



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**“Modelli non lineari ad effetti misti della farmacocinetica della
piperacillina in pazienti ricoverati in terapia intensiva con e senza terapia
renale sostitutiva”**

Relatrice: Prof.ssa Chiara Dalla Man

Correlatore: Dott. Edoardo Faggionato

Laureanda: Martina Casiraghi

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Data di laurea 03/07/2024

Sommario

Un trattamento antibiotico mirato ed efficace è di vitale importanza per i pazienti ricoverati in terapia intensiva. Le loro gravi condizioni cliniche, spesso in rapida evoluzione, possono compromettere il successo terapeutico della terapia antibiotica. Al centro di questo studio vi è la piperacillina, antibiotico frequentemente utilizzato per combattere le infezioni nei pazienti critici.

L'obiettivo della tesi è lo sviluppo di un modello della cinetica di questo farmaco, utile ad ottimizzare la terapia antibiotica, personalizzandola in base alle condizioni specifiche del paziente, al fine di ottenere la concentrazione terapeutica desiderata. Ciò è fondamentale per migliorare il trattamento delle infezioni nosocomiali nei soggetti critici e ridurre la mortalità ad esse associata, oltre a limitare l'insorgenza di resistenze batteriche agli antibiotici, una delle maggiori problematiche della medicina moderna.

Mediante il software Monolix, sono stati sviluppati modelli non lineari ad effetti misti per analizzare l'andamento della concentrazione plasmatica di questo farmaco nel tempo. Il modello finale, costruito a partire dai dati di 119 soggetti estratti dalla cartella clinica elettronica MargheritaTre, è un modello mono-compartmentale che calcola la clearance del farmaco come somma del contributo della clearance propria del paziente, determinata dalla creatinina serica, e della clearance extracorporea, legata alle terapie renali sostitutive. La variabilità residua, definita a priori, è modellata tramite la combinazione di un termine costante e di un termine proporzionale alla concentrazione misurata. Per fornire una stima della variabilità inter-individuale, il modello include i parametri clinici che influenzano la cinetica della piperacillina: la pressione arteriosa media e il pH ematico sulla clearance e la bilirubina totale sul volume di distribuzione. Questo modello potrà essere incluso in un simulatore farmacocinetico integrato nella cartella clinica elettronica che rappresenterà un passo avanti verso la medicina di precisione, fornendo ai medici suggerimenti in tempo reale per adattare le dosi di piperacillina al paziente specifico.

Abstract

A targeted and effective antibiotic treatment is of vital importance for patients admitted to intensive care. Their severe clinical conditions, often rapidly evolving, can compromise the therapeutic success of antibiotic therapy. One powerful antibiotic drug is piperacillin, an antibiotic frequently used to combat infections in critical patients.

The aim of the thesis is the development of a model of the kinetics of this drug, useful for optimizing antibiotic therapy, personalizing it based on the specific conditions of the patient, in order to achieve the desired therapeutic concentration. This is fundamental to improve the treatment of nosocomial infections in critical subjects and reduce the mortality associated with them, as well as to limit the onset of bacterial resistance to antibiotics, one of the major problems of modern medicine.

Nonlinear mixed-effects models have been developed to analyze the trend of the plasma concentration of this drug over time, using the Monolix software. The final model, built from the data of 119 subjects extracted from the MargheritaTre electronic medical record, is a single-compartment model that calculates the clearance of the drug as the sum of the contribution of the patient's own clearance, determined by serum creatinine, and extracorporeal clearance, linked to renal replacement therapies. The residual variability is modeled through the combination of a constant term and a term proportional to the measured concentration. To provide an estimate of inter-individual variability, the model includes the clinical parameters that influence the kinetics of piperacillin: mean arterial pressure and blood pH on clearance and total bilirubin on the volume of distribution. This model can be included in a pharmacokinetic simulator integrated into the electronic medical record, which will represent a step forward towards precision medicine, providing doctors with real-time suggestions to adapt the doses of piperacillin to the specific patient.

Indice

.....	0
Sommario	2
Abstract	3
1. Introduzione	6
1.1 Piperacillina.....	7
1.2 Principi di farmacocinetica.....	8
1.2.1 Assorbimento.....	8
1.2.2 Distribuzione.....	9
1.2.3 Metabolismo	11
1.2.4 Eliminazione	12
1.3 Terapia sostitutiva renale.....	13
1.4 Alterazioni della farmacocinetica nei pazienti critici.....	17
1.5 Modelli di farmacocinetica della piperacillina	19
1.6 Scopo della tesi.....	20
2. Dataset e pre-elaborazione dei dati	22
2.1 Protocollo	22
2.2 Pre-elaborazione dei dati.....	25
2.3 Selezione del dataset	28
3. Modelli	30
3.1 Modelli non lineari ad effetti misti.....	30
3.2 Monolix	32
3.3 Sviluppo del modello.....	33
3.3.1 Modello strutturale.....	33
3.3.2 Modello d'errore	40
3.3.3 Modello stocastico	41
3.3.4 Modello delle covariate	42
3.4 Valutazione e confronto dei modelli	43
3.4.1 Analisi dei residui	43
3.4.2 Precisione delle stime	44
3.4.3 VPC.....	45
3.4.4 Stima della verosimiglianza e criteri di parsimonia	46
3.5 Strategia di sviluppo del modello.....	47

