1,68].

Για τη χορήγηση μέσω της αναπνευστικής οδού μπορεί να δοθεί τόσο η θειική κολιστίνη όσο και το CMS, παρ' όλα αυτά προτιμάται το CMS καθώς η εισπνοή θειικής κολιστίνης παρουσιάζει υψηλότερη συχνότητα ερεθισμού της αναπνευστικής οδού [69].

Η ενδομυϊκή ένεση με CMS, σπάνια χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική, γιατί μπορεί να προκαλέσει σοβαρό τοπικό πόνο ενώ επίσης δεν έχει σαφή κλινικά αποτελέσματα καθώς η έκταση της απορρόφησης ποικίλει [8].

Η κολιστίνη παρουσιάζει μειωμένη διεισδυτική ικανότητα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF), και μάλιστα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, μόνο το 5% των επιπέδων κολιστίνης στον ορό ανιχνεύονται στο CSF [70]. Κατά τη διάρκεια της μηνιγγίτιδας, εξαιτίας της φλεγμονής που συμβαίνει στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό υπάρχει αυξημένη διαπερατότητά, επιτρέποντάς έτσι στην κολιστίνη να επιτύχει συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ του 0 [71] έως και 25-67% [72,73].

Υπάρχει όμως η δυνατότητα το προφάρμακο να χορηγηθεί ενδοραχιαίως, επιτυγχάνοντας έτσι συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις αντίστοιχες ενδοφλέβιες. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί και η πιθανότητα συνδυαστικής ενδοφλέβιας και ενδοραχιαίας χορήγησης λόγω μεγαλύτερης πιθανότητας επιτυχούς έκβασης της θεραπείας [15].

Για τη θεραπεία λοιμώξεων του κεντρικού νευρικού συστήματος ενδείκνυται επίσης η χορήγηση μεθανοσουλφονικής κολιστίνης ενδοκοιλιακά, όταν υπάρχει πιθανότητα η ενδοφλέβια χορηγούμενη κολιστίνη να μην μπορεί να δημιουργήσει επαρκείς συγκεντρώσεις φαρμάκου στην εστία της λοίμωξης και η θεραπεία με αυτή να είναι αναποτελεσματική [11].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η κολιστίνη έχει δράση έναντι πολυανθεκτικών βακτηρίων και μπορεί να αντιμετωπίσει λοιμώξεις οφειλόμενες σε CRE, CRAB και CRPA (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa* αντίστοιχα). Όσον αφορά τις λοιμώξεις που προκαλούνται από CRE η κολιστίνη ή η πολυμιξίνη Β μπορούν να χορηγηθούν σε συνδυασμό με έναν ή περισσότερους επιπρόσθετους παράγοντες στους οποίους το παθογόνο παρουσιάζει ευαισθησία. Αν ένας δεύτερος δραστικός παράγοντας δεν είναι διαθέσιμος, τότε υπάρχει η δυνατότητα να συνδυαστούν με παράγοντες στους οποίους το παθογόνο δεν παρουσιάζει ευαισθησία (π.χ. καρβαπενέμες). Η ίδια συνδυαστική θεραπεία μπορεί να ακολουθηθεί και σε περίπτωση λοίμωξης από CRPA. Σε αντίθεση με την περίπτωση του *A.baumannii*, οπότε προτείνεται η χορήγηση ενός δεύτερου ή ακόμα και τρίτου παράγοντα μόνο εάν παρουσιάζουν ευαισθησία, αλλιώς εφαρμόζεται αγωγή μονοθεραπείας με κολιστίνη [15].

1.10 ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η συνδυαστική θεραπεία της κολιστίνης με άλλα αντιβιοτικά αποτελεί ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα τα τελευταία χρόνια. Οι λόγοι που συγκλίνουν υπέρ του συνδυασμού αυτού είναι οι ακόλουθοι:

1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιθυμητή συγκέντρωση της κολιστίνης στο πλάσμα στην κατάσταση ισορροπίας πρέπει να κυμαίνεται περίπου στα 2 mg/L. Ο στόχος αυτός, έπειτα από την κατάλληλη προσαρμογή της δόσης, επιτυγχάνεται σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με $Cl_{cr} < 80$ ml/L. Όταν όμως η $Cl_{cr} > 80$ ml/L η δυνατότητα επίτευξη των κατάλληλων επιπέδων κολιστίνης στο αίμα μειώνεται.

2. Εξαιτίας του στενού θεραπευτικού εύρους της κολιστίνης, δεν είναι υπάρχει η δυνατότητα αύξησης των ημερήσιων δόσεων συντήρησης του CMS λόγω της πιθανότητας εμφάνισης νεφροτοξικότητας.

3. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από μοντέλα λοίμωξης των πνευμόνων μετά από παρεντερική χορήγηση κολιστίνης υποδηλώνουν ανεπαρκή ανταπόκριση in vivo στις πολυμυξίνες.

4. Τέλος, η αντίσταση στις πολυμυξίνες αυξάνεται διαρκώς, με αναφορές μη επιτυχούς έκβασης της θεραπείας, ιδίως κατά τη διάρκεια της μονοθεραπείας. Εξαιτίας λοιπόν των διάφορων περίπλοκων μηχανισμών αντίστασης που εμφανίζονται, όπως ο μηχανισμός της ετεροαντίστασης, της μεταφοράς γονιδίων αντοχής με τη βοήθεια πλασμιδίων και τη συσχέτισης της αντίστασης αυτής με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας [75-77] αυξάνονται οι αναφορές για εφαρμογή της συνδυαστικής θεραπείας, ως μέθοδος για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας [15].

Η επιτυχία της συνδυαστικής θεραπείας της κολιστίνης με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες βασίζεται στο μηχανισμό της συνέργειας, της αύξηση δηλαδή της διαπερατότητας της βακτηριακής μεμβράνης (από τις πολυμυξίνες), με αποτέλεσμα τη διέλευση του συγχορηγούμενου αντιμικροβιακού παράγοντα εντός του κυττάρου και την επίτευξη αυξημένων συγκεντρώσεων εντός αυτού [9,15]. Με αυτό το σκεπτικό τα αντιβιοτικά που έχουν περιπλασματική ή ενδοκυτταρική δράση επιτυγχάνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αντίστοιχο διαμέρισμα [78].

Το ζήτημα της συνδυαστικής θεραπείας της κολιστίνης έχει λάβει μεγάλη προσοχή και είναι ένα πολυσυζητημένο και αμφιλεγόμενο θέμα. Αυτό που επιβεβαιώνει τις δυσκολίες για την επιλογή της μονοθεραπείας ή της συνδυαστικής θεραπείας είναι ότι η συνέργεια των αντιβιοτικών που παρατηρείται στις *in vitro* δοκιμασίες μπορεί να μην συσχετίζεται με τα *in vivo* αποτελέσματα [79]. Από την άλλη, μια θεραπεία συνδυασμού, μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική από μια μονοθεραπεία, επειδή μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών [78].

Το αντιμικροβιακό φάσμα της κολιστίνης περιλαμβάνει, ανεξάρτητα από τον μηχανισμό αντίστασης, MDR και XDR Gram-αρνητικά παθογόνα, όπως *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, και *P. aeruginosa*, ενώ ο *Proteae* είναι εγγενώς ανθεκτικός [80].

Όσον αφορά τα ανθεκτικά στην καρβαπενέμη στελέχη *Enterobacteriaceae* (CRE), ο συνδυασμός κολιστίνης με ένα άλλο δραστικό *in vitro* αντιβιοτικό έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με μειωμένα ποσοστά θνησιμότητας [15,74,81,82].

Συγκεκριμένα ο συνδυασμός μεροπενέμης με κολιστίνη ή γενταμυκίνη ή τιγκεκυκλίνη έχει οδηγήσει στη μείωση της θνησιμότητας ιδιαίτερα σε ασθενείς με σηπτικό σοκ ή με υψηλή βαθμολογία θνησιμότητας ή ταχέως θανατηφόρες υποκείμενες ασθένειες [74,82,83]. Ωστόσο, σε χαμηλού κινδύνου λοιμώξεις του αίματος (BSI) και σε κοιλιακές λοιμώξεις, η μονοθεραπεία φαίνεται επαρκής θεραπευτική επιλογή [82].

Επιπλέον, η μελέτη των Qureshi et al. [84] επιβεβαίωσε ότι ο συνδυασμός κολιστίνης ή τιγκεκυκλίνη με καρβαπενέμη για την αντιμετώπιση των CRE, μείωσε τα ποσοστά θνησιμότητα σε σχέση με τη μονοθεραπεία των αντιβιοτικών αυτών.

Επίσης, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν και τον τριπλό συνδυασμό αντιβιοτικών, ειδικότερα στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από CPKP (*carbapenemase-producing K. pneumoniae*) και η κολιστίνη θεωρείται ο βασικός αντιμικροβιακός παράγοντας της τριπλής θεραπείας, παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που το επιβεβαιώνουν, και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση [85].

Αν και η συνδυαστική θεραπεία με βάση την κολιστίνη, για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *Acinetobacter*, δεν έχει καλύτερη κλινική επιτυχία ή μειωμένη θνησιμότητα, προσφέρει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μικροβιολογικής απόκρισης από τη μονοθεραπεία με κολιστίνη [8,14,86]. Με βάση *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι αυτός ο

συνδυασμός εμφανίζει συνέργεια, το οποίο μπορεί ενδεχομένως να βοηθήσει στην αποτροπή εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών *Acinetobacter Baumannii*. [89,90]

Χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητα παρατηρήθηκαν όμως σε ασθενείς που είχαν λοίμωξη με MDR ή XDR *Acinetobacter Baumannii* και υποβλήθηκαν σε θεραπεία με συνδυασμό κολιστίνης και άλλων αντιβιοτικών, σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό σουλβακτάμης και άλλων αντιβιοτικών. Έτσι ο συνδυασμός κολιστίνης με σουλβακτάμη ή άλλα αντιβιοτικά προτείνεται ως μια από τις καλύτερες θεραπευτικές επιλογές για MDR και XDR λοίμωξη από *Acinetobacter*. Όμως, αν και η θεραπεία με βάση την τιγκεκυκλίνη οδήγησε σε χαμηλότερη νεφροτοξικότητα σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με κολιστίνη, έχει μικρότερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά το ποσοστό επιτυχούς έκβασης της θεραπείας. Αυτό οφείλεται πιθανώς στην ανεπαρκή συγκέντρωση της τιγκεκυκλίνη στο πλάσμα [91]. Επομένως, η τιγκεκυκλίνη δεν πρέπει να αποτελεί θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων, ειδικά σε ασθενείς με βακτηριαιμία.

Ενώ η αποτελεσματικότητα της θεραπείας συνδυασμού κολιστίνης / ριφαμπικίνης για CoRAB (*colistin-resistant Acinetobacter baumannii*) στελέχη δεν έχει ισχυρές ενδείξεις, υπάρχουν επιστημονικές αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας συνδυασμού κολιστίνης / ριφαμπικίνης για το CRAB (*carbapenem resistant A. Baumannii*) [92]. Οι Durante-Mangoni et al. [93] έδειξαν την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας κολιστίνης / ριφαμπικίνης σε CRAB στελέχη μέσω μιας καλά σχεδιασμένης, πολυκεντρικής, τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης. Επιπλέον, οι Nordqvist et al. πρότειναν ότι η θεραπεία συνδυασμού κολιστίνης / ριφαμπικίνης μπορεί να αποτρέψει τον μετασχηματισμό του ευαίσθητου στην κολιστίνη *A. baumannii* σε ανθεκτικό CoRAB [94].

Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη συγχορήγηση κολιστίνης με άλλα νεφροτοξικά φάρμακα, όπως η βανκομυκίνη ή οι αμινογλυκοσίδες, διότι έχει παρατηρηθεί αυξημένη νεφροτοξικότητα. Ταυτόχρονα, απαιτείται προσοχή κατά τη συγχορήγηση της με αναισθητικά ή φάρμακα νευρομυϊκού αποκλεισμού, διότι επιδρά στην απευλευθέρωση της ακετυλοχολίνης. Τέλος, η χορήγηση της κολιστίνης αντενδίδνυται σε άτομα με μυασθένεια Gravis, καθώς μπορεί να προκαλέσει αναπνευστική καταστολή [95].

1.11 ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ

Η χορήγηση της κολιστίνης γίνεται κυρίως με τη μορφή του ανενεργού προφαρμάκου CMS (colistimethate sodium), δεδομένου ότι είναι λιγότερο τοξικό, και το οποίο μετατρέπεται *in vivo*, έπειτα από υδρόλυση, στη δραστική μορφή της κολιστίνης. Για τον προσδιορισμό της χορηγούμενης δόσης αλλά και της οδού χορήγησης της κολιστίνης πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν πληροφορίες που αφορούν το είδος του παθογόνου μικροοργανισμού, την ευαισθησία του στην κολιστίνη, τη βαρύτητα και την εντόπιση της λοίμωξης, την ηλικία, το σωματικό βάρος και τη νεφρική λειτουργία του ασθενούς. Για τη βελτιστοποίηση του δοσολογικού σχήματος σε κάθε ασθενή θα ήταν επιθυμητό να προσδιορίζονται τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) εξαιτίας της εκτεταμένης διατομικής μεταβλητότητας της φαρμακοκινητικής που παρατηρείται σε όλες τις κατηγορίες της νεφρικής λειτουργίας αλλά και το στενό θεραπευτικό εύρος της κολιστίνης [96-101]. Η καταλληλότερη στιγμή για τη λήψη δείγματος αίματος για ανάλυση TDM είναι πριν την επόμενη χορήγηση της δόσης, όπου θεωρείται ότι η συγκέντρωση του CMS είναι μειωμένη συγκριτικά με την κολιστίνη [50]. Η διάρκεια της θεραπείας πρέπει να είναι τουλάχιστον πέντε ημέρες.

1.11.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ CMS

Σύμφωνα με την περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος το CMS πρέπει να χορηγείται με αργή ενδοφλέβια έγχυση σταθερού ρυθμού μέσα σε 30- 60 λεπτά, αφού πρώτα η κόνις που περιέχεται στο φυαλίδιο ανασυσταθεί με διάλυμα προς έγχυση (water for injection) ή με φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) ή ακόμα και με διάλυμα δεξτρόζης.

Η δόση του CMS μπορεί να εκφραστεί σε διαφορετικές δοσολογικές μονάδες, όπως τις διεθνείς μονάδες (IU), που χρησιμοποιούνται κυρίως στην Ευρώπη και σε mg ενεργούς βάσης κολιστίνης (CBA), που χρησιμοποιούνται κυρίως σε Βόρεια και Νότια Αμερική, όπου ένα εκατομμύριο διεθνείς μονάδες (IU) CMS αντιστοιχούν περίπου σε 33 mg CBA, που είναι 80 mg προφαρμάκου. Οι δυο αυτοί διαφορετικοί τρόποι έκφρασης μιας δόσης κολιστίνης (δηλ. ως mg CBA ή ως mg CMS) πολλές φορές συγχέονται από τους κλινικούς γιατρούς και

μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη φαρμακευτική αγωγή με αποτέλεσμα να απειλείται η ασφάλεια των ασθενών [97].

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται η αντιστοιχία των μονάδων IU του CMS σε mg CMS και σε mg ενεργούς βάσης κολιστίνης CBA.

Πίνακας 1.1: Αντιστοιχία CMS και δραστικής μορφής φαρμάκου [102]

Δραστικότητα		≈ mg CMS
IU CMS	≈ mg CBA	
12.500	0.4	1
150.000	5	12
1.000.000	34	80
4.500.000	150	360
9.000.000	300	720

1.11.2 ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ

Για την ενδοφλέβια χορήγηση επιλέγεται το CMS καθώς είναι λιγότερο τοξικό και μετατρέπεται in vivo στη δραστική μορφή της κολιστίνης. Πριν τη χορήγηση γίνεται ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου με όχι περισσότερο από 10ml διαλύματος ενέσιμου ύδατος (WFI) ή 0.9% χλωριούχου νατρίου (NaCl). Για την έγχυση, το περιεχόμενο του ανασυσταμένου φιαλιδίου, συνήθως αραιώνεται με 50ml 0.9% NaCl.

Το δοσολογικό σχήμα που ακολουθείται σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση συνήθως ξεκινάει με δόση φόρτισης 300 mg CBA (~ 9 εκατομμύρια IU CMS) με έγχυση 30-60λεπτών και στη συνέχεια χορηγείται η πρώτη δόση συντήρησης 12-24 ώρες αργότερα [15].

Μελέτες σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της κολιστίνης στο πλάσμα αργεί να φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα, ενώ όταν χορηγείται δόση

εφόδου η επιθυμητή συγκέντρωση επιτυγχάνεται πιο γρήγορα [105,106,109,110]. Αρχικά ο Dalfino [111] και οι συνεργάτες του επισήμαναν ότι μια δόση φόρτισης 9 MIU και δόση συντήρησης 9 MIU διαιρεμένη σε δύο δόσεις μπορεί να οδηγήσει στο επιθυμητό αποτέλεσμα, χωρίς να παρατηρείται νεφροτοξικότητα ή ανάπτυξη αντοχής.

Σύμφωνα με την Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) του EMA [112] η προτεινόμενη δόση φόρτισης σε ασθενείς με σωματικό βάρος άνω των 60 κιλών είναι 9 MIU ενώ όταν είναι κάτω από 60 κιλά χορηγούνται 6 MIU. Η δόση φόρτισης χορηγείται ανεξάρτητα από τη νεφρική λειτουργία. Η χορήγηση της δόση συντήρησης μπορεί να ξεκινήσει 12 [113] έως 24 ώρες [105] μετά τη δόση φόρτισης. Γενικά όμως η έναρξη της δόσης συντήρησης πρέπει να είναι ανάλογη με τα μεσοδιαστήματα των δόσεων.

Επίσης, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν δόση φόρτισης του CMS από 6 έως 12 MIU σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, προκειμένου να επιτευχθούν αποτελεσματικές συγκεντρώσεις κολιστίνης στο πλάσμα από την πρώτη ημέρα θεραπείας [109,110,111,114].

