



Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация
Катедра Приложна неорганична химия

**ОПТИМИЗАЦИОННИ ХИМИКО-АНАЛИТИЧНИ И
ПОПУЛАЦИОННИ ФАРМАКОКИНЕТИЧНИ ПОДХОДИ
ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА И
КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ**

Кристина Василева Божинова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация представена за присъждане на образователна и
научна степен „Доктор“ по професионално направление

Химически науки (Аналитична химия)

Научен ръководител:

Проф. д-р Димитър Терзииванов, дм, дмн

Научен консултант:

Доц. д-р Иванка Атанасова, дм

София 2017

Дисертацията съдържа 182 страници, в които са включени 27 фигури, 20 таблици, 32 приложения и 287 цитирани източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен Катедрен съвет на Катедра Приложна неорганична химия към Факултета по химия и фармация на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 25.05.2017 г.

Кристина Божинова е била свободен докторант към Катедра Приложна неорганична химия, ФХФ, СУ.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 14.07.2017 г. от 16:00 часа, в Заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация
Катедра Приложна неорганична химия

**ОПТИМИЗАЦИОННИ ХИМИКО-АНАЛИТИЧНИ И
ПОПУЛАЦИОННИ ФАРМАКОКИНЕТИЧНИ ПОДХОДИ
ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА И
КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ**

Кристина Василева Божинова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация представена за присъждане на образователна и
научна степен „Доктор“ по професионално направление
Химически науки (Аналитична химия)

Научен ръководител:

Проф. д-р Димитър Терзииванов, дм, дмн

Научен консултант:

Доц. д-р Иванка Атанасова, дм

Научно жури:

Чл. кор. проф. дхн Тони Спасов
Проф. д-р Димитър Терзииванов, дм, дмн
Проф. д-р Стоян Александров, дхн
Доц. д-р Анри Аструг, дф
Проф. д-р Таня Кунева, дм

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
III. МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ	9
III.1 ВЕЩЕСТВА, РЕАКТИВИ И ХРОМАТОГРАФСКА АПАРАТУРА	9
III.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ВЕТХ ОПРЕДЕЛЯНЕ	9
III.3 ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНИЯТА И УЧАСТНИЦИ	14
III.4 ФАРМАКО-СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ	15
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	17
IV.1 ОПТИМИЗИРАНИ И ВАЛИДИРАНИ ВЕТХ МЕТОДИКИ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕКАРСТВА	17
IV.2 ПРИЛОЖЕНИЕ НА АЛОМЕТРИЧНОТО СКАЛИРАНЕ ПРИ ОЦЕНКА АКТИВНОСТТА НА СУР1А2	27
IV.3 ПРИЛОЖЕНИЕ НА D-ОПТИМАЛНОСТТА ПРИ ДИЗАЙНИРАНЕ НА ПОПУЛАЦИОННИ ФАРМАКОКИНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ	33
IV.4 ПРИЛОЖЕНИЯ НА МЕТОДА МОНТЕ КАРЛО ЗА ЛЕКАРСТВЕНО ФЕНОТИПИЗИРАНЕ АКТИВНОСТТА НА СУР1А2 ЧРЕЗ КОФЕИН	49
IV.5 ОБОБЩЕНИЕ	54
V. ИЗВОДИ	57
VI. ПРИНОСИ	58
VII. БИБЛИОГРАФИЯ	59
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ	63

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на английски език:

137U – 1,3,7 – триметил пикочна киселина

13U – 1,3 – диметил пикочна киселина

17U – 1,7 – диметил пикочна киселина

1U – 1 – метил пикочна киселина

1X – 1 - метилксантин

37U – 3,7 – диметил пикочна киселина

3U – 3 метил пикочна киселина

3X – 3 - метилксантин

7U – 7 – метил пикочна киселина

7X – 7 - метилксантин

ААР - 4-ацетамидофенол

АМ – аминомодификатор

AUC_{0-t} – Площ под кривата лекарствена концентрация/време от $t = 0$ до $t = t$

$AUC_{0-\infty}$ - Площ под кривата лекарствена концентрация/време от $t = 0$ до $t = \infty$

ВМІ – Индекс на телесната маса

ВМR - Базалнаа метаболитна скорост

$C_{(t)}$ – Концентрация на лекарство във време ‘t’

CAF - Кофеин

CBZ - Карбамазепин

CL_{hum} – Клирънс при хора

CL_p – Плазмен клирънс

CL_{rat} – Клирънс при плъхове

CLS1 - Системен лекарствен клирънс, нормализиран спрямо телесното тегло

C – лекарствена концентрация

C_{max} – Максимална лекарствена концентрация

C_{min} – Минимална лекарствена концентрация

CV – коефициент на вариация

CYP450 – цитохром P450 ензимна суперфамилия

D – лекарствена доза

DBA – дибутиламин

EMA – европейска агенция по лекарствата

Fu - Бионаличност на лекарство

F – скорост на подвижната фаза

FDA – агенция за контрол на храните и лекарствата

i. s. – вътрешен стандарт

KA – Абсорбционна константа

KEL – Елиминационна константа

LOD – откриваем минимум

LOQ – минимално определяемо количество

МС – мас-спектрометър

NAVPA - Натриев валпроат

NPAG - Метод на непараметричната адаптивна решетка (Nonparametric adaptive grid)
NPEM - Метод на непараметрично моделиране на максималното очакване (Nonparametric Expectation Maximisation Modelling)
PB - Фенобарбитал
PDF - Плътност на разпределението на една случайна величина
PHT - Фенитоин
PX - Параксантин
QCS – проби за качествен контрол
QSAR – количествена връзка между структура и биологична активност
RMeSE – корен квадратен от квадратичната грешка на медианата
RMSE корен квадратен от квадратичната грешка
 R_s - Коефициентът на разделяне
SD – стандартно отклонение
t - Време
 $t_{1/2}$ – Време на биологичен полуживот
TB – Теобромин
 t_{max} – Време, при което се наблюдава максималната лекарствена концентрация
TP - Теофилин
 V_d – Обем на разпределение
VS1 – Обем на разпределение, нормализиран спрямо телесното тегло

Съкращения на български език:

АБО – Апостериорни байесовски оценки
БЕ - Биеквивалентност
ВЕТХ - Високо-ефективна течна хроматография, високо-ефективен течнокроматографски
ВЕТХ – МС – високо-ефективна течна хроматография с мас спектрометрия
ДЛП - Добра Лабораторна Практика
Ж - Жена
М – Мъж
МЕ – Средна грешка
MeE – Средна грешка на медианата
МК – Монте Карло
п.ф. - Подвижна фаза
 pK_a - Дисоциационна константа (отрицателен логаритъм на йонизационната константа)
РЛП – Референтен лекарствен продукт
ТЛП - Тестван лекарствен продукт
ФД - Фармакодинамика, фармакодинамичен
ФК - Фармакокинетика, фармакокинетичен

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години популационния фармакокинетичен/фармакодинамичен анализ убедително навлиза в съвременната фармакотерапия. Той предоставя съществена информация както за въздействието на физиологични и патологични процеси върху фармакокинетиката/фармакодинамиката (ФК/ФД) на лекарствата, така и за значението на интер- и интраиндивидуалната вариабилност при оценка на ФК/ФД поведение на лекарствата. Това е от особена значимост поради факта, че патологичните процеси обикновено непредсказуемо променят вариабилността на лекарствения отговор.

Разработени са нови непараметрични методи за оценка на популационните ФК/ФД параметри и тяхното статистическо разпределение в определени популации от здрави и болни индивиди. При комбинирането им с апостериорното Байесовско предсказване може да се създават терапевтично ефикасни и безопасни дозови режими, което е особено важно при критично болни, за да се реализира т.нар. цел ориентирана лекарствена терапия. С методи като непараметрично моделиране на максималното очакване и методът на непараметричната адаптивна решетка (nonparametric adaptive grid, NPAG) е възможно с ограничен брой пробовземания да се разработят ФК модели и да се разкрият неочаквани субпопулации от болни, чийто лекарствен клирънс ясно се отклонява от общата тенденция. А това е от съществено значение при тези болни за създаване на безопасни дозови режими.

Дизайнът на конвенционалните клинични изпитвания за сравняване степента и скоростта на резорбция изисква голям брой пробовземания. При такава голяма бройка, разтегната обикновено в едно денонощие, а при лекарства с дълъг полуживот и до 4-5 денонощия, е напълно възможно физиологичният профил на кръвта да се промени от първите спрямо последните проби. Този момент, който трудно се контролира от един индивид на друг, може да бъде източник на грешка и да увеличи интра- и интериндивидуалната вариабилност (дисперсията). А бъдещите клинични проучвания вървят в посока на увеличен порядък, за да могат да оценяват и индивидуалната експозиция на организма спрямо лекарството и взаимодействието индивид-лекарствена форма. Това изисква увеличаване на броя участници в тези проучвания и неминуемо ще ги оскъпява. Традиционният дизайн може да се окаже критично неприложим, ако проучванията се правят върху болни, при които пробовземанията трябва да бъдат сведени до оптималния минимум. За всеки ФК модел съществува критичен минимум от точки върху кривата плазмени концентрации/време, който позволява тя да бъде реконструирана статистически достоверно, ако, и само ако, те са оптималните. При рискови болни е добре ограниченият брой пробовземания да са съобразени с D-оптималната стратегия, за да съдържат максимална информация. Критерият D-оптималност намира времената, при които лекарствените плазмени концентрации са най-чувствителни на промяна в стойностите на оценяваните ФК параметри и минимизира общата дисперсия на оценките на структурните ФК параметри.

С помощта на метода Монте-Карло се симулира наблюдение върху големи виртуални популации, което дава възможност за по-точна оценка на ФК/ФД параметри и тяхното статическо разпределение. Монте-Карло методът намира все по-широко приложение в популационния ФК/ФД анализ за прецизиране оценката на лекарствените ФК/ФД параметри, получени рандомизирано от малък брой индивиди и ограничен брой пробовземания на биологичен материал от тях.

Най-важната ензимна фамилия, която метаболизира лекарства, цитохром 450, CYP450, се е съхранила в междувидовото разнообразие. CYP450 е еволюирала от един единствен потомствен ген от преди повече от един милиард години и се наблюдават малки разлики в аминокиселинната последователност при различните биологични видове. Но и малките промени в аминокиселинната секвенция могат да доведат до сериозни разлики в субстратната специфичност и каталитична активност. По тази причина разликите в CYP450 изоформите между видовете са основна причина за наблюдаваните междувидови различия при лекарствения метаболизъм. Фармакологичните данни, получени от експериментални изпитвания, чрез подходящи подходи, могат успешно да се екстраполират за хора. Такива практики се използват при откриване и разработване на нови лекарствени молекули или при изследване ФК поведение на лекарства. Алометричното скалиране позволява, въпреки анатомичните, физиологични и биохимични различия между бозайниците, да се екстраполира между тях ФК поведение на различни лекарства.

Човешката суперфамилия *CYP1* се състои от два структурни гена *CYP1A1* и *CYP1A2*, които кодират протеините CYP1A1 и CYP1A2. При хората ензимът CYP1A2 метаболизира широк спектър от полициклични ароматни въглеводороди, включително потенциални прокарциногени от околната среда и лекарства. CYP1A2 отговаря за 15% от общото белтъчно съдържание на чернодробната CYP450. Следователно, мониторирането на активността на CYP1A2 може да даде ценна информация относно прогресията на чернодробните патологии, както и за резултата от чернодробна трансплантация.

За целите на популационното ФК/ФД моделиране е необходимо високоефективният течно-хроматографски анализ на лекарства в биологични течности, прилаган за едновременно определяне на няколко изследвани лекарства, да притежава висока чувствителност и селективност. Необходими са оптимизационни подходи за бързо установяване на най-подходящите условия за химически анализ. Рутинното използване на химическия анализ изисква валидиране, за да се осигурят максимална точност и възпроизводимост при измерване на плазмените и уринни концентрации на лекарствата и/или техните метаболити.

Бърз и лесен за изпълнение оптимизационен подход в комбинация с валидиране на високо-ефективните течнохроматографски методики водят до прецизно определяне на лекарствените концентрации, което е важно условие за прецизен популационен непараметричен ФК анализ. Популационният непараметричен ФК анализ в съчетание с D-оптималния дизайн и метода на Монте Карло може да намери приложение в експериментални и клинични проучвания, както и за индивидуализиране на терапията при таргетирани популации от пациенти.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е:

Разработване и прилагане на подходи за оптимизиране на високо-ефективни течнокроматографски методи и на популационни фармакокинетични анализи в експерименталната и клинична фармакология.

Въз основа на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Оптимизиране и валидиране на високо-ефективна течнокроматографска методика за едновременно качествено и количествено определяне на валпроева киселина, фенитоин и карбамазепин в кръв от пациенти.
2. Оптимизиране и валидиране на високо-ефективна течнокроматографска методика за едновременно качествено и количествено определяне на кофеин и неговите метаболити в биологични течности от бозайници.
3. Алометрично предсказване при хора активността на ензима CYP1A2 чрез експериментално фармакокинетично изследване.
4. Приложение на D-оптималния дизайн при популационния фармакокинетичен анализ на кофеин.
5. Приложение на D-оптималния дизайн при клинични проучвания на ампицилин и теофилин.
6. Приложение на метода Монте Карло симулации за целите на лекарственото фенотипизиране активността на CYP1A2.

III. МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

III.1 ВЕЩЕСТВА, РЕАКТИВИ И ХРОМАТОГРАФСКА АПАРАТУРА

Всички използвани вещества са с чистота за анализ.

За анализа са използвани: високоефективен течен хроматограф с автоматичен градиентконтролер; две помпи модел Waters 501, фотодиоден детектор Waters 991, компютър NEC с принтер-плотер модел Waters 5200 (Waters Chromatography Division, Milford, Massachusetts).

III.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ВЕТХ АНАЛИЗИ

III.2.1 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ВЕТХ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИЕПИЛЕПТИЧНИ ЛЕКАРСТВА

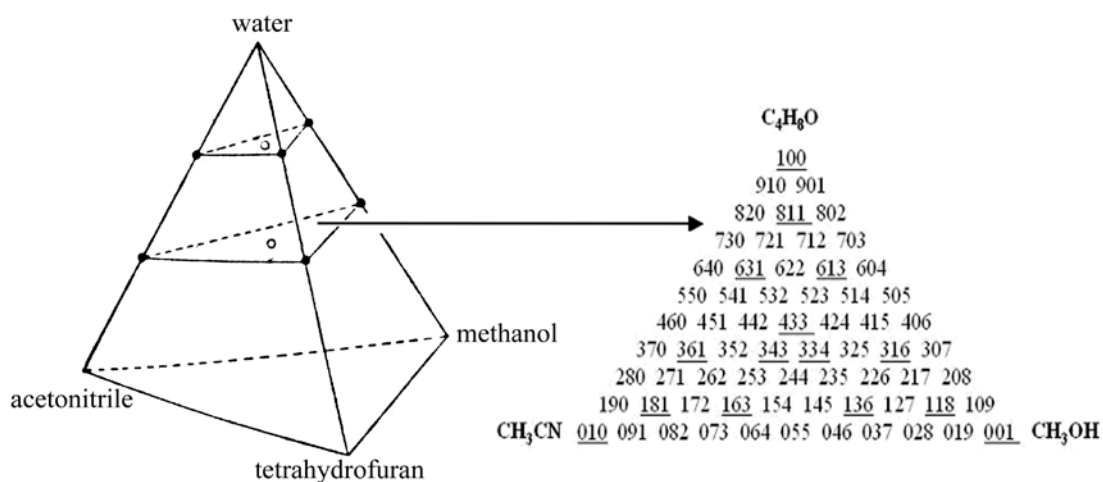
Хроматографска колона

LiChrospher 100 RP18 5 μ m (125 x 4mm i.d.) [Merck, Darmstadt, Germany], с предколона Guard-Pak TM μ Bondapak C18 [Waters].

Оптимизиране условията на хроматографската методика

Оптимизирането на рН на подвижната фаза се извърши като необходимото рН на воден разтвор на $0.1\text{M Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ се постигна с $3\text{M H}_3\text{PO}_4$

Оптимизирането на подвижната фаза се извърши на хроматографска колона LiChrospher 100 RP8 $5\mu\text{m}$ ($25 \times 4\text{mm i.d.}$) [Merck, Darmstadt, Germany], при изократно елуиране със скорост на потока 1 mL/min , като за подвижна фаза се приготвиха 15 комбинации [40] от $0.1\text{M Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (рН 5.8): $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}$ в различни процентни съотношения (вж. Фигура 3.1 и Приложение № 1). Хроматограмите се регистрират при дължина на вълната $\lambda=210\text{nm}$.



Фигура 3.1. Композиции ацетонитрил–тетраhydroфуран-метанол с различна селективност при подобна елуираща сила на подвижната фаза

Предварителна обработка на пробите за анализ

При изработване на пробите за калибриране (т. нар. натоварени проби) към 0.100 mL чист от изследваните вещества серум (бленкова проба) се прибавят по 0.020 mL стандартен разтвор с определена концентрация. При изследване на серумните проби от болни и здрави индивиди към 0.100 mL плазма се прибавя по 0.020 mL разтвор на вътрешен стандарт ($C = 125\text{ mg/L}$).

Пробите се хомогенизират. Към пробите се прибавят 0.025 mL 1M HCL , наситена с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0.050 mL CH_3CN и се разбъркват. Получената емулсия се центрофугира за 10 минути при 13000 оборота/мин и 0.050 mL от супернатанта се инжектират. [36].

III.2.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ЧРЕЗ ВЕТХ НА КОФЕИН И ПЪРВИЧНИТЕ МУ МЕТАБОЛИТИ В КРЪВ И УРИНА ПРИ ПЛЪХОВЕ И ХОРА

Хроматографски колони

LiChrospher 100 RP18 5 μ m (25 x 4mm i.d.), LiChrospher 100 RP18 5 μ m (15 x 4mm i.d.) [Merck, Darmstadt, Germany].

Предварителна обработка на пробите за анализ

При изработване на пробите за калибриране (т. нар. натоварени проби) към 0.500mL чиста от изследваните вещества плазма (бленкова проба) се прибавят по 0.100 mL стандартен разтвор с определена концентрация. При изследване на плазмените проби от здрави доброволци и мъжки плъхове порода Wistar към 0.500 mL плазма се прибавя по 0.100 mL разтвор на вътрешен стандарт (C = 5 mg/L). Екстракцията на пробите се извършва чрез прибавяне на 6 mL екстрагент (хлороформ:2-пропанол). Получената емулсия се разбърква и се центрофугира. 5 mL от органичния слой се изпарява на водна баня под струя от въздух до сух остатък. Последният се разтваря в 0.100 mL от подвижната фаза и 0.050 mL от супернатанта се инжектират.

Хроматографски анализ

За оптимизиране на подвижната фаза се приготвиха 15 комбинации [40] от 0.01MCH₃COOH:CH₃OH:CH₃CN:C₄H₈O в различни процентни съотношения (Фигура 3.1 и Приложение 4) като подвижна фаза за разделяне на ТВ, ААР, ТР, РХ и САФ, при изократно елуиране със скорост на потока 1.5 mL/min. Хроматограмите са регистрирани при дължина на вълната $\lambda=274$ nm.

Хроматографският анализ за качествено и количествено определяне на кофеин и първичните му метаболити се валидира при изократичен режим, подвижна фаза: 0.01M CH₃COOH:CH₃OH:C₄H₈O (93.83-5-1.17; v-v-v), при обемна скорост на елуентите F=1.5mL/min, входно налягане p = 1700 psi, при стайна температура и хроматографска колона LiChrospher 100 RP18 5 μ m (15 x 4mm i.d.)

Количественото определяне се извършва след валидиране на течнохроматографската методика с уравнение на аналитичната грешка:

$$SD=0.00206 + 0.200717C - 0.039061C^2 + 0.002854C^3 \quad [3.1]$$

(*C* е измерената плазмена концентрация на кофеин, а *SD* е стандартното отклонение), което се използваше като претеглящ фактор при NPEM популационния фармакокинетичен анализ.

III.2.3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОФЕИН И НЕГОВИ ПЪРВИЧНИ И ВТОРИЧНИ МЕТАБОЛИТИ В УРИНА

Хроматографска колона

Хроматографска колона Ultrasphere ODS 5µm 4.6mm*25cm [Beckman Instruments, CA], с предколона Guard-Pak TM -µ-Bondapak C18 [Waters].

Предварителна обработка на пробите за анализ

При изработване на пробите за калибриране към 0.100 mL чиста от изследваните вещества урина се прибавят по 0.100 mL стандартен разтвор с определена концентрация и по 0.010 mL разтвор на вътрешен стандарт (*C*=1 mg/L). При изследване на уринни проби от здрави доброволци към 0.200 mL урина се прибавя по 10 µl разтвор на вътрешен стандарт.

Пробите се насищат с амониев сулфат и се хомогенизират. Екстракцията на пробите се извършва по модифицирана методика на Aldridge [4]. 50 µl от супернатанта се инжектират.

Хроматографски анализ

Използваните подвижни фази (п. ф.) А съдържат 0.1M ацетатен буфер : ацетонитрил : тетраhydroфуран в обемни съотношения 98.8-1-0.2 и са с рН 2.9, 3.9, 5.01, 6.0, 7.25, като за всяка рН стойност се приготвят по четири подвижни фази: без аминомодификатор, с 1mM n-бутиламин, 1mM n-дибутиламин или 1mM триетиламин. При всички случаи подвижната фаза В е ацетонитрил. Преди анализа ацетатният буфер се филтрува през филтър с големина на порите 0.22 µM и приготвените подвижни фази се третират за 20 минути в ултразвукова баня. Преди началото на анализите течно-хроматографската система се кондиционира 45 минути, а преди инжектиране на проба системата се промива по 10 минути с бидестилирана вода и се кондиционира по 15 минути със следващата подвижна фаза. Хроматограмите се регистрират при λ=276 nm.

Хроматографският анализ се валидира при градиентен режим на елуиране (Таблица 3.1), при обемна скорост на елуентите *F* = 1.1 mL/min, входно налягане *p* = 90 bar и стайна температура.

Таблица 3.1. Програма на градиентно елуиране

Минути	F[mL/min]	п. ф. А[%]	п. ф. В[%]
0	1.1	100	0
8	1.1	100	0
15	1.1	75	25
27	1.1	40	60
34	1.1	0	100

Използваните подвижни фази съдържат 0.1M ацетатен буфер (pH 3.8): ацетонитрил: тетраhydroфуран, в обемни съотношения: п.ф. А 98.8-1-0.2 и п. ф. В 91.4-7-1.6, към всяка фаза се прибавя по 1mM дибутиламин. Хроматограмите се регистрираха при $\lambda=276$ nm.