3.6 Applicazione del modello al dataset completo	48
4. Risultati	50
4.1 Selezione del modello d'errore	50
4.2 Sviluppo del modello strutturale	52
4.2.1 Modello mono-compartimentale	52
4.2.2 Modello bi-compartimentale	53
4.3 Sviluppo del modello stocastico	54
4.4 Sviluppo del modello delle covariate	55
4.5 Risultati del modello migliore	57
4.6 Applicazione del modello finale sul dataset completo	60
5. Discussione	62
5.1 Sintesi del progetto	62
5.2 Risultati del modello finale	63
5.3 Interpretazione clinica dei risultati	64
5.4 Limitazioni del progetto e prospettive future	65
6. Conclusioni	67
Bibliografia	68

1. Introduzione

I pazienti ricoverati in terapia intensiva presentano condizioni cliniche estremamente gravi e sono soggetti a cambiamenti repentini ed imprevedibili. Le infezioni contratte in questi reparti, costituiscono una delle principali cause di decesso, data la notevole vulnerabilità di questi pazienti. Negli ultimi anni, si è assistito ad un incremento sia del numero che della gravità delle infezioni, con tassi di mortalità estremamente alti [1, 2]. Il rischio del paziente di contrarre l'infezione durante la degenza in terapia intensiva è legato all'utilizzo di pratiche particolarmente invasive, tra cui accessi intravascolari, cateteri vescicali e intubazione profonda [3]. Per questo motivo, questi pazienti necessitano di una diagnosi tempestiva e di un trattamento antibiotico mirato ed efficace. Nonostante ciò, nella pratica clinica quotidiana, si è ancora lontani dal dosaggio ottimale per questa popolazione di pazienti, principalmente a causa delle alterazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche determinate dallo stato patologico e dalle terapie a cui è sottoposto l'individuo. Questi fattori, infatti, possono modificare le velocità di distribuzione ed eliminazione compromettendo il successo della terapia antibiotica. In particolare, una bassa esposizione al farmaco potrebbe favorire lo sviluppo di ceppi batterici resistenti, al contrario un sovradosaggio aumenterebbe il rischio di tossicità [1]. Pertanto, è opportuno effettuare degli aggiustamenti posologici che tengano conto di queste variazioni al fine di ottimizzare l'uso degli antibiotici in questo contesto.

La scelta di un trattamento personalizzato nel caso di pazienti in terapia intensiva non è per nulla semplice ed immediata. Il medico deve considerare, nel minor tempo possibile, i molteplici fattori che potrebbero incidere sulla riuscita della terapia. Prime tra tutte, le caratteristiche antropometriche e demografiche del paziente e in che modo esse influenzano la concentrazione del farmaco all'interno dell'organismo. In secondo luogo, la particolare condizione patologica che ha causato il ricovero del paziente, la somministrazione combinata di altri farmaci, la presenza di comorbidità o insufficienze d'organo e l'applicazione di trattamenti accessori, come l'emodialisi e l'emofiltrazione, sono tutti fattori che possono alterare l'efficacia degli antibiotici utilizzati [1, 2]. Data la complessità dell'analisi preliminare, spesso il medico si affida all'adozione di regimi di dosaggio standard. Tuttavia, la scelta di tali protocolli si è spesso rivelata inadeguata nel trattare queste tipologie di pazienti [4, 5].

1.1 Piperacillina

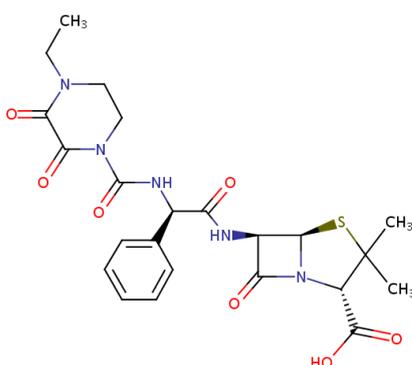


Figura 1. 5: Rappresentazione della struttura chimica della Piperacillina.