Οι δοσολογίες που προτείνονται από τον EMA [107] και τον FDA [108] κατηγοριοποιούν με βάση τη νεφρική λειτουργία και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.2: Δοσολογικά ημερήσια σχήματα συντήρησης CMS από EMA και FDA. [47]

Creatinine Clearance (mL/min)	European Medicines Agency Daily Dose Evaluated		US Food and Drug Administration Daily Doses Evaluated ^a	
			Patient Body Weight Approach	Uniform Weight of 80 kg Approach
≥80	10,9 MIU	360 mg CBA ^b	5 mg/kg CBA	360 mg CBA
50 to <80	9 MIU	300 mg CBA	3.8 mg/kg CBA	304 mg CBA
30 to <50	5.5–7.5 MIU	250 mg CBA	2.5 mg/kg CBA	200 mg CBA
10 to <30	4.5–5.5 MIU	183 mg CBA	1 mg/kg CBA	80 mg CBA
<10	3.5 MIU	117 mg CBA	1 mg/kg CBA	80 mg CBA

a Ο FDA προτείνει δυο τρόπους, ο ένας βασίζεται στο σωματικό βάρος του ασθενούς, για τους παχύσαρκους ασθενείς χρησιμοποιείται το ιδανικό βάρος, και στη δεύτερη προσέγγιση θεωρεί ότι το βάρος του ασθενούς είναι τα 80 κιλά. Και στις δυο προσεγγίσεις η μέγιστη ημερήσια δόση είναι τα 360 mg.

b Οι οδηγίες του EMA αναφέρουν ότι η δόση σε ασθενείς με καλή νεφρική λειτουργία μπορούν να φτάσουν τα 400mg τη μέρα, δηλαδή περίπου 12MIU.

Πρέπει να σημειωθεί ότι με την προσέγγιση του FDA σε ασθενείς χαμηλού σωματικού βάρους η δόση είναι αρκετά χαμηλή [47].

Έτσι, για έναν ασθενή με φυσιολογική νεφρική λειτουργία, χορηγείται μια ημερήσια δόση 300-360 mg CBA (~ 9-10,9 εκατομμύρια IU). Η συνολική αυτή δόση διαιρείται σε δύο μέρη που χορηγούνται με απόσταση 12 ωρών και η IV έγχυση για κάθε δόση πρέπει να διαρκεί 30-60'. Είναι όμως σημαντικό κατά τη διάρκεια της θεραπείας με κολιστίνη να παρακολουθείται η νεφρική λειτουργία και η δοσολογία να προσαρμόζεται βάση αυτής.

Επίσης, ο Nation και οι συνεργάτες του [113] ανέπτυξαν αλγορίθμους εξατομίκευσης της δοσολογίας της ενδοφλέβιας κολιστίνης σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση ώστε να επιτυγχάνεται ο επιθυμητός κλινικός στόχος για συγκέντρωση κολιστίνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση, $C_{ss,avg}$, ίση με 2mg/L.

Πίνακας 1.3: Τροποποίηση της δοσολογίας με βάση τη νεφρική λειτουργία [113].

Creatinine clearance, mL/min	Dose of colistimethate For $C_{ss,avg}$ of 2 mg/L	
	mg CBA/ day	Million IU/day
0	130	3.95
5 to < 10	145	4.40
10 to < 20	160	4.85
20 to < 30	175	5.30
30 to < 40	195	5.90
40 to < 50	220	6.65
50 to < 60	245	7.40

60 to < 70	275	8.35
70 to < 80	300	9.00
80 to < 90	340	10.3
≥90	360	10.9

Abbreviations: CBA, colistin base activity; C_{ss,avg}, average steady-state plasma concentrations of colistin.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι παρά τη χορήγηση των ίδιων δόσεων CMS, εμφανίζεται ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων κολιστίνης στο πλάσμα ανάμεσα στους ασθενείς, το οποίο πιθανόν να οφείλεται: α) σε διαφορές στη χημική σύνθεση (βαθμός μεθανοσουλφονίωσης) του CMS από μάρκα σε μάρκα ή από παρτίδα σε παρτίδα [116], β) σε μετατροπή του CMS σε κολιστίνη κατά τη συλλογή, την επεξεργασία ή και κατά την ανάλυση του δείγματος [14,115,117] και (γ)σε διαφορές μεταξύ των εθνικοτήτων.

1.11.2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΟΝΤΑΙ ΣΕ CRRT

Οι ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση μπορεί να αναπτύξουν οξεία ή οξεία επί χρόνιας νεφρική ανεπάρκεια με αποτέλεσμα να υποβάλλονται σε θεραπεία συνεχούς νεφρικής υποκατάστασης (CRRT). Παρόλο που υπάρχουν φαρμακοκινητικές μελέτες και συνιστώμενη δοσολογία για CMS σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση με φυσιολογική ή μειωμένη νεφρική λειτουργία, υπάρχουν μόνο μερικές μελέτες φαρμακοκινητικής του CMS και της κολιστίνης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε CRRT [114, 118-120].

Συνεπώς δεν υπάρχει συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένες συστάσεις μπορεί να οδηγήσουν σε υποθεραπευτικά επίπεδα φαρμάκου [14].

Το CMS και η κολιστίνη έχουν μοριακά βάρη 1.750 και 1.155 Da, αντίστοιχα, που σημαίνει ότι είναι αρκετά μικρά για να διαπερνούν τις μεμβράνες αιμοδιήθησης. Επίσης, η πρωτεϊνική δέσμευση της κολιστίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου και κυμαίνεται μεταξύ 10 και 50% σε μελέτες σε ζώα [42], γεγονός που επιτρέπει περαιτέρω την απομάκρυνση του φαρμάκου με CRRT. Παρόμοιες τιμές δέσμευσης με πρωτεΐνη έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση [110]. Επιπλέον, καθώς δεν πραγματοποιείται σωληναριακή επαναρρόφηση, η κάθαρση της κολιστίνης είναι, όπως

αναμενόταν, υψηλότερη από εκείνη που επιτεύχθηκε από έναν υγιή νεφρό, παρόλο που οι ρυθμοί διήθησης που εφαρμόζονται είναι συνήθως λιγότερο από το μισό του φυσιολογικού ρυθμού σπειραματικής διήθησης [114]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν σημαντική εξωσωματική κάθαρση κολιστίνης και CMS από το CRRT και υποστηρίζουν την πρόταση για υψηλότερες δόσεις CMS σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση που υποβάλλονται σε CVVHDF και CVVHD, προκειμένου να αποφευχθούν οι υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις και η επακόλουθη θεραπευτική αποτυχία [114,118,121].

Μια μελέτη 8 ασθενών που υποβλήθηκαν σε CVVHDF (ρυθμός υγρού αιμοκάθαρσης, 1 έως 1,5 λίτρα / ώρα) έδειξε ότι οι μέσες μέγιστες συγκεντρώσεις κολιστίνης μετά από δόση φόρτισης 9MU ήταν 1,55mg/l και κατά τη διάρκεια της θεραπείας συντήρησης με 4,5MU κάθε 12 ώρες ήταν 1,72 mg/l, που είναι χαμηλότερες από τις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Οι συγγραφείς λοιπόν πρότειναν δόση φόρτισης 12 MU και δόση συντήρησης 6,7-7,5 MIU κάθε 12 ώρες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε CVVHDF, παρ' όλα αυτά μια τέτοια δοσολογία χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. [114]

Η μελέτη αυτή ενισχύει την πρόταση της φαρμακοκινητική μελέτης των Garonzik et al [106] για ημερήσια δόση συντήρησης >10 MIU CMS σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης, υπερβαίνοντας έτσι τις ημερήσιες δόσεις CMS ασθενών με φυσιολογική CL_{Cr} . Η μελέτη του Garonzik [106] έχει πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με ένα μεγάλο εύρος νεφρικής λειτουργίας περιλαμβάνοντας και εκείνους που υποβάλλονται σε CRRT και προτείνονται δοσολογικά σχήματα βάση αλγορίθμων, για εξατομίκευση δόσης με αποτέλεσμα να επιτευχθεί το επιθυμητό $C_{ss,avg}$.

Πίνακας 1.4: Προτεινόμενες δόσεις φόρτισης και ημερήσιες δόσεις συντήρησης CMS^a. [106]

Dose	Category of critically ill patient	Dosing suggestions
Loading dose	All patient categories	Loading dose of CBA (mg) = colistin $C_{ss,avg}$ target ^b X 2.0 X body wt (kg) ^c See caveat in footnote c. First maintenance dose should be given 24 h later.
Maintenance dose	Not on renal replacement	Daily dose of CBA (mg) = colistin $C_{ss,avg}$ target ^b X (1.50 X CrCL + 30) ^d . Recommended dosage intervals based on CrCL: <10ml/min/1.73 m ² , every 12 h, 10-70 ml/min/1.73 m ²

		every 12 (or 8)h, and >70 ml/min/1.73 m ² every 12 (or 8)h. See important caveat in footnote d.
	Receiving intermittent hemodialysis	Daily dose of CBA on a non-HD day to achieve each 1.0-mg/liter colistin C _{ss,avg} target ^b = 30 mg ^e . Supplemental dose of CBA on a HD day ^f : add 50% to the daily maintenance dose if the supplemental dose is administered during the last hour of the HD session, or add 30% to the daily maintenance dose if the supplemental dose is administered after the HD session. Twice-daily dosing is suggested.
	Receiving continuous renal replacement	Daily dose of CBA to achieve each 1.0-mg/liter colistin C _{ss,avg} target = 192 mg. ^g Doses may be given every 8-12 h.

a Expressed as mg of colistin base activity (CBA) for various categories of critically ill patients. The suggested maintenance daily dose would commence 24 h after administration of a CMS loading dose. Example: To target a colistin C_{ss,avg} of 2.5 mg/liter, a 55-kg patient with a CrCL of 40 ml/min/1.73m² would receive a loading dose of 275 mg CBA followed in 24 h by commencement of a maintenance regimen of 225 mg CBA/day in 2 to 3 equally divided doses.

b Colistin C_{ss,avg} target is expressed in mg/liter. This target should be based on MIC, site, and severity of infection.

c Use the lower of ideal or actual body weight, expressed in kg. At this time, we suggest caution in the use of a loading dose greater than 300 mg CBA (see the text for more details).

d Based upon the population PK analysis for 101 critically ill patients not on continuous renal replacement therapy. Colistin C_{ss,avg} target expressed in mg/L. Creatinine clearance (CrCL) expressed in ml/min/1.73m² . Although the Jelliffe equation was used to estimate CrCL in this study, other means (e.g., Cockcroft and Gault equation) may be used to estimate CrCL which would then be normalized to a body surface area of 1.73m². See text for caveat regarding use of the algorithm in patients with CrCL values < 70 ml/min/1.73m² or when targeting a “high” colistin C_{ss,avg}, both being circumstances where the algorithm may predict daily doses of CBA substantially greater than the current upper limit in the product label.

e Based upon use of equation 10 and setting CrCL to zero.

f Supplemental dose of CMS to achieve a similar colistin C_{ss,avg} on a HD day as occurs on a non-HD day. It is assumed that the hemodialysis session occurs toward the end of a CMS dosage interval.

g Based on the population PK analysis for 4 critically ill patients receiving continuous renal replacement therapy

1.11.3 ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ [104]

Η μεθανοσουλφονική κολιστίνη μπορεί να δοθεί και με τη μορφή αερολύματος με τη χρήση εκνεφωτή, για τη θεραπεία λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Για την παρασκευή του διαλύματος πριν τη χορήγηση πρέπει πρώτα η κόνις να διαλύεται σε 2-4 ml μίγματος είτε ίσης ποσότητας φυσιολογικού ορού 0,9% NaCl με ενέσιμο ύδωρ είτε μόνο με ενέσιμο ύδωρ. Το προκύπτον διάλυμα είναι θολό και θα πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων, γι' αυτό κατά την παρασκευή του, η προσθήκη του διαλύτη μέσα στο γυάλινο φιαλίδιο πρέπει να γίνει αργά και να ακολουθεί ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα χορηγείται μέσω νεφελοποιητή, συνδεδεμένο σε παροχή αέρα/οξυγόνου.

Η κλινική κατάσταση του ασθενούς και η ανταπόκριση του στη χορηγούμενη θεραπεία θα πρέπει να καθορίζουν τη δοσολογία του φαρμάκου.

Συνιστώμενες δόσεις:

Παιδιά < 2 ετών: 500.000 –1.000.000 IU δύο φορές την ημέρα.

Παιδιά > 2 ετών και ενήλικες: 1.000.000 –2.000.000 IU δύο ή τρεις φορές την ημέρα.

1.11.4 ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΡΑΧΙΑΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ [1]

Η κολιστίνη μπορεί επίσης να χορηγηθεί ενδοκοιλιακά και ενδοραχιαία. Η δοσολογία ωστόσο για τη χορήγηση αυτή είναι αμφιλεγόμενη.

Η χορήγησή της υπό αυτές τις οδούς έχει αναφερθεί για τη θεραπεία λοιμώξεων του κεντρικού νευρικού συστήματος που προκαλούνται από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια. Η διάρκεια της θεραπείας στην βιβλιογραφία μπορεί να ποικίλει από μία έως τέσσερις εβδομάδες.[103] Η ενδοραχιαία δόση κυμαίνεται από 40,000IU έως 125,000IU ημερησίως, ενώ στην ενδοκοιλιακή χορήγηση η δόση κυμαίνεται από 125,000 έως 250,000 IU χωρισμένη σε δυο δόσεις, ο χορηγούμενος όγκος στην ενδοραχιαία χορήγηση δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 1 ml. Η πιο συχνά εμφανιζόμενη ανεπιθύμητη ενέργεια στις περιπτώσεις αυτές ήταν η ασηπτική μηνιγγίτιδα.

1.12 ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό που έγινε ευρέως γνωστό τη δεκαετία του 1950, εξαιτίας όμως των ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφάνιζε, η αγωγή με κολιστίνη δεν ήταν ανεκτή από τους ασθενείς και έτσι η χρήση της περιορίστηκε από το 1980 και έπειτα. Τα τελευταία χρόνια όμως η ανάπτυξη ανθεκτικών Gram(-) στελεχών σε όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά αλλά και η έλλειψη σύνθεσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων έφεραν ξανά την κολιστίνη στο προσκήνιο. Από τις δύο μορφές της κολιστίνης που είναι διαθέσιμες, η θειική κολιστίνη εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα στους ασθενείς σε σύγκριση με τη μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS). Ανάλογα με την οδό που επιλέγεται για τη χορήγηση του φαρμάκου εμφανίζονται και οι αντίστοιχες ανεπιθύμητες ενέργειες. [104]

1.12.1. ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ

Οι δυο κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες που εκδηλώνονται μετά την ενδοφλέβια χορήγηση κολιστίνης είναι η νεφροτοξικότητα και η νευροτοξικότητα. Και οι δυο αυτές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι δοσοεξαρτώμενες, αναστρέψιμες, και ταχέως μειούμενες όταν διακόπτεται η χορήγηση του φαρμάκου. [1]

A. Νεφροτοξικότητα

Το ποσοστό της νεφροτοξικότητας όπως προσδιορίζεται, μέσα από τις πιο πρόσφατες μελέτες, είναι μειωμένο σε σχέση με τις παλαιότερες.[104] Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι έχει περιοριστεί η χρήση της θειικής κολιστίνης που έχει μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με το CMS, για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Επιπλέον, σήμερα δίνεται η δυνατότητα για καθημερινό έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας και των παραγόντων που μπορούν να την επηρεάσουν, με αποτέλεσμα να εξατομικεύεται η δοσολογία που θα λάβουν οι ασθενείς και έτσι να αποφεύγεται η χορήγηση υψηλότερων δόσεων όπως συνέβαινε στο παρελθόν. [1]

Παρ' όλα αυτά το ποσοστό νεφροτοξικότητας που προσδιορίζεται από τις σύγχρονες μελέτες έχει ένα μεγάλο εύρος που μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια μεταξύ των

πληθυσμών των ασθενών και στη χρήση διαφορετικών κριτηρίων προσδιορισμού της νεφροτοξικότητας. Τα τελευταία χρόνια, για να μειωθεί αυτή η μεταβλητότητα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κριτήρια για τον προσδιορισμό της και τα κριτήρια RIFLE αποτελούν ένα απλό και άμεσα διαθέσιμο κλινικό εργαλείο για την ταξινόμηση της νεφροτοξικότητας σε διαφορετικούς πληθυσμούς. [122-124]

Η νεφροτοξικότητα της κολιστίνης αναφέρεται μερικές φορές ως ένα ταχέως εμφανιζόμενο γεγονός, που μπορεί να συμβεί εντός των πέντε πρώτων ημερών της θεραπείας. [125,126]

Οι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση νεφροτοξικότητας από την κολιστίνη ποικίλουν μεταξύ των μελετών που υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Ορισμένοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση νεφροτοξικότητας είναι η προχωρημένη ηλικία, το ιστορικό νεφρικής ανεπάρκειας και η προγενέστερη συνδυαστική θεραπεία με άλλους νεφροτοξικούς παράγοντες [44,127]. Πιο αναλυτικά η προχωρημένη ηλικία αναγνωρίζεται ως ένας παράγοντας κινδύνου διότι ότι οι ηλικιωμένοι ασθενείς είναι πιο πιθανό να έχουν συννοσηρότητες ενώ ταυτόχρονα, στην ηλικία αυτή υπάρχει αναμενόμενη έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας [15, 128]. Στους νεφροτοξικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν εντάσσονται τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ), τα ενδοφλέβια σκιαγραφικά, τα νεφροτοξικά αντιβιοτικά όπως η ριφαμπικίνη, η βανκομυκίνη και οι αμινογλυκοσίδες, τα διουρητικά αγκύλης, τα αγγειοσυσπαστικά/ινότροπα φάρμακα και οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης [129]. Μέσα από άλλες μελέτες επισημαίνεται ότι οι χρόνιες συνυπάρχουσες καταστάσεις, η σοβαρότητα της νόσου (υψηλότερη βαθμολογία APACHE II), καθώς και η παρουσία υποαλβουμιναιμίας είναι και αυτοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση νεφροτοξικότητας. [15,130,131]