III.2.4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ЧРЕЗ ВЕТХ НА АМПИЦИЛИН

За количествения анализ беше валидирана високоефективна течно-хроматографска (ВЕТХ) методика, модификация на предложения от Vtee и сътр. [56] метод за количествено определяне на субстанцията ампицилин.

Хроматографски условия

Разделянето се осъществява в изократичен режим с подвижна фаза фосфатен буфер (pH4.6): метанол (85:15, v:v) на колона LiChrospher 100 RP-18, 125x4 mm i.d. 5 μ m (Merck, Darmstadt, Germany) с предколона – LiChrospher RP18, 5 μ m, (4x4 mm). Хроматограмите се регистрират при дължина на вълната $\lambda = 210$ nm.

Уравнението на аналитичната грешка е

$$SD = -0.000838 + 0.124291C - 0.000155C^2 \quad [3.2]$$

където C е измерената плазмена концентрация на ампицилин, а SD е стандартната грешка, и е използвано като претеглящ фактор при популационния ФК анализ. За да се оцени интра-индивидуалната вариабилност в изследваната популация е изчислен дисперсионния фактор γ , който се равнява на 0.931 и показва, че практически цялостната интра-индивидуална вариабилност се дължи на аналитичната грешка.

Течно-хроматографската методика е валидирана съгласно изискванията на световните стандарти за биоаналитичен анализ.

Времето на задържане на ампицилин е 10.88 ± 0.73 min.

Аналитичен добив: 80.81% с коефициент на вариация (CV) 13.04%, изследван 18 пъти в продължение на периода на анализ на ампицилин.

Вътродневната повторяемост е с CV < 9%, а междудневната - с CV = 14.05% при 24 измервания за периода на анализ на ампицилин в плазмата на доброволците.

Оценената точност на измерванията на ампицилин при различни контролни работни концентрации е:

0.75mg/L - 90.62% от истинската концентрация при 14 измервания за същия период;

1 mg/L - 95.45%. при 26 измервания;

2 mg/L - 98.82% при 14 измервания.

В данните са включени и резултатите от контрола на качеството на измерванията, извършени с концентрации 0.75, 1, и 2 mg/L всяка седмица по време на анализа на пробите от плазма на пациентите.

В изследвания концентрационен обхват 0.3 - 16 mg/L зависимостта сигнал/концентрация, оценена чрез площите на пиковете, е линейна (корелационен коефициент 0.996, коефициент на детерминация 0.992). Най-малкото определяемо количество е 3 ng. Минималната определяема концентрация е 0.3 mg/L с 95% доверителен интервал в концентрационните граници 0.231mg/L - 0.369 mg/L.

III.3 ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНИЯТА И УЧАСТНИЦИ

Всички индивиди – участници в клиничните проучвания подписват информирано съгласие преди да бъдат включени в съответното проучване. Информиранията съгласия и всички останали документи по проучванията са получили одобрение от Комисия по Етика.

III.3.1 ПОПУЛАЦИОНЕН ФК АНАЛИЗ НА НАТРИЕВ ВАЛПРОАТ, ФЕНИТОИН И КАРБАМАЗЕПИН

По една кръвна проба от пациент се взема чрез венепункция сутрин “на гладно” преди болният да приеме нова доза лекарство/а. Пробата се центрофугира, серумът се отделя и се замразява при - 20°C до химическия анализ.

III.3.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ И КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА КОФЕИН И МЕТАБОЛИТИТЕ МУ

Плъхове

Изследването се проведе върху 31 бели мъжки плъха порода Wistar (с тегло 200-350 g, възраст 130-150 дни), които се третираха еднократно с 5 mg/kg телесно тегло Coffeinum purum p.o. (Приложение № 7). От животно се вземаше само по една кръвна проба след декапитирането му за съответния час. Кръвните проби се вземаха съответно на 0 час преди прием на кофеин и на 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 24 часове след прием на кофеин.

При експериментите с животни са спазени международните изисквания за работа с тях (International Guiding Principles for Animal Research) и принципите на Добрата Лабораторна Практика (ДЛП).

Доброволци

В клиничното проучване взеха участие 34 възрастни индивиди несвързани с роднинска връзка (за подробности виж Приложение № 10). Всеки участник предварително подписваше писмено съгласие за участие и приемаше перорална доза

кофеин от $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. От всеки се вземаше 1 кръвна проба преди приема на кофеин и по 2 кръвни проби след приема за определяне плазмените концентрации на кофеин и първичните му метаболити (Приложение № 10).

III.3.3 КЛИНИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА АМПИЦИЛИН ПРИ ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ

Изследването се планира като открито, рандомизирано, кръстосано с два периода на третиране с тест и референтен лекарствени продукти, съдържащи Ampicillin. Подбрани са 14 здрави доброволци от мъжки и женски пол. По време на двата периода на клиничното изпитване рандомизирано се прилагат еднократни дози от 500 mg от ТЛП и РЛП съотв., с “отмиващ” период от 7 дни.

Кръвта за определяне на индивидуалните плазмени концентрации на ампицилин след еднократна доза се взема в следните часове: преди медикация (0 час); 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 24 часа след медикацията.

III.3.4 КЛИНИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ТЕОФИЛИН ПРИ ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ

В изследването са включени 26 доброволни участници от мъжки пол на възраст между 18 и 55 години с нормално съотношение ръст/тегло според ВМІ, които бяха дали писмено съгласие. Всички участници последователно приемат по 250 mg от изследвания или референтния продукт в еднократна доза, съгласно рандомизационна схема. За определяне плазмените концентрации на теофилин от всеки участник са взети кръвни проби преди приема на съответния продукт и на 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 и 24 часа след приема.

III.4 ФАРМАКО-СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

III.4.1 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Използвани статистически програми: MS Excel 2000, Statistica v. 5.0/1995; Microcal™ Origin™ v. 5.0/1997; SlideWrite Plus v. 3.00/1995; TableCurve v. 1.10, Prism v. 2.01 (софтуерен продукт GraphPad Prism – GraphPad Software, Inc.).

III.4.2 ПОПУЛАЦИОНЕН ФАРМАКОКИНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

Популационните ФК модели са създадени чрез софтуерните продукти за непараметричен популационен ФК анализ USC*PASC и MM-USC*PASC.

III.4.3 D- ОПТИМАЛЕН ДИЗАЙН ПРИ НЕПАРАМЕТРИЧНО ПОПУЛАЦИОННО ФК МОДЕЛИРАНЕ

D-оптималния дизайн се реализира двустъпално.

Стъпка 1. Определянето на D-оптималните времена се извършва по D'Argenio (1981) [15], като изчисленията са осъществени с програмата REUNEX (написана от Dr. R.W. Jelliffe), която използва при оптимизирането критерия D-оптималност. Този

критерий намира времената, при които лекарствените плазмени концентрации са най-чувствителни на всяка промяна в стойностите на структурните ФК параметри и минимизира детерминантата на обратната информационна матрица на Fisher, вследствие на което се минимизира общата дисперсия на оценките на структурните ФК параметри. Тествани са за D-оптималност различни комбинации от актуални времена.

Стъпка 2. Чрез популационния непараметричен ФК анализ, основан на NPEM, се създават D-оптимални популационни ФК модели за кофеин, теофилин и ампицилин. Определянето на D-оптималните времена, изграждането на D-оптималния ФК модел на теофилин и възстановяването на зависимостите плазмени концентрации – време беше извършено с програмите REUNEX и BESTDOSE (от Drs. R. W. Jelliffe и M.N. Neely).

III.4.4 МЕТОД МОНТЕ КАРЛО (МК) СИМУЛАЦИИ ЗА ЛЕКАРСТВЕНО ФЕНОТИПИЗИРАНЕ

При МК симулациите се използва орална доза от 220 mg кофеин и се използват 10 симулирани плазмени концентрации на лекарството от 0.5 час до 24 час (0.5; 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 10, и 24 час – обединените часове от Приложение № 10 [53]) след дозиране на лекарството за всеки един Монте Карло симулиран субект (n=250). В симулираната популация VS1 и CLS1 са приети за взаимно независими. KA (= $4.54 \pm 0.8245 \text{ h}^{-1}$) и VS1 (= $0.58 \pm 0.0135 \text{ L/kg}$) имат едни и същи стойности за 3-те субпопулации (приема се, че KA и VS1 имат нормално разпределение [53]), но разпределението на CLS1 е предвидено като тримодално със средни: $0.00994 \pm 0.000003925 \text{ L/h/kg}$; $0.081 \pm 0.0002624 \text{ L/h/kg}$, и $0.251 \pm 0.00252 \text{ L/h/kg}$ за субпопулациите с нисък, среден и висок CLS1, респ. Грешката в симулираните плазмени концентрации на кофеин се оценява чрез полиномно уравнение от трети порядък (виж у-ние 3.1) и се включва в Монте Карло симулациите на кофеиновите симулирани плазмени концентрации. Тази информация относно разпределенията на стойностите на ФК параметри се използва като входяща за извършване на Монте Карло симулации чрез компютърна програма, която е предоставена от нейния автор Dr. Michael Van Guilder. Двеста и петдесет ФК профили на кофеин са симулирани и техните симулирани плазмени кофеинови концентрации са използвани в популационния ФК анализ чрез непараметричния NPAG метод, разработен от Dr. R. Leary [38], и вграден в NPAG софтуера [9]. Параметризацията на ФК модел на кофеин е извършена с KA, VS1, и CLS1, респ.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1 ОПТИМИЗИРАНИ И ВАЛИДИРАНИ ВЕТХ МЕТОДИКИ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕКАРСТВА

Многокомпонентният състав на биологичната матрица затруднява качествения и количествен анализ на лекарствата. Оптимизирането на хроматографския процес може да се ориентира към три главни задачи: избор на хроматографска колона, избор на подвижна фаза и избор на подходящо предварително пречистване на пробите. Намаляването на размера на пълнежа на колоната намалява височината на теоритичната тарелка и съответно подобрява разделянето, затова са изследвани колони със средна големина на частиците 5 μm .

IV.1.1 ОПТИМИЗИРАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ ВЕТХ АНАЛИЗ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НАТРИЕВ ВАЛПРОАТ, ФЕНИТОИН И КАРБАМАЗЕПИН

Тъй като стойностите за pK_a на антиепилептичните лекарства са доста различни, оптималната стойност за pH е установена експериментално, след оценяване на разделянето на анализиранияте съединения при подвижни фази, с pH на фосфатния буфер в интервала от 3.01 до 6.03. Най-добро разделяне се постига при елуент с pH 5.8.

За получаване на данни за оптимизационния процес са анализирани 15 различни процентни съотношения на съдържанието на подвижната фаза, които съответстват на 15 точки с различна селективност (Фигура 3.1 и Приложение № 1), но с подобна елуираща сила.

Експериментално са намерени следните съотношения между различните органични модификатори:

$$\varphi(C_4H_8O) = 0.792 \varphi(CH_3OH) \quad [4.1]$$

$$\varphi(CH_3CN) = 0.625 \varphi(CH_3OH) \quad [4.2]$$

$$\varphi(CH_3CN) = 0.789 \varphi(C_4H_8O) \quad [4.3]$$

φ - обемна част на органичния разтворител

Регресионни коефициенти с по-голяма достоверност, оценена чрез F-критерия (по-голям от съответната таблична стойност), по-малка грешка и по-високи корелационни коефициенти бяха изчислени чрез следното уравнение [14, 44]:

$$\ln k = A_1\varphi_1^2 + A_2\varphi_2^2 + A_3\varphi_3^2 + B_1\varphi_1 + B_2\varphi_2 + B_3\varphi_3 + C + D_{12}\varphi_1\varphi_2 + D_{13}\varphi_1\varphi_3 + D_{23}\varphi_2\varphi_3 \quad [1]$$

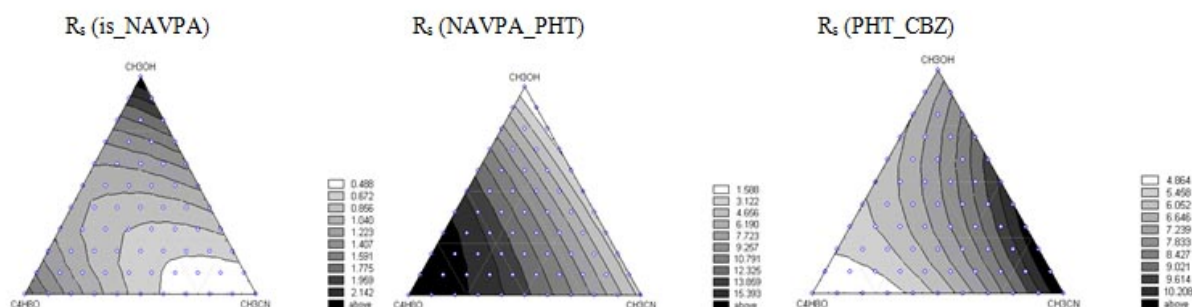
φ - обемна част на органичния разтворител

A, B, C, D - коефициенти

Наблюдава се добра корелация между предсказаните и наблюдавани стойности за капацитета k за всичките изследвани съединения (Приложение № 2).

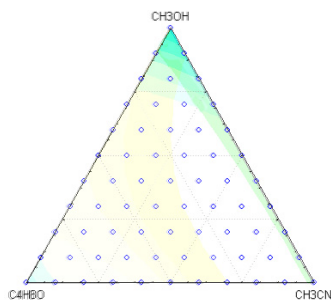
Задържането на натриевия валпроат и фенитоина изключително силно се повлиява от различните комбинации на органичните модификатори. Времето на

задържане на тези две вещества варират в широки граници. Целта на оптимизирането на подвижната фаза е да се постигне максимално добро разделяне на пиковете един от друг за възможно кратко време. Два пика се считат за напълно разделени при стойност на коефициента на разделяне R_s по-голяма от единица [3]. От данните за капацитета, получени от съответните регресионни модели, се изчислява R_s и се търси оптималната комбинация за п.ф. (Фигура 4.1)



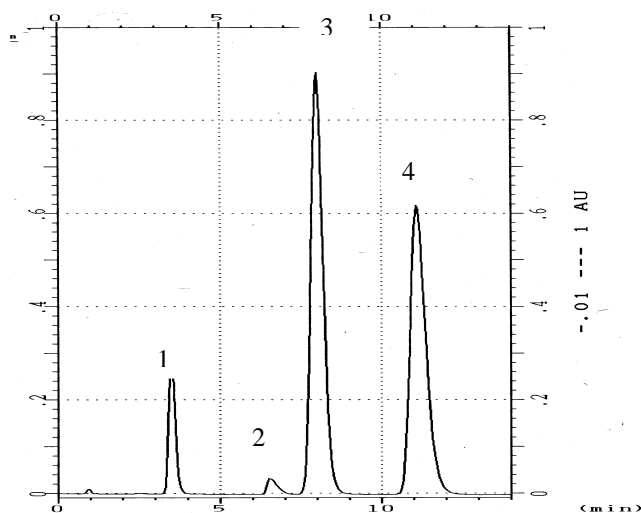
Фигура 4.1 Графично представяне на изчисления чрез оптимизационния модел коефициент на разделяне R_s за всяка двойка съседни пикове на i.s., NAVPA, PHT, CBZ.

Фази с големи количества ацетонитрил или с тройна комбинация тетраhydroфуран:ацетонитрил:метанол проявяват ниска селективност спрямо двойката пикове на PB и NAVPA, докато при двукомпонентните фази (фосфатен буфер:тетраhydroфуран и фосфатен буфер: метанол) определено разделянето се подобрява. Стойността на R_s за двойката пикове е максимална в селективна точка с координати 001, т. е. при обемни съотношения Фосфатен буфер-Метанол (52:48). За двойката NAVPA и PHT максимално разделяне се постига при използване само на тетраhydroфуран като органичен модификатор. Стойностите на коефициента на разделяне за NAVPA и PHT, обаче, са твърде високи, около 15. В точка 001 стойността на R_s за NAVPA и PHT е около 1.5. За двойката PHT и CBZ целта е да се намери стойност за R_s около 1.5, така че да се осигури добро разделяне при възможно кратко време за анализ. При търсене на оптималната композиция за подвижна фаза се оказва, че е достатъчна двукомпонентна фаза, за да се постигне пълно хроматографско разделяне (Фигура 4.2). При комбинацията фосфатен буфер:метанол (001) се получава сравнително добро разделяне на всички анализи за сравнително кратко време за анализ. При п.ф. фосфатен буфер: метанол (52:48, v:v) и хроматографска колона RP8 опитно установената стойност за R_s за двойката пикове натриев валпроат и фенитоин се оказва под 0.9, което при голямата разлика в площите на двата пика може да доведе до неточното им интегриране. Ето защо се премина на хроматографска колона RP18, което наложи повишаване на обемната скорост.



Фигура 4.2 Оптимална композиция на елуентите, при която всички двойки съседни пикове са добре разделени за най-кратко време.

При така подобрите условия на хроматографския анализ се постига селективно и възпроизводимо разделяне на пиковете на проблемните двойки съединения, за приемлив период от време (Фигура 4.3).



Фигура 4.3. Хроматограма на стандартен разтвор на валпроева киселина, фенитоин и карбамазепин при оптимизирани течно-хроматографски условия: 1-is, 2-NAVPA, 3-РНТ, 4-CBZ.

Ефективността на хроматографския процес се характеризира чрез измерване на капацитета, броя на теоретичните тарелки, селективността и коефициента на разделяне за изследваните съединения (Таблица 4.1)

Таблица 4.1. Характеристика на хроматографското разделяне.

Съединение	k	N	α	R _s
PB	4.00	265		
NAVPA	8.51	1006	2.13	3.7
PHT	10.34	507	1.21	1.5
CBZ	14.71	720	1.42	2.0

k – капацитет; *N* - брой теоретични тарелки; α - селективност;
R_s – коефициент на разделяне.

Относителното задържане α е над 1 и оценява подходящата селективност на сорбента [3]. Изчислените коефициенти на разделяне *R_s* имат стойности равни или над 1.5, което гарантира разделяне на пиковете до базовата линия.

Подобно оптимизиране на п.ф. може да се прилага дори при ВЕТХ-МС-МС разделяне [16] или при хроматографско разделяне на моноклонални антитела [41].

Прилаганата течно-хроматографска методика е валидирана в съответствие с принципите на Добрата Лабораторна Практика и с международните критерии [7, 26, 54].

При статистическото сравняване на средните стойности на времената на задържане и на техните стандартни отклонения за анализирани съединения коефициентите на вариация (CV) са в граници 0.40 – 0.7% при вътрედневни и 1.01 – 1.20 % при междудневни измервания. Чистотата на получените пикове над 90% при ниво на подобност 800, тествана с опцията "Purity check" на използваната софтуерна програма показва добрата идентичност на пиковете със съответните съединения.

Вътрעדневната и междудневна повтаряемост на анализа се оценява чрез CV на измерените концентрации, получените резултати под 10%, както при вътрעדневните, така и при междудневните измервания, са подобни за всички анализи при всяка от оценяваните концентрации. Такъв порядък е наблюдаван и от други автори [35, 36, 57]. За определяне точността на методиката наблюдаваните концентрации са сравнени с теоретичните концентрации и стойностите на CV варират в границите 90-105%. Калибрационният обхват за различните изследвани лекарства е различен. Той е определен на базата на максимални наблюдавани концентрации по литературни данни [21, 42] и съответства на очакваните серумни концентрации при пациенти. Зависимостта на отношението площ на пика на всеки от анализите към площта на пика на вътрешния стандарт от концентрацията за изследваните съединения е с корелационни коефициенти на калибрационите криви 0.98 - 0.99. В Приложение № 6 са дадени точките със съответните им стандартни отклонения, които формират калибрационните криви. Откриваемият минимум (LOD) за натриевият валпроат е 0.9 mg/L, за фенитоина е 0.007 mg/L и за карбамазепина е 0.005 mg/L. Минималното определяемо количество (LOQ) с CV до 20% за натриевият валпроат е 6 mg/L, за фенитоина е 0.07 mg/L и за карбамазепина е 0.05 mg/L.

Kushida и Ishizaki [36] правят извод, че най-подходящ за предварителна обработка на пробите е метода с изсолване с 1M HCL наситена с (NH₄)₂SO₄ и екстракция с ацетонитрил. След оптимизиране обемът на разтвора на HCl беше

намален 10 пъти, а ацетонитрилът - с 10 μL . Валидираната според препоръките за Добра Лабораторна Практика методика е подходяща за нуждите на рутинния хроматографски анализ за количествено определяне на антиепилептичните лекарства натриев валпроат, фенитоин и карбамазепин. С помощта на оптимизационните процеси ВЕТХ методиката се улесни, като се намери двукомпонентна подвижна фаза. А намаляването на обемите на изсолващия и екстрахиращия разтвори повиши нейната чувствителност.

IV.1.2 ОПТИМИЗИРАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА ВЕТХ МЕТОДИКА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОФЕИН И ПЪРВИЧНИТЕ МУ МЕТАБОЛИТИ

Ендогенните пуринови съединения, които могат да интерферират с пиковете на кофеина и метаболитите му, и частичното хроматографско разделяне на двойката РХ - ТР затрудняват точното качествено и количествено определяне на тези анализи. При предварителни изследвания се установи, че хроматографският капацитет за метилксантините почти не се изменя при промяна киселинността на подвижната фаза, поради по-високите им pK_a стойности (над 8). Следователно оптимизирането на хроматографския процес се ориентира към две главни задачи: избор на хроматографска колона и избор на подвижна фаза. Действително пиковете на РХ и ТР се разделят много добре при колона с размер на частиците 5 μm и дължина 25 cm, но времето за анализ - 35 минути е много дълго за рутинен анализ само на четири анализа, в същото време входното налягане от 2500 psi е изключително високо. Ето защо течно-хроматографският анализ се проведе на колона с дължина 15 cm.