Επίσης όταν η μέση συγκέντρωση της κολιστίνης στο πλάσμα που παρατηρείται μετά τις δόσεις συντήρησης είναι $>2,42$ mg/L φαίνεται να συνδέεται με αύξηση της νεφροτοξικότητας. [44]

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νεφροτοξικότητας της κολιστίνης περιλαμβάνουν μείωση της κάθαρσης της κρεατινίνης, πρωτεϊνουρία, κυλινδρουρία ή ολιγουρία. [104,131-133]

Η νεφροτοξικότητα της κολιστίνης, σε ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού $<1,2$), ορίζεται ως αύξηση της κρεατινίνης στον ορό σε επίπεδα > 2 , μείωση

κατά 50% στην υπολογισμένη κάθαρση κρεατινίνης σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς ή μείωση της νεφρικής λειτουργίας που οδηγεί σε ανάγκη για νεφρική υποκατάσταση. Σε ασθενείς με προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία, η νεφρική ανεπάρκεια ορίζεται ως αύξηση του επιπέδου κρεατινίνης ορού ίση ή μεγαλύτερη από 50%, μείωση κατά 50% της υπολογισμένης κάθαρσης κρεατινίνης σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς ή μείωση της νεφρικής λειτουργίας που οδηγεί στην ανάγκη για θεραπεία νεφρικής υποκατάσταση. Η κάθαρση κρεατινίνης πρέπει να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον τύπο Cockcroft Gault. [131]

Το CMS αποβάλλεται κυρίως μέσω της νεφρικής οδού, με νεφρική σωληναριακή έκκριση. Ενώ η κολιστίνη υφίσταται εκτεταμένη νεφρική σωληναριακή επαναρρόφηση (έως και 80%) και απομακρύνεται κυρίως με μη νεφρικούς μηχανισμούς. [11,131,134]

Στη νεφροτοξικότητα της κολιστίνης συμβάλει το δ-αμινοβουτυρικό οξύ που βρίσκεται στο μόριο της κολιστίνης, καθώς και η σύσταση της αλυσίδας του λιπαρού οξέος και ο μηχανισμός της νεφροτοξικότητας μοιάζει με αυτόν της αντιβακτηριακής της δράση. Στην πραγματικότητα, η κολιστίνη αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων, η οποία οδηγεί στην είσοδο εντός των κυττάρων κατιόντων, ανιόντων και νερού που οδηγεί σε διόγκωση των κυττάρων και κυτταρική λύση. Επομένως, η κολιστίνη προκαλεί οξεία σωληναριακή νέκρωση που εκδηλώνεται ως αύξηση της κρεατινίνης στον ορό και μείωση της κάθαρσης κρεατινίνης, μαζί με την πρωτεϊνουρία, την κυλινδρουρία και την ολιγουρία που προαναφέρθηκαν. Αυτή η επίδραση της κολιστίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια της έκθεσης. [104,135,136]

Υπάρχουν επίσης αναφορές περιπτώσεων οξείας διάμεσης νεφρίτιδας λόγω αντιδράσεων υπερευαισθησίας στις πολυμιξίνες. [44,137]

Τα ιστολογικά ευρήματα νεφρικής βλάβης που προκαλούνται από την κολιστίνη συνήθως περιλαμβάνουν εστιακή ακανόνιστη διαστολή σωληναρίων, σχηματισμό επιθηλιακών και πολυμορφοπύρηνων κυττάρων, και εκφυλισμό και αναγέννηση επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί διαχωρισμός των σωληναρίων από τους γύρω ιστούς, κάτι που υποδηλώνει οίδημα. Η βασική μεμβράνη είναι συνήθως ανέπαφη, όπως και τα σπειράματα. [104,138]

Σε μια μελέτη των Ozkan et al. [139] οι συγγραφείς προσπάθησαν να διερευνήσουν την παθογένεση της νεφροπάθειας που σχετίζεται με την κολιστίνη. Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος της απόπτωσης που σχετίζεται με την κασπάση και συγκεκριμένα της κασπάσης 1 και 3, της καλπαΐνης 1, τους οξειδωτικούς παράγοντες iNOS και eNOS στην παθογένεση της νεφροτοξικότητας της κολιστίνης. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η οξειδωτική βλάβη συσχετίστηκε με αύξηση των iNOS και eNOS και ότι η αύξηση της έκφρασης eNOS ήταν παράλληλη με την αποπτωτική βλάβη και συνεπώς τη νεκρωτική βλάβη. Αποδείχθηκε επίσης αύξηση της κασπάσης 1 και 3, τα οποία είναι μέλη της οικογένειας πρωτεάσης κυστεΐνης. Η κασπάση 3 είναι ένα ένζυμο το οποίο ενεργοποιείται μέσω των μονοπατιών ενδογενούς και εξωγενούς απόπτωσης και οδηγεί στη θανάτωση του κυττάρου προκαλώντας βλάβες στο DNA. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η απόπτωση των νεφρικών κυττάρων σχετίζεται με τη νεφροπάθεια που προκαλείται από την κολιστίνη.

Για την πρόληψη της νεφροτοξικότητας, η λήψη ασκορβικού οξέος ή άλλου αντιοξειδωτικού φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση της νεφρικής βλάβης που προκαλείται από το CMS, αλλά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα. [15]

Όταν κατά τη διάρκεια της αγωγής με κολιστίνη εμφανίζεται νεφροτοξικότητα, προτείνεται η άμεση διακοπή του φαρμάκου. Ταυτόχρονα, η χορήγηση μαννιτόλης για την πρόκληση ωσμωτικής διούρησης βοηθά στη μείωση των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα. Τέλος κρίνεται απαραίτητος και ο τακτικός έλεγχος των προσλαμβανόμενων υγρών και των επιπέδων των ηλεκτρολυτών στο αίμα, ώστε να επιτυγχάνεται η κατάλληλη ηλεκτρολυτική ισορροπία. [104]

B. Νευροτοξικότητα

Η δεύτερη κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια της κολιστίνης είναι η νευροτοξικότητα. Η επίπτωση της νευροτοξικότητας είναι μικρότερη σε σύγκριση με τη νεφροτοξικότητα. Η νευρολογική τοξικότητα που προκύπτει έπειτα από τη συστηματική χορήγηση της κολιστίνης περιλαμβάνει ζάλη, γενικευμένη ή μη μυϊκή αδυναμία, παραισθησία προσώπου ή περιφερική παραισθησία, μερική κώφωση, οπτικές διαταραχές, ίλιγγο, σύγχυση, παραισθήσεις, επιληπτικές κρίσεις, αταξία και νευρομυϊκό αποκλεισμό. Το τελευταίο

προκαλεί συνήθως ένα κλινικό σύνδρομο που μοιάζει με μυασθένεια, καθώς συνδέεται με αναπνευστική ανεπάρκεια ή άπνοια λόγω παράλυσης των αναπνευστικών μυών. [140]

Υπάρχουν όμως κάποια παλιά περιστατικά που έχουν αναφερθεί, που συσχετίζουν την ενδομυϊκή χορήγηση πολυμυξινών με την ανάπτυξη επεισοδίων αναπνευστικής άπνοιας. [104,140-144]

Παρ' ότι στην παλαιότερη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με την άπνοια, στην πρόσφατη βιβλιογραφία τέτοια περιστατικά είναι πολύ σπάνια. [145,146]

Τέλος, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της νευροτοξικότητας και της κυστικής ίνωσης [104] διότι στους ασθενείς αυτούς αναφέρθηκαν υψηλότερα ποσοστά νευροτοξικότητας σε σύγκριση με ασθενείς που δεν είχαν κυστική ίνωση.

Οι παράγοντες κινδύνου που ενδέχεται να προκαλέσουν την ανάπτυξη νευροτοξικότητας περιλαμβάνουν την υποξία και τη συγχορήγηση πολυμυξινών με μυοχαλαρωτικά, ναρκωτικά, ηρεμιστικά, αναισθητικά φάρμακα ή κορτικοστεροειδή. [104,141,147]

Επίσης ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία ή μυασθένεια gravis διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης νευρομυϊκού αποκλεισμού και αναπνευστικής παράλυσης. [148]

Οι ήπιες νευρολογικές εκδηλώσεις των πολυμυξινών συνήθως υποχωρούν μετά από άμεση διακοπή των φαρμάκων. Παρουσία όμως νευρομυϊκού αποκλεισμού είναι επιτακτική η άμεση διακοπή των πολυμυξινών και άλλων νευροτοξικών παραγόντων. Εάν ο ασθενής εμφανίσει άπνοια, πρέπει να γίνει μηχανική υποστήριξη της αναπνοής. Ενώ οι ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλονται σε αιμοδιήθηση μόνο όταν συνυπάρχει νευροτοξικότητα με νεφροτοξικότητα. [104]

1.12.2 ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ

Η θεραπεία με εισπνεόμενη κολιστίνη μπορεί να περιπλέκεται από την εμφάνιση πονόλαιμου, βήχα, βρογχοσυστολής και σφίξιμο στο στήθος. Η φύση της βρογχοσυστολής που αναπτύσσεται κατά την εισπνοή κολιστίνης έχει προταθεί να σχετίζεται με διάφορους μηχανισμούς. Μεταξύ αυτών είναι η άμεση χημική διέγερση, η απελευθέρωση της ισταμίνης,

η αλλεργία στον αεραγωγό, ο ερεθισμός από χημικές ουσίες ή από τον αφρό που παράγεται κατά τη διάρκεια νεφελοποίησης, και η υπεροσμωτικότητα στον αεραγωγό [149]. Οι νεφελοποιημένες πολυμυξίνες μπορούν να προκαλέσουν βρογχοσυστολή ακόμη και σε ασθενείς χωρίς ιστορικό άσθματος ή ατοπίας, αν και όταν υπάρχουν αυτές οι καταστάσεις, ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος [149]. Συνήθως η βρογχοσυστολή απαιτεί διακοπή του φαρμάκου, χορήγηση βρογχοδιασταλτικών και συμπληρωματικού οξυγόνου.

1.13 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΣΟΥΛΦΟΝΙΚΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ

Η κολιστίνη ως βάση, στη μη εστεροποιημένη μορφή της, μπορεί να κατανεμηθεί καλά τόσο στο υδατικό περιβάλλον, όσο και στις λιπιδικές μεμβράνες των κυττάρων. Η υδρόφοβη συμπεριφορά της οφείλεται στην ύπαρξη λιπαρών οξέων στο μόριο της. Στις γ-αμινοβουτυρικές ομάδες που διαθέτει, οφείλονται οι βασικές της ιδιότητες ($pK_a=10$). Επίσης, η κολιστίνη ενεργοποιείται από τις λιπάσες, ενώ εμφανίζει ανθεκτικότητα σε διάφορα πεπτικά ένζυμα όπως η θρυψίνη (pH 4.4-7.5), η πεψίνη (pH 2.2-4.8), η ερεψίνη (pH 6.1-7.8), και η παγκρεατίνη (pH 4.4-7.5). [12]

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της σταθερότητας της θειικής κολιστίνης σε διαλύματα. Σε υδατικά διαλύματα είναι σταθερή στους 4°C για 60 ημέρες ενώ στους 37°C για 120 ώρες. Δεν εμφανίζει ικανοποιητική σταθερότητα στο πλάσμα ($\theta=37^\circ\text{C}$) και σε διαλύματα με $pH>6$. Σε μορφή σκόνης μπορεί να διατηρηθεί σταθερή για 12 μήνες σε θερμοκρασία 4 °C. [12,116]

Η σταθερότητα της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS), προσδιορίζεται μέσω υπολογισμού της συγκέντρωσης της κολιστίνης που σχηματίζεται, έπειτα από την υδρόλυση της CMS. Αυτό συμβαίνει με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Είναι γνωστό ότι η CMS αποτελεί προφάρμακο το οποίο υδρολύεται σε υδατικό περιβάλλον οδηγώντας σε ένα μίγμα σουλφομεθυλιωμένων παραγώγων και κολιστίνης. Βάσει αυτών των δεδομένων, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες προκειμένου να γίνει μια εκτίμηση της σταθερότητας της CMS. Σε μια από αυτές χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SAX-HPLC, με σκοπό να υπολογιστεί η σταθερότητα της CMS σε υδατικά διαλύματα. Η μελέτη έδειξε ότι μετά από παραμονή του διαλύματος στους 37 °C για 12 ώρες δεν ανιχνεύεται CMS. Αντιθέτως

διατηρήθηκε σταθερό χωρίς να μετατραπεί σε κολιστίνη, στους 4 °C για διάρκεια 2 ημερών.[116]

Η υδρόλυση της CMS σε κολιστίνη είναι απαραίτητη για να εκδηλωθεί η αντιμικροβιακή της δράση. Σε *in vitro* κατάσταση κάτι τέτοιο είναι απαγορευτικό. Είναι προφανές λοιπόν, ότι η παραγωγή και η αποθήκευση σκευασμάτων και βιολογικών δειγμάτων ασθενών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακοκινητικές μελέτες και περιέχουν CMS, πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Στην πρώτη περίπτωση αν συμβεί υδρόλυση του CMS πριν τη χορήγηση του φαρμάκου υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για πρόκληση τοξικότητας από την κολιστίνη στον ασθενή [12], ενώ στην δεύτερη περίπτωση θα είναι λανθασμένα τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής μελέτης.

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες στις οποίες μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στην σταθερότητα της CMS και της κολιστίνης στο πλάσμα, για διάστημα 6 με 12 μηνών. Πιο αναλυτικά, το πλάσμα που περιείχε κολιστίνη εμφάνισε μεγαλύτερη σταθερότητα όταν αποθηκεύτηκε στους -70 °C και στους -80 °C, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της στους -20 °C.

Το πλάσμα που περιείχε CMS σε συγκεντρώσεις από 2mg/L έως 30mg/L εμφάνισε στους -80 °C και στους -70 °C ικανοποιητική σταθερότητα για το CMS με αποτέλεσμα να μην υδρολύεται προς κολιστίνη. Αντιθέτως στους -20°C το δείγμα με συγκέντρωση 2mg/L φάνηκε να μην είναι σταθερό καθώς μέσα στους πρώτους 2 μήνες ανιχνεύθηκε ποσότητα κολιστίνης. Συμπερασματικά το πλάσμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση CMS εμφάνιζε καλύτερη σταθερότητα, σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που μελετήθηκε, υποδηλώνοντας έτσι ότι η σταθερότητα του CMS στο πλάσμα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση[150]. Τέλος, διαλύματα τα οποία περιείχαν CMS (77.5 mg/ml) και προορίζονταν για εισπνεόμενη χρήση εμφάνιζαν καλή σταθερότητα σε κατάσταση αποθήκευσης στους 4 °C και στους 25 °C [151].

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ- ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

2.1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί συνέχεια προηγούμενης με στόχο τη μέτρηση των επιπέδων της κολιστίνης στο πλάσμα αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με λοίμωξη από πολυανθεκτικά Gram (-) βακτήρια, στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του ΓΝΑ «Ευαγγελισμός», μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του μετά νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS) και τον χαρακτηρισμό της φαρμακοκινητικής του δραστικού μεταβολίτη, της κολιστίνης, για κάθε ασθενή. Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος έξι (6) αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση μετά από την έγγραφη συγκατάθεση.

2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στο πλαίσιο της μελέτης ελήφθησαν δείγματα αίματος σύμφωνα με το δειγματοληπτικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στον Πίνακα 2.1. Η δειγματοληψία έγινε από το ιατρικό προσωπικό της ΜΕΘ στο Νοσοκομείο «Ευαγγελισμός».

Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη περιλαμβάνονται έξι (6) ασθενείς ηλικίας >18 ετών (διάμεση ηλικία 44.5 έτη, εύρος 38-81 έτη) με νοσοκομειακή λοίμωξη που έχουν απόλυτη ένδειξη ενδοφλέβιας- i.v. χορήγησης κολιστίνης είτε εμπειρικά (βάσει αποικισμών και επιδημιολογίας της αντοχής στη ΜΕΘ), είτε στα πλαίσια τεκμηριωμένης λοίμωξης (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*) και βρίσκονται σε φίλτρο συνεχούς φλεβοφλεβικής αιμοδιαδιήθησης – Continuous Venovenous Hemodiafiltration – CVVHDF).

Η κολιστίνη χορηγήθηκε με τη μορφή CMS σε δόση εφόδου 9 MIU (αντιστοιχεί σε 270 mg colistin) και στη συνέχεια σε δόση 4.5 MIU (αντιστοιχεί σε 135 mg colistin) κάθε 12 ώρες.

Πίνακας 2.1: Πρωτόκολλο δειγματοληψίας αίματος

	0	15 min	1h	2	6	12	24
Πλάσμα (1 ^η δόση)	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος
	0		1h	2	6	12	
Πλάσμα (4 ^η δόση)	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	

Στην περίπτωση που η δειγματοληψία ήταν παράλληλη με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης στο δειγματοληπτικό σχήμα προστίθενται επιπλέον δείγματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2). Το συνοπτικό πρωτόκολλο της μελέτης δίνεται διαγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.

Πίνακας 2.2: Πρωτόκολλο συμπληρωματικής δειγματοληψίας αίματος παράλληλα με αιμοκάθαρση

	0	15 min	1h	2	6	12	24
Pre-filter (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				
	0		1h				
Post-filter (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				
Υγρό Διύλισης (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				

2.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΠΡΩΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E.MERK (Darmstadt, Germany)
- Μεθανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, E.MERK (Darmstadt, Germany)
- Τετραϋδροφουράνιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, Lab Scan (Dublin, Ireland)
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA)
- Υδροξείδιο του νατρίου, (NaOH, sodium hydroxide 1mol/l CHEM-LAB, Belgium)
- Βορικό οξύ, (H₃BO₃ pure 99.8%, PENTA)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, (NaHCO₃, PANREAC QUIMICA, Barcelona Spain,)
- Αντιδραστήριο φθορισμού FMOC-CL (9-Fluorenylmethyl chloroformate, 98%, ACROS ORGANICS)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO 99,9% MERCK KgaA (Darmstadt, Germany)

2.2.2 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

- Μεθανοσουλφονική κολιστίνη, Colistin Sulfate, Alfa Aesar LOT:G05Z041
- Θεϊκή νετιλμικίνη, Netilmicin sulfate, SIGMA LOT: 052M4162V (ως εσωτερικό πρότυπο)

2.2.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου, όγκου 1,5ml τύπου erpendorf
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 16x100mm

2.2.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Αναλυτικός ζυγός, KERN
- Στήλη LC column Luna 3n C18 (2) 100A, size 50x3mm
- Σύστημα HPLC, SIL-HTC auto sampler SHIMADZU
- Αντλία, LC-20AD , prominence LIQUID CHROMATOGRAPH
- Όργανο αποσυμπίεσης, DGU-20A5R DEGASSING UNIT

- Ανιχνευτής, RF-20A prominence FLUORESCENCE DETECTOR
- Vortex, IKA MS 3 basic
- Φυγόκεντρος, ERMILE Ξ32HK
- Πεχάμετρο, SCHOTT Instruments
- Συμπιεστής, Sample concentrator, TECHINE DRI-BLOCK DB-3

2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ COLISTIN ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η ποσοτικοποίηση της κολιστίνης στο πλάσμα βασίστηκε στη δημοσιευμένη μέθοδο των Divyabharathi Cheryala, I-Lin Tsai, Hsin-Yun Sunb, Shu-Wen Lin, Ching-Hua Kuo [153] (Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma) με τροποποιήσεις σύμφωνα με τις μελέτες των Markou και συνεργατών [152] και Ratjen F. και συνεργατών [154]. Η χρησιμοποιούμενη κινητή φάση (mobile phase) αποτελείται από ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, τετραϋδροφουράνιο (THF) και νερό σε αναλογία όγκου 82%/16%/2% (82/16/2).

Συνοπτικά, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η νετιλμυκίνη ως εσωτερικό πρότυπο τόσο στην καμπύλη αναφοράς (καμπύλη διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης) όσο και στα άγνωστα δείγματα. Έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών πλάσματος με προσθήκη ισχυρού οξέος και ακολούθησε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με φυγοκέντρηση. Δεδομένου ότι η κολιστίνη είναι ένα μόριο που δεν φθορίζει, για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίησή της τροποποιήθηκε σε φθορίζον μόριο με την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου (διαδικασία παραγωγοποίησης). Έτσι, μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε στήλη στερεάς εκχύλισης (Solid Phase Extraction Column – S.P.E.), όπου γίνεται παραγωγοποίηση της κολιστίνης με κατάλληλο αντιδραστήριο, FMOC-CL. Ακολουθεί η έκλυση της ουσίας με κατάλληλο διαλύτη, εξάτμιση του διαλύτη, ανασύσταση του στερεού υπολοίπου και μέτρηση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (reverse-phase high performance liquid chromatography, HPLC) με ανιχνευτή φθορισμού. Η αναλυτική πειραματική πορεία τόσο για την καμπύλη αναφοράς όσο και για τα άγνωστα δείγματα, περιγράφεται στα επόμενα εδάφια.

2.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Παρασκευή βοηθητικών διαλυμάτων:

- ✓ **Διάλυμα NaOH 10%**
Ζυγίζονται 10 gr άνυδρου NaOH σε μορφή pellet και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ακολουθεί αραιώση με νερό μέχρι τα 100 mL
(προσοχή η αραιώση γίνεται σταδιακά καθώς κατά την διάλυση έχουμε αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος)
- ✓ **Ρυθμιστικό Διάλυμα NaHCO₃ (1% pH=10)**
Ζυγίζεται 1 gr NaHCO₃ και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL όπου αραιώνεται περίπου μέχρι τη μέση. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH με την προσθήκη διαλύματος NaOH 10 % μέχρι να επιτευχθεί το ζητούμενο pH 10 και μετά αραιώνεται μέχρι την χαραγή.
- ✓ **Διάλυμα βορικού οξέος H₃BO₃ 0,1M**
Ζυγίζονται 1,24 gr H₃BO₃ και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ακολουθεί αραιώση με νερό μέχρι την χαραγή.
(για να διευκολυνθεί η διάλυση του στερεού βορικού οξέος στο νερό, χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων).
- ✓ **Διάλυμα αντιδραστήριου παραγωγοποίησης Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (Fmoc-CL) 100 mM**
Ζυγίζονται 260 mg Fmoc-CL και μεταφέρονται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 10 mL. Ακολουθεί αραιώση με ακετονιτρίλιο (ACN) μέχρι την χαραγή.

Πριν από κάθε ανάλυση (ποσοτικοποίηση κολιστίνης) κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, δηλαδή μια καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων ως προς το αναλυτικό σήμα που είναι ο λόγος των εμβαδών των λαμβανόμενων κορυφών της κολιστίνης προς εκείνων του χρησιμοποιούμενου εσωτερικού πρότυπου (I.S.), που είναι η νετιλμυκίνη.

2.3.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Αρχικά, παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης της κολιστίνης και του εσωτερικού πρότυπου της νετιλμυκίνης (stock solutions).

Παρασκευή Stock Solution Colistin sulfate 1 mg/mL

Ζυγίζονται 100 mg Colistin Sulfate, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώνονται με H₂O μέχρι τη χαραγή. Έτσι προκύπτει το stock solution colistin sulfate τελικής συγκέντρωσης C_{stock} = 1 mg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινού χρώματος γυάλινο μπουκάλι με βιδωτό πώμα και αποθηκεύεται στους -70 °C.

Παρασκευή Stosk Solution netilmicin (I.S.) 0,05 mg/mL

Ζυγίζονται 50 mg νετιλμικίνης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με H₂O μέχρι τη χαραγή. Έτσι προκύπτει διάλυμα εσωτερικού προτύπου τελικής συγκέντρωσης C_{IS} = 0.05 mg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινού χρώματος γυάλινο μπουκάλι με βιδωτό πώμα και αποθηκεύεται στους -70 °C.

Κάθε εργαστηριακή μέρα, παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας (working solutions), δηλαδή διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης κολιστίνης και νετιλμικίνης που προκύπτουν με αραιώση ποσότητας stock solution σε κατάλληλο όγκο H₂O, προκειμένου να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας νετιλμικίνης (I.S.)

Από το stock solution netilmicin 0,05 mg/mL, λαμβάνονται 100 μL και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη μέχρι τελικού όγκου 10 mL. Έτσι παρασκευάζεται διάλυμα I.S. 5 μg/mL. (C_{ISplasma} = 2 μg/mL).

Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας Colistin sulfate

Παρασκευάζονται τα Working Solutions στις συγκεντρώσεις (C_{ws}) που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3). Από τα διαλύματα αυτά προκύπτουν τα πρότυπα δείγματα εργασίας σε πλάσμα αίματος με τελικές συγκεντρώσεις C_{plasma} (Πίνακας 2.3) που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς μετά από μέτρηση στην HPLC, ενώ χρησιμοποιούνται και τρία δείγματα ελέγχου σε τρία επίπεδα της καμπύλης αναφοράς όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3:

Πίνακας 2.3: Εύρος συγκεντρώσεων διαλυμάτων εργασίας κολιστίνης και δειγμάτων ελέγχου (QC) σε πλάσμα αίματος για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

A/A	Vstock(μL)	Cws -αρχικό (μg/mL)	Vws-αρχικό (μL)	Cws (μg/mL)	C plasma (μg/mL)	
1	62.5	12.5	1600	2	0.16	
2	125	25	1600	4	0.32	QC
3	250	50	2400	12	0.96	
4	375	75	3200	24	1.92	QC
5	500	100	4000	40	3.2	
6	625	125	4800	60	4.8	QC

Παρασκευαστικά στάδια καμπύλης αναφοράς

1. Με πιπέτα ακριβείας, τοποθετούνται 250 μL καθαρού πλάσματος σε κατάλληλα επισημασμένο erendorff.
2. Με πιπέτα ακριβείας προστίθενται 20 μl Colistine Working Solution της εκάστοτε συγκέντρωσης (Πίνακας 2.3).
3. Με πιπέτα ακριβείας προστίθενται 50 μl I.S. Working Solution συγκέντρωσης 5 μg/mL και ακολουθεί ανάμιξη σε vortex για 1 min.
4. Με πιπέτα ακριβείας προστίθενται 50 μL 50% TFA και ακολουθεί ανάμιξη σε vortex για 1 min.
5. Φυγοκέντρωση για 10 min σε 5000 rcf στους 4 °C.
6. Στη συνέχεια γίνεται ενεργοποίηση στήλης στερεάς εκχύλισης στερεάς εκχύλισης 100 mg:
 - Προσθήκη 1 mL MeOH
 - Ρύθμιση σε pH= 10 με την προσθήκη 1 mL buffer NaHCO₃ (1% pH=10).
7. Με γυάλινη πιπέτα Pasteur, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης και τοποθετείται προσεκτικά πάνω στο πληρωτικό υλικό της στήλης στερεάς εκχύλισης.
8. Ανοίγουμε το κενό και το δείγμα περνά πολύ αργά μέσα από την στήλη.
9. Όταν στεγνώσει η στήλη προστίθενται πάλι 1 mL buffer NaHCO₃ 1% pH=10.

10. Όταν στεγνώσει η στήλη, κλείνουμε το κενό και ακολουθεί η προσθήκη 60 μL διαλύματος παραγωγοποίησης Fmoc-Cl 100 mM πολύ αργά.
11. Περιμένουμε για 15 min μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση.
12. Μετά τα 15 min ανοίγουμε το κενό και έτσι το διάλυμα παραγωγοποίησης απορρίπτεται.
13. Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 2 mL διαλύματος ACN/H₂O 70/30.
14. Όταν έχουν στεγνώσει πλήρως οι διαλύτες, αλλάζουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες και παραλαμβάνουμε την ουσία μας με προσθήκη 1 mL ακετόνης.
15. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂, στους 30-40 °C.
16. Στο προκύπτον ξηρό υπόλειμμα προστίθενται 150 μL H₃BO₄ 0.1 M για αποφυγή της υδρόλυσης της κολιστίνης κατά την ανασύσταση
17. Ακολουθεί ανασύσταση με 100 μL DMSO και ήπιο Vortex ~ 15 sec.
18. Λαμβάνονται 100 μL του ανασυσταμένου διαλύματος και τοποθετούνται σε HPLC vial.
19. Ξεκινά η διαδικασία της ανάλυσης στο μηχάνημα.

Χρωματογραφικές Συνθήκες

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο προσδιορισμού της κολιστίνης σε πλάσμα αίματος δίνονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Χρωματογραφικές συνθήκες προσδιορισμού κολιστίνης σε πλάσμα με HPLC-FL

Χρόνος ανάλυσης δείγματος	25 min
Μήκη κύματος ανιχνευτή	Excitation:260 Emission:316
Στήλη-Column	Phenomenex Luna C18(2), 100 A, 3 μm, 50*3 mm
Κινητή φάση-Mobile Phase	MeCN/H ₂ O/ THF (82/16/2)
Flow rate	0.5 mL/min
Όγκος ένεση δείγματος-injection volume	20μL
Retention time col A	~21 min
Retention time Col B	~16,5 min

2.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

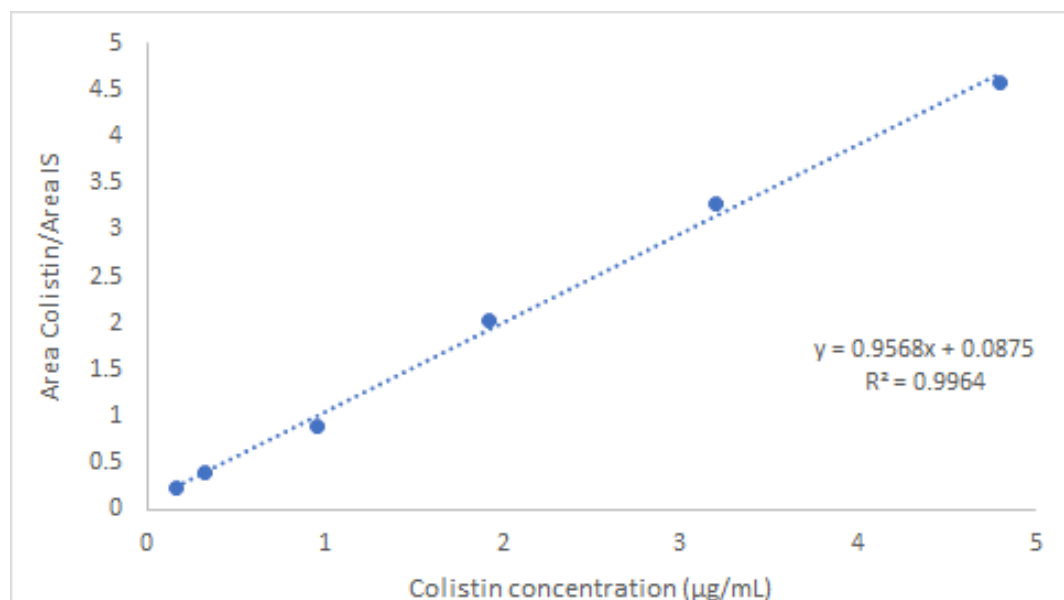
1. Σε κατάλληλα επισημασμένα φιαλίδια, βάζουμε 50 μl I.S. working solution συγκέντρωσης 5 μg/mL και 50 μL 50% TFA και κάνουμε vortex.
2. Προσθέτουμε σε κάθε φιαλίδιο 250 μL πλάσματος από τα άγνωστα δείγματα, και κάνουμε vortex για 30 sec.

Στη συνέχεια, ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία με εκείνη που ακολουθήθηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, στάδια 5- 19.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα για την ποσοτικοποίηση της κολιστίνης, παρασκευάζεται καμπύλη αναφοράς (Κ.Α.). Όλες οι Κ.Α. χαρακτηρίζονται από καλή γραμμικότητα και επαναληψιμότητα. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ανιχνεύει και την κολιστίνη Α και την κολιστίνη Β. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση την κορυφή της κολιστίνης Α. Στο σχήμα 3.1 δίνεται ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό κολιστίνης σε πλάσμα αίματος με τη μέθοδο HPLC-FL που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ενώ στον Πίνακα 3.1 δίνονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά ποιότητας τριών Κ.Α. που κατασκευάστηκαν σε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες.

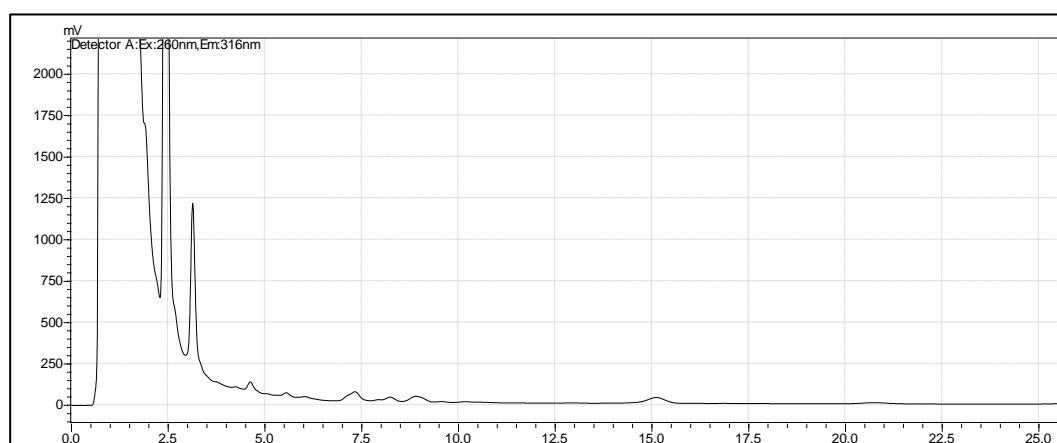


Σχήμα 3.1: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό κολιστίνης σε πλάσμα αίματος με HPLC-FL

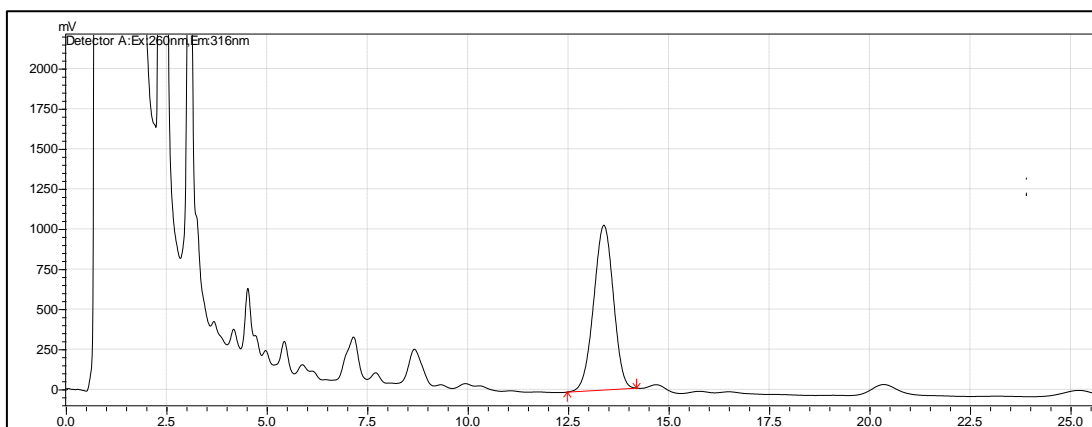
Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά ποιότητας καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό κολιστίνης σε πλάσμα αίματος

A/A	Κλίση±SD	Τεταγμένη±SD	R ²	Εύρος συγκεντρώσεων (µg/mL)	Αριθμός σημείων
1	0.951±0.029	0.129±0.079	0.997	0.16-4.8	5
2	0.764±0.041	0.017±0.07	0.991	0.16-4.8	5
3	0.957±0.029	0.088±0.072	0.996	0.16-4.8	6

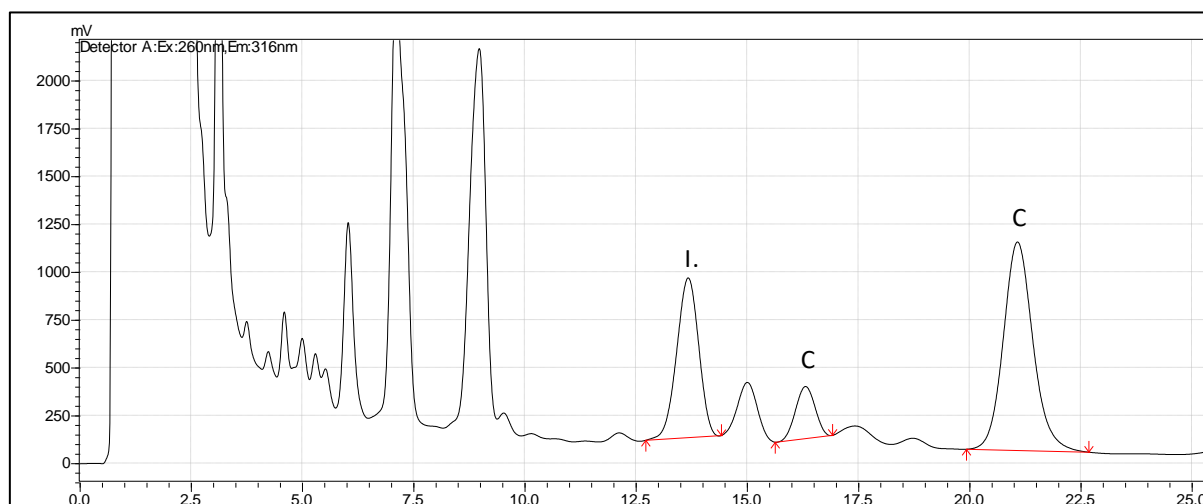
Στα σχήματα που ακολουθούν (Σχήματα 3.2-3.4) δίνονται ενδεικτικά χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (blank), δείγματος εσωτερικού προτύπου (zero) και δείγματος προτύπου διαλύματος Κ.Α., όπου αποδεικνύεται η διακριτική ικανότητα της εφαρμοζόμενης HPLC-FL μεθόδου.