За получаване на данни за оптимизационния процес са анализирани 15 различни процентни съотношения на съдържанието на подвижната фаза, които съответстват на 15 точки с различна селективност (Фигура 3.1 и Приложение № 4), но с подобна елуираща сила. Експериментално получените съотношения между различните органични модификатори са:

$$\varphi(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}) = 0.10 \varphi(\text{CH}_3\text{OH}) \quad [4.4]$$

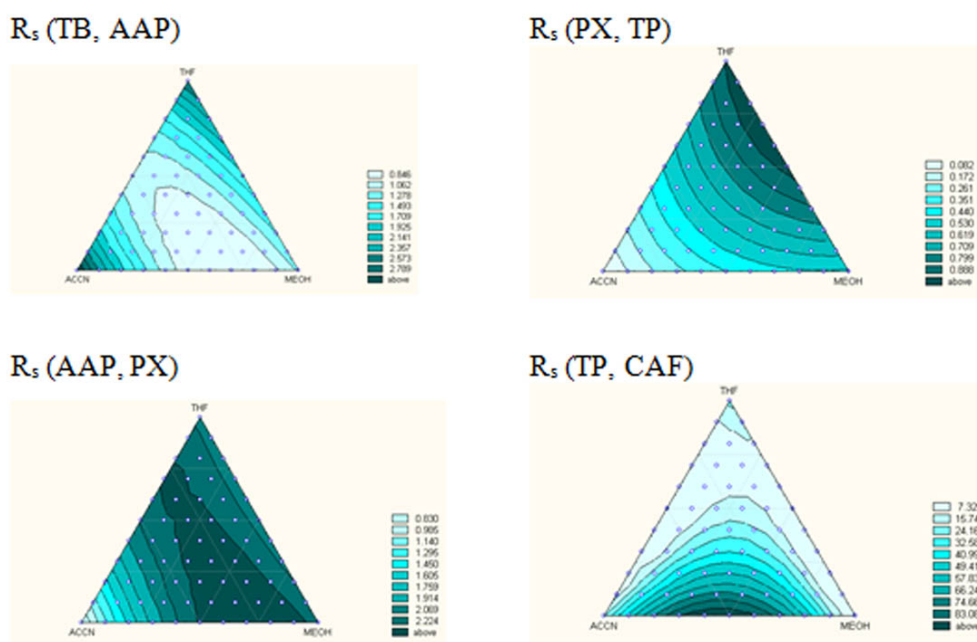
$$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0.40 \varphi(\text{CH}_3\text{OH}) \quad [4.5]$$

$$\varphi(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}) = 0.25 \varphi(\text{CH}_3\text{CN}) \quad [4.6]$$

При оптимизационния процес регресионни коефициенти с по-малка грешка и по-високи корелационни коефициенти бяха изчислени при уравнение [1] [14, 44]. Данни за моделните уравнения на капацитетите са представени в Приложение № 5.

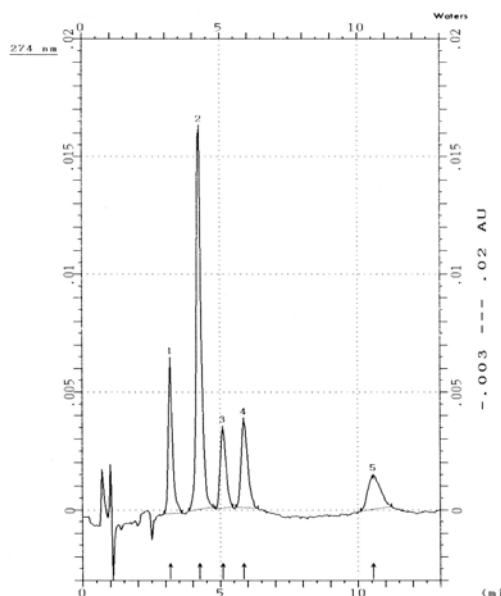
За разделянето на двойката пикове, съответстващи на РХ и ТР, оптимум се наблюдава при съотношения на тетраhydroфуран-метанол между 6-4 и 10-0 (Фигура 4.4). Стойността на R_s за двойката пикове е максимална в селективна точка с координати 703 (Фигура 4.4), т. е. при обемни съотношения тетраhydroфуран-метанол (5:1.17). В точката 703 коефициентът на разделяне за двойката ТВ и ААР е в периферията на отималните условия, но предсказаният $R_s = 2.0$ е достатъчен, за да се осигури разделяне на пиковете до базовата линия. Двойката пикове ААР и РХ, както се вижда на Фигура 4.4 имат високи стойности за R_s почти за всички комбинации на

подвижната фаза с изключение на подвижни фази с голямо съдържание на ацетонитрил. TP и CAF са напълно разделени. Тук целта е да се намери ниска стойност за R_s , което води до намаляване времето за анализ.



Фигура 4.4 Графично представяне на изчисления чрез оптимизационния модел коефициент на разделяне R_s за всяка двойка съседни пикове на ТВ, i.s., PX, TP, CAF.

При комбинацията тетраhydroфуран-ацетонитрил-метанол 703 се получава много добро разделяне на всички аналити за сравнително кратко време за анализ. При така подобрите условия на хроматографския анализ се постига селективно и възпроизводимо разделяне на пиковете на проблемните двойки съединения, за приемлив период от време (Фигура 4.5). Може да се отбележи, че добре разграниченият пик на TP позволява този хроматографски анализ да се използва успешно и в случаите на мониториране на лекарства, съдържащи TP.



Фигура 4.5. Хроматограма на стандартен разтвор на теобромин, параксантин, теофилин и кофеин при оптимизирани течно-хроматографски условия: 1-ТВ, 2-is, 3-PX, 4-TP, 5-CAF.

Данните в Таблица 4.2 характеризират ефективността на хроматографския процес за изследваните съединения.

Таблица 4.2. Характеристика на хроматографското разделяне.

Съединение	k	N	α	R_s
ТВ	3.17	309		
ААР	4.52	995	1.42	1.22
PX	5.64	825	1.25	1.45
TP	6.70	632	1.19	1.06
CAF	12.57	685	1.88	3.47

k – капацитет; *N* - брой теоретични тарелки; α - селективност;
R_s – коефициент на разделяне.

Прилаганата течно-хроматографска методика е валидирана в съответствие с препоръките на FDA и EMA , публикувани в литературата [7, 26, 54].

Коефициентите на вариация (CV) за времената на задържане на анализирани съединения са в граници 0.62 – 2.07% при вътрედневни и 6.91 – 12.42% при междудневни измервания. Получените данни за чистотата на пикове над 90% при ниво на подобност 800 (тестувани с "Purity check") показват добрата идентичност на пиковете със съответните съединения. Вътрעדневната и междудневна повтаряемост на анализа, е със стойности за CV под 15% на измерените концентрации, получените

резултати са подобни за всички анализи при всяка от оценяваните концентрации. Точността на методиката за 0.05 mg/L варира в границите 80-110%, за 2.00 mg/L - 82-120%, за 5.00 mg/L - 81-115%, като са представени най-ниската получена и съответно най-високата стойност за всички изследвани вещества. Зависимостта отношение площ на пика на всеки от анализите към площта на пика на вътрешния стандарт от концентрацията за изследваните съединения е линейна в интервала 0.022 mg/L - 10 mg/L. Корелационните коефициенти на калибрационите криви са 0.98 - 0.99. В Приложение № 6 са дадени точките, формиращи кривите, със съответните им стандартни отклонения. LOD и за четирите вещества е 0.01 mg/L. LOQ - с CV до 20% е 0.022 mg/L.

Добрата аналитична надеждност на разработената методика се оценява чрез анализ на две успоредни проби от плазма, натоварена с три различни познати концентрации: 0.05 mg/l, 2.00 mg/l и 5.00 mg/l на теобромин, параксантин, теофилин и кофеин в дните, през които се провежда изследването. Няма точки, които да са извън допустимите за Добрата Лабораторна Практика граници. Валидираната според препоръките за Добра Лабораторна Практика методика е подходяща за нуждите на рутинния хроматографски анализ на кофеин и неговите метаболити в плазма.

Приложеният оптимизационен подход дава възможност за бързо и лесно намиране на най-подходящата композиция за п. ф., като в същото време не изисква скъп сложен и специализиран софтуер. Достатъчни са данните от измерванията на времената на задържане на изследваните вещества при 15 различни изоелутропни композиции на подвижната фаза. С този оптимизационен подход могат да се оптимизират ВЕТХ условия както за лекарства с различни химични състав и строеж - натриев валпроат, фенитоин и карбамазепин, така и лекарства и техните метаболити - кофеин и метаболитите му. Подходът може да бъде прилаган при анализ на лекарства в различни биологични течности - плазма и/или серум, взети от хора или животни.

IV.1.3 ОПТИМИЗИРАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА ВЕТХ АНАЛИЗ НА КОФЕИН И НЕГОВИТЕ ПЪРВИЧНИ И ВТОРИЧНИ МЕТАБОЛИТИ В УРИНА

Многокомпонентният състав на биологичната матрица урина затруднява качествения и количествен анализ на кофеин и неговите метаболити. Ниските концентрации на кофеин и метаболитите му в нея изискват пречистване и концентриране на изследваните проби. Това налага специална предварителна подготовка на пробите преди хроматографския анализ. При проведените сравнителен анализ на екстракционни процедури, описани в литературата, при обемно отношение 85:15 на екстрагента хлороформ : 2-пропанол [4] се постига значително по-пълна екстракция, както за по-полярните деривати на пикочната киселина, така и за сравнително неполярните метилксантини, следващото концентриране на екстракта повишава чувствителността на методиката.

В Приложение № 8 е показана функционалната зависимост на капацитета от процента органичен модификатор - ацетонитрил в подвижна фаза за моно- и

диметилзаместените ксантини и пикочни киселини. Тази зависимост е нелинейна и се описва добре с полином от втора степен [30]:

$$\log k' = a_0 + a_1 \cdot Q + a_2 \cdot Q^2 \quad [4.7]$$

a_0, a_1, a_2 - регресионни коефициенти;

Q - обемни проценти органичен модификатор в п. ф.

Изследван е ефектът на първични, вторични и третични амини върху задържането на кофеин и производните му. За целта анализите се хроматографират без аминомодификатор (АМ) или в присъствие на *n*-бутиламин, *n*-дибутиламин или на триетиламин поотделно в подвижна фаза със стойности на рН 2.9, 3.9, 5.01, 6.0, 7.25. и се изследва зависимостта $k' = f(\text{pH}, \text{АМ})$ за всяко от изследваните съединения. Увеличаването на рН на подвижната фаза в граници от 2.9 до 7.25 за метилзаместените пикочни киселини води до намаляване на хроматографския им капацитет. Този ефект се обяснява с частичното йонизиране на веществата (pK_a около 6) при нарастване на рН на средата. Прибавянето на АМ към елуента оказва различно влияние върху взаимодействието на анализите с неподвижната фаза, в зависимост от рН стойностите и вида на аминомодификатора. Зависимостта от концентрацията на избрания модификатор - DBA върху капацитета в изследвания буферен концентрационен интервал от 0 до 25mM показва поведение подобно на описаното от [5]. За по-добро разбиране на процесите при хроматографското разделяне на кофеина и неговите първични и вторични метаболити имаме идея по-нататък да се използва QSAR метода [28, 37].

При така подбраните условия на хроматографския анализ и прилагането на градиентен режим се постига селективно и възпроизводимо разделяне на пиковете на проблемните [18, 55] двойки съединения 7X и 1U, 3X и 37U, PX и TP, за приемлив период от време.

Таблица 4.3 характеризира ефективността на колоната за изследваните съединения. Факторът на асиметрия в граници от 1 ± 0.4 показва добрата симетрия на получените хроматографски пикове.

Таблица 4.3. Характеристики на хроматографското разделяне.

Съединение	N	F _{as}
3U	5735	1
7U	4790	1.23
7X	7298	0.94
1U	8724	1.07
3X	10263	1.33
37U	7407	0.8
1X	7571	0.7
IS	13527	0.89
13U	21238	0.73
TB	20811	1.11
17U	38253	0.77
PX	50939	0.86
TP	84459	0.93
137U	66634	1.4
CAF	66643	0.81

N - брой теоретични тарелки

F_{as} - коефициент на асиметрия

Прилаганата течно-хроматографска методика е валидирана в съответствие с препоръките, публикувани в литературата [48]. Коефициентите на вариация (CV) на времената на задържане са в граници 0.19 - 5.2% при вътрედневни и 0.54 - 7.4% при междудневни измервания. Чистотата на получените пикове е над 90% при ниво на подобност 800, тествана с опцията "Purity check". Вътрעדневната и междудневна повтаряемост на анализа е с CV са под 20% за ниските, под 14% за средните и под 9% за високите концентрации, получените резултати са подобни за всички аналити. Точността на методиката е изчислена за концентрациите: 0.6 mg/L, тя варира в границите 80-110%, за 5 mg/L - 91.6-120%, за 50 mg/L - 87-104%, като са представени най-ниската получена и съответно най-високата стойност за всички изследвани вещества. Калибрацията се извърши по метода на вътрешния стандарт. Калибрационните криви бяха линейни в интервала 0.15 mg/L - 10 mg/L за 3U и 7U, от 0.15 до 25 mg/L за 1U и 37U и от 0.15 mg/L до 50 mg/L за останалите аналити. Корелационните коефициенти на калибрационите криви са над 0.987. В Приложение № 9 са дадени точките, формиращи кривите, със съответните им доверителни интервали. LOD и за четиринадесетте вещества е 2.5 µg/L. LOQ - с CV до 20% е 0.15 mg/L. Добрата аналитична надеждност на разработената методика се оценяваше чрез анализ на урина, натоварена с три различни концентрации: 1.25, 6 и 20 mg/L. Получените от тяхното измерване стойности за точност и повтаряемост са с коефициенти на вариация под 15% за междудневни измервания.

Валидираната според препоръките за Добра Лабораторна Практика методика е подходяща за нуждите на рутинния хроматографски анализ на кофеин и неговите метаболити в урина. Измерените стойности на уринните нива на кофеин и неговите

първични и вторични метаболити могат да се използват при оценка на различните метаболитни отношения във ФК анализ, както и при фенотипизиране активността на CYP1A2.

IV.2 ПРИЛОЖЕНИЕ НА АЛОМЕТРИЧНОТО СКАЛИРАНЕ ПРИ ОЦЕНКА АКТИВНОСТТА НА CYP1A2

Клирънсът, като оценка за способността на организма да се очисти от ксенобиотици, има значение при откриване и разработване на нови лекарства, тъй като лекарства с високо предсистемно елиминиране (*first-pass metabolism*), може да имат ниска бионаличност и да се окажат неподходящи за по-нататъшно разработване. Клирънсът играе важна роля и при оценка на първата доза за приложение на лекарства при хора, базирана на данни, получени от животни [$CL_p = (F_u) \cdot D / AUC_{0-\infty}$].

От получени данни за концентрацията на кофеин (Таблицы 4.4 и 4.5) при бели мъжки плъхове порода Wistar, които са били подложени на кофеинов тест, се изгражда популационен фармакокинетичен модел на кофеин, като се използва метода на непараметричното моделиране на максималното очакване, NPEM2, който функционира и само с една кръвна проба (плазмено ниво) от животно [17, 31, 46]. Единственото предположение, което се прави е, че видът на дискретното разпределение на стойностите на ФК параметри е еднакъв за всички животни. Демографските особености, измерените с гореописаната ВЕТХ методика плазмени нива на кофеин и фармакокинетичните данни за хора са представени в Таблицы 4.6 и 4.7 (вж. и Приложение № 10) [53]. От човешката група са изключени тежките пушачи, тъй като резултатите от проведен сравнителен статистически анализ с Mann Whitney теста за оценка влиянието на тютюнопушенето върху активността на CYP1A2 при системни пушачи (≥ 10 цигари/ден) и непушачи, разкри 2 пъти по-високи стойности на кофеиновия клирънс при тях.

Сравнителният статистически анализ показва липса на значима разлика както в системния клирънс между жени и мъже, така и между средната им възраст [53]. Затова не е правена стратификация по пол или възраст на индивидите. Индивидите, които имат забавен или бърз кофеинов метаболизъм [53] също не са включени в настоящето изследване. Така се селектира група от 19 индивида, която рандомизирано се раздели на две групи: обучаваща (Таблица 4.6), която се състои от 10 човека и валидираща – от 9 човека (Таблица 4.7). Съответно беше рандомизирано разделена и групата на плъховете на 10 и 9 плъха, които се включиха в обучаващата (Таблица 4.4) и валидираща групи (Таблица 4.5). Всички експерименти за алометрично скалиране са проведени с обучаващата субгрупа. Окончателно избраният подход се доказва чрез валидиращата група.

В по-ранни разработки сме установили, че няма значима разлика в резорбцията на кофеин между хора и плъхове, както и между нормализираните, спрямо телесното тегло, стойности за обемите на разпределение. Но е наблюдавана статистически сигнификантна разлика в скоростта на очистване на кофеин от организма при хора и плъхове. CYP1A2 има основна роля в метаболизма на кофеин и при хора, и при

плъхове, затова кофеиновия клирънс се прилага като биомаркер при тестване на ензимната активност на CYP1A2 както при плъхове, така и при хора [34].

Таблица 4.4. Получени данни за 10 бели мъжки плъха порода Wistar – обучаваща група, подложени на кофеинов тест.

№	Тегло [kg]	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (mg.L^{-1})	Кофеинов клирънс (L/h/kg)	Нормализиран по дозата кофеинов клирънс (L/h/mg)
1.	0.28	4 [2.13]	0.13	0.026
2.	0.3	5 [1.93]	0.17	0.035
3.	0.305	2 [3.67]	0.20	0.040
4.	0.26	3 [2.57]	0.24	0.047
5.	0.265	9 [0.47]	0.25	0.050
6.	0.26	0.5 [4.07]	0.28	0.056
7.	0.305	10 [0.22]	0.32	0.064
8.	0.3	10 [0.07]	0.42	0.084
9.	0.3	7 [0.15]	0.47	0.093
10.	0.27	8 [0.32]	0.59	0.118

Дозата, с която са третирани хората е 3 mg/kg, докато дозата при плъховете е 5 mg/kg. Затова се налага полученият популационен кофеинов клирънс и за плъховете, и за хората да бъде нормализиран по приетата доза (Таблицы 4.4, 4.5, 4.6 и 4.7).

В настоящата работа се предлага сигурен, точен и удобен подход, чрез който се намира алометричната зависимост между експериментално получени данни за човешки и животински кофеинови клирънси. За да се удостовери валидността на алометричния модел, той се прилага върху други експериментално получени данни за кофеиновия клирънс – от валидиращата група.

Таблица 4.5. Получени данни за 9 бели мъжки плъха порода Wistar – валидираща група, подложени на кофеинов тест.

№	Тегло [kg]	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (mg.L^{-1})	Кофеинов клирънс (L/h/kg)	Нормализиран по дозата кофеинов клирънс (L/h/mg)
1.	0.28	4 [2.33]	0.14	0.028
2.	0.26	9 [0.39]	0.19	0.037
3.	0.32	2 [4.03]	0.20	0.039
4.	0.305	6 [1.5]	0.20	0.041
5.	0.275	1 [5.44]	0.24	0.048
6.	0.285	5 [1.55]	0.25	0.049
7.	0.3	1 [3.76]	0.25	0.050
8.	0.265	6 [0.52]	0.51	0.103
9.	0.295	7 [0.39]	0.59	0.118

Таблица 4.6. Демографски данни и данни за кофеиновия клирънс при хора, включени в обучаващата група.

№	Пол	Възраст	Височина	Тегло [kg]	Кретининов клирънс (ml/min/1.73m ²)	Цигари за ден	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (mg.L ⁻¹)	Кофеинов клирънс (L/h/kg)	Нормализиран по дозата кофеинов клирънс (L/h/mg)
1	Ж	41	160	62	133.42	Не пуши	0.5; 3 [1.38; 6.48]	0.043	0.0142
2	Ж	28	161	78	92.95	Не пуши	10; 24 [2.05; 0.70]	0.048	0.0158
3	Ж	47	148	55.85	119.2	1-2	4; 8 [4.39; 3.19]	0.048	0.0159
4	М	41	179	96.5	126.46	5-6	4; 8 [4.10; 2.45]	0.048	0.0161
5	Ж	44	156	49.5	102.07	Не пуши	1; 7 [7.89; 2.66]	0.057	0.0190
6	М	39	176	95.2	78.88	Не пуши	1; 7 [3.90; 1.89]	0.088	0.0292
7	М	22	180	74	105.54	3-4/седмично	4; 8 [2.76; 1.55]	0.089	0.0296
8	Ж	23	168	50	107.13	Не пуши	0.5; 3 [1.53; 2.66]	0.13	0.0425
9	М	28	186	72	22	5	10; 24 [0.68; 0.08]	0.14	0.0474
10	Ж	37	174	75	52.14	Не пуши	4; 8 [2.07; 0.80]	0.14	0.0481

Таблица 4.7. Демографски данни и данни за кофеиновия клирънс при хора, включени във валидиращата група.

№	Пол	Възраст	Височина	Тегло [kg]	Кретининов клирънс (ml/min/1.73m ²)	Цигари за ден	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (mg.L ⁻¹)	Кофеинов клирънс (L/h/kg)	Нормализиран по дозата кофеинов клирънс (L/h/kg)
1	Ж	60	160	114	124.62	Не пуши	2; 6 [9.36; 4.63]	0.043	0.0142
2	М	43	181	107	121.87	Не пуши	2; 6 [4.81; 4.27]	0.048	0.0158
3	М	18	187	78.5	92.43	2-3	1; 7 [5.85; 2.78]	0.048	0.0158
4	Ж	25	164	55	142.91	Не пуши	4 [3.95]	0.048	0.0161
5	М	40	176	83	111.24	Не пуши	4; 8 [5.26; 2.78]	0.052	0.0173
6	Ж	18	172	72	103.46	Не пуши	1; 7 [4.89; 2.21]	0.077	0.0256
7	М	18	163	77	175.7	Не пуши	10; 24 [1.51; 0.19]	0.078	0.0259
8	Ж	40	167	67	102.56	Не пуши	4; 8 [2.69; 1.14]	0.127	0.0424
9	Ж	41	160	50	131.91	Не пуши	1; 7 [3.01; 1.28]	0.143	0.0476

Зависимостта между нормализираните кофеинови клирънси на плъхове и хора от съответните обучаващи групи е линейна и показва висока корелация ($r = 0.96$, $p < 0.001$):

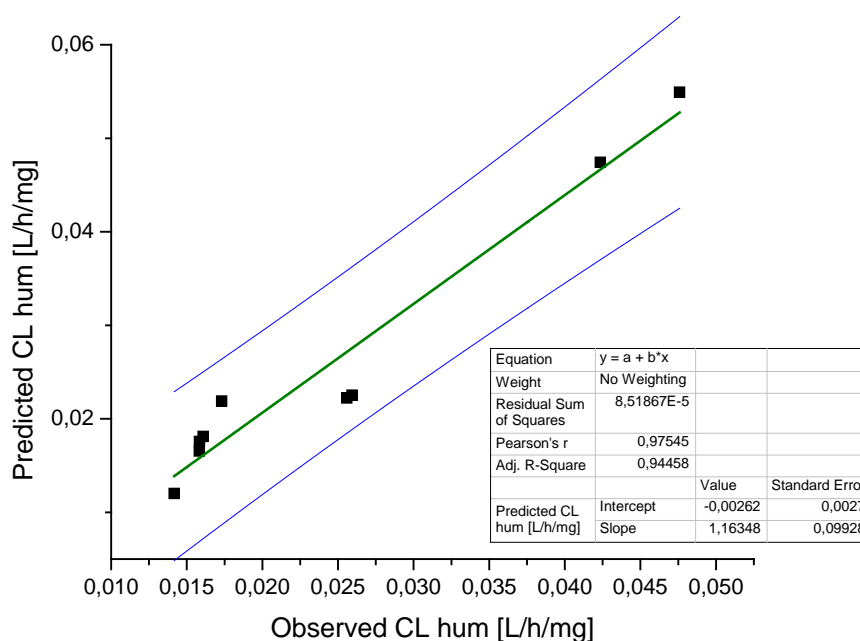
$$CL_{hum} = 0.473 * CL_{rat} - 0.00105 \quad [4.8]$$

За да се удостоверят възможностите на уравнение [4.8], то се проверява като в него за CL_{rat} се вземат кофеиновите клирънси на плъховете от валидиращата група и се предсказват човешки кофеинови клирънси. Предсказаните по този начин човешки кофеинови клирънси след това се сравняват с наблюдаваните човешки кофеинови клирънси от валидиращата група хора.

На Фигура 4.6 е представено отношението между наблюдаваните и предсказаните с уравнение [4.8] човешки клирънси за пациентите от валидиращата група.

$$\text{Predict } CL_{hum} = 1.12 * \text{Observ } CL_{hum} - 0.00262 \quad [4.9]$$

Наклонът на правата от уравнение [4.9], приблизително равен на единица, отрезъкът, практически неразличим от 0, корелацията - 0.975 и $p < 0.001$ удостоверяват възможностите за достатъчно точно предсказване на човешкия клирънс и чрез него на активността на ензима CYP1A2 чрез предложения алометричен подход.



Фигура 4.6. Сравняване на предсказания кофеинов клирънс с наблюдавания при хора от валидиращата група

Предсказаните и наблюдавани клирънси на кофеина при хора бяха сравнени чрез *t*-тест:

Дескриптивна статистика	Брой	Средна стойност	SD	SEM
Наблюдавани CL	9	0.02452	0.01242	0.00414
Предсказани CL	9	0.02591	0.01482	0.0494
<i>Разлика</i>		-0.00139		

	t - статистика	DF^a	Prob > [t]
Equal Variance Assumed	-0.21618	16	0.83158
Equal Variance NOT Assumed (Welch Correction)	-0.21618	15.52738	0.83166

^a – дисперсионният фактор, DF, представлява ad hoc оценка на дисперсията и е подобен на SD, но по-добре отразява формата на разпределение на всеки параметър

Получените резултати показват, че няма статистически сигнификантна разлика между популационните средни на кофеиновите клирънси при наблюдаваните и предсказани стойности.

Алометричното скалиране е често използван подход при разработването на нови лекарства и при клинично-фармакологични изследвания. То се прилага при пренасяне на ФК данни от животни върху хора или от възрастни към педиатрични пациенти [20]. В настоящата работа алометричното скалиране се приложи в съчетание с популационния фармакокинетичен анализ за предсказване на кофеиновия клирънс при хора от данни от плъхове и оценяване на междувидовия метаболизъм на ензима CYP1A2. Получените резултати показват, че предложеният подход може да се използва както за надежно предсказване на човешките фармакокинетични параметри от данни за животни, така и за оценяване на различната метаболитна активност при различни биологични видове.

IV.3 ПРИЛОЖЕНИЕ НА D-ОПТИМАЛНОСТТА ПРИ ДИЗАЙНИРАНЕ НА ПОПУЛАЦИОННИ ФАРМАКОКИНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

IV.3.1 D-ОПТИМАЛЕН ДИЗАЙН, ПРИЛОЖЕН ПРИ ПОПУЛАЦИОННО ФАРМАКОКИНЕТИЧНО МОДЕЛИРАНЕ НА КОФЕИН

Две двойки актуални времена, (3h;10h) и (4h;10h), изпълняват изискванията за D-оптималност, резултиращи в най-ниските стойности за коефициентите на вариация, дисперсиите на грешката и критерия D-оптималност за структурните ФК параметри обем на разпределение, VS1 и елиминационна константа, KEL. Така че създадените популационни ФК модели с медианите на моделните ФК параметри,

използвайки наблюдаваните плазмени нива на кофеин на тези часове (3h;10h, NPEM2-10h3h) и (4h;10h, NPEM2-10h4h), ще съдържат най-много информация, необходима за оценка на системния клирънс и възстановяване на елиминационната фаза [51]. Тези два популационни ФК модела бяха създадени с 14 концентрации, по една от индивид за съответните часове, или общо от 14 индивида (за подробности вж. Приложение № 10).

Валидирането на D-оптималния популационен ФК модел NPEM2-10h3h е извършено върху 39, а валидирането на NPEM2-10h4h модела – върху 32 измерени плазмени концентрации на кофеин от 20 участника (Таблица 4.8). И двата D-оптимални популационни ФК модела показват много ниска грешка и висока прецизност, оценени чрез средната грешка, *ME* и корен квадратен от квадратичната грешка, *RMSE* [49]. *ME* се равняваше на -0.046 mg.L^{-1} за NPEM2-10h3h модела и на -0.018 mg.L^{-1} за NPEM2-10h4h модела, респ. *RMSE* за NPEM2-10h3h модела беше 0.871 mg.L^{-1} , а за NPEM2-10h4h модела – 1.069 mg.L^{-1} . И двете грешки за двата D-оптимални популационни ФК модела не се различават статистически значимо от нулата.

Апостериорните Байесовки оценки (АБО) на кофеиновия клирънс се изчисляваха чрез създадените D-оптимални популационни ФК модела (NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h), използвайки 1 или 2 плазмени концентрации на кофеин като Байесовска предварителна (*Bayesian priors*) информация и се сравняваха със стойностите на индивидуалните кофеинови клирънси, изчислени със създадения популационен модел на кофеин за популация от възрастни индивиди, т.н. “златни стандарти” (Приложение № 10). Разпределението на индивидуалните системни кофеинови клирънси, нетрансформирани и логаритмично трансформирани при основа 10, се тестваха за нормалност чрез Колмогоров-Смирнов, Lilliefors, Shapiro-Wilk's и χ^2 тестовете. Нулевата хипотеза за Гаусово разпределение се отхвърляше при $p < 0.05$. Нетрансформираните и log-трансформираните индивидуални оценки на CLS1 се тестваха за нормално разпределение и чрез пробит анализ. Поради това, че тестовете за нормалност разкриха не-Гаусово разпределение на системния клирънс в тази популация, резултатите са представени като медиани (Таблица 4.9). Двустранният Mann Whitney U (the rank sum) тест беше използван за оценка на разликите между медианите при ниво на значимост $\alpha = 0.05$.

Таблица 4.8. Пациенти, кофеинови плазмени концентрации и часове на вземането им, включени при валидиране на NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h популационни фармакокинетични модели за определяне на D-оптималните времена

№	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (: mg.L ⁻¹)	Байесовско предсказване чрез:
01	4 и 8 [2.23; 3.32]	NPEM2-10h3h
02	4 и 8 [4.10; 2.45]	NPEM2-10h3h
03	4 и 8 [2.67; 1.14]	NPEM2-10h3h
04	1 и 7 [3.01; 1.28]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
05	1 и 7 [4.89; 2.21]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
06	4 и 8 [4.39; 3.19]	NPEM2-10h3h
07	1 и 7 [5.85; 2.78]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
08	4 и 8 [2.76; 1.55]	NPEM2-10h3h
09	1 и 7 [3.90; 1.89]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
10	4 [3.95]	NPEM2-10h3h
11	4 и 8 [5.26; 2.78]	NPEM2-10h3h
12	1 и 7 [7.89; 2.66]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
13	3 [6.48]	NPEM2-10h4h
14	3 [3.38]	NPEM2-10h4h
15	3 [2.78]	NPEM2-10h4h
16	3 [1.48]	NPEM2-10h4h
17	2 и 6 [9.36; 4.63]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
18	3 [5.44]	NPEM2-10h4h
23	3 [3.60]	NPEM2-10h4h
24	3 [2.66]	NPEM2-10h4h
25	2 и 6 [2.26; 0.78]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
26	2 и 6 [4.81; 4.27]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
27	2 и 6 [2.06; 0.40]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
28	1 и 7 [6.57; 1.27]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
29	4 и 8 [2.07; 0.80]	NPEM2-10h3h
31	3 [2.36]	NPEM2-10h4h
33	2 и 6 [3.32; 2.17]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h
34	2 и 6 [16.09; 14.09]	NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h

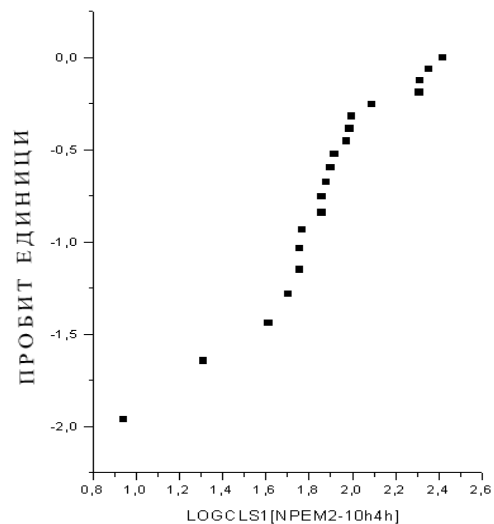
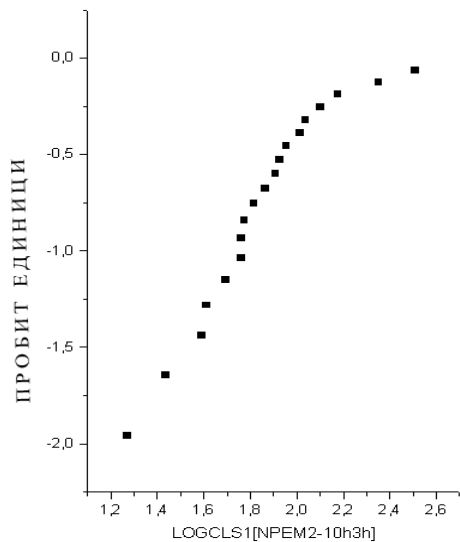
Таблица 4.9. Параметри на популационните ФК модели на САФ, оценени чрез NPEM2 метода на базата на D-оптималните времена (3h;10h, NPEM2-10h3h) и (4h;10h, NPEM2-10h4h) (медиана \pm DF^a)

Параметър	(NPEM2-10h3h) Стойност на популационния параметър (медиана \pm DF)	(NPEM2-10h4h) Стойност на популационния параметър (медиана \pm DF)
КА (h^{-1})	6.09 \pm 2.84	8.15 \pm 3.40
VS1 ($L.kg^{-1}$)	0.67 \pm 0.33	0.42 \pm 0.27
CLS1 ($L.h^{-1}.kg^{-1}$)	0.096 \pm 0.017	0.062 \pm 0.025
KEL (h^{-1})	0.144 \pm 0.050	0.148 \pm 0.094

^a – дисперсионният фактор, DF, представлява ad hoc оценка на дисперсията и е подобен на SD, но по-добре отразява формата на разпределение на всеки параметър

В таблица 4.9 са представени медианите на структурните ФК параметри, включени в двата D-оптимални популационни ФК модела, използвани за реконструкция на елиминационната фаза и предсказване на системния клирънс на кофеин, базирайки се на априорната Байесовска информация (*Bayesian priors*), получена от 1 или 2 измерени концентрации от индивид. Не се установи статистически значима разлика при сравняване на клирънсите, получени чрез D-оптималния модел, в сравнение с ФК модел получен чрез две измерени плазмени концентрации на кофеин от индивид при 34 болни. Пробит анализа на нетрансформирани и log-трансформирани индивидуални АБО на кофеиновия клирънс, предсказани с двата D-оптимални популационни ФК модела, разкриха статистически значимо прекъсване и отклонение от линейността (Фигура 4.7, $p=0.0003$ за NPEM2-10h3h предсказаните клирънси и $p=0.001$ за NPEM2-10h4h предсказаните клирънси, респ.). Сравняване стойностите на индивидуалните клирънси, оценени със създадения популационен модел на кофеин, т.н. “златни стандарти”, с АБО получени с двата D-оптимални популационни ФК модела, NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h, разкри липса на статистически значима разлика в стойностите на медианите. Медианата на “златните стандарти” е $0.057 L.h^{-1}.kg^{-1}$, медианата на предсказаните АБО на клирънса с D-оптималния популационен модел NPEM2-10h3h е $0.069 L.h^{-1}.kg^{-1}$ (двустранен Mann Whitney U = 195, $p=0.903$), а с NPEM2-10h4h модела – $0.077 L.h^{-1}.kg^{-1}$ (двустранен Mann Whitney U = 166, $p=0.365$).

Непараметричният Spearman rank корелационен анализ при ниво на значимост $\alpha=0.05$ установи високо сигнификантна корелация между индивидуалните клирънси, изчислени със създадения популационен модел на кофеин, т.н. “златни стандарти” и индивидуалните АБО на клирънса, получени с двата D-оптимални популационни ФК модела, NPEM2-10h3h и NPEM2-10h4h, респ. ($r_s = 0.98$ при $p<0.0001$ и $r_s = 0.74$ при $p<0.0002$).



Фигура 4.7. А) Пробит анализ на на log-трансформирани индивидуални АБО на кофеиновия клирънс, предсказани с D-оптималния популяционен модел NPEM-2-10h3h ($p = 0.0003$)

Б) Пробит анализ на log-трансформирани индивидуални АБО на кофеиновия клирънс, предсказани с D-оптималния популяционен модел NPEM-2-10h4h ($p = 0.0001$)

Сравнени са предсказващите способности на двата D-оптимални популяционни ФК модела. Тъй като разпределенията на предсказаните индивидуални АБО на системния кофеинов клирънс са не-Гаусови, се сравняваха медианната грешка (MeE) за оценка на точността и корен квадратен от квадратичната медианна грешка ($RMeSE$) за оценка на прецизността [25]. Сравнението показва, че предсказаните индивидуални клирънси с D-оптималния популяционен модел NPEM2-10h4h са по-точни в сравнение с NPEM2-10h3h модела ($MeE = 0.0001517$ срещу $0.0004545 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), докато D-оптималният популяционен модел NPEM2-10h3h предсказва по-прецизно ($RMeSE = 0.001304$ срещу $0.005413 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$).

Установеното не-Гаусово разпределение на активността на ензима CYP1A2 поставя въпроса за търсене на тази двойка от времеви точки, които да позволят оценка на системния клирънс на кофеин с минимална дисперсия, т.е. тези 2 времена да изпълняват условията за оптималност.

За да се оцени интра-индивидуалната вариабилност в изследваната популация беше изчислен дисперсионния фактор γ , който се равняваше на 4.30 и показваше, че около 25% от цялостната интра-индивидуална вариабилност се дължи на аналитичната грешка. Около 87% от изучаваната популация показва нисък или среден по големина системен кофеинов клирънс (до $150 \text{ ml.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), което е в съгласие с наблюденията на Kadlubar et al [32]. Останалите 13% могат да се разглеждат като бързи метаболитори на кофеин и/или ускорени от пушенето бързи метаболитори с клирънс $> 200 \text{ ml.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Резултатите от проведените тестове за нормалност заедно с данните от пробит анализа еднозначно показват, че разпределението на кофеиновия клирънс в тази популация не е нито Гаусово, нито log-нормално. Резултатите в настоящето проучване получени чрез прилагане на

NPЕМ метод в комбинация с D-оптимален дизайн, показват недвусмислено полимодално разпределение на активността на този ензим в тази смесена популация от пушачи и непущачи.

Интер-индивидуалната вариабилност в активността на ензима CYP1A2 при човек варира повече от 40 пъти [10, 11, 47] и индивидуалните различия в експресията му могат да са допринасящи фактори за развитие на карцином от прокарциногени, както и да увеличат риска от неочаквани лекарствени взаимодействия [13, 25, 33]. Необходими са популационни ФК проучвания, за да се оцени и контролира тази висока интер- и интра-индивидуална вариабилност, при които обаче конвенционалният, “богат на проби”, ФК сценарий е непригоден. Затова при проведеното популационно ФК проучване за фенотипизиране се приложи много по-подходящия подход на “ФК скрининг” [51], чрез вземане на 1 или 2 проби от индивид за измерване плазмените нива на кофеин, което е за предпочитане пред използване на уринни метаболитни отношения [22, 43].

24-часовият период на вземане на кръвни проби за анализ концентрациите на кофеин покрива около 5 полуживота на кофеин в тази популация и осигурява оптимално време за количествена оценка на клирънса му [23]. Популационните стойности на моделните ФК параметри KA, VS1, CLS1 и KEL (Таблица 4.9) са много сходни с тези, получени с “богати на проби” ФК протоколи [6, 12]. Нещо повече, с популационните стойности за KA и KEL от двата D-оптимални популационни ФК модела, NPЕМ2-10h3h и NPЕМ2-10h4h (Таблица 4.9) се изчисляват времена на максималните плазмени концентрации, t_{max} , равняващи се съответно на 0.63h и 0.50h, които са в съгласие с данните на [11], получени с конвенционален ФК протокол.

Включените 14 плазмени концентрации на кофеин в изграждането на двата D-оптимални популационни ФК модела са повтарящи се в оптималните времена и отговарят на изискванията за D-оптималност - 8 проби са взети на 3 и 4 час, а 6 – на 10 час след дозовия прием на кофеин [15].

Резултатите от проучването недвусмислено разкриват много добрите предсказващи способности на двата D-оптимални популационни ФК модела на кофеин. От практическа гледна точка и двете двойки времена могат да се приемат за D-оптимални за определяне на системния клирънс на кофеин, като наблюдаваните разлики в точността и прецизността при предсказване на клирънса са практически незначими. Получените резултати убедително показват несъмнените предимства на популационния D-оптимален дизайн пред стандартния D-оптимален дизайн. За разлика от стандартния D-оптимален дизайн, който игнорира вариабилността между индивидите, използваният от нас популационен D-оптимален дизайн се съобразява с различните източници на ФК вариабилност, включвайки популационната информационна матрица на Fisher при определяне на оптималния ФК протокол и се фокусира по-скоро върху оценка разпределението на моделните ФК параметри в изучаваната популация отколкото върху индивидуалните им стойности [29].

IV.3.2 ПРИЛОЖЕНИЕ НА D-ОПТИМАЛНАТА СТРАТЕГИЯ ПРИ КЛИНИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ТЕОФИЛИН

Преди и по време на анализа на клиничните проби биоаналитичният метод е валидиран в концентрационен обхват от 0.100 до 12.0 mg/L в съответствие с изискванията за клинично приложим биоаналитичен метод и принципите на Добрата Лабораторна Практика. Количествено определяемият минимум (LOQ) е 0.100 mg/L с праг на чувствителност (LOD) - 0.025 mg/L. Аналитичният добив на теофилин и на вътрешния стандарт antipyrine е над 70 %.

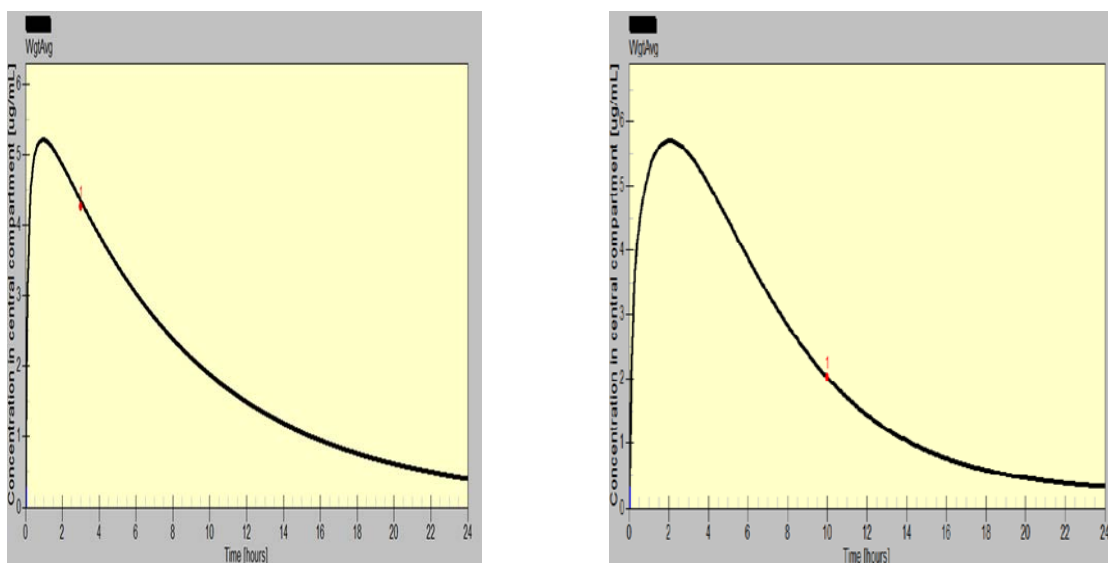
В клиничното проучване взеха участие 26 възрастни индивиди от мъжки пол. Всеки участник предварително подписваше писмено съгласие за участие и приемаше перорална доза теофилин от 250 mg. От всеки се вземаше 1 кръвна проба преди приема на теофилин и по 15 кръвни проби след приема за определяне плазмените концентрации на теофилин.