Σχήμα 3.2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (χρησιμοποιούμενη μήτρα: πλάσμα αίματος)



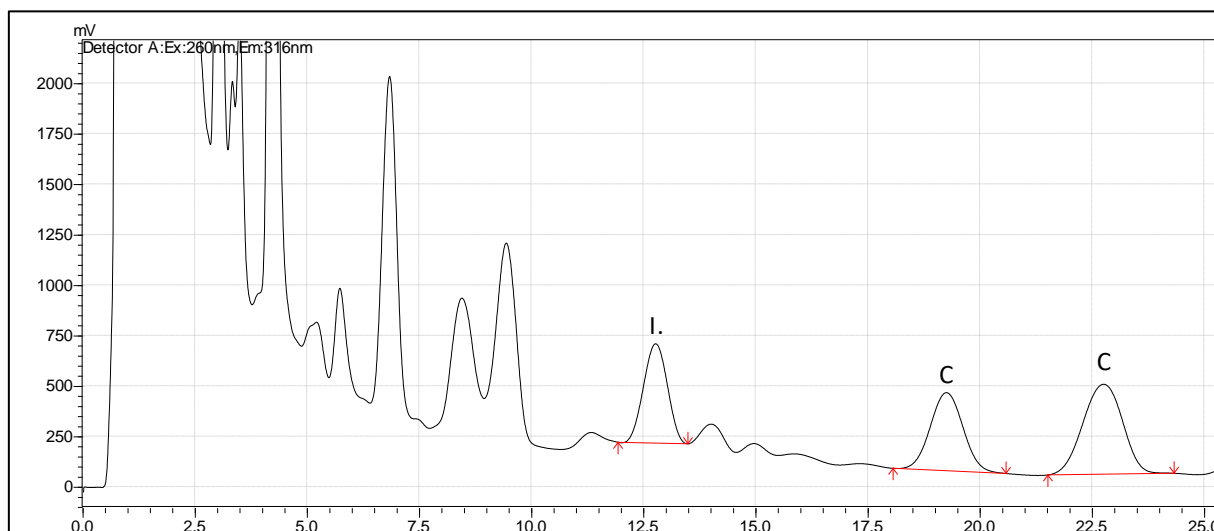
Σχήμα 3.3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μηδενικού δείγματος. Η σεσημασμένη κορυφή αντιστοιχεί στην κορυφή του χρησιμοποιούμενου εσωτερικού προτύπου, της νετιλμικίνης.
Χρόνος ανάσχεσης: 13,372 min.



Σχήμα 3.4: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος καμπύλης αναφοράς. Οι σεσημασμένες κορυφές αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο I.S., κολιστίνη B και κολιστίνη A αντίστοιχα. Χρόνος ανάσχεσης κολιστίνης B: 16.303 min. Χρόνος ανάσχεσης κολιστίνης A: 21.068 min.

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.5) δίνεται ενδεικτικό χρωματογράφημα για τη μέτρηση της κολιστίνης στο πλάσμα ασθενών με την μέθοδο HPLC-FL που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία και επιβεβαιώνεται η ικανοποιητική διακριτική ικανότητα της μεθόδου.



Σχήμα 3.5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος ασθενούς.

Μετρήθηκαν τα δείγματα που είχαν συλλεχθεί από έξι ασθενείς που συμμετείχαν στον κλινικό πρωτόκολλο.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων όλων των δειγμάτων συνοψίζονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.

3.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές συγκέντρωσης των ασθενών στο αίμα τόσο πριν την είσοδο στη συσκευή αιμοδιήθησης ($C_{pre-filter}$) όσο και μετά την έξοδο από τη συσκευή αιμοδιήθησης ($C_{post-filter}$) και έγινε ανάλυση των δεδομένων $C_{pre-filter}$ vs χρόνος και $C_{post-filter}$ vs χρόνος για τον προσδιορισμό των βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων (κάθαρση Cl και όγκος κατανομής Vd) για τους 6 ασθενείς που πήραν μέρος στη μελέτη με χρήση του λογισμικού Phoenix™ PK/PD Platform v 8.3 (<https://www.certara.com/>).

Έγινε μη-διαμερισματική ανάλυση (non-compartmental analysis, NCA) των δεδομένων συγκέντρωσης στο πλάσμα- χρόνου, μετά από τη χορήγηση της πρώτης i.v δόσης για τα δεδομένα C_{pre} vs time και $C_{post-filter}$ vs time. Υπολογίστηκαν οι παράμετροι AUC_{0-t} , επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα – χρόνου, C_{max} , μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα και T_{max} , χρόνος επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης στο αίμα, και εκτιμήθηκε η τιμή της συγκέντρωσης κολιστίνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση, $C_{ss,av}$, ως δείκτης της αποτελεσματικότητας της κολιστίνης (Πίνακας 3.2). Η NCA εφαρμόστηκε τόσο για κάθε ασθενή ξεχωριστά ενώ έγινε επίσης και μη-διαμερισματική ανάλυση αραιών δεδομένων (NCA sparse methodology) δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μικρός αριθμός ασθενών. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο (NCA) αρχικά υπολογίζεται η μέση καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου με υπολογισμό της μέσης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και το τυπικό σφάλμα (SE) των δεδομένων συγκέντρωσης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οι θεωρητικοί και όχι οι πραγματικοί χρόνοι δειγματοληψίας. Χρησιμοποιώντας τη μέση καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου υπολογίζονται οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι της μη-διαμερισματικής ανάλυσης AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} . Επιπλέον, υπολογίζεται το SE των παραμέτρων AUC_{0-t} και C_{max} , χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα πληροφορία για κάθε ασθενή. Πιο συγκεκριμένα, το $SE(C_{max})$ υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης σε χρόνο T_{max} ενώ ο υπολογισμός του $SE(AUC_{0-t})$ γίνεται με βάση την εξίσωση 3.1:

$$SE(AUC) = \sqrt{Var(AUC)} \quad (3.1)$$

Τα αποτελέσματα από τη μη διαμερισματική ανάλυση και οι υπολογιζόμενες τιμές $C_{ss,av}$ δίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Μη διαμερισματική ανάλυση δεδομένων

Ασθενής	Φαρμακοκινητική Παράμετρος	Pre-filter/Post-filter	C _{ss,avg} pre/post (mg/L)**	Κλινικός στόχος[113]
AN	AUC _{0-t} (h×mg)/L	52.5/-	4.38/-	C _{ss,av} = 2 mg/L
	C _{max} (mg/L)	25.0/-		
	T _{max} (h)	0.25/-		
	t _{1/2} (h)	7.6/-		
	CL (L/h)*	3.5/-		
ATH	AUC _{0-t} (h×mg)/L	10.2/17.8	0.85/1.48	
	C _{max} (mg/L)	1.6/2.64		
	T _{max} (h)	1/0.5		
	t _{1/2} (h)	-		
	CL (L/h)*	26.5/15.2		
PE	AUC _{0-t} (h×mg)/L	61.3/46.5	5.1/3.88	
	C _{max} (mg/L)	10.2/10.9		
	T _{max} (h)	0.25/0.5		
	t _{1/2} (h)	12.5/6.8		
	CL (L/h)*	2.84/4.6		
VU	AUC _{0-t} (h×mg)/L	27.1/48.0	2.25/4.0	
	C _{max} (mg/L)	3.7/5.2		
	T _{max} (h)	2/2		
	t _{1/2} (h)	5.9/22.5		
	CL (L/h)*	7.8/3.2		
ZA	AUC _{0-t} (h×mg)/L	14.9/11.8	1.24/0.983	
	C _{max} (mg/L)	1.7/1.6		
	T _{max} (h)	0.25/0.25		
	t _{1/2} (h)	15.3/6.8		
	CL (L/h)*	18.2/22.9		
ZAF	AUC _{0-t} (h×mg)/L	46.9/26.9	3.9/2.24	
	C _{max} (mg/L)	6.8/2.95		
	T _{max} (h)	6/6		
	t _{1/2} (h)	2.13/16.7		
	CL (L/h)*	5.5/6.8		
NCA sparse methodology	AUC _{0-t} (h×mg)/L (%RSE)	41.8/39.3	3.48/3.28	
	C _{max} (mg/L) (%RSE)	6.4/3.4		
	T _{max} (h)	0.25/1		
	t _{1/2} (h)	4.6/6.1		
	CL (L/h)*	6.5/6.9		

*CL= ολική κάθαρση, υπολογιζόμενη ως Dose/AUC; **C_{ss,avg}=μέση συγκέντρωση στη σταθεροποιημένη κατάσταση, υπολογιζόμενη ως AUC/μεσοδιάστημα δόσεων = AUC/12; *** τιμές από τη βιβλιογραφία (63,64)

Ακολούθησε φαρμακοκινητική μοντελοποίηση των δεδομένων συγκέντρωσης στο πλάσμα (C_{pre-filter})-χρόνου και (C_{post-filter})-χρόνου, τόσο για κάθε ασθενή ξεχωριστά όσο και

για το σύνολο των ασθενών, για την περιγραφή της κινητικής της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση υπό αιμοδιαθήθηση και τον υπολογισμό βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων (ολική κάθαρση Cl, όγκος κατανομής V_d).

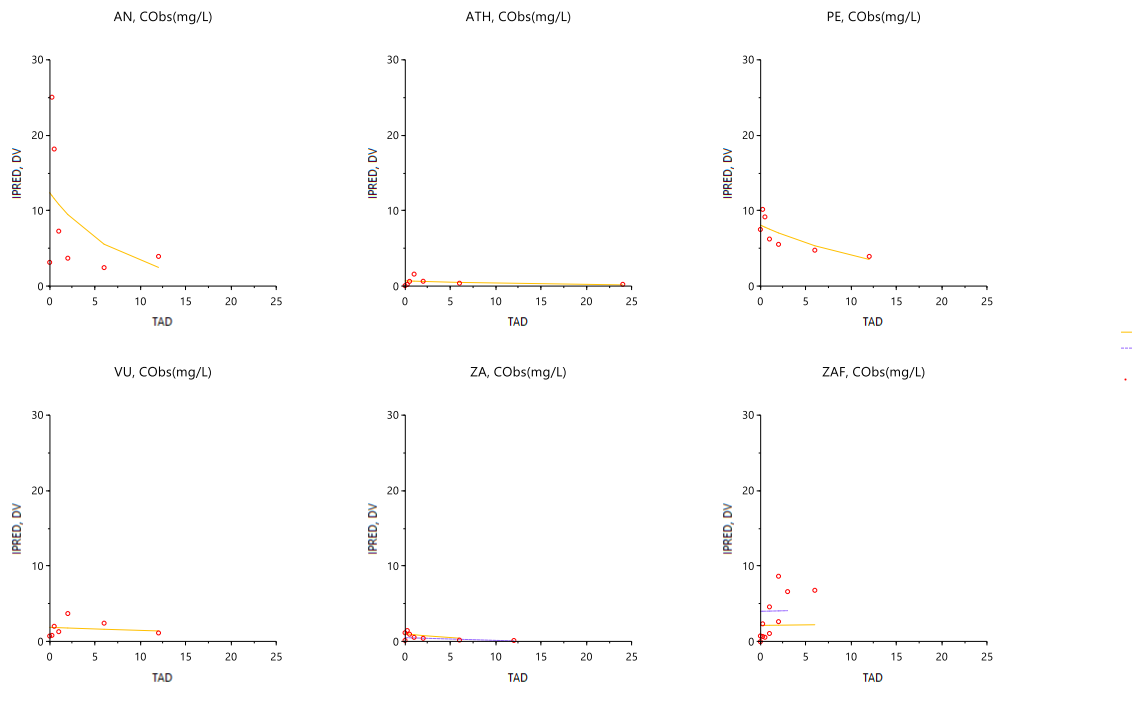
Για την προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος naïve pooled η οποία είναι η ενδεδειγμένη για *in vivo* μελέτες με μικρό αριθμό ασθενών καθώς και όταν είναι διαθέσιμος μικρός αριθμός δειγμάτων αίματος από κάθε ασθενή. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή, όταν εφαρμόζεται σε πληθυσμιακά δεδομένα, αντιμετωπίζει όλες τις παρατηρήσεις σαν να προέρχονται από ένα άτομο, δηλαδή αγνοεί την υπάρχουσα διατομική μεταβλητότητα και υπολογίζει μόνο τις τιμές των παραμέτρων, και το τυπικό σφάλμα της εκτίμησης, λαμβάνοντας όμως υπόψη τις διατομικές διαφορές στη δόση και στις τιμές των συμμεταβλητών, αν υπάρχουν.

Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [51,106,109,110,155,157,158], το μονοδιαμερισματικό μοντέλο κατανομής βρέθηκε να περιγράφει την κινητική της κολιστίνης σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση. Στον Πίνακα 3.3 δίνονται οι προσδιοριζόμενες τιμές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων για κάθε ασθενή και για το σύνολο των ασθενών (πληθυσμός). Στο Σχήμα 3.6 δίνονται τα αντίστοιχα φαρμακοκινητικά προφίλ μαζί με τις προβλεπόμενες από το μονοδιαμερισματικό μοντέλο τιμές για κάθε ασθενή ξεχωριστά, ενώ στο σχήμα 3.7 δίνεται η αντίστοιχη απεικόνιση για το σύνολο των ασθενών (πληθυσμός).

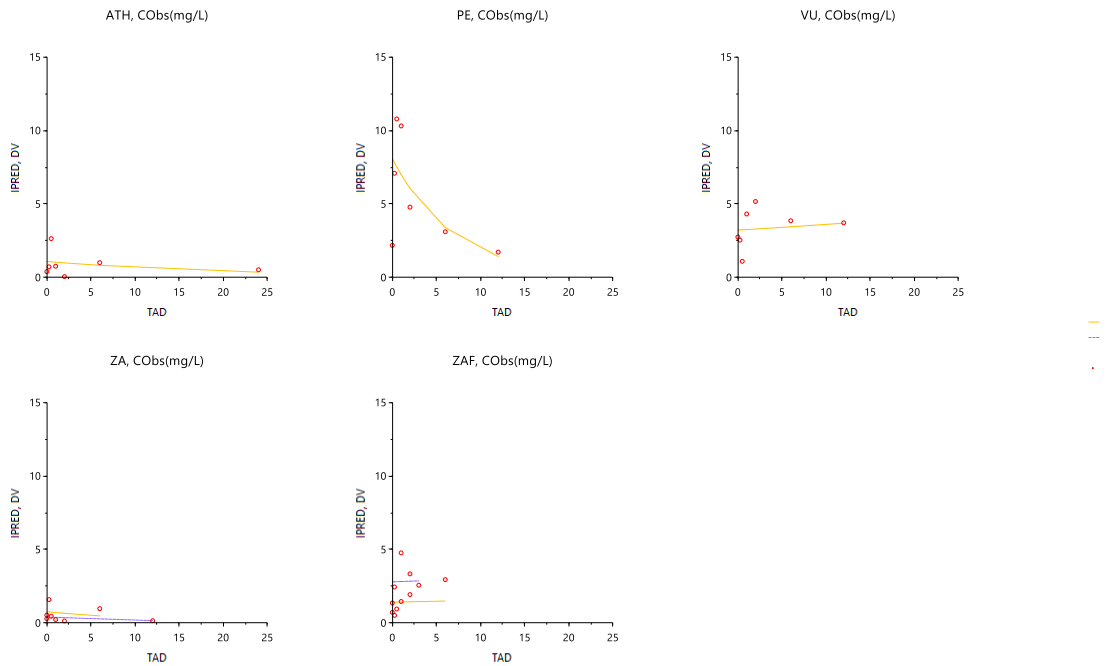
Πίνακας 3.3: Τιμές ΦΚ παραμέτρων (\pm %RSE) όπως υπολογίζονται με βάση το μονο-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής

Παράμετρος	Ασθενής												Πληθυσμιακή μέση τιμή παραμέτρου	
	AN		ATH		PE		VU		ZA		ZAF			
	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter	pre-filter	post-filter
CL (\pm %RSE) [L/h]	2.9 (29.3)	-*	20.6 (35.7)	11.4 (43.6)	2.29 (17.5)	4.8 (17.8)	3.4 (235)	-	35.4 (26.9)	37.2 (36.6)	-	-	5.3 (31.5)	5.5 (65.3)
Vd (\pm %RSE) (L)	21.8 (28.4)	-	372.0 (28.8)	247.8 (31.4)	33.3 (7.96)	33.4 (17.7)	142.3 (29.97)	83.8 (18.1)	254.7 (25.18)	359.0 (34.1)	222.8 (40.2)	241.4 (21.0)	50.3 (30.8)	82.3 (42.4)
RE (\pm %RSE)	0.67 (36.9)	-	0.68 (37.2)	0.75 (39.0)	0.17 (27.5)	0.39 (30.5)	0.56 (34.1)	0.37 (30.1)	0.65 (33.9)	0.71 (35.4)	0.90 (34.8)	0.49 (25.9)	1.15 (19.6)	0.92 (18.7)

CL: ολική κάθαρση, **Vd:** όγκος κατανομής, **RE:** υπολειπόμενο σφάλμα, **%RSE:** % σχετικό τυπικό σφάλμα; * δεν υπήρχαν δεδομένα

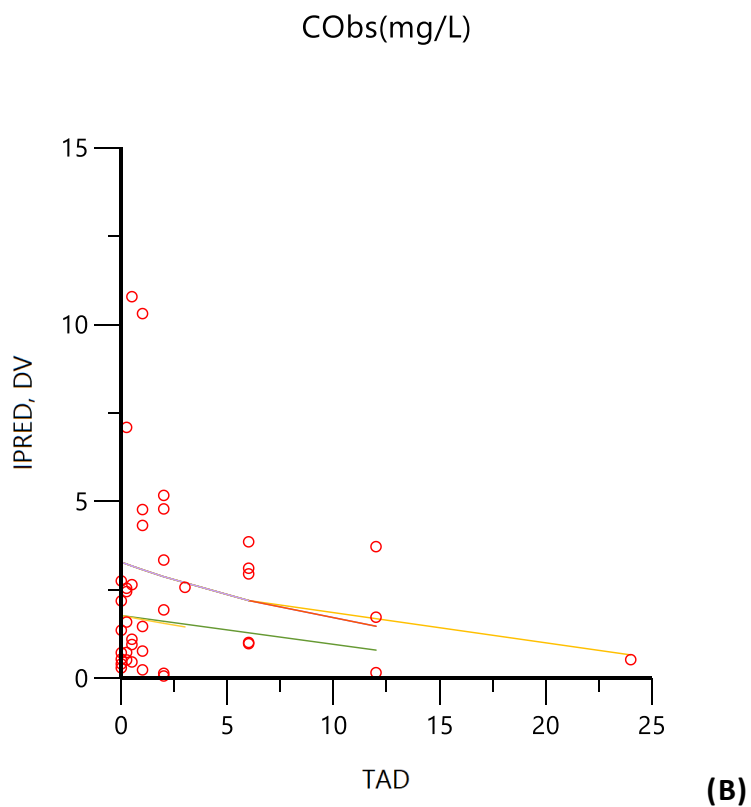
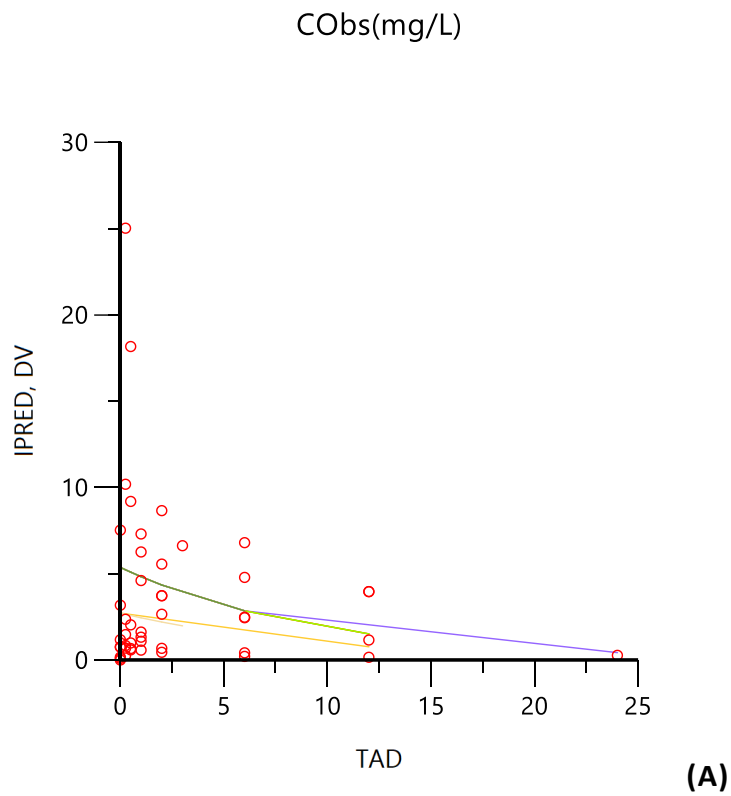


(A)



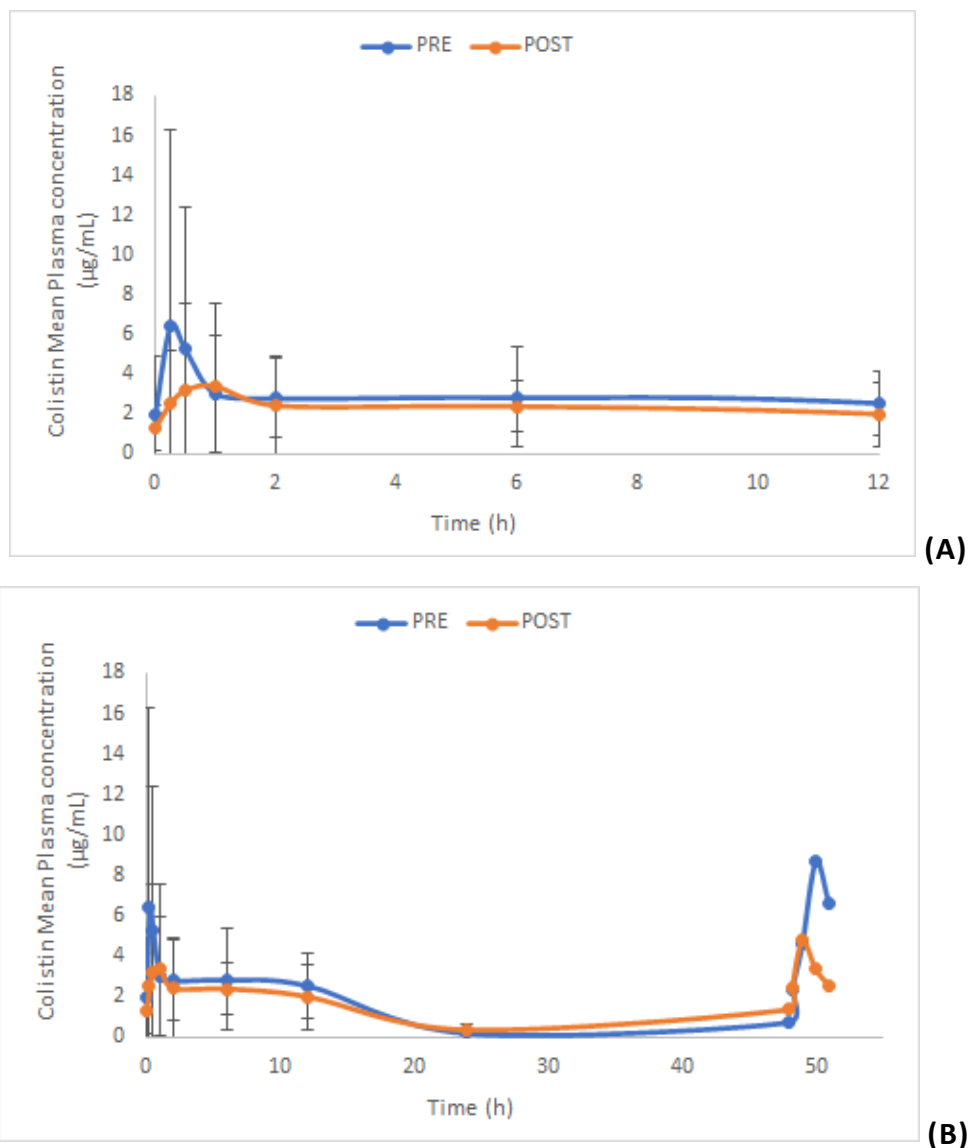
(B)

Σχήμα 3.6: Απεικονίσεις των παρατηρούμενων (σύμβολα) και προβλεπόμενων από το μοντέλο (γραμμές) τιμών συγκέντρωσης κολιστίνης στο πλάσμα ως προς το χρόνο για κάθε ασθενή ξεχωριστά: C_{pre-filter} (A), C_{post-filter} (B).



Σχήμα 3.7: Απεικονίσεις των παρατηρούμενων (σύμβολα) και προβλεπόμενων από το μοντέλο (γραμμές) τιμών συγκέντρωσης κολιστίνης στο πλάσμα για το σύνολο των ασθενών: $C_{\text{pre-filter}}$ (A), $C_{\text{post-filter}}$ (B).

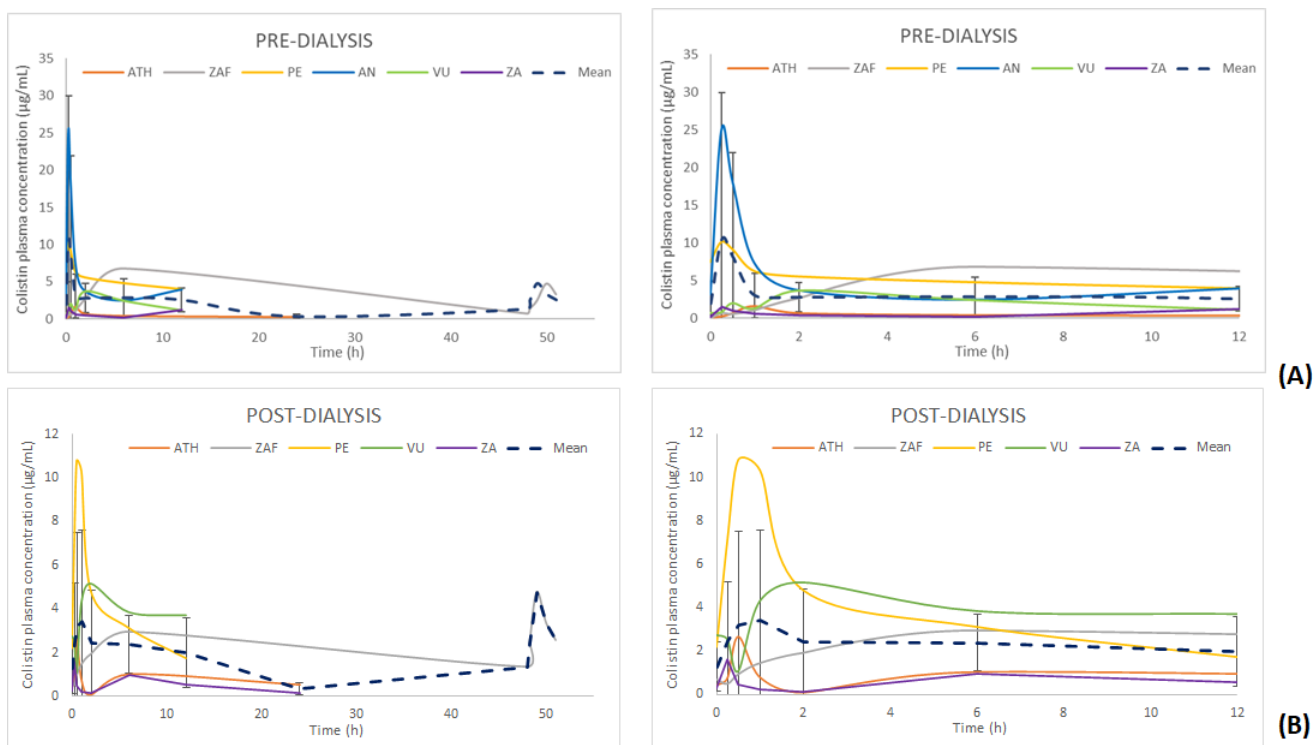
Οι τιμές συγκέντρωσης κολιστίνης στο αίμα των ασθενών που μετρήθηκαν μετά την απομάκρυνση από τη συσκευή αιμοδιήθησης ($C_{\text{post-filter}}$), χρησιμοποιήθηκαν για τον έμμεσο υπολογισμό της ποσότητας του φαρμάκου που απομακρύνεται με τη διαδικασία της αιμοδιήθησης. Στο σχήμα 3.8 δίνονται οι συγκριτικές μέσες απεικονίσεις $C_{\text{pre-filter}}$ vs time και $C_{\text{post-filter}}$ vs time.



Σχήμα 3.8: Συγκριτικές μέσες απεικονίσεις $C_{\text{pre-filter}}$ vs time και $C_{\text{post-filter}}$ vs time έως 12 μετά τη χορήγηση της 1ης δόσης και έως το τέλος της δειγματοληψίας.

Στο Σχήμα 3.9 δίνονται οι αντίστοιχες απεικονίσεις για κάθε ασθενή ξεχωριστά (κλειστές γραμμές) μαζί με την μέση απεικόνιση (στικτή έντονη γραμμή) μέχρι το τέλος της δειγματοληψίας (A) και μέχρι 12 ώρες μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης (B).

Όπως ήταν αναμενόμενο οι μετρούμενες συγκεντρώσεις κολιστίνης στο πλάσμα του αίματος των ασθενών όταν το δείγμα αίματος λαμβάνεται μετά την απομάκρυνση από τη συσκευή αιμοδιήθησης ($C_{\text{post-filter}}$) είναι μικρότερες σε σύγκριση με αυτές πριν την απομάκρυνση ($C_{\text{pre-filter}}$), γεγονός που αντανακλάται και στις προσδιοριζόμενες τιμές των παραμέτρων AUC και C_{max} , ενώ παρατηρείται και καθυστέρηση στο χρόνο επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης, T_{max} (Πίνακας 3.2). Αντίθετα, οι τιμές του όγκου κατανομής και της ολικής κάθαρσης δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά όταν υπολογίζονται pre- και post-filter. Είναι πιθανό αυτό να οφείλεται στο μικρό αριθμό ασθενών και στην υψηλή μεταβλητότητα.



Σχήμα 3.9: Απεικονίσεις $C_{\text{pre-filter}}$ vs time (A) και $C_{\text{post-filter}}$ vs time (B), έως το τέλος της δειγματοληψίας και έως 12 ώρες μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης, για τους 6 ασθενείς της μελέτης. Η στικτή μπλε γραμμή είναι η μέση απεικόνιση \pm SD.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κολιστίνη ανήκει στις πολυμιξίνες και είναι κυκλικό πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε στη δεκαετία του 1950. Η χρήση της επαναπροσδιορίστηκε στη δεκαετία του 1990 κυρίως σε ασθενείς με κυστική ίνωση ενώ πρόσφατα έχει αρχίσει και χορηγείται με τη μορφή του μεθανοσουλφονικού εστέρα (CMS) και σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικροβιακά στελέχη.

Το Δεκέμβριο του 2014 ο EMA εξέδωσε οδηγία σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων CMS μετά από απαίτηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής [107]. Σύμφωνα με την οδηγία απαιτείται από τους παρασκευαστές προϊόντων CMS η επικαιροποίηση και εναρμόνιση για όλα τα κράτη μέλη, των πληροφοριακών εντύπων των προϊόντων συμπεριλαμβανομένων των δοσολογικών οδηγιών και προτείνονται διαφορετικά δοσολογικά σχήματα για ασθενείς με CrCl ≥ 80 mL/min, ≥ 50 - <80 mL/min, 30 - <50 mL/min και <30 mL/min, ώστε να επιτευχθεί $C_{ss,avg} \geq 0.5$ mg/L, ≥ 1.0 mg/L, ≥ 2.0 mg/L και ≥ 4.0 mg/L, αντίστοιχα. Παράλληλα και ο FDA ενέκρινε αλλαγές στις οδηγίες χορήγησης και δοσολογίας των προϊόντων CMS που κυκλοφορούν στις ΗΠΑ [108]. Πρόσφατα, οι Nation και συνεργάτες [113] ανέπτυξαν αλγόριθμους εξατομίκευσης της δοσολογίας της ενδοφλέβιας κολιστίνης ώστε να επιτυγχάνεται ο επιθυμητός κλινικός στόχος για συγκέντρωση κολιστίνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση, $C_{ss,av}$, ίση με 2mg/L, δεδομένου ότι κατά την έναρξη της θεραπείας δεν είναι πάντα γνωστό το MIC (minimum inhibitory concentration) του μικροβιακού στελέχους της λοίμωξης.

Στην παρούσα μελέτη, η οποία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης μελέτης στον ίδιο πληθυσμό ασθενών [157], μετρήθηκαν τα επίπεδα της κολιστίνης σε πλάσμα αίματος έξι (6) αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με λοίμωξη από πολυανθεκτικά gram(-) βακτήρια, στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του ΓΝΑ «Ευαγγελισμός», μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του μετά νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS), έγινε αποτύπωση του φαρμακοκινητικού προφίλ της κολιστίνης για κάθε ασθενή, προσδιορίστηκαν οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι (Cl, V_d , AUC, C_{max} , T_{max}) και η συγκέντρωση κολιστίνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση, $C_{ss,av}$, ως δείκτης της αποτελεσματικότητας της κολιστίνης.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.2 προκύπτει ότι για 4 από τους 6 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη η υπολογιζόμενη τιμή της $C_{ss,av}$, τόσο με βάση τις απεικονίσεις C_{pre} vs time όσο και με βάση τις απεικονίσεις και $C_{post-filter}$ vs time, είναι > 2 mg/L που ορίζεται ως ο επιθυμητός κλινικός στόχος [113].