Изискванията за D-оптималност се изпълняват от плазмените концентрации на теофилин, наблюдавани на 3, 4 и 10-и час след перорален прием на лекарството. Така беше създаден популационен ФК модел за теофилин – NPEM-Theophylline-OPТ - използвайки регистрираните плазмени нива на теофилин на тези часове (3, 4 и 10 час). За тестване на модела рандомизирано избрани пациенти бяха разделени в три работни групи по шест човека (Таблица 4.10). За всеки пациент от работна група 1 беше направена симулация като само с една D-оптимална точка на трети час беше възстановена зависимостта плазмени концентрации – време и беше оценена площта под кривата AUC_{0-24} . При група 2 избраната D- оптимална точка беше десети час, а при група 3 – се използваше комбинация от две точки: на 3 и 10 час принадлежащи към елиминационната log-линейна фаза на теофилин.

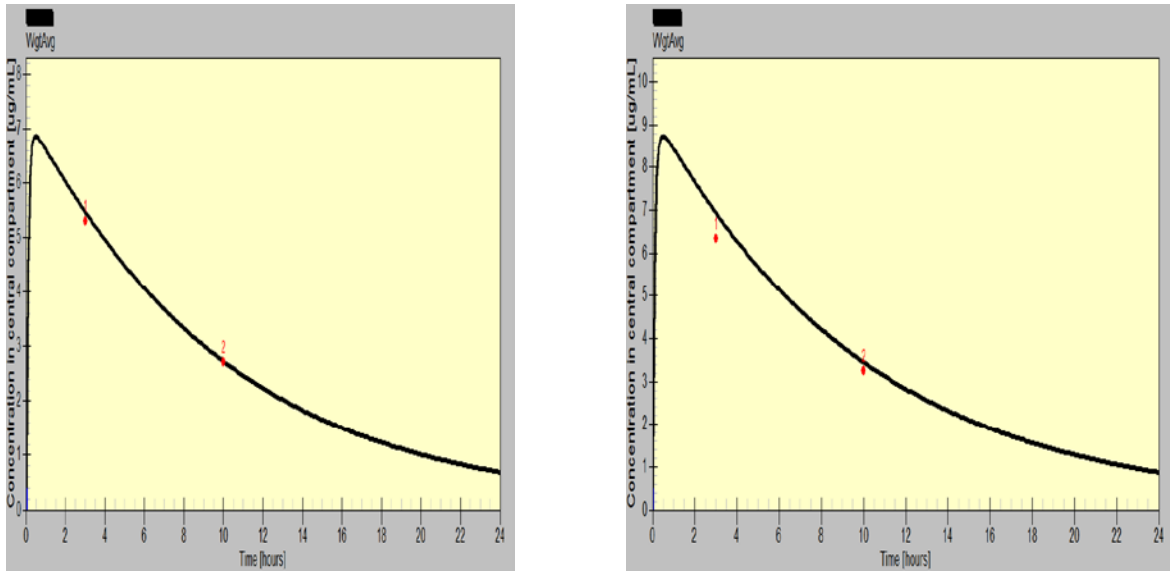
Таблица 4.10. Предсказани AUC_{0-24} с NPEM-Theophylline-ОРТ при 1 и 2 D-оптимални точки за доброволците, разпределени в съответните работни групи

№ на работна група	№ на пациент в работна група	Предсказани AUC_{0-24}
№ 1: 3 час	1	47.86
	2	53.76
	3	69.61
	4	48.55
	5	45.55
	6	57.59
№ 2: 10 час	1	52.38
	2	62.75
	3	61.11
	4	38.42
	5	59.33
	6	57.53
№ 3: 3 и 10 час	1	66.61
	2	66.34
	3	57.80
	4	45.54
	5	84.13
	6	61.31

Симулираните концентрация/време криви с NPEM-Theophylline-ОРТ при 1 и 2 D-оптимални точки като *Bayesian prior* на 4-ма здрави, случайно подбрани доброволци № 1, 13, 20 и 24, са показани на Фигури 4.8 и 4.9. D-оптималният популационен ФК модел на теофилин добре възстановява хода на зависимостта лекарствена концентрация/ време.



Фигура 4.8. Симулация с D-оптималния популационен ФК модел, NPEM-Theophylline-ОРТ, на концентрация/време зависимостта с 1 D-оптимална точка като *Bayesian prior* на 2-ма здрави доброволци: № 1 и 13.



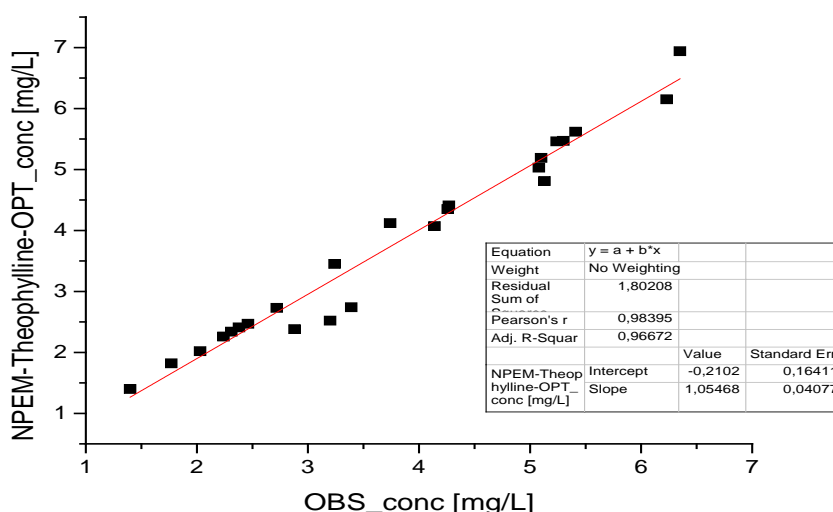
Фигура 4.9. Симулация с D-оптималния популационен ФК модел, NPEM-Theophylline-OPT, на концентрация/време зависимостта с 2 D-оптимални точки като *Bayesian prior* на 2-ма здрави доброволци: № 20 и 24.

Средните стойности с техните стандартни отклонения и коефициенти на вариация на структурните ФК параметри обем на разпределение и системен клирънс на теофилин от D-оптималния популационен ФК модел на теофилин са представени на Таблица 4.11.

Таблица 4.11. Средни стойности за NPEM2 оценките на структурните ФК параметри на теофилин при здрави доброволци от D-оптималния популационен ФК модел (NPEM-Theophylline-OPT) за индивидите от трите работни групи

NPEM-Theophylline-OPT	Средна стойност ± SD (CV%)	
	VS1 [L/kg]	CLS1 [L/h/kg]
3 h (n=6)	0.46 ± 0.019 (4.23)	0.07 ± 0.014 (20.28)
10 h (n=6)	0.37 ± 0.042 (11.38)	0.057 ± 0.004 (7.77)
3 и 10 h (n=6)	0.49 ± 0.005 (1.00)	0.050 ± 0.004 (7.39)

Валидността на модела беше тествана чрез зависимостта предсказани плазмени концентрации на теофилин на 3, 10 и комбинация на 3 и 10 час, получени посредством създадения NPEM-Theophylline-OPT (Фигура 4.10) и наблюдаваните плазмени теофилинови концентрации за същите точки. Беше установена високо сигнификантна корелация между експерименталните и модел предсказаните концентрации на теофилин ($r = 0.984$, $p < 0.001$).



Фигура 4.10. Предсказани чрез NPEM-Theophylline-OPT модела концентрации на теофилин, сравнени с наблюдаваните.

D-оптималният популационен ФК модел NPEM-Theophylline-OPT предсказваше с висока точност и прецизност апостериорните Байесовски предсказани концентрации на теофилин. Тестваше се работната хипотеза, че D-оптималният популационен ФК модел на теофилин ще предскаже зависимостта плазмени концентрации – време на теофилин само с една или комбинация от две D-оптимални точки. Това означава площите под кривата, базирани на информацията от D-оптималните плазмени концентрации на теофилин, да нямат статистически значима разлика спрямо наблюдаваните.

На Таблица 4.12 са представени средните стойности на площите под кривата AUC_{0-24} на плазмените концентрации на теофилин, предсказани чрез NPEM-Theophylline-OPT за D- оптималните времена на 3, 10 и 3 и 10 часове, както и средните стойности на наблюдаваните AUC за същите часове. Отношенията между предсказаните и наблюдавани стойности за AUC_{0-24} са в границите 0.8 – 1.25.

Таблица 4.12. Отношение на предсказани с NPEM-Theophylline-OPT и наблюдавани площи под кривата на плазмените концентрации на теофилин

№ на работна група: D-оптимален час на пробовземане	Средна стойност на наблюдаваните AUC_{0-24}	Средна стойност на предсказаните AUC_{0-24}	Отношение предсказани/наблюдавани AUC_{0-24}
№ 1: 3 ч.	58.41	53.82	0.92
№ 2: 10 ч.	50.59	55.25	1.09
№ 3: 3 и 10 ч.	66.53	63.62	0.96

Не беше установена статистически значима разлика между предсказаните и наблюдавани площи под кривата, което предполагаше, че с D-оптималния популационен ФК модел на теофилин ще може с висока степен на достоверност да се предсказва площта под кривата на плазмените концентрации на теофилин само с една или две D-оптимални точки.

Резултатите от проучването недвусмислено доказват много добрите предсказващи способности на D-оптималния популационен модел на теофилин при здрави доброволци. D-оптималният ФК протокол в комбинация с непараметричен популационен ФК анализ могат да се окажат подходящия методичен подход за етични и икономически ефективни ФК проучвания за сравнителна бионаличност върху болни и рискови популации (деца, старци), където пробовземанията трябва да бъдат сведени до оптималния минимум.

IV.3.3 ПРИЛОЖЕНИЕ НА D-ОПТИМАЛНАТА СТРАТЕГИЯ ПРИ КЛИНИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА АМПИЦИЛИН

Течно-хроматографската методика беше валидирана, съгласно изискванията на световните стандарти за биоаналитичен анализ. При количествения анализ е използван методът на абсолютната калибровка. Времето на задържане на ампицилин е $10.88 \pm 0.73 \text{ min}$. Методиката е с аналитичен добив 80.81% и с коефициент на вариация (CV) 13.04%, изследван 18 пъти в продължение на периода на анализ на ампицилин. Вътрედневната повторимост е с $CV < 9\%$, а междудневната - с $CV = 14.05\%$ при 24 измервания за периода на анализ на ампицилин в плазмата на доброволците. Оценената точност на измерванията на ампицилин при различни контролни работни концентрации е:

0.75mg/L - 90.62% от истинската концентрация при 14 измервания за същия период;

1 mg/L - 95.45%. при 26 измервания;

2 mg/L - 98.82% при 14 измервания.

В данните са включени и резултатите от контрола на качеството на измерванията (QCS) извършени с концентрации 0.75, 1, и 2 mg/L всяка седмица по време на анализа на пробите от плазма на доброволците. В изследвания концентрационен обхват 0.3 - 16 mg/L зависимостта сигнал/концентрация, оценена чрез площите на пиковете, е линейна (корелационен коефициент: 0.996, коефициент на детерминация: 0.992). LOD е 3 ng. LOQ е 0.3 mg/l с 95% доверителен интервал в концентрационните граници 0.231mg/l - 0.369mg/l.

Прие се работна хипотеза, че популационният ФК модел на тествания лекарствен продукт (ТЛП) ще реконструира плазмените концентрации на референтния продукт (РЛП), ако и само ако, тестваният продукт е биоеквивалентен на референтния лекарствен продукт.

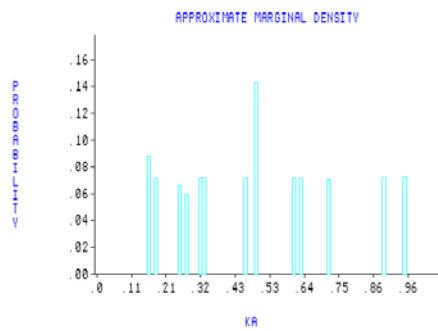
Изискванията за D-оптималност се изпълняваха от плазмените концентрации на ампицилин, наблюдавани на 1, 4 и 6-и час след перорален прием на ампицилин. Така че създадените популационни ФК модели за Т и РЛП, използвайки

регистрираните плазмени нива на ампицилин на тези часове (1; 4 и 6 час) ще съдържат най-много информация за тези параметри и ще възстановяват статистически най-достовърно хода на плазмените концентрации във времето. Създадени са два D-оптимални популационни ФК модела за Т и РЛП: NPEM2-OPT-TEST и NPEM2-OPT-REFERENT.

Дискретните маргинални плътности на разпределението на структурните ФК параметри KA, VS1 и CLS1 на Т и РЛП са представени на Фигура 4.11. По абсцисата са представени оценките на структурните параметри, а по ординатата – вероятността на всяка отделна стойност за съответния параметър. За всеки структурен параметър са дадени средната, стандартното отклонение и медианата. Съдейки по оценките за средната и медианата, разпределението на структурните ФК параметри за Т и РЛП следва нормално Гаусово разпределение.

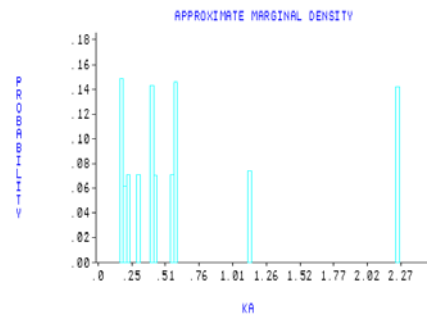
На Фигура 4.12 са показани съответно наблюдаваните концентрации на ТЛП (а) и РЛП (б) ампицилин при 14 здрави доброволци и апостериорните Байесовски предсказани концентрации с D-оптималните популационни ФК модели, NPEM2-OPT-TEST и NPEM2-OPT-REFERENT. Установена е високо сигнификантна корелация между експерименталните и модел предсказаните концентрации на ТЛП ампицилин ($r = 0.967, p < 0.001$) и РЛП ампицилин ($r = 0.913, p < 0.001$).

а)



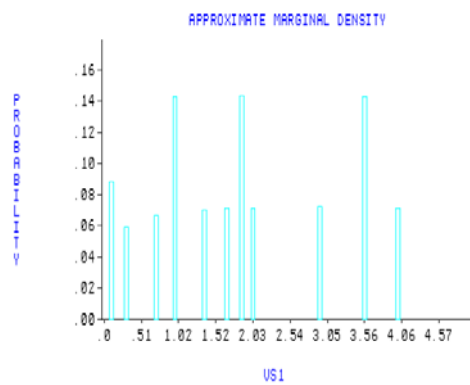
Средната и SD са $0.631 \pm 0.00002 \text{ h}^{-1}$.
Оценката на медианата е 0.6299 h^{-1} .

б)



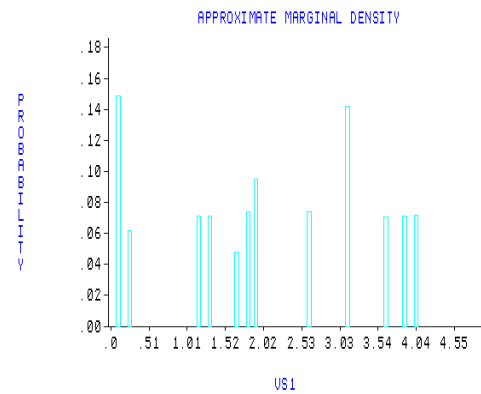
Средната и SD са $0.550 \pm 0.0277 \text{ h}^{-1}$.
Оценката на медианата е 0.5625 h^{-1} .

в)



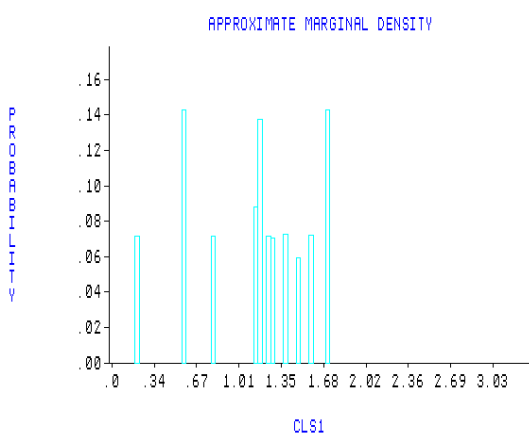
Средната и SD са $0.962 \pm 0.0001 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$.
Оценката на медианата е $0.9805 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$.

г)



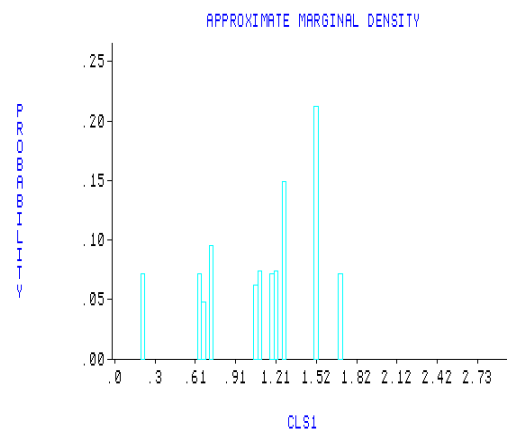
Средната и SD са $1.166 \pm 0.0277 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$.
Оценката на медианата е $1.1750 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$.

д)



Средната и SD са $0.592 \pm 0.00002 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.
Оценката на медианата е $0.5834 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

е)

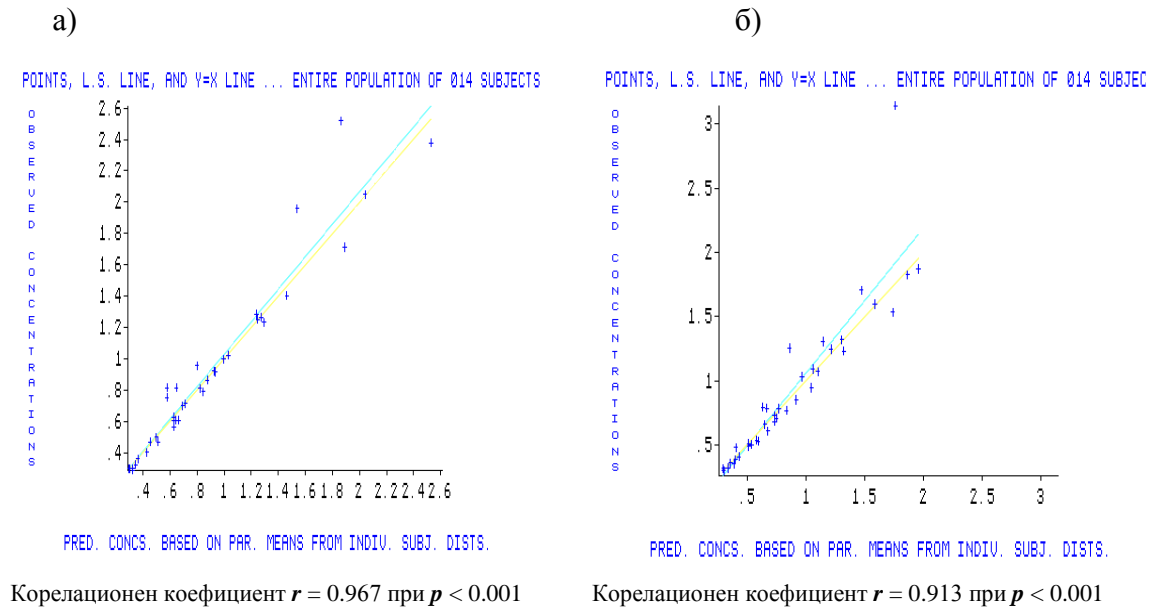


Средната и SD са $0.647 \pm 0.027 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.
Оценката на медианата е $0.6450 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Фигура 4.11 Дискретна маргинална плътност на разпределение ($n=14$) на абсорбционната константа KA ($1/h$) на ампицилин: а) ТЛП и б) РЛП; на обема на разпределение, нормализиран към телесната маса, $VS1$ (L/kg), на ампицилин: в) ТЛП и г) РЛП; на системния клирънс, нормализиран към телесната маса, $CLS1$ ($L/h/kg$), на ампицилин: д)ТЛП и е) РЛП.

Средните стойности на структурните ФК параметри на двата D-оптимални популационни ФК модели на ампицилин и взаимното им сравнение са представени на Таблица 4.13.

Точността на NPEM2-OPT-TEST, оценена чрез *ME* се равнява на -0.0255 mg/L и прецизността, оценена чрез *RMSE* се равнява на 0.146 mg/L. Точността и прецизността на NPEM2-OPT-REFERENT се равняват съответно на - 0.0436 mg/L и 0.246 mg/L. Тези грешки са практически несъществени в сравнение с наблюдаваната средна концентрация на ампицилин, равняваща се на 0.922 mg/L.



Фигура 4.12 Корелационно поле на наблюдаваните и предсказаните концентрации на ампицилин с D-оптималния популационен ФК модел при хора:

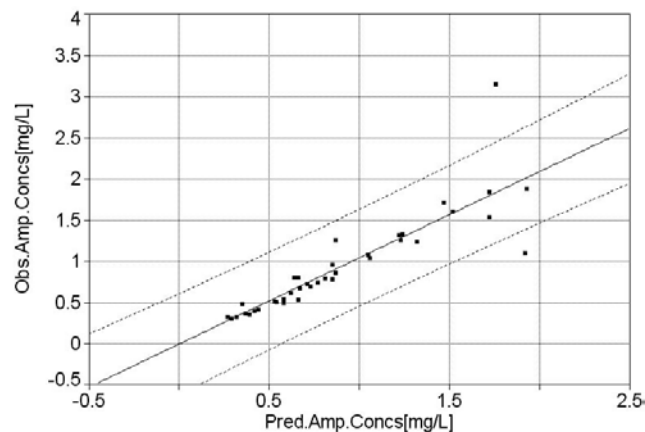
а) NPEM2-OPT-TEST и б) NPEM2-OPT-REFERENT.

Не е установена статистически значима разлика между средните на моделните ФК параметри между двата модела, което предполагаше, че с D-оптималния популационен ФК модел на Т продукта NPEM2-OPT-TEST ще могат да се предсказват с висока статистическа достоверност оптималните концентрации на референтния продукт на 1, 4 и 6 час (Фигура 4.13). D-оптималният популационен ФК модел NPEM2-OPT-TEST, предсказваше с висока точност и прецизност апостериорните Байесовски предсказани концентрации на ампицилин - референт.

Таблица 4.13. Сравнение между NPEM2 оценките на структурните ФК параметри на ампицилин при здрави доброволци от двата D-оптимални популационни ФК модела (NPEM2-OPT-TEST и NPEM2-OPT-REFERENT)

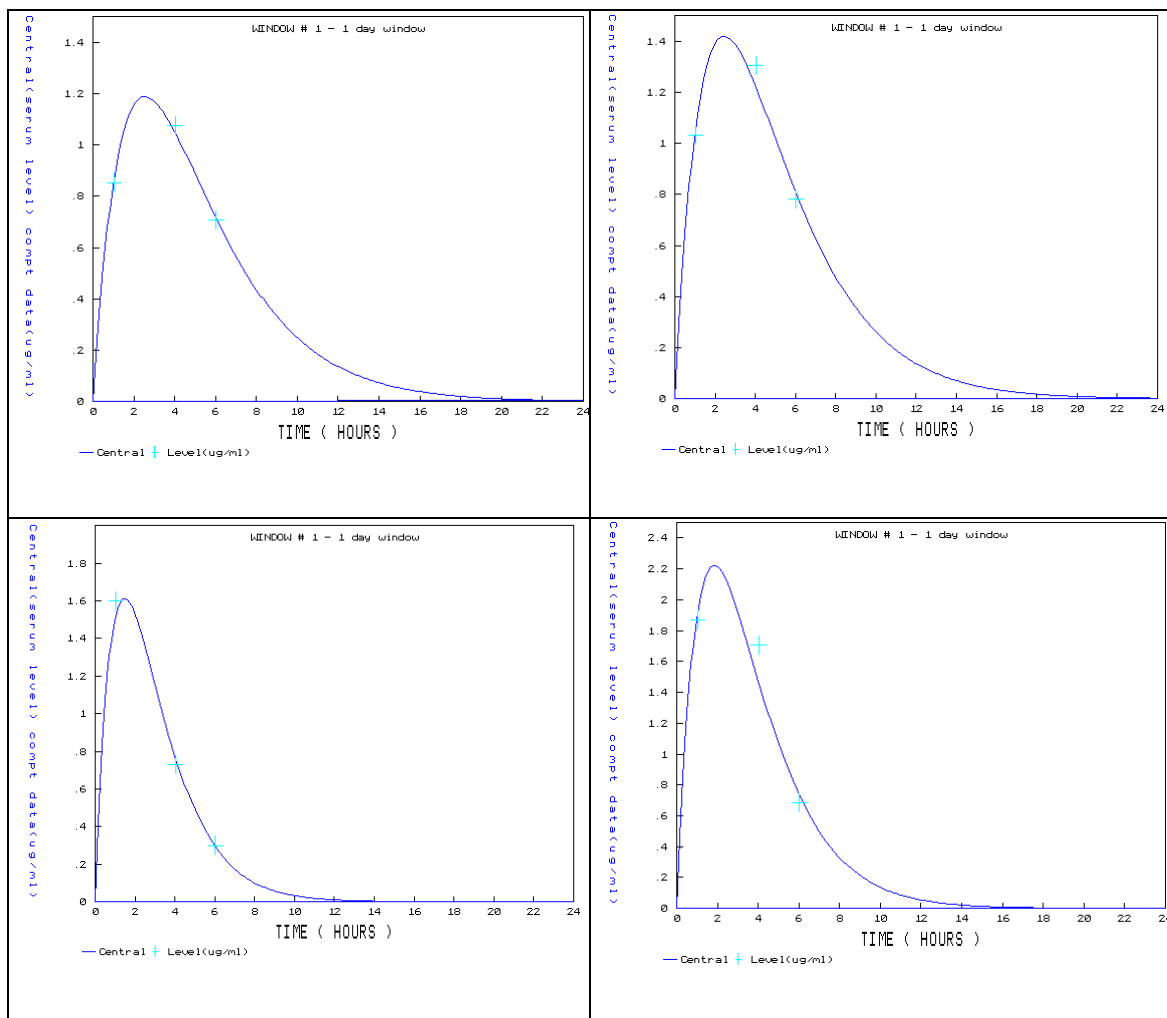
Средна стойност \pm SD		
NPEM2-OPT-TEST (n=14)	NPEM2-OPT-REFERENT (n=14)	<i>p</i> -стойност
KA = 0.482 \pm 0.241 (1/h) (CV% = 49)	0.698 \pm 0.673 (CV% = 96)	0.134
VS1 = 1.859 \pm 1.205 (L/kg) (CV% = 65)	2.065 \pm 1.322 (CV% = 63)	0.335
CLS1 = 1.150 \pm 0.434 (L/h/kg) (CV% = 38)	1.122 \pm 0.397 (CV% = 35)	0.427

На Фигура 4.13 са показани наблюдаваните D-оптимални плазмени концентрации на ампицилин (РЛП) и апостериорните Байесовски предсказани концентрации с NPEM2-OPT-TEST. Установена беше високо сигнификантна корелация между експерименталните и модел предсказаните концентрации на ампицилин РЛП ($r = 0.874$, $p < 0.001$, $n = 38$).



Фигура 4.13. Корелация между предсказаните с NPEM2-OPT-TEST и наблюдаваните концентрации на ампицилин-референтен лекарствен продукт: $n = 38$, $r = 0.874$ при $p < 0.001$.

На Фигура 4.14 са показани симулираните време/концентрации криви на ампицилин при четири здрави доброволци със съответно по 3 точки като *Bayesian prior* за РЛП. D-оптималният популационен ФК модел на тест продукта, NPEM2-OPT-TEST, добре възстановява хода на зависимостта време/концентрация на РЛП. Крайната минимизирана стойност на оценъчната Байесовска функция беше в границите от 0.366 до 2.253.



Фигура 4.14. Симулация с D-оптималния популационен ФК модел, NPEM2-ОРТ-TEST, на време/концентрация зависимостта с 3 точки като *Bayesian prior* за РЛП на 4-ма здрави доброволци: № 007, 008, 011 и 014.

Предположението, че популационният ФК модел на ТЛП ще реконструира плазмените концентрации на РЛП ако и само ако, тестваният продукт е биоеквивалентен на референтния лекарствен продукт, се потвърди. Това означава плазмените концентрации на ампицилин, генерирани от популационните ФК модели, създадени на основата на информацията от D-оптималните плазмени концентрации на ампицилин, измерени след приема на двата лекарствени продукта, да нямат статистически значима разлика, т.е. популационният модел, създаден от “тест” плазмените концентрации на ампицилин (тест популационен ФК модел, NPEM2-ОРТ-TEST), да предсказва статистически значимо плазмените нива на лекарството от референтния продукт.

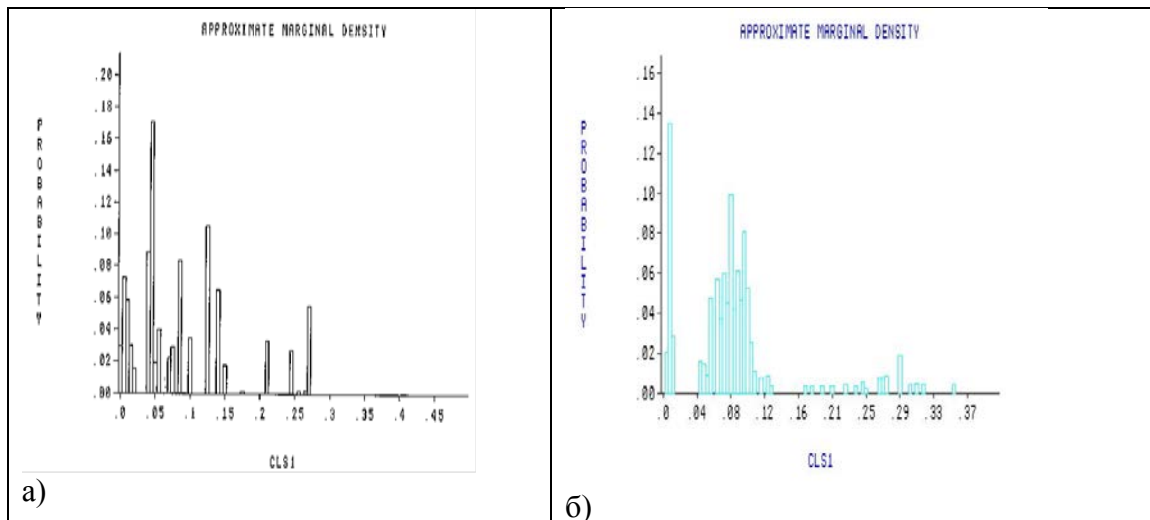
Резултатите от проучването недвусмислено разкриват много добрите предсказващи способности на D-оптималния популационен модел на ампицилин при здрави доброволци. D-оптималният ФК протокол в комбинация с непараметричен популационен ФК анализ могат да се окажат дълго търсения методичен подход за етични и икономически ефективни ФК проучвания върху хора с вземане на кръвни проби в D-оптималните точки и за измерване концентрацията на съответното

лекарство за оценка значенията и разпределението на неговите моделни ФК параметри.

IV.4 ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДА МОНТЕ КАРЛО ЗА ЛЕКАРСТВЕНО ФЕНОТИПИЗИРАНЕ АКТИВНОСТТА НА СУР1А2 ЧРЕЗ КОФЕИН

Тъй като популационните ФК проучвания включват ограничен брой болни (здрави) индивиди е невъзможно да се оцени истинското разпределение на стойностите на ФК параметри. Методът Монте Карло предоставя въз основа на Теоремата за граничните стойности [24] информация за голям брой от виртуални индивиди, които симулират истинска популация, данните за които не биха могли реално да се измерят в клинични и експериментални условия. За разлика от симулационните методи, които използват само популационните средни, фармакокинетичните параметри, използвани при Монте Карло симулациите се генерират въз основа на централната тенденция и дисперсията на всеки един ФК параметър [19]. В резултат, симулираните индивидуални ФК профили на кофеин в сравнително голяма популация могат да осигурят точна информация за истинското разпределение на стойностите на системния кофеинов клирънс, респ. на СУР1А2 активността.

Дискретната маргинална плътност на кофеиновия клирънс, нормализиран спрямо телесното тегло, както е установено с NPEM2 метода (n=34) е представена на Фигура 4.15 (а). Абсцисата представя CLS1 оценките, а ординатата представя вероятността да има конкретна стойност за CLS1. Средната и SD бяха $0.08749 \pm 0.07282 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Оценките на 25th, 50th (медиана) и 75th персантил бяха 0.04249, 0.05696 и $0.12773 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, респ. Стойността на модата беше $0.0475 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Асиметрията и ексцесът бяха 1.1646 и 3.5849, респ. Статистическото разпределение на оценките на CLS1 беше не-Гаусово и с дясна асиметрия със средна стойност по-висока от медианата. Бяха наблюдавани 3 подгрупи (кълстера) от субекти. Тази информация относно разпределенията на стойностите на CLS1 беше използвана като входяща за изработване на Монте Карло симулации. Резултатът от NPAG програмата, както е представен на Фигура 4.15 (б), представя дискретната маргинална плътност на кофеиновия клирънс, нормализиран спрямо телесното тегло, CLS1, както е оценена с NPAG програмата (n=250 Монте Карло симулирани субекти). По абсцисата са представени CLS1 оценките, а по ординатата – вероятността за отделните стойности за CLS1. Средната CLS1 стойност и нейната SD са $0.0873418 \pm 0.0655 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Оценките на 25-тия, 50-тия (медиана) и 75-тия перцентил са 0.058577387, 0.084106746 и $0.098820347 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, респ. Стойността на модата е $0.084466455 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Асиметрията и ексцесът са 1.7622591 и 6.7314311, респ. Очевидно, формата на статистическото разпределение на CLS1 на кофеина при Монте Карло симулирани пациенти също е не-Гаусово и асиметрията вдясно е с по-висока средна стойност в сравнение с медианата. Полученото в резултат разпределение на стойностите на системния кофеинов клирънс на тези 250 Монте Карло симулирани субекти (Монте Карло симулирани ФК профили) е тримодално (Фигура 4.16), каквото е разпределението и при реалните 34 пациенти.

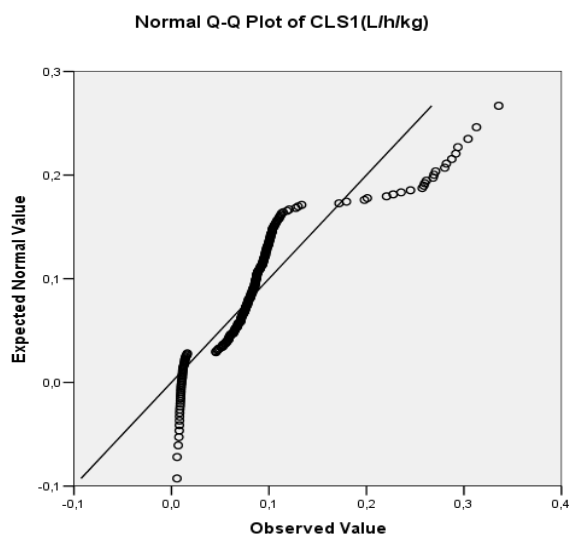


Фигура 4.15. Дискретна маргинална плътност на клирънса, нормализиран спрямо телесното тегло, CLS1. По абсцисата са представени оценките на CLS1, а по ординатата е представена вероятността да се измери конкретна стойност за CLS1. а) CLS1 са взети от [53]; б) CLS1 са оценени чрез NPAG метода (n=250 Монте Карло симулирани субекти).

Общата вероятност за получаване на стойности на клирънсите под $0.0163033 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ е около 18%, а за клирънси от 0.0456114 до $0.1335420 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ е 73%. Наблюдаваше се добре локализиран клъстер при стойности на клирънсите $> 0.171852 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ с обща вероятност около 9%. Най-висока вероятност, около 14%, беше вероятността на клирънси със стойност между 0.010 и $0.011 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$.

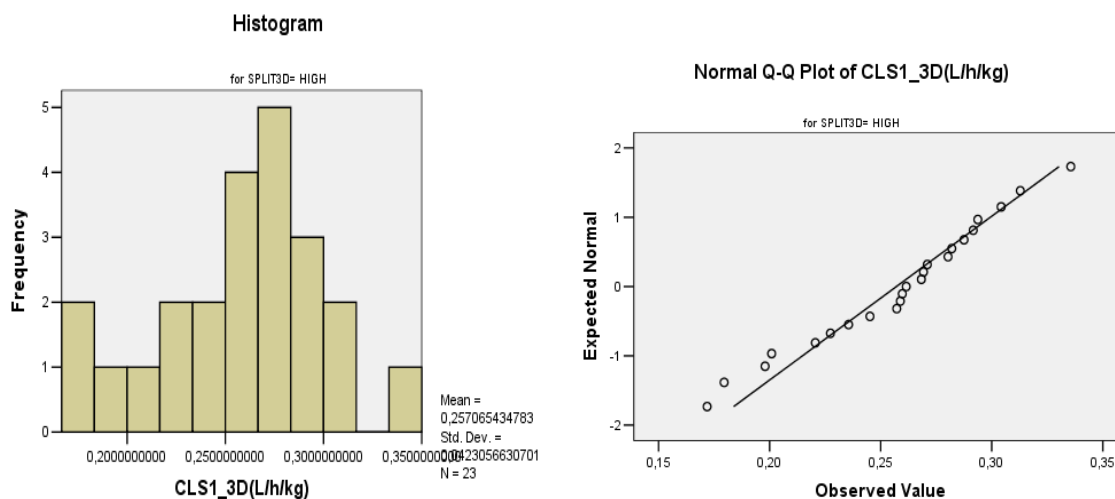
Фигура 4.16 представя разцепването на разпределението на кофеиновите CLS1 стойности на тези 250 Монте Карло симулирани субекти в 3 клъстера, когато се прилага техниката Q-Q. Тази техника се използва за определяне дали статистическото разпределение на променливата отговаря на нормално разпределение. Ако избраната променлива има нормално разпределение, точките образуват клъстер около права линия. Очевидно, разпределението на кофеиновия CLS1 е не-Гаусово и представя комбинация от 3 отделни нормални разпределения.

Средната стойност и SD за клъстера с високи CLS1 стойности бяха $0.25707 \pm 0.04231 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, за субпопулацията със средни стойности на клирънса средната и SD бяха $0.08445 \pm 0.0173 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, и за ниския CLS1 клъстер тези стойности бяха $0.01082 \pm 0.00261 \text{ L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$.

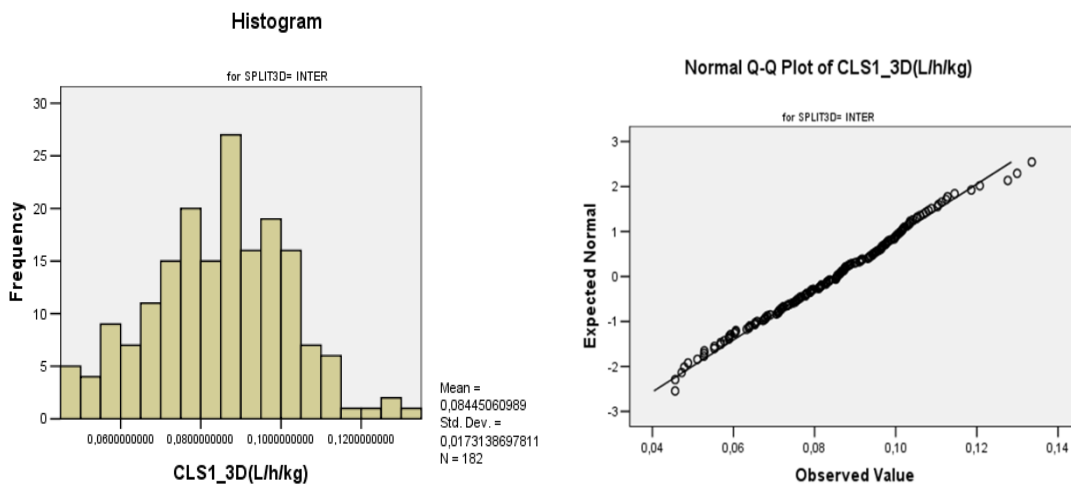


Фигура 4.16. Разпределение на стойностите на кофеинския CLS1, получени от 250 Монте Карло симулирани субекти, на 3 кълстера след прилагане на теста за нормалност.

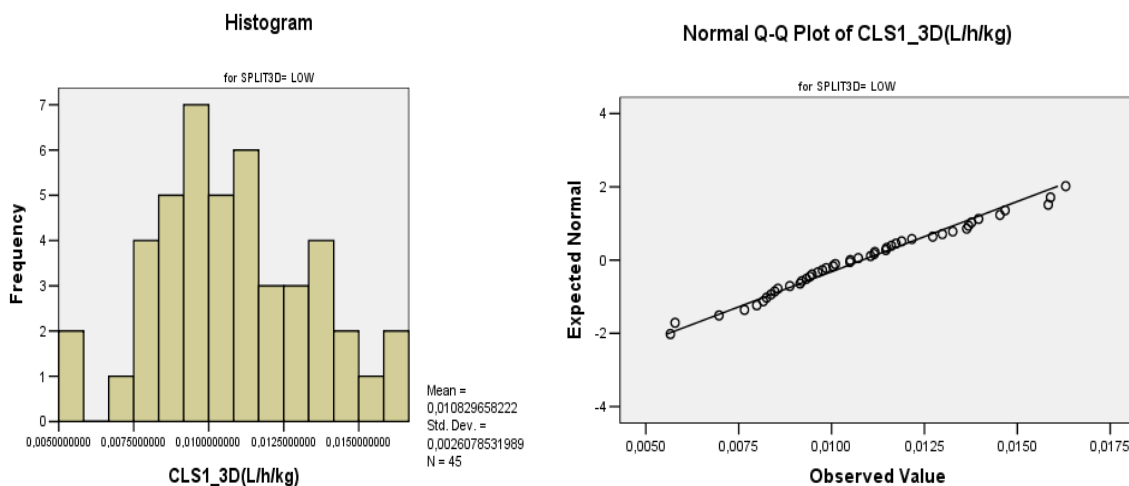
По-детайлен статистически анализ на тези 3 кълстера от субпопулации разкри, че вътре в кълстерите разпределението на кофеинския системен CLS1 беше Гаусово както е валидирано чрез теста за нормалност, представен чрез Q-Q графики (Фигури 4.17, 4.18, и 4.19).



Фигура 4.17. Разпределението на кофеинския системен клирънс, CLS1, в кълстера от високи стойности на CLS1 е от Гаусов тип със средна и SD 0.25707 ± 0.04231 L/h/kg (n=23).



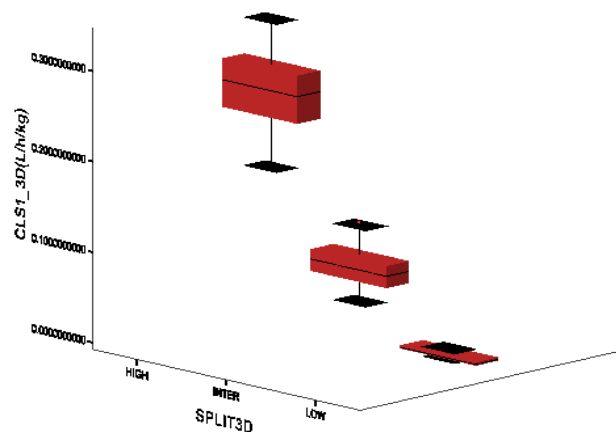
Фигура 4.18. Разпределението на кофеинския системен клирънс, CLS1, в кълъстера от средни CLS1 стойности е от Гаусов тип със средна и SD 0.08445 ± 0.01731 L/h/kg ($n=182$).



Фигура 4.19. Разпределението на кофеинския системен клирънс, CLS1, в кълъстера от ниски CLS1 стойности е от Гаусов тип със средна и SD 0.01082 ± 0.00261 L/h/kg ($n=45$).

Идентификацията на субпопулациите е възможна само, ако има повече от две стандартни отклонения между трите средни стойности [27, 39]. Тримодалността може да се определи със сигурност, т.е. повече от 90%, когато разделянето е с повече от 4-6 единици стандартно отклонение [27]. Освен това, биха могли да се направят допълнителни параметрични допускания, касаещи ефекта от големината на съотношенията на компонентите и ефекта от относителната ширина, т.е. ефекта от промяната в съотношението на 3-те стандартни отклонения за 3-те кълъстера от компоненти [27]. Тъй като относителните съотношения между изследваните

популации могат да варират, описанието на разпределението по клъстери не е възможно нито за нормално, нито за логаритмично разпределение [45].



Фигура 4.20. Сравнение между стойностите за кофеиновите CLS1 и тяхната вариабилност, данните са получени от между трите субпопулации на Монте Карло симулираните субекти.