- Σύγκριση φαρμακοκινητικών παραμέτρων (CL, V_d) με βιβλιογραφικά δεδομένα

Σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [51,105,106,109,110,155,157,158] η κινητική της κατανομής της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση με τη μορφή CMS σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, περιγράφεται από το μονοδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.4) δίνονται οι τιμές κάθαρσης (CL) και όγκου κατανομής (V_d) όπως υπολογίστηκαν στην παρούσα μελέτη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τις κύριες φαρμακοκινητικές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση και έχουν δημοσιευτεί [105,106,109,110,158], σε υγιείς εθελοντές [51] καθώς και στην πρώτη φάση της παρούσας μελέτης στη ΜΕΘ του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός» [157].

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.5 προκύπτει ότι οι υπολογιζόμενες στην παρούσα μελέτη τιμές των βασικών ΦΚ παραμέτρων είναι σε συμφωνία με τις μελέτη των Garonzik et al. [106] Leuppi-Taegtmeyer et al., [158] και Karaiskos et al. [105] καθώς και με τα αποτελέσματα της πρώτης φάσης της παρούσας μελέτης [157] που διενεργήθηκε σε 5 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς της ΜΕΘ του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός», ενώ είναι μικρότερες σε σύγκριση με τις πληθυσμιακές φαρμακοκινητικές μελέτες που διενεργήθηκαν το 2009 και 2012 από τους Plachouras et al. [109] και Mohamed et al. [110] αντίστοιχα. Επιπλέον, στη μελέτη των Gouet et al. [49] οι τιμές του όγκου κατανομής της κολιστίνης είναι σημαντικά μικρότερη, διαφορά που είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στη μικρή διασπορά των τιμών της κάθαρσης κρεατινίνης στους υγιείς εθελοντές που έλαβαν μέρος στη μελέτη Gouet et al. [49] (134 ml/min εύρος 100–165), σε σύγκριση με το μεγάλο εύρος τιμών CrCL στις υπόλοιπες μελέτες π.χ 41-126 ml/min με διάμεση τιμή 84 ml/min, στη μελέτη των Plachouras et al. [109], και 51-170 ml/min με διάμεση τιμή 68.5 ml/min στη δική μας μελέτη. Να σημειωθεί βέβαια ότι ο ιδιαίτερα μικρός αριθμός ασθενών στην παρούσα μελέτη δεν επιτρέπει την εξαγωγή απόλυτων συμπερασμάτων.

Πίνακας 3.4: Τιμές ΦΚ παραμέτρων (\pm %RSE) κολιστίνης σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, όπως υπολογίζονται με βάση το μονο-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής στην παρούσα μελέτη και στη βιβλιογραφία

Παράμετρος	Δημοσιευμένη εργασία							Παρούσα μελέτη Pre-filter/post-filter
	Plachouras et al. [109]	Garonzik et al. [106]	Gouet et al. [51]	Karaiskos et al. [105]	Λευρι-Taegtmeier et al. [158]	Mohamed et al. [110]	Γιαννοπούλου 2016 [157]	
CL (\pm %RSE) [L/h]	9.1 (19)	2.72 (-)	2.92 (15)	4.10 (13)	1.93 (67)	8.2 (6.0–11.2)*	3.9 (7.7)	5.3 (29.4)/5.5 (65.3)
V_d (\pm %RSE) (L)	189 (12)	45.1 (6)	12.4 (15)	69.5 (9.8)	70.1 (50)	218 (192–252)*	57.6 (19.7)	50.3 (30.8)/82.3 (42.4)

CL: ολική κάθαρση, **V_d:** όγκος κατανομής, * median value (range)

4.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη:

- Μετρήθηκαν τα επίπεδα της κολιστίνης σε πλάσμα αίματος έξι (6) αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με λοίμωξη από πολυανθεκτικά gram(-) βακτήρια, στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του ΓΝΑ «Ευαγγελισμός», μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του μετά νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS).
- Αποτυπώθηκε το φαρμακοκινητικό προφίλ της κολιστίνης για κάθε ασθενή και προσδιορίστηκαν οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι (CL , V_d , AUC , C_{max} , T_{max}) τόσο με μη-διαμερισματική ανάλυση όσο και με φαρμακοκινητική μοντελοποίηση.
- Το μονοδιαμερισματικό μοντέλο κατανομής βρέθηκε να περιγράφει ικανοποιητικά την κινητική της κολιστίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.
- Οι υπολογιζόμενες τιμές $C_{ss,avg}$ για 4 από τους 6 ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη προσεγγίζουν ικανοποιητικά τον μέσο κλινικό στόχο των 2mg/L που προκύπτει με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του EMA και του FDA.

Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη και είναι πιθανόν τα αποτελέσματα/συμπεράσματα να διαφοροποιηθούν με την ένταξη περισσότερων ασθενών και την πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση των δεδομένων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Συνοπτικό σχεδιάγραμμα μελέτης

Συμμετέχουν όλοι οι ασθενείς που λαμβάνουν κολιστίνη και υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση

Δοσολογία: 9 MU και στη συνέχεια 4,5 MU κάθε 12 ώρες

Σημειώνεται ο ακριβής χρόνος χορήγησης

Πλάσμα: - 0, 15 min, 1h, 2, 6, 12 και 24 μετά την πρώτη δόση

- 0, 15 min , 1h, 2, 6 και 12 μετά την τέταρτη δόση

Συλλογή δειγμάτων σε φιαλίδια που χρησιμοποιούνται για γενική αίματος (μωβ πώμα) σε πάγο φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (3000 rpm x 5min) και αποθήκευση του υπερκείμενου σε ένα γυάλινο φιαλίδιο (1.5ml) στους -70°C.

Πίνακας 2.1: Πρωτόκολλο δειγματοληψίας αίματος

	0	15 min	1h	2	6	12	24
Πλάσμα (1 ^η δόση)	✓ ακριβής ς χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβή ς χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος
	0		1h	2	6	12	
Πλάσμα (4 ^η δόση)	✓ ακριβή ς χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβή ς χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	✓ ακριβής χρόνος	

Πίνακας 2.2: Πρωτόκολλο συμπληρωματικής δειγματοληψίας αίματος παράλληλα με αιμοκάθαρση

	0	15 min	1h	2	6	12	24
Pre-filter (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				

	0		1h				
Post-filter (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				
Υγρό Διύλισης (4 ^η δόση)			✓ ακριβής χρόνος				

Ο χρόνος 0 αναφέρεται πριν την έγχυση ενώ οι υπόλοιποι χρόνοι αναφέρονται μετά το τέλος της έγχυσης, pre και post για την ένδειξη πριν και μετά φίλτρου δείγματα

Τα δείγματα θα ονομάζονται ως εξής:

A.A. ασθενούς/αριθμός δόσης (1^η ή 4^η)/χρόνος μετά τη δόση

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Patient ID	Time (h)	PRE filter - Colistin plasma concentration (mg/L)	POST filter - Colistin plasma concentration (mg/L)	DOSE (mg)
ZA	0	0.164073176	0.291022851	270
ZA	0.25	1.471479928	1.587156056	
ZA	0.5	0.986845002	0.458958475	
ZA	1	0.571185465	0.234741126	
ZA	2	0.446295782	0.137653376	
ZA	6	0.208130266	0.975508083	
ZA	12	1.174323763	0.537964552	
ZA	24	0.15751698	0.155919409	
ATH	0	0.089055568	0.402790299	270
ATH	0.25	0.251002057	0.726989996	
ATH	0.5	0.663077761	2.643737371	
ATH	1	1.619709814	0.766317662	
ATH	2	0.67511534	0.061709899	
ATH	6	0.414812245	1.009654147	
ATH	24	0.268852317	0.523717782	
ZAF	0	0	0.719892305	135
ZAF	0.25	0.685850056	0.515578604	
ZAF	0.5	0.585264947	0.951013561	
ZAF	1	1.083469111	1.462003746	
ZAF	2	2.651946127	1.930994077	
ZAF	6	6.797993239	2.948328651	
ZAF	12.75	0.759049722	1.355320712	
ZAF	13	2.361721991	2.448041158	
ZAF	13.25	4.603572532	4.767226481	
ZAF	13.75	8.654880496	3.3397328	
ZAF	14.75	6.622320849	2.568608194	
PE	0	7.523790396	2.184294722	270
PE	0.25	10.18350814	7.090193795	
PE	0.5	9.18786685	10.78515215	

PE	1	6.260201976	10.30696544	
PE	2	5.556251086	4.785343499	
PE	6	4.785343499	3.10863365	
PE	12	3.961787112	1.724272047	
AN	0	3.174284388		270
AN	0.25	25.02152754		
AN	0.5	18.16415817		
AN	1	7.302797113		
AN	2	3.724685085		
AN	6	2.479153369		
AN	12	3.961787112		
VU	0	0.745369508	2.748961687	
VU	0.25	0.835539837	2.542135096	
VU	0.5	2.035709319	1.100463797	
VU	1	1.321731889	4.318448949	
VU	2	3.721462083	5.16730996	
VU	6	2.448616189	3.855460365	
VU	12	1.156949364	3.718801896	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections, *Clin Infect Dis*. 2005; 40:1333–41.
2. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:723–63.
3. Komura S, Kurahashi K. Partial purification and properties of L-2,4- diaminobutyric acid activating enzyme from a polymyxin E producing organism. *J Biochem (Tokyo)* 1979; 86:1013–21.
4. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K. A new antibiotic “colistin” produced by spore-forming soil bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* 1950; 3:457–8.
5. Reed MD, Stern RC, O’Riordan MA, Blumer JL. The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 645–54.
6. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 535–543.
7. Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med* 1970; 72: 857–868.
8. D. Yahav, L. Farbman, L. Leibovici, M. Paul. «Colistin: new lessons on an old antibiotic». *Clinical Microbiology and Infection*, 2012: 18-29.
9. Vaara, Martti. "Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics." *Molecules*, 2019: 24(2),249.
10. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1–12.
11. Jian Li, Roger L Nation, John D Turnidge, Robert W Milne, Kingsley Coulthard, Craig R Rayner, David L Paterson. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet infectious diseases* 2006; 6:589-601.
12. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int.J. Antimicrob. Agents* .2005; 25(1),11–25.
13. David Landman, Claudiu Georgescu, Don Antonio Martin, and John Quale, Polymyxins Revisited. *Clinical Microbiology reviews*. 2008, 21(3);449-465.

14. Phillip J. Bergen, Jian Li, Craig R. Rayner, Roger L. Nation. Colistin methanesulphonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006;50(6): 1953- 1958.
15. Brian T. Tsuji, Jason M. Pogue, Alexandre P. Zavascki, Mical Paul, George L. Daikos. "International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDS)." *Pharmacotherapy*, 2019: 10-39.
16. Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock RE. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3317–3321.
17. Tony Velkov, Kade D. Roberts, Roger L. Nation, Jiping Wang, Philip E. Thompson, Jian Li. «Teaching ‘Old’ Polymyxins New Tricks: New-Generation Lipopeptides Targeting Gram-Negative ‘Superbugs’.» *ACS Chem. Biol.* , 2014: 1172–1177.
18. Arnold Peterson, Robert Hancock, Estelle McGroarty. Binding of Polycationic Antibiotics and Polyamines to Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 1985,164(3);1256-1261.
19. Tony Velkov, Kade D Roberts, Roger L Nation, Philip E Thompson and Jian Li. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013,8(6);711-724.
20. Zakuan Z. Deris, Jesmin Akter, Sivashangarie Sivanesan, Kade D. Roberts, Philip E. Thompson, Roger L. Nationa, Jian Li, and Tony Velkov. A secondary mode of action of polymyxins against gram negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014, 67(2);147–151.
21. Timothy R. Sampson, Xiang Liu, Max R. Schroeder, Colleen S. Kraft, Eileen M. Burd, and David S. Weiss. Rapid Killing of *Acinetobacter baumannii* by Polymyxins Is Mediated by a Hydroxyl Radical Death Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012,56(11); 5642–5649.
22. https://www.researchgate.net/figure/Action-of-colistin-on-bacterial-membraneThe-cationic-cyclic-decapeptide-structure-of_fig3_271441729
23. Abiola O. Olaitan, Serge Morand, Jean-Marc Rolain. "Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria." *Frontiers in Microbiology*, 2014: 5:643.

24. Ana C. Gales, Harald Seifert, Deniz Gur, Mariana Castanheira, Ronald N. Jones, Helio S. Sader. "Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016)." *Open Forum Infectious Diseases*, 2019: 34-46.
25. Richard A. Moore, Lydia Chan, Robert E. W. Hancock. Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 1984, 26(4);539-545.
26. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16:161–8.
27. Craig R. MacNair, Jonathan M. Stokes, Lindsey A. Carfrae et al. «Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics». *NATURE COMMUNICATIONS*, 2018: 9:458.
28. Lucie Bardet, Liliane Okdah, Stéphanie Le Page, Sophie Alexandra Baron, JeanMarc Rolain. «Comparative evaluation of the UMIC Colistine kit to assess MIC of colistin of gram-negative rods» *BMC Microbiology*, 2019: 19:60.
29. Haiyan Long, Yu Feng, Ke Ma, Lu Liu, Alan McNally, Zhiyong Zong. «The co-transfer of plasmid-borne colistin-resistant genes mcr-1 and mcr-3.5, the carbapenemase gene bla_{NDM-5} and the 16S methylase gene rmtB from *Escherichia coli*». *SCIENTIFIC REPORTS*, 2019: 9:696.
30. Alejandra Gallardo-Godoy, Craig Muldoon, Bernd Becker, Alysha G. Elliott, Lawrence H. Lash et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B.J. *Med. Chem*. 2016; 59(3):1068–1077.
31. Mark D. Adams, Gabrielle C. Nickel, Saralee Bajaksouzian, Heather Lavender, A. Rekha Murthy, Michael R. Jacobs, Robert A. Bonomo. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2009, 53(9);3628-3634.
32. Lauren M. Lim, Pharm.D., Neang Ly, B.S., Dana Anderson, Pharm.D., Jenny C. Yang, Pharm.D., Laurie Macander, Pharm.D., Anthony Jarkowski III, Pharm.D., Alan Forrest, Pharm.D., Jurgen B. Bulitta, Ph.D., and Brian T. Tsuji, Pharm.D. Resurgence of colistin: a

- review of resistance, toxicity, pharmacodynamics and dosing. *Pharmacotherapy*.2010, 30(12); 1279– 1291.
33. Joseph B. McPhee, Shawn Lewenza Robert, E. W. Hancock. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrAPmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*,2004,50(1);205-207.
 34. Li J, Rayner CR, Nation RL, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;9:2946–50.
 35. Tsuji BT, Landersdorfer CB, Lenhard JR, et al. Paradoxical effect of polymyxin B: high drug exposure amplifies resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;7:3913–20.
 36. Tam VH, Schilling AN, Vo G, et al. Pharmacodynamics of polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;9:3624–30.
 37. Bergen PJ, Li J, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW. Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* 2008;3: 636–42.
 38. Bergen PJ, Bulitta JB, Forrest A, Tsuji BT, Li J, Nation RL. Pharmacokinetic/pharmacodynamic investigation of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* using an in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;9:3783–9.
 39. Khan DD, Friberg LE, Nielsen EI. A pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) model based on in vitro time-kill data predicts the in vivo PK/PD index of colistin. *J Antimicrob Chemother* 2016;7:1881–4.
 40. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics /pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2683–90. [https://doi.org/ 10.1128/AAC.06486-11](https://doi.org/10.1128/AAC.06486-11).
 41. Cheah SE, Wang J, Nguyen VT, Turnidge JD, Li J, Nation RL. New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. *J Antimicrob Chemother* 2015;12:3291–7.

42. Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, et al. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3): 1117-24.
43. Dudhani RV, Turnidge JD, Nation RL, Li J. fAUC/MIC is the most predictive pharmacokinetic/pharmacodynamic index of colistin against *Acinetobacter baumannii* in murine thigh and lung infection models. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(9): 1984-90.
44. Sorli L, Luque S, Grau S, et al. Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis* 2013; 13:380.
45. Forrest A, Garonzik SM, Thamlikitkul V, et al. Pharmacokinetic/toxicodynamic analysis of colistin-associated acute kidney injury in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(11). pii:e01367–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01367-17>.
46. Horcajada JP, Sorli L, Luque S, et al. Validation of a colistin plasma concentration breakpoint as a predictor of nephrotoxicity in patients treated with colistin methanesulfonate. *Int J Antimicrob Agents* 2016.
47. Nation RL, Garonzik SM, Li J, et al. Updated US and European dose recommendations for intravenous colistin: how do they perform? *Clin Infect Dis* 2016; 62:552–8.
48. <http://erx.gr/p/z/?type=spc&bcode=2801871703018>
49. W. Couet, N. Gregoire, S. Marchand and O. Mimoz. Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. *Clin Microbiol Infect*, 2012,18(1); 30–39.
50. Grégoire N., Aranzana-Climent V., Magréault S., Marchand S., Couet W., Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin. Pharmacokinet.* 2017, 56, 1441–1460.
51. Couet W, Gregoire N, Gobin P, Saulnier PJ, Frasca D, Marchand S, et al. Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(6):875–9.
52. Azad MA, Huang JX, Cooper MA, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. Structure-activity relationships for the binding of polymyxins with human alpha-1-acid glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(3):278–91.
53. Argyris S Michalopoulos, Matthew E Falagas. "Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients." *Annals of Intensive Care*, 2011: 1:30.

54. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases, 7th edn. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.
55. Nation RL, Forrest A. Clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics of polymyxins: implications for therapeutic use. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:219-249.
56. Li J, Coulthard K, Milne R, et al. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:987–92.
57. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:837–40.
58. Diao L, Meibohm B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic– pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clin Pharmacokinet.* 2013;52(10):855–68.
59. C. R. Catchpole, J. M. Andrews, N. Brenwald and R. Wise. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,1997,39(2); 255–260.
60. Rastogi N, Potar MC, David HL. Antimycobacterial spectrum of colistin (polymyxin E). *Ann Inst Pasteur Microbiol*,1986,137A;45-53.
61. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST, 2016. Available from http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/. Accessed January 24, 2019.
62. CLSI. M100-S27. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 26th Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2017.
63. Thien B. Tran, Tony Velkov, Roger L. Nation, Alan Forrest. «Pharmacokinetics /pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?» *International Journal of Antimicrobial Agents* 48, 2016: 592–597.
64. Patricia J. Simner, Yehudit Bergman, Marisol Trejo, Ava A. Roberts, Remy Marayan, et al. "Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli." *Journal of Clinical Microbiology*, 2019: e01163-18.
65. A. S. Michalopoulos, M. E. Falagas, Colistin and polymyxin B in critical care, *Crit Clin*, 24, 377-391, 2008.