Статистическото сравнение на оценките за кофеиновите CLS1 на Монте Карло симулираните субекти между трите субпопулации (Таблица 4.14 и Фигура 4.20) показва значими разлики между техните средни ($p < 0.0001$). Тестването на променливите разкрива значими разлики между високите CLS1 и средните CLS1 субпопулации ($F_{22,181} = 5.97$, $p < 0.0001$), както и между високите CLS1 и ниски CLS1 субпопулации ($F_{22,44} = 262.77$, $p < 0.0001$). Променливите на средните и ниски CLS1 субпопулации бяха също така значимо различни ($F_{181,44} = 43.99$, $p < 0.0001$). Взети заедно разликите в средните стойности на CLS1 за трите клъстера водят до заключението за разпределението на 3 отделни субпопулации. Както беше предсказано от теорията, когато средните стойности на трите субпопулации бяха с повече от 6SD отдалечени един от друг, тези три разпределения са разделени с висока резолюция (вж. Фигури 4.16, 4.17 и 4.20).

Непараметричните методи за популационен ФК анализ (NPEM и NPAG) не правят допускания за вида на съвместно вероятностно разпределение. Те изчисляват цялостната съвместна плътност или разпределение на точките, всяка от които съдържа набор от стойности на параметри и всяка от които има централна вероятност [45]. Полезна особеност на тези методи е тяхната възможност да откриват неочаквани субпопулации [45, 52].

При сравняване на средните на кофеиновите CLS1 на тези 3 субгрупи от Монте Карло симулирани субекти със средните на кофеиновите CLS1, както е представено в [53] показва, че няма статистически разлики между тях (Таблица 4.14, двустранен t -тест при ниво на значимост $\alpha = 0.05$). В светлината на проведеното от Tam et al [50]

изследване за влиянието на входящия брой наблюдения при Монте Карло симулациите може да се предвиди, че входящ набор от 34-ма индивида от кавказката раса, които нямат родство помежду си доставят достатъчно информация за разпределението на системния кофеинов клирънс [53].

Таблица 4.14. Сравнение между стойностите на кофеиновия CLS1 във всяка от трите подгрупи по Terziivanov et al. [53] и от Монте Карло симулираните (MCS) субекти

Субпопулация	Средна±SD (Terziivanov et al [53])	Средна±SD (MCS)	Статистическа значимост
Високи CLS1	0.25 ± 0.0282	0.26 ± 0.0423	P=0.7931
Средни CLS1	0.08 ± 0.0377	0.08 ± 0.0173	P=0.1791
Ниски CLS1	0.010±0.0048	0.01 ± 0.0026	P=0.4618

Значителна клинична полза при подхода на непараметричното популационно ФК моделиране е, че многократните поддържащи точки с техните многократни набори от параметрични стойности осигуряват многократни предсказания на бъдещи серумни концентрации и други отговори за всеки следващ дозов режим. Следователно, въз основа на този популационен ФК модел на кофеин може да се предскаже кофеиновия системен клирънс на даден пациент след дозиране с безопасна кофеинова доза за оценка на неговите CYP1A2 активност и CYP1A2 фенотип.

IV.5 ОБОБЩЕНИЕ

Оптимизационните подходи, които бяха приложени при определяне на най-подходящите условия за хроматографски анализ, позволяват бързо, сравнително лесно и икономически изгодно разработване на високоефективни течно-хроматографски методики за качествено и количествено едновременно определяне както на натриев валпроат, карбамазепин и фенитоин – лекарства с различна химическа структура, така и на кофеин и неговите метаболити – вещества с подобна химическа структура. Така оптимизираните ВЕТХ методики бяха валидирани според международните препоръки [7, 26, 54] и с достатъчна специфичност, чувствителност, точност и възпроизводимост количествено се определяха както антиепилептичните лекарства в човешка плазма, така и кофеин и метаболитите му в биологични течности от хора и малки лабораторни животни.

С измерените чрез оптимизираните и валидирани ВЕТХ методики лекарствени концентрации беше изграден популационен ФК модел на кофеин при хора и беше изследвано влиянието на тютюнопушенето и бъбречната функция върху системния кофеинов клирънс [2, 53]. Измерените концентрации на кофеин, определени чрез същата ВЕТХ методика, от плазма на бели мъжки плъхове порода Wistar послужиха

да се създаде популационен и D-оптимален ФК модели на кофеин при плъхове за първи път досега в експерименталната фармакология и фармакокинетика [1, 8].

Популационният ФК анализ намира все по-широко приложение и в ранните фази от клиничната апробация на нови лекарства. Алометричното скалиране беше приложено в съчетание с популационния фармакокинетичен анализ за предсказване на човешкия кофеинов клирънс от данни от малки лабораторни животни и оценяване на междувидовата вариабилност в активността на ензима CYP1A2. Базирайки се на нашия опит за възможностите на D-оптималността при създаване на популационни ФК модели при малки лабораторни животни [8] в настоящата работа беше направен първи опит да се създадат популационни ФК модели на някои лекарства чрез D-оптималния дизайн при хора. Вземането на малък брой кръвни проби във времена, които предоставят максимална информация за ФК поведение на лекарството е щадящо и позволява, при съвкупност от добра техника на вземане на кръв и достатъчно чувствителна аналитична методика ползваща микрообемни кръв, да се хуманизира ФК анализ и да се редуцират разходите. Въз основа на определените плазмени концентрации на кофеин, ампицилин и теофилин чрез ВЕТХ методиките, описани в настоящия дисертационен труд, бяха намерени D-оптималните времена за пробовземане и създадени популационни непараметрични ФК модели на кофеин, ампицилин и теофилин, основани на D-оптималния дизайн, които преодоляват ограниченията на класическите ФК методи за анализ и демонстрират високите си възможности и в областта на клиничните проучвания.

D-оптималният ФК протокол в комбинация с непараметричен популационен ФК анализ могат да се окажат дълго търсения методичен подход за етични и икономически ефективни ФК проучвания върху хора и малки лабораторни животни с вземане само на 1 кръвна проба от човек или животно и за измерване концентрацията на съответното лекарство за оценка значенията и разпределението на неговите моделни ФК параметри в изучаваната популация. Един такъв оптимизиран ФК дизайн би бил особено подходящ при изследвания, оценяващи взаимодействието на различни ендогенни и екзогенни фактори с фармакокинетичното поведение на различни лекарства. Съчетаването на методологията на популационния ФК анализ със стратегията на D-оптималните времена успешно би могла да намери приложение в т.н. еволюционна фармакокинетика (алометрично скалиране) за достоверно предсказване на ФК на лекарства при хора въз основа данните получени от животни.

Една от причините за широката терапевтична лекарствена вариабилност е разликата във фенотипа на лекарствения метаболизъм. Досегашните методи за фенотипизиране обикновено се основават на лекарствените метаболитни отношения в кръв и урина. За да може да се определят по-точно оценката и статистическото разпределение на ФК параметри са необходими голям брой пациенти (индивиди), което от етични съображения е неприложимо в клинични условия. За първи път данни, получени от фенотипизиране ензимната активност на CYP1A2, и непараметричен популационен ФК модел, изграден въз основа на тях, се използват като входяща информация за метода "Монте-Карло симулации" за да се изследва статистическото разпределение на системния клирънс на кофеин в

популация от 250 симулирани индивиди. Методът “Монте-Карло симулации” може да се прилага в популационния ФК анализ за тестване на разпределението на ФК параметри, като се използват данните получени от популационен ФК модел на малка случайна извадка от индивиди при два случайно подбрани часа за вземане на кръвни проби. Резултатите от настоящето изследване могат да намерят приложение за симулиране на фармакоепидемиологични проучвания за оценяване експозицията на рискови популации от населението спрямо карциногенни полициклични ароматни въглеводороди.

Разработването на такива модели и приложението им в клиничната практика безспорно имат своя голям теоретичен и практичен принос. Проблемът засяга особено т.нар. рискови групи болни, при които подобни анализи трудно се провеждат и винаги съществува риск от нежелани лекарствени реакции, недостатъчен ефект от лечението и допълнително влошаване в състоянието на болния.

V. ИЗВОДИ

Въз основа на извършената работа се направиха следните изводи:

1. Приложеният оптимизационен метод позволява само с няколко опита да се намерят най-подходящите високо-ефективни течнохроматографски условия за едновременно качествено и количествено определяне в биологични течности:

- на натриев валпроат, карбамазепин и фенитоин;
- на кофеин и първичните му метаболити.

2. За целите на популационния фармакокинетичен анализ са подходящи така валидираните течно-хроматографски методики, тъй като показват специфичност, точност и чувствителност при определяне в биологични течности:

- на натриев валпроат, карбамазепин и фенитоин;
- на кофеин и неговите метаболити.

3. Предложеният алометричен подход в съчетание с популационния фармакокинетичен анализ може да се прилага за оценка на ензимната активност на CYP1A2 при използван биомаркер системния кофеинов клирънс. Получените резултати могат да послужат при неклинични проучвания на нови лекарства и при проучване на лекарствени взаимодействия.

4. D-оптималният дизайн в комбинация с непараметричния популационен фармакокинетичен анализ на кофеин могат да се окажат дълго търсения методичен подход за етични и икономически ефективни фармакоепидемиологични и фенотипизиращи проучвания за откриване на прокарциногенна експозиция при високо рискови популации.

5. Резултатите от приложението на D-оптималният дизайн, комбиниран с непараметричния популационен фармакокинетичен анализ при лекарствата ампицилин и теофилин, предоставят работещ модел в бъдеще проучванията за биоеквивалентност да се провеждат в специални таргетни популации, показани за лимитирано пробовземане.

6. Приложението на метода Монте Карло са оказа резултатно при лекарственото фенотипизиране на CYP1A2, особено за рандомизирани клинични данни с ограничена извадка от изследвани индивиди.

7. Получените резултати могат да послужат при хора за индивидуализиране на режима на терапията с лекарства, субстрати на ензима CYP1A2.

VI. ПРИНОСИ

1. Разработване на подход за оптимизиране на течно-хроматографски методики за едновременно количествено определяне:

- на антиепилептични лекарства – натриев валпроат, карбамазепин и фенитоин;
- на кофеин и метаболитите му

за целите на популационния фармакокинетичен анализ.

2. Комбиниране на алометричното скалиране с популационния фармакокинетичен анализ за оценка ензимната активност на CYP1A2.

3. Създаване и валидиране на D-оптимални популационни фармакокинетични модели на кофеин, теофилин и ампицилин с ограничен брой взети кръвни проби за лекарствен анализ за целите на клиничните проучвания.

4. Приложение на метода Монте Карло в комбинация с популационния непараметричен фармакокинетичен анализ при лекарственото фенотипизиране активността на CYP1A2.

VII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Георгиева, М. Токсикологично и клинично-фармакологично проучване на български нисколактозен млечнокисел пробиотик Biostim LBS. Дисертация. МУ, София. (2006).
2. Димитрова, В. Клинично приложение на популационния фармакокинетичен анализ. Дисертация. МУ, София. (2004).
3. Пецев, Н. Хроматография, “Св. Кл. Охридски”, София. (1992).
4. Aldridge, A., J.V. Aranda, A. Neims. Caffeine metabolism in the newborn. Clin Pharmacol. Ther. 25/4 (1979) pp. 447 – 453.
5. Bidlingmeyer, BA, SN. Deming, WP. Price et al. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid-chromatography. J. Chromatogr. 186 (1979) pp. 419 - 434.
6. Bonati, M., R. Latini, F. Galetti, et al. Caffeine disposition after oral doses. Clin. Pharmacol. Ther. 32 (1982) pp. 98-106.
7. Bozhinova, K. Bioequivalence as a bioanalytical problem. Workshop “Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling”. Sofia (2004).
8. Bozhinova, K., I. Atanasova and D. Terziivanov. Application of population pharmacokinetic analysis in experimental pharmacology. Annual of SU St. Kliment Ohridski, Medical Faculty. v.2 (*in press*).
9. Bustad, A, R. Jelliffe and D. Terziivanov. A comparison of Parametric and Nonparametric Methods of Population Pharmacokinetic Modeling. Presented at the Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Atlanta, GA, March 26 (2002).
10. Butler, MA., M. Iwasaki, F. P. Guengerich et.al. Human cytochrome P-450 pa (P-4501a2), the phenacetin O-decethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 (1989) pp. 7696-7700
11. Butler, MA., N. P. Lang, J. E. Young et al. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. Pharmacogenetics. 2 (1992) pp. 116-127.
12. Carrillo, JA. et J. Benitez. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. Clin. Pharmacokinet. 39 (2000) pp. 127-153
13. Chen, F., ZY Hu, R. B. Parker, S. C. Laizure. Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS and clinical application. Biomedical Chromatography. 31/6 (2017) pp. 1-8.
14. Coenegracht, P.M.J., A.K. Smilde, H.J. Metting et al. Comparison of optimization methods in reversed-phase high-performance liquid chromatography using mixture designs and multi-criteria decision making. J Chromatogr. 485 (1989) pp. 195 - 217.
15. D’Argenio, DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiments. J. Pharmacokinet. Biopharm. 9 (1981) pp.739-755
16. Deeb, D., D. A. McKeown, H. J. Torrance, F. M. Wylie, B. K. Logan and K. S. Scott. Simultaneous Analysis of 22 Antiepileptic Drugs in Postmortem Blood, Serum and Plasma Using LC-MS-MS with a Focus on Their Role in Forensic Cases. Journal of Analytical Toxicology 38 (2014) pp. 485-494

17. Denaro, CP, III P Jacob et NL. Benowitz Evaluation of pharmacokinetic methods used to estimate caffeine clearance and comparison with a Bayesian forecasting method. – Ther. Drug. Monit. 20 (1998) pp. 78-87.
18. Desiraju, RU., ET. Sugita and RL. Mayock. Determination of Theophylline and Its Metabolites by Liquid Chromatography. J Chromatogr Sci. 15 (1977) pp. 563 -568.
19. Drusano, G, S. Preston, C. Hardalo et al. Use of Preclinical Data for Selection of a Phase II/III Dose for Evernimicin and Identification of a Preclinical MIC Breakpoint. Antimicrobial agents and chemotherapy 45/1 (2001) pp. 13–22.
20. Farandzha, D., V. Dimitrova, I. Atanasova, L. Spassov and D. Terziivanov. Comparison of Three Estimators for Determining Cyclosporine Dosing in Infants After Liver Transplantation. Int. J. Clin. Pharm. Ther. (*in press*).
21. Frank, E., E. Schwarz, J. Juenke et al. Performance Characteristics of Four Immunoassays for Antiepileptic Drugs on the IMMULITE 2000 Automated Analyzer. Am J Clin Pathol. 118/1 (2002) pp. 124-131.
22. Fuhr, U. et KL. Rost. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. Pharmacogenetics. 4 (1994) pp. 109-16
23. Gibaldi, M. and D. Perrier. Pharmacokinetics. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. (1972).
24. Grimm, H. Ch. 7 Principles of Statistical Estimation in Biostatistics Pharmacology, Pergamon Press. 2 (1973) pp. 611 – 623.
25. Guengerich, FP and A. Parikh, RJ. Turesky, et al. Inter-individual differences in the metabolism of environmental toxicants: cytochrome P4501A2 as a prototype. Mutation Res. 428 (1999) pp. 115-124.
26. Guidance for Industry, Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, FDA 05.2001.
27. Healy, P, R. Polk, L. Kanawati et al. Interaction between oral ciprofloxacin and caffeine in normal volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 33 (1989) pp. 474-478.
28. Héberger, K. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. Journal of Chromatography A. 1158/1–2 (2007) pp. 273-305.
29. Hooker, AC., M. Foracchia, MG. Dodds et al. An evaluation of population D-optimal designs via pharmacokinetic simulations. Ann. Biomed. Engin. 31 (2003) pp. 98-111
30. Hsieh, H. M. & JG. Dorsey. Accurate determination of log k'w in reversed-phase liquid chromatography: Implications for quantitative structure—retention relationships. J. Chromatogr 631 (1993) pp. 63 - 78.
31. Jelliffe, RW., A. Schumitzky et M. Van Guilder. User manual for version 10.6 of the USC*PACK collection of PC programs. Laboratory of Applied Pharmacokinetics. University of Southern California. School of Medicine, Los Angeles. (1995)
32. Kadlubar, F. F., G. Talaska, M. A. Butler et al. Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. Mutation and the Environment. Part B: Metabolism, testing methods and chromosomes. New York, Wiley-Liss. 340 (1990) pp. 107-114.
33. Kadlubar, FF. Biochemical individuality and its implications for drug and

carcinogen metabolism. Recent insights from acetyltransferase and cytochrome P4501A2 phenotyping and genotyping in humans. *Drug Metab. Dispos.* 26 (1994) pp. 37-46

34. Kot, M. and W. A. Daniel. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological Reports.* 60 (2008) pp. 789–797

35. Kuhnz, W. & H. Nau. Automated high-pressure liquid chromatographic assay for antiepileptic drugs and their major metabolites by direct injection of serum samples. *Ther. Drug Monit.* 6/4 (1984) pp. 478-483.

36. Kushida, K. and T. Ishizaki. Concurrent determination of valproic acid with other antiepileptic drugs by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 338 (1985) pp. 131-139.

37. Kuz'min, V.E., A.V. Bogatsky, A.G. Artemenko, Eugene N. Muratov, P.G. Polischuk, L.N. Ognichenko, A.V. Liahovsky, A.I. Hromov and E.V. Varlamova. Virtual Screening and Molecular Design Based on Hierarchical Qsar Technology. Volume 8 of the series Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics. (2010) pp. 127-176.

38. Leary, R, R. Jelliffe, A. Schumitzky et al. A unified parametric/nonparametric approach to population PK/PD modeling. Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe. Paris. (2002).

39. May, D, C. Jarboe, A. VanBakel et al. Effects of cimetidine on caffeine disposition in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther.* 31 (1982) pp. 656-661.

40. Outinen, K., H. Vuorela and R. Hiltunen. Optimization of HPLC separation by computer-assisted optimization methods. Comparison of three methods. *Eur J Pharmaceut Sci.* 4 (1996) pp. 199 - 210.

41. Rodriguez-Aller, M., D. Guillarmea, A. Beck and S. Fekete. Practical method development for the separation of monoclonal antibodies and antibody-drug-conjugate species in hydrophobic interaction chromatography, part 1: optimization of the mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 118 (2016) pp. 393–403

42. Romanyshyn, L., J. Wichmann, N. Kucharczyk et al. Simultaneous Determination of Felbamate, Primidone, Phenobarbital, Carbamazepine, Two Carbamazepine Metabolites, Phenytoin, and One Phenytoin Metabolite in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit.* 16/1 (1994) pp. 90-99.

43. Rostami-Hodjegan, A., S. Nurminen, PR. Jackson, et al. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics.* 6 (1996) pp. 121-149

44. Schoenmakers, P.J. Optimization of chromatographic selectivity. Elsevier, Amsterdam. (1986).

45. Schrenk, D, D. Brockmeier, K. Mörike et al. A distribution study of CYP1A2 phenotypes among smokers and non-smokers in a cohort of healthy Caucasian volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 53 (1998) pp. 361-367.

46. Schumitzky, A. Nonparametric EM algorithms for estimating prior distributions. *Appl. Math. Comput.* 45 (1991) pp. 143-157.

47. Schweikl, H, JA. Taylor, S. Kitareewan et al. Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics.* 3 (1993) pp. 239-249

48. Shah, VP, KK. Midna, S. Dighe et al. Analytical methods validation:

Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: Sponsored by the American Association of Pharmaceutical Chemists, U.S. Food and Drug Administration, Fédération Internationale Pharmaceutique, Health Protection Branch (Canada) and Association of Official Analytical Chemists. *Inter J Pharmac.* 82/1-2 (1992) pp. 1 - 7.

49. Sheiner, LB. et SL. Beal. Some suggestions for measuring predictive performance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 9 (1981) p. 503-512.

50. Tam, V, S. Kabbara, R. Yeh et al. Impact of Sample Size on the Performance of Multiple-Model Pharmacokinetic Simulations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 50/11 (2006) pp. 3950–3952.

51. Temple, R. The clinical investigation of drug use by the elderly: Food and Drug guidelines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42 (1987) pp. 681-685

52. Terziivanov, D, I. Atanasova and V. Dimitrova. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in patients with liver impairments analyzed by NPEM2 algorithm – a retrospective study. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 36 (1998) pp. 376-382.

53. Terziivanov, D., K. Bozhinova, V. Dimitrova and I. Atanasova. Nonparametric Expectation Maximization (NPEM) Population Pharmacokinetic Analysis of Caffeine Disposition from Sparse Data in Adult Caucasians. Systemic Caffeine Clearance as a Biomarker for Cytochrome P450 1A2 Activity. *Clin Pharmacokinet.* 42 (2003) pp. 1393-1409.

54. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Validation of Analytical Procedures. 06.1997.

55. Van Gennip, AH., J. Grift, EJ. Van Bree-Blom et al. Urinary excretion of methylated purines in man and in the rat after the administration of theophylline. *J. Chromatogr.*, 163/4 (1979) pp. 351 - 362.

56. Vree, T.B. et al., Rapid determination of amoxycillin (clamoxy) and ampicillin (penbritin) in body fluids of many by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.).* 145 (1978) pp. 496-501.

57. Wilson, J., I. Watson, J. Williams et al. Primary standardization of assays for anticonvulsant drugs: comparison of accuracy and precision. *Clin Chem.* 48/11 (2002) pp. 1963-1969.

Приложение № 1. Експериментални данни, използвани за създаване на моделните уравнения за оптимизиране на ВЕТХ методика за едновременно определяне на натриев валпроат, фенитоин и карбамазепин.

	C_4H_8O [%]	CH_3O H [%]	CH_3CN [%]	0.1M фосфатен буфер [%]	k(PB)	k(NAVPA)	k(PHT)	k(CBZ)
100	38	0	0	62	5.42	4.39	1.39	6.56
010	0	30	0	70	2.43	2.09	4.78	5.78
001	0	0	48	52	1.65	2.42	4.62	4.09
811	30.4	3	4.8	61.8	4.20	3.71	1.57	6.13
118	3.8	3	38.4	54.8	2.68	2.82	3.92	5.34
181	3.8	24	4.8	67.4	2.72	2.88	4.48	6.56
631	22.8	9	4.8	63.4	3.74	3.74	2.10	6.63
613	22.8	3	14.4	59.8	3.60	3.90	1.93	6.25
361	11.4	18	4.8	65.8	3.34	3.69	3.17	6.78
316	11.4	3	28.8	56.8	2.89	3.50	2.89	6.35
163	3.8	18	14.4	63.8	2.72	2.94	4.86	6.88
136	3.8	9	28.8	58.4	2.41	2.92	4.40	6.05
433	15.2	9	14.4	61.4	3.16	4.05	2.65	6.40
343	11.4	12	14.4	62.2	3.58	3.58	3.19	6.78
334	11.4	9	19.2	60.4	3.12	3.68	3.12	6.73

Приложение № 2 Оптимизационни уравнения за предсказване капацитета на на фенобарбитал (i.s.), натриев валпроат, фенитоин и карбамазепин*. Графично представяне на наблюдения срещу предсказания чрез оптимизационния модел*

k(i.s.)

$$\ln k = 1.069088 + 0.000299\varphi_1^2 - 0.00011\varphi_2^2 - 0.00011\varphi_3^2 + 0.009084\varphi_1 - 0.00224\varphi_2 - 0.00428\varphi_3 + 0.000263\varphi_1\varphi_2 + 0.000242\varphi_1\varphi_3 + 0.000282\varphi_2\varphi_3 \quad (R^2 0.935)$$

k(NAVPA)

$$\ln k = 1.087208 + 0.000141\varphi_1^2 - 0.0002\varphi_2^2 - 0.000054\varphi_3^2 + 0.005961\varphi_1 - 0.0036\varphi_2 - 0.00148\varphi_3 + 0.001014\varphi_1\varphi_2 + 0.00041\varphi_1\varphi_3 + 0.000346\varphi_2\varphi_3 \quad (R^2 0.878)$$

k(PHT)

$$\ln k = 1.127762 - 0.00042\varphi_1^2 + 0.000239\varphi_2^2 + 0.0000821E-05\varphi_3^2 + -0.01371\varphi_1 + 0.007619\varphi_2 + 0.003809\varphi_3 - 0.00053\varphi_1\varphi_2 - 0.00071\varphi_1\varphi_3 + 0.000839\varphi_2\varphi_3 \quad (R^2 0.994)$$

k(CBZ)

$$\ln k = 1.736805 + 0.0000415\varphi_1^2 - 0.0000033\varphi_2^2 - 0.000077\varphi_3^2 + 0.00209\varphi_1 + 0.0015\varphi_2 - 0.00224\varphi_3 + 0.000274\varphi_1\varphi_2 + 0.000305\varphi_1\varphi_3 + 0.000636\varphi_2\varphi_3 \quad (R^2 0.891)$$

* - φ_1 – обемна част на органичен разтворител тетраhydroфуран; φ_2 - обемна част на органичен разтворител ацетонитрил; φ_3 обемна част на органичен разтворител метанол.

Приложение № 3. Данни за доверителните интервали на всяка точка от калибрационните криви.

	Площ на анализирано съединение/Площ на i.s. ± SD							
Съединени е								
NAVPA				0.005± 0.0001	0.021±0.0003	0.056± 0.007	0.118± 0.001	0.177 ± 0.001
PHТ	0.064 ± 0.001	0.081 ±0.002	0.112±0.006	0.348 ± 0.012	0.639 ± 0.001	1.896± 0.028	3.698± 0.035	5.484± 0.013
CBZ	0.042 ± 0.001	0.051±0.001	0.079±0.003	0.27 ± 0.012	0.531 ± 0.003	1.602 ±0.015	3.127± 0.042	4.727 ± 0.023

Данните са средна стойност (n = 5) на отношението площ на пик на изседвано съединение към площ на пик на вътерешен стандарт.

Приложение № 4. Експериментални данни, използвани за създаване на моделите за оптимизиране на ВЕТХ методика за определяне на кофеин и първичните му метаболити в биологични течности при хора и плъхове.

	C_4H_8O [%]	CH_3OH [%]	CH_3CN [%]	0.1M CH_3COOH [%]	k(TB)	k(AAP)	k(PX)	k(TP)	k(CA)
811	1.35	0.65	1.65	96.35	1.35	1.75	1.94	2.09	2.74
181	0.167	5.3	1.65	92.88	1.44	1.33	2.02	2.02	2.92
118	0.167	0.67	13.33	85.83	1.33	1.57	1.90	2.00	2.85
631	1	2	1.7	95.30	1.38	1.68	1.96	2.09	2.80
361	0.5	4	1.67	93.83	1.40	1.59	1.98	2.04	2.88
316	0.5	0.65	10	88.85	1.35	1.44	1.91	2.03	2.79
613	1	0.67	5	93.33	1.24	1.54	1.83	1.97	2.64
136	0.17	2	10	87.83	1.46	1.38	1.94	2.02	2.89
343	0.5	2.66	5	91.84	1.32	1.52	1.92	2.02	2.78
334	0.5	2	6.67	90.83	1.43	1.58	2.01	2.12	2.88
433	0.67	2	5	92.33	1.44	1.66	2.02	2.14	2.86
010	0	6.67	0	93.33	1.40	1.53	1.96	1.96	2.92
100	1.67	0	0	98.33	1.25	1.73	1.86	2.02	2.64
001	0	0	16.67	83.33	1.41	1.20	1.95	2.04	1.11

Приложение № 5. Оптимизационни уравнения за предсказване капацитета на теобромин, 4-ацетамидофенол, параксантин, теофили и кофеин*.

k(TB)

$$\ln k = 4675.95\varphi_1^2 + 295.376\varphi_2^2 + 47.28\varphi_3^2 - 15630.25\varphi_1 - 3928.34\varphi_2 - 1571.47\varphi_3 + 13062.49 + 2350.62\varphi_1\varphi_2 + 940.31\varphi_1\varphi_3 + 236.32\varphi_2\varphi_3$$

(R² 0.8731)

k(AAP)

$$\ln k = -5105.74\varphi_1^2 - 324.59\varphi_2^2 - 52.00\varphi_3^2 + 17144.64\varphi_1 + 4322.82\varphi_2 + 1730.22\varphi_3 - 14390.67 - 2574.77\varphi_1\varphi_2 - 1030.55\varphi_1\varphi_3 - 259.85\varphi_2\varphi_3$$

(R² 0.9265)

k(PX)

$$\ln k = 2818.60\varphi_1^2 + 179.22\varphi_2^2 + 28.89\varphi_3^2 - 9452.73\varphi_1 - 2383.61\varphi_2 - 956.95\varphi_3 + 7927.12 + 1421.56\varphi_1\varphi_2 + 570.73\varphi_1\varphi_3 + 143.90\varphi_2\varphi_3$$

(R² 0.7814)

k(TP)

$$\ln k = 2527.58\varphi_1^2 + 160.85\varphi_2^2 + 25.94\varphi_3^2 - 8477.40\varphi_1 - 2138.57\varphi_2 - 858.88\varphi_3 + 7110.11 + 512.20\varphi_1\varphi_2 + 1275.32\varphi_1\varphi_3 + 129.20\varphi_2\varphi_3$$

(R² 0.7817)

k(CAF)

$$\ln k = -49275.69\varphi_1^2 - 3137.27\varphi_2^2 - 502.04\varphi_3^2 + 165243.1\varphi_1 + 41694.86\varphi_2 + 16679.15\varphi_3 - 138528.3 - 9947.72\varphi_1\varphi_2 - 24868.04\varphi_1\varphi_3 - 2509.90\varphi_2\varphi_3$$

(R² 0.9320)

* - φ_1 – обемна част на органичен разтворител тетраhydroфуран; φ_2 - обемна част на органичен разтворител ацетонитрил; φ_3 обемна част на органичен разтворител метанол.

Приложение № 6. Данни за доверителните интервали на всяка точка от калибрационните криви и съответните корелационни коефициенти.

Съединение	Концентрация на анализирано съединение/ Концентрация на вътрешен стандарт						
	0.022 ± SD	0.1 ± SD	0.2 ± SD	0.4 ± SD	1 ± SD	4 ± SD	10 ± SD
ТВ	0.20* ± 0.038	0.64 ± 0.035	1.08 ± 0.055	2.08 ± 0.071	5.47 ± 0.816	21.10 ± 2.359	51.47 ± 6.15
РХ	0.11 ± 0.008	0.42 ± 0.030	0.73 ± 0.030	1.57 ± 0.051	3.87 ± 0.326	16.03 ± 1.48	43.77 ± 2.486
ТР	0.17 ± 0.012	0.55 ± 0.054	0.94 ± 0.041	2.07 ± 0.270	5.01 ± 0.304	21.32 ± 0.028	54.27 ± 2.614
САФ	0.11 ± 0.010	0.43 ± 0.052	0.81 ± 0.066	1.67 ± 0.250	4.35 ± 0.324	19.24 ± 1.362	49.60 ± 2.766

* - средна стойност ($n = 5$) на отношението площ на пик на изследвано съединение към площ на пик на вътрешен стандарт.

Приложение № 7. Получени данни за бели мъжки плъхове порода Wistar

№	Час на вземане на пробата [h]	Тегло на плъх [gr]	Доза [mg]	TB [mg/L]	PX [mg/L]	TP [mg/L]	CAF [mg/L]
1.	0.5	265	1.325	0.13	0.17	0.07	2.05
2.	0.5	260	1.300	0.11	0.20	0.11	4.07
3.	1	300	1.500	0.36	0.58	0.26	3.76
4.	1	275	1.375	0.17	0.21	0.09	5.44
5.	2	320	1.600	0.37	0.55	0.31	4.03
6.	2	305	1.525	0.29	0.40	0.15	3.67
7.	3	260	1.300	0.70	1.02	0.60	2.76
8.	3	260	1.300	0.71	0.93	0.51	2.57
9.	4	280	1.400	0.64	0.68	0.43	2.13
10.	4	280	1.400	0.70	0.80	0.48	2.33
11.	5	285	1.425	1.03	0.90	0.66	1.55
12.	5	300	1.500	1.25	1.12	0.82	1.93
13.	6	305	1.525	0.91	0.68	0.56	1.5
14.	6	265	1.325	0.74	0.68	0.52	0.52
15.	7	300	1.500	0.56	0.36	0.40	0.15
16.	7	295	1.475	0.85	0.67	0.59	0.39
17.	8	240	1.200	0.46	0.25	0.36	0.11
18.	8	270	1.350	0.72	0.54	0.47	0.32
19.	9	265	1.325	0.74	0.60	0.44	0.47
20.	9	260	1.300	0.73	0.46	0.45	0.39
21.	10	305	1.525	0.45	0.28	0.37	0.22
22.	10	300	1.500	0.36	0.04	0.20	0.07
23.	10	295	1.475	0.61	0.27	0.36	0.16

24.	11	280	1.400	0.27	0.09	0.16	< LOQ
25.	11	290	1.450	0.29	0.05	0.19	< LOQ
26.	12	280	1.400	0.42	< LOQ	0.36	0.19
27.	12	260	1.300	0.30	< LOQ	0.18	< LOQ
28.	12	290	1.450	0.10	< LOQ	0.04	< LOQ
29.	24	270	1.350	0.07	< LOQ	0.08	< LOQ
30.	24	295	1.475	0.060	< LOQ	0.04	< LOQ
31.	24	310	1.55	0.08	< LOQ	0.04	< LOQ

Приложение № 8. Зависимост на капацитета от процентното съдържание на ацетонитрил в подвижната фаза.

Полиномни уравнения от втора степен, описващи зависимостта:

$$\text{Log } k' = a_0 + a_1 \cdot Q + a_2 \cdot Q^2$$

	3U	7U	7X	1U	3X	37U	1X	13U	ТВ	17U	РХ	ТР
a₀	1.00	1.16	1.25	1.27	1.34	1.41	1.47	1.73	0.80	2.40	2.41	2.41
a₁	-0.38	-0.31	-0.30	-0.29	-0.30	-0.29	-0.33	-0.33	-0.34	-0.60	-0.57	-0.56
a₂	0.05	0.037	0.027	0.025	0.026	0.023	0.032	0.030	0.030	0.068	0.064	0.063
R	0.98	0.994	0.995	0.994	0.995	0.992	0.996	0.995	0.996	1.00	1.00	1.00

Приложение № 9. Данни за доверителните интервали на всяка точка от калибрационните криви и съответните корелационни коефициенти.

Концентрация [mg/l]										
	0.15	0.6	1	2.5	5	10	12.5	25	50	r
3U	0.012 [*] ±0.004 ^{**}	0.03±0.009	0.07±0.01	0.22±0.01	0.5±0.09	0.9±0.15				0.999
7U	0.011±0.003	0.04±0.004	0.08±0.01	0.28±0.02	0.56±0.1	1.08±0.3				0.999
7X	0.027±0.003	0.05±0.002	0.13±0.01	0.39±0.02	0.86±0.03		3.86±0.62	7.91±0.7	14.22±1.31	0.994
1U	0.002±0.0001	0.04±0.003	0.05±0.008	0.25±0.02	0.57±0.05	1.0±0.3		2.76±0.2		0.986
3X	0.034±0.004	0.11±0.005	0.2±0.01	0.52±0.01	1.09±0.04		4.9±0.6	10.37±1.04	18.98±1.24	0.995
37U	0.015±0.003	0.08±0.001	0.11±0.02	0.32±0.01	0.64±0.04		3.13±0.56	5.86±0.5	7.01±1.27	0.982
1X	0.025±0.005	0.1±0.009	0.14±0.02	0.37±0.02	0.77±0.03		3.85±0.49	7.97±0.5	16.04±0.8	0.995
13U	0.012±0.003	0.08±0.016	0.12±0.01	0.33±0.02	0.73±0.006		3.6±0.49	6.66±0.66	11.7±0.97	0.992
ТВ	0.032±0.004	0.13±0.003	0.18±0.008	0.5±0.01	1.09±0.04		5.21±0.47	10.85±1.01	22.9±0.6	0.995
17U	0.022±0.002	0.08±0.01	0.12±0.02	0.36±0.03	0.78±0.05		4.01±0.5	7.7±0.5	12.4±1.5	0.987
PX	0.016±0.004	0.07±0.005	0.14±0.01	0.39±0.04	0.82±0.07		4.0±0.25	9.3±1.0	17.25±1.7	0.994
TP	0.029±0.002	0.11±0.007	0.18±0.006	0.48±0.02	1.02±0.02		4.92±0.3	10.9±0.67	20.8±0.39	0.995
137U	0.020±0.002	0.09±0.002	0.13±0.003	0.33±0.01	0.64±0.06	1.4±0.07	3.27±0.2	7.34±0.49	14.13±0.4	0.995
CAF	0.03±0.004	0.13±0.03	0.17±0.008	0.45±0.02	0.98±0.04	1.98±0.1	4.68±0.32	9.86±0.69	19.55±0.68	0.995

* - средна стойност ($n = 5$) на отношението площ на пик на изследвано съединение към площ на пик на вътрешен стандарт (A_c/A_{is})

** - доверителен интервал при 95% вероятност

Приложение № 10. Демографски и клинични данни за участниците и индивидуалните стойности на системния кофеинов клирънс, CLS1, подредени по нарастващ ред.

№	Пол*	Възраст**	Височина (cm)	Тегло (kg)	Кретининов клирънс (ml/min/1.73m ²)	Цигари за ден	Консумацията на концентриран алкохол	Комедикация	Час на вземане (h) на кофеинови плазмени концентрации (mg.L ⁻¹)	CLS1 (ml.h ⁻¹ .kg ⁻¹)
34	Ж	56	165	47	10.55	10	Не пие	Ципрофлоксацин Диклофенак	2; 6 [16.09; 14.09]	2.53
01	М	58	170	83	81.59	Не пуши	0.5L/седмично	Витамини	4; 8 [2.23;3.32]	7.58
14	М	45	176	90	100.91	Не пуши	0.05L/дневно	Няма	0.5; 3 [0.27; 3.38]	7.82
18	Ж	24	165	66	131.26	Не пуши	Не пие	Няма	0.5; 3 [0.28; 5.44]	9.09
15	М	19	189	80	98.68	Не пуши	Не пие	Атенолол	0.5; 3 [0.10; 2.78]	12.50
23	Ж	24	167	65	152.36	10	Не пие	Няма	0.5; 3 [0.09; 3.60]	12.53
31	М	32	164	56.5	29.21	Не пуши	Не пие	Фамотидин	0.5; 3 [0.05; 2.36]	17.50
13	Ж	41	160	62	133.42	Не пуши	Не пие	Няма	0.5; 3 [1.38; 6.48]	42.50
17	Ж	60	160	114	124.62	Не пуши	Не пие	Няма	2; 6 [9.36; 4.63]	42.50
21	Ж	26	158	45	127.74	15	Не пие	Няма	10; 24 [1.8; 0.07]	42.50
22	Ж	28	161	78	92.95	Не пуши	0.02L/дневно	Еналаприл	10; 24 [2.05; 0.70]	47.50
26	М	43	181	107	121.87	Не пуши	Не пие	Атенолол Диклофенак	2; 6 [4.81; 4.27]	47.50
07	М	18	187	78.5	92.43	2-3	1L/седмично	Пропранолол	1; 7 [5.85; 2.78]	47.52
06	Ж	47	148	55.85	119.20	1-2	0.15L/седмично	Няма	4; 8 [4.39; 3.19]	47.60
10	Ж	25	164	55	142.91	Не пуши	Не пие	Няма	4 [3.95]	48.25
02	М	41	179	96.5	126.46	5-6	~0.2L/дневно	Няма	4; 8 [4.10;2.45]	48.29
11	М	40	176	83	111.24	Не пуши	0.05-0.1L/дневно	Няма	4; 8 [5.26; 2.78]	51.92
12	Ж	44	156	49.5	102.07	Не пуши	Не пие	Няма	1; 7 [7.89; 2.66]	57.04
05	Ж	18	172	72	103.46	Не пуши	Не пие	Няма	1; 7 [4.89; 2.21]	76.75
19	М	18	163	77	175.70	Не пуши	Не пие	Няма	10; 24 [1.51; 0.19]	77.79
09	М	39	176	95.2	78.88	Не пуши	1L/вино/месечно	Няма	1; 7 [3.90; 1.89]	87.49
33	Ж	38	160	64	41.17	10-15	Не пие	Еналаприл	2; 6 [3.32; 2.17]	88.57
08	М	22	180	74	105.54	3-4/седмично	Не пие	Няма	4; 8 [2.76; 1.55]	88.69
28	М	25	176	91.4	43.87	20	0.15L/месечно	Няма	1; 7 [6.57; 1.27]	102.50
03	Ж	40	167	67	102.56	Не пуши	0.5Lбира/10дни	Няма	4; 8 [2.69; 1.14]	127.06
20	Ж	23	175	98	196.92	17	Не пие	Няма	10; 24 [0.86; 0.04]	127.55
24	Ж	23	168	50	107.13	Не пуши	Не пие	Няма	0.5; 3 [1.53; 2.66]	127.55

32	М	28	186	72	22.00	5	Не пие	Няма	10; 24 [0.68; 0.08]	142.28
04	Ж	41	160	50	131.91	Не пуши	0.05L/2седмици	Няма	1; 7 [3.01; 1.28]	142.78
29	Ж	37	174	75	52.14	Не пуши	Не пие	Еналаприл Преднизон	4; 8 [2.07; 0.80]	144.40
25	М	51	172	70	107.93	20	0.1L/дневно	Няма	2; 6 [2.26; 0.78]	212.59
30	М	62	167	63	59.38	20	0.3L/дневно	Еналаприл	10; 24 [0.42; 0.06]	247.75
16	Ж	27	167	57.5	138.25	Не пуши	Не пие	Няма	0.5; 3 [3.88; 1.48]	272.06
27	М	24	180	69	116.74	20	0.05L/дневно	Няма	2; 6 [2.06; 0.40]	272.50

* М = Мъж и Ж = Жена; ** възрастта е за последния рожден ден в години

Списък на публикациите:

1. Terziivanov, D., K. Bozhinova, V. Dimitrova and I. Atanasova. Nonparametric Expectation Maximization (NPEM) Population Pharmacokinetic Analysis of Caffeine Disposition from Sparse Data in Adult Caucasians. Systemic Caffeine Clearance as a Biomarker for Cytochrome P450 1A2 Activity. *Clin Pharmacokinet.* 42 (2003) p. 1393-1409. (I. F. 4.01)
2. Bozhinova, K., I. Atanasova and D. Terziivanov. Application of population pharmacokinetic analysis in experimental pharmacology. *Annual of SU St. Kliment Ohridski, Medical Faculty*, v.2 (in press).
3. Божинова, К., Д. Терзииванов. Количествена оценка на лекарствени концентрации в биологични течности за целите на популационния фармакокинетичен анализ. I. Доказване валидността на ВЕТХ метод за едновременно определяне на кофеин и неговите първични метаболити в кръв и урина. *Analyt Lab.* 6/3 (1997) стр. 142-148.

Забелязани цитати:

1. Jordan, S.D., Stone, M.D., Alexander, E., Haley, J., McKee, A. Patient case: Impact of smoking cessation on international normalized ratio. *Journal of Pharmacy Practice.* 27/5 (2014) pp. 470-473
2. Plowchalk, D.R., Rowland Yeo, K. Prediction of drug clearance in a smoking population: Modeling the impact of variable cigarette consumption on the induction of CYP1A2. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 68/6 (2012) pp. 951-960
3. Uney, K., Tumer, I., Traş, B. Measurements of caffeine and plasma metabolite/caffeine ratios as a test for hepatic drug-oxidizing capacity in goats. *Xenobiotica.* 41/7 (2011) pp. 585-592
4. Uney, K., Traş, B. Comparative pharmacokinetics and metabolisms of caffeine in sheep breeds. *Journal of Veterinary Medical Science.* 73/1 (2011) pp. 25-31
5. Song, J., Park, K.U., Park, H.D., Yoon, Y., Kim, J.Q. High-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for plasma theophylline and its metabolites. *Clinical Chemistry.* 50/11 (2004) pp. 2176-2179

Участия в национални и международни конгреси, симпозиуми, конференции и семинари

1. Bozhinova, K. and N. Dimov. Modeling of caffeine methabolites retention on reversed phase HPLC. Second International Workshop, September 18-20, 1997, Blagoevgrad.
2. Bozhinova, K. Bioequivalence as a bioanalytical problem. Workshop "Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling", 2004, Sofia.

3. Terziivanov D. and K. Bozhinova. Application of Population Pharmacokinetic Analysis and Monte Carlo Simulations Method in Drug Phenotyping. Assessment of Cytochrome P450 1A2 Activity in a Population of Adult Non-Related Caucasians from Sparse Data. EHRLICH II –2nd World Conference on Magic Bullets Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich. Nürnberg, October 3-5, 2008. Abstract Book 2008.