66. Boisson M, Jacobs M, Gregoire N, Gobin P, Marchand S, Couet W, et al. Comparison of intrapulmonary and systemic pharmacokinetics of colistin methanesulfonate (CMS) and colistin after aerosol delivery and intravenous administration of CMS in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12): 7331–9.
67. Littlewood JM, Koch C, Lambert PA, et al. A ten-year review of colomycin. *Respir Med*. 2000;94(7):632–640.
68. Hamer DH. Treatment of nosocomial pneumonia and tracheobronchitis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with aerosolized colistin. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:328–30.
69. Westerman EM, Le Brun PPH, Touw DJ, et al. Effect of nebulized colistin sulphate and colistin sulphomethate on lung function in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *J Cystic Fibrosis* 2004;3:23–8.
70. Markantonis SL, Markou N, Fousteri M et al. Penetration of colistin into cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4907– 4910.
71. Everett ED, Strausbaugh LJ. Antimicrobial agents and the central nervous system. *Neurosurgery* 1980; 6: 691–714.
72. Jimenez-Mejias ME, Pichardo-Guerrero C, Marquez-Rivas FJ, MartinLozano D, Prados T, Pachon J. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 212–214.
73. Antachopoulos C, Karvanen M, Iosifidis E et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of colistin in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3985–3987.
74. Karaikos I, Lagou S, Pontikis K, et al. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health* 2019;7:151.
75. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis*. 2017;64(6):711–8.
76. Giacobbe DR, Del Bono V, Trearichi EM, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control–control study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(12):1106–8.

77. Abboud CS, Monteiro J, Stryjewski ME, et al. Post-surgical mediastinitis due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: clinical, epidemiological and survival characteristics. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47(5):386–90.
78. Claudia Stein, Oliwia Makarewicz, Jürgen A. Bohnert, Yvonne Pfeifer, Miriam Kesselmeier, Stefan Hagel, Mathias W. Pletz. « Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates.» *PLOS ONE*, 2015: DOI:10.1371.
79. Paul M, Carmeli Y, Durante-Mangoni E, Mouton JW, Tacconelli E, Theuretzbacher U, et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69:2305–2309.
80. Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. (2017) 13:59–71.
81. Karaiskos I, Antoniadou A, Giamarellou H. Combination therapy for extensively-drug resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. (2017) 15:1123–40.
82. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. (2014) 58:2322–8.
83. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. (2015) 70:2133–43.
84. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2108–13.
85. David M. Jacobs, M. Courtney Safr, Dennis Huang, Faisal Minhaj, Adam Parker and Gauri G. Rao Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* (2017) 16:76
86. Kirati Kengkla, Khachen Kongpakwattana, Surasak Saokaew, Anucha Apisarnthanarak and Nathorn Chaiyakunapruk: Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 22–32

87. Chen Z, Chen Y, Fang Y et al. Meta-analysis of colistin for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection. *Sci Rep* 2015; 5: 8.
88. Liu Q, Li W, Feng Y et al. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and metaanalysis. *PLoS One* 2014; 9: e98091.
89. Dong X, Chen F, Zhang Y et al. In vitro activities of rifampin, colistin, sulbactam and tigecycline tested alone and in combination against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67: 677–80.
90. Kempf M, Djouhri-Bouktab L, Brunel JMet al. Synergistic activity of sulbactam combined with colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 180–1.
91. Giamarellou H, Poulakou G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of tigecycline. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7: 1459–70.
92. Park HJ, Cho JH, Kim HJ, Han SH, Jeong SH, Byun MK. Colistin monotherapy versus colistin/rifampicin combination therapy in pneumonia caused by colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: a randomised controlled trial. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;17:66–71.
93. Durante-Mangoni E, Signoriello G, Andini R, Mattei A, De Cristoforo M, Murino P, et al. Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial. *Clin Infect Dis* 2013;57:349– 58, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit253>.
94. Nordqvist H, Nilsson LE, Claesson C. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with rifampicin for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:1845–50.
95. <https://reference.medscape.com/drug/colistimethate-sodium-coly-mycin-mcolistin-342578#5>
96. Landersdorfer CB, Nation RL. Colistin: how should it be dosed for the critically ill? *Semin Respir Crit Care Med* 2015; 36:126–35.
97. Nation RL, Li J, Cars O, et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis* 2015; 15:225–34.
98. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis* 2014; 59:88–94.

99. Li J, Rayner CR, Nation RL, et al. Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and colistin in a critically ill patient receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4814–5.
100. Spapen HD, Honore PM, Gregoire N, et al. Convulsions and apnoea in a patient infected with New Delhi metallo-beta-lactamase-1 *Escherichia coli* treated with colistin. *J Infect* 2011; 63:468–70.
101. Bode-Boger SM, Schopp B, Troger U, Martens-Lobenhoffer J, Kalousis K, Mailander P. Intravenous colistin in a patient with serious burns and borderline syndrome: the benefits of therapeutic drug monitoring. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42:357–60.
102. European Medicines Agency (2014) Polymyxin-containing medicines. Polymyxin Article 31 referral – annex III amendments to relevant sections of the summary of product characteristics and the package leaflets. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Polymyxin_31/WC500176332.pdf. Last accessed 16 Jun 2019
103. Bargiacchi O, De Rosa FG. Intrathecal or intraventricular colistin: a review. *Infez Med* 2016;1:3–11.
104. Matthew E Falagas and Sofia K Kasiakou. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. 2006; 10(1): R27.
105. Karaiskos I, Friberg LE, Pontikis K, Ioannidis K, Tsagkari V, Galani L, et al. Colistin population pharmacokinetics after application of a loading dose of 9 MU colistin methanesulfonate in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. (2015) 59:7240–48.
106. S. M. Garonzik, J. Li, V. Thamlikitkul, D. L. Paterson, S. Shoham, J. Jacob, F. P. Silveira, A. Forrest and R. L. Nation. Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Formed Colistin in Critically Ill Patients from a Multicenter Study Provide Dosing Suggestions for Various Categories of Patients. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*,2011,55(7); 3284–3294
107. European Medicines Agency completes review of polymyxin-based medicines: Recommendations issued for safe use in patients with serious infections resistant to standard antibiotics. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Polymyxin_31/WC500176333.pdf. Accessed 2 December 2015.

108. FDA Approved Drug Products. Label and approval history for Coly-Mycin M, NDA 050108. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/050108s030lbl.pdf. Accessed 2 December 2015.
109. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;8:3430–6.
110. Mohamed AF, Karaikos I, Plachouras D, et al. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;8:4241–9.
111. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada ML, Coppolecchia S, Miragliotta G, Bruno F, Brienza N. 2012. High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. *Clin Infect Dis* 54:1720–1726.
112. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Assessment report. Polymyxinbased products. 2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Polymyxin_31/WC500179664.pdf. Accessed 23 March 2017.
113. Nation RL, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Forrest A, Paterson DL, et al. Dosing guidance for intravenous colistin in critically-ill patients. *Clin Infect Dis*. 2016. doi:10.1093/cid/ciw839
114. Karaikos I, Friberg LE, Galani L, Ioannidis K, Katsouda E, Athanassa Z, Paskalis H, Giamarellou H. 2016. Challenge for higher colistin dosage in critically ill patients receiving continuous venovenous haemodiafiltration. *Int J Antimicrob Agents* 48:337–341.
115. Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S (1964) Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother* 23:552–574
116. He H, Li JC, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, Tsuji BT, Thompson PE, Roberts K, Velkov T, Li J (2013) Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *J Antimicrob Chemother* 68(10):2311–2317.
117. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K (2003) Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4):1364–1370

118. Karvanen M, Plachouras D, Friberg LE, Paramythiotou E, Papadomichelakis E, Karaiskos I, Tsangaris I, Armaganidis A, Cars O, Giamarellou H. 2013. Colistin methanesulfonate and colistin pharmacokinetics in critically ill patients receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 57:668 – 671.
119. Leporati M, Bua RO, Mariano F, Carignano P, Stella M, Biancone L, Vincenti M. 2014. Determination by LC-MS/MS of colistins A and B in plasma and ultrafiltrate from critically ill patients undergoing continuous venovenous hemodiafiltration. *Ther Drug Monit* 36:182–191. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3182a8997c>.
120. Markou N, Fousteri M, Markantonis SL, Zidianakis B, Hroni D, Boutzouka E, Baltopoulos G. 2012. Colistin pharmacokinetics in intensive care unit patients on continuous venovenous haemodiafiltration: an observational study. *J Antimicrob Chemother* 67:2459 –2462. <https://doi.org/10.1093/jac/dks257>.
121. Mariano F, Leporati M, Carignano P, Stella M, Vincenti M, Biancone L. Efficient removal of colistin A and B in critically ill patients undergoing CVVHDF and sorbent technologies. *J Nephrol* 2015; 28:623–31.
122. Koksali I, Kaya S, Gencalioglu E, Yilmaz G. Evaluation of Risk Factors for Intravenous Colistin Use-related Nephrotoxicity. *Oman Med J* 2016;31:318–21.
123. Inci A, Karabay A, Erus S, Demiraran Y. Nosocomial Infections and Associated Risk Factors in Geriatric Patients in the Intensive Care Unit. *Eurasian J Emerg Med* 2016; 15: 177–80.
124. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008;73:538–46.
125. DeRyke CA, Crawford AJ, Uddin N, Wallace MR (2010) Colistin dosing and nephrotoxicity in a large community teaching hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 54(10):4503–4505.
126. Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, Lephart P, Kaye KS (2011) Incidence of and risk factors for colistin associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis* 53(9):879–884.
127. M. Karvanen, Optimization of colistin dosage in the treatment of multiresistant Gram-negative infections (dissertation), Uppsala: Uppsala Universiteit, 2013.

128. Moataz M. Hassan, Zied Gaifer, Ibrahim S. Al-Zakwani. «Incidence and risk factors of nephrotoxicity in patients on colistimethate sodium». *International Journal of Clinical Pharmacy*, 2018: 40:444–449.
129. Kim J, Lee K-H, Yoo S, Pai H (2009) Clinical characteristics and risk factors of colistin-induced nephrotoxicity. *Int J Antimicrob Agents* 34(5):434–438.
130. Ali S Omrani, Wafa A Alfahad, Mohamed M Shoukri, Abeer M Baadani, et al. "High dose intravenous colistin methanesulfonate therapy is associated with high rates of nephrotoxicity; a prospective cohort study from Saudi Arabia." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2015: 14:3.
131. Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71:801–10.
132. John E, Bennett RD, Blaser MJ (2015) Polymyxins (Polymyxin B and Colistin). In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8 edn. Elsevier Saunders, Canada, pp 549–555.
133. Hartzell JD, Neff R, Ake J, Howard R, Olson S, Paolino K, Vishnepolsky M, Weintrob A, Wortmann G (2009) Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis* 48(12):1724–1728.
134. Honoré PM, Jacobs R, Joannes-Boyau O, Lochy S, Boer W, De Waele E, Van Gorp V, De Regt J, Collin V, Spapen HD (2014) Continuous renal replacement therapy-related strategies to avoid colistin toxicity: a clinically orientated review. *Blood Purif* 37(4): 291–295.
135. Mendes CAC, Burdmann EA (2009) Polymyxins: review with emphasis on nephrotoxicity. *Rev Assoc Med Bras* 55(6):752–759.
136. Falagas ME, Fragoulis KN, Kasiakou SK, Sermaidis GJ, Michalopoulos A (2005) Nephrotoxicity of intravenous colistin: a prospective evaluation. *Int J Antimicrob Agents* 26(6):504–507.
137. Rocco M, Montini L, Alessandri E, Venditti M, Laderchi A, De Pascale G, Raponi G, Vitale M, Pietropaoli P, Antonelli M (2013) Risk factors for acute kidney injury in critically ill patients receiving high intravenous doses of colistin methanesulfonate and/or other nephrotoxic antibiotics: a retrospective cohort study. *Crit Care* 17:R174.
138. Katz R (1963) Renal and possibly hepatic toxicity from coly-mycin. Report of a case. *Med Ann Dist Columbia* 32:408

139. Gulsum Ozkan, Sukru Ulusoy, Asim Orem, Mehmet Alkanat, Sevdegöl Mungan, Esin Yulug, Fulya Balaban Yucesanb. How Does Colistin-Induced Nephropathy Develop and Can It Be Treated? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8); 3463–3469.
140. Duncan DA: Colistin toxicity. Neuromuscular and renal manifestations. Two cases treated by hemodialysis. *Minn Med* 1973, 56:31-35.
141. Perkins RL: Apnea with intramuscular colistin therapy. *JAMA* 1964, 190:421-424.
142. Anthony MA, Louis DL: Apnea due to intramuscular colistin therapy. Report of a case. *Ohio State Med J* 1966, 62:336-338.
143. Gold GN, Richardson AP Jr: An unusual case of neuromuscular blockade seen with therapeutic blood levels of colistin methanesulfonate (Coly-Mycin). *Am J Med* 1966, 41:316-321.
144. Lindesmith LA, Baines RD Jr, Bigelow DB, Petty TL: Reversible respiratory paralysis associated with polymyxin therapy. *Ann Intern Med* 1968, 68:318-327.
145. Shrestha A, Soriano SM, Song M, Chihara S. Intravenous colistin-induced acute respiratory failure: A case report and a review of literature. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014;4:266—70.
146. Theodoros Kelesidis & Matthew E Falagas (2015) The safety of polymyxin antibiotics, *Expert Opinion on Drug Safety*, 14:11, 1687-1701.
147. de Gouw NE, Crul JF, Vandermeersch E, Mulier JP, van Egmond J, Van Aken H: Interaction of antibiotics on pipecuroniuminduced neuromuscular blockade. *J Clin Anesth* 1993, 5:212-215.
148. Decker DA, Fincham RW: Respiratory arrest in myasthenia gravis with colistimethate therapy. *Arch Neurol* 1971, 25:141-144.
149. Alothman GA, Ho B, Alsaadi MM, Ho SL, O'Drowsky L, Louca E, Coates AL: Bronchial constriction and inhaled colistin in cystic fibrosis. *Chest* 2005, 127:522-529.
150. Rajesh V. Dudhani, Roger L. Nation and Jian Li. Evaluating the stability of colistin and colistin methanesulphonate in human plasma under different conditions of storage. *J Antimicrob Chemother.* 2010, 65(7);1412-1415
151. Stephanie J. Wallace, Jian Li, Craig. R. Rayner, Kingsley Coulthard and Roger L. Nation. Stability of Colistin Methanesulfonate in Pharmaceutical Products and Solutions for Administration to Patients, *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008, 52(9);3047-3051

152. Markou N, Markantonis SL, Dimitrakis E *et al.* Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, Gram-negative bacilli infections: a prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin. Ther.* 30(1), 143–151(2008).
153. Divyabharathi Chepyalaa, I-Lin Tsai, Hsin-Yun Sun, Shu-Wen Lin, Ching-Hua Kuo, Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 980 (2015) 48–54.
154. Ratjen F, Rietschel E, Kasel D, Schwiertz R, Starke K, Beier H, Van Koningsbruggen S, Graseman H, Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:306-311.
155. Imberti R, Cusato M, Villani P *et al.* Steady-state pharmacokinetics and BAL concentration of colistin in critically ill patients after IV colistin methanesulfonate administration. *Chest* 138(6), 1333–1339(2010).
156. Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Study of stability of Polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2002);29:203-212.
157. Αμιλιανή Γιαννοπούλου. Διπλωματική Εργασία. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην «Κλινική Φαρμακευτική». Αθήνα, 2016.
158. Leuppi-Taegtmeyer A., Decosterd L., Osthoff M., Mueller N.J, Buclin T., Corti N. Multicenter Population Pharmacokinetic Study of Colistimethate Sodium and Colistin Dosed as in Normal Renal Function in Patients on Continuous Renal Replacement Therapy.
159. Grégoire N, Mimoz O, Mégarbane B, Comets E, Chatelier D, Lasocki S, Gauzit R, Balayn D, Gobin P, Marchand S, Couet W. 2014. New colistin population pharmacokinetic data in critically ill patients suggesting an alternative loading dose rationale. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 7324 –7330. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03508-14>.
160. Karnik ND, Sridharan K, Jadhav SP, Kadam PP, Naidu RK, Namjoshi RD, Gupta V, Gore MS, Surase PV, Mehta PR, Gogtay JA, Thatte UM, Gogtay NJ (2013) Pharmacokinetics of colistin in critically ill patients with multidrug-resistant Gram-negative bacilli infection. *Eur J Clin Pharmacol* 69(7):1429– 1436. <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1493-9>

161. Roberts JA, Lipman J. 2009. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med* 37:840–851. <http://dx.doi.org/10.1097 /CCM.0b013e3181961b>
162. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34:1589–1596.
163. Kristoffersson AN et al., Population pharmacokinetics of colistin and the relation to survival in critically ill patients infected with colistin susceptible and carbapenem-resistant bacteria, *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/ j.cmi.2020.03.016>
164. Pacheco, T.; Bustos, R.H.; González, D.; Garzón, V.; García, J.C.; Ramírez, D. An Approach to Measuring Colistin Plasma Levels Regarding the Treatment of Multidrug-Resistant Bacterial Infection. *Antibiotics* 2019, 8, 100.
165. Rigatto, M.H.; Oliveira, M.S.; Perdigão-Neto, L.V.; Levin, A.S.; Carrilho, C.M.; Tanita, M.T.; Tuon, F.F.; Cardoso, D.E.; Lopes, N.T.; Falci, D.R.; et al. Multicenter Prospective Cohort Study of Renal Failure in Patients Treated with Colistin versus Polymyxin, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60, 2443–2449