La Piperacillina è un antibiotico appartenente alla classe dei β -lattamici, del gruppo delle penicilline [2]. Viene generalmente somministrato in concomitanza con il Tazobactam, un inibitore della β -lattamasi, per inibirne la degradazione enzimatica [4]. Questo farmaco ha mostrato un'attività antibatterica ad ampio spettro contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi ed è ben tollerato dai pazienti fragili, con una percentuale di eventi avversi intorno al 2% dei pazienti [1]. Per tali ragioni, è uno degli antimicrobici più comunemente utilizzato nei reparti di terapia intensiva per il trattamento delle infezioni, tra cui sepsi, polmonite e infezioni intra-addominali. L'attività antibatterica dei β -lattamici è tempo-dipendente, ovvero la loro efficacia è correlata al tempo per il quale la concentrazione plasmatica di farmaco non legato è maggiore della concentrazione minima inibitoria ($FL > MIC$), durante il periodo di somministrazione. Per la piperacillina/tazobactam il mantenimento di $FL > MIC$ per almeno il 50% del tempo è associata ad esiti clinici favorevoli, ma nei pazienti critici potrebbero essere necessari obiettivi più elevati [1, 2, 6]. Secondo la pratica standard, la piperacillina viene somministrata per via parenterale, mediante bolo intermittente. È stato dimostrato che dosaggi più frequenti e l'adozione di infusione prolungata o continua possano migliorare l'efficacia complessiva del farmaco [4]. Ciononostante, il 20% dei pazienti sottoposti a tali regimi presenta ancora un'esposizione non ottimale a tale antibiotico [1]. I β -lattamici sono farmaci idrofilici, ovvero dissolvono facilmente in acqua e si distribuiscono prevalentemente nel flusso ematico e nello spazio interstiziale. Per questo motivo sono fortemente influenzati dai cambiamenti fisiologici osservati nei pazienti critici. L'eliminazione di questa molecola si verifica prevalentemente a livello renale ed è quindi alterata nei pazienti con insufficienza renale e sottoposti a trattamenti di depurazione extracorporea.

1.2 Principi di farmacocinetica

Il successo di una terapia farmacologica è legato alla correttezza della diagnosi e al regime di dosaggio scelto. Una volta selezionato il farmaco da utilizzare, devono essere opportunamente impostate la dose, la modalità, la frequenza e la durata della somministrazione. Quando si introduce un farmaco all'interno del corpo, si richiede di raggiungere adeguate concentrazioni della sostanza nel flusso sanguigno, durante tutto il periodo di trattamento. L'intervallo di concentrazioni per cui si ha l'effetto desiderato è chiamato range terapeutico. Se il dosaggio del farmaco è troppo basso, esso risulterà inefficace, incrementando il rischio di sviluppo di resistenza antimicrobica; viceversa, se la sua concentrazione supera una certa soglia potrebbero insorgere degli effetti collaterali e persino diventare tossico per l'organismo.

Una volta introdotta la sostanza all'interno dell'organismo, essa va incontro a una serie di processi fisiologici che determinano il profilo temporale della sua concentrazione plasmatica. Questi sono in ordine: assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione. Le cinetiche del farmaco attraverso queste quattro fasi sono descritte dalla farmacocinetica, la branca della farmacologia, il cui scopo è quello di prevedere con ragionevole accuratezza l'andamento temporale delle concentrazioni dei farmaci al fine di mantenere la concentrazione all'interno del range terapeutico.

1.2.1 Assorbimento

L'assorbimento di un farmaco è il processo che descrive il trasferimento del farmaco dal luogo in cui viene somministrato fino al suo ingresso nel sistema circolatorio. Esistono diverse modalità di assorbimento:

- Assorbimento istantaneo: il farmaco è introdotto direttamente nel flusso sanguigno, viene assorbito in un arco di tempo infinitesimale ed è, quindi, disponibile immediatamente per l'azione terapeutica. Un esempio tipico è l'iniezione endovenosa tramite bolo;
- Assorbimento di ordine zero: il farmaco viene assorbito con una velocità costante, in un dato intervallo. Ciò significa che una quantità fissa del farmaco entra nel sistema circolatorio per unità di tempo, indipendentemente dalla concentrazione rimanente del farmaco. Questo tipo di assorbimento viene ad esempio osservato quando il farmaco viene somministrato attraverso una infusione endovenosa continua;
- Assorbimento di primo ordine: il farmaco viene assorbito con una velocità direttamente proporzionale alla sua concentrazione. Matematicamente, questo può essere espresso come:

$$v = k \cdot C \quad (1.1)$$

dove v rappresenta la velocità di assorbimento, k è la costante di proporzionalità, e C è la concentrazione del farmaco. La maggior parte dei farmaci segue questo tipo di cinetica di assorbimento, con una velocità che diminuisce man mano che la concentrazione del farmaco si riduce, fino a quando tutto il farmaco non è stato del tutto assorbito [7].

La scelta del metodo di somministrazione e la comprensione della cinetica di assorbimento sono fondamentali per garantire che il farmaco raggiunga la concentrazione terapeutica.

Questa Tesi tratterà solo farmaci iniettati per via endovenosa e che quindi non presentano la fase di assorbimento. Quest'ultima è la via di somministrazione preferenziale nei pazienti critici, in quanto presentano accessi vascolari e le pompe di infusione utilizzate in terapia intensiva permettono di controllare il dosaggio e la velocità di infusione dei farmaci con precisione. Ciò semplifica di molto le analisi farmacocinetiche dal punto di vista matematico e statistico e rende i risultati più affidabili, in quanto la concentrazione del farmaco non è dipendente dalla durata e dalla velocità dell'assorbimento [3].

1.2.2 Distribuzione

La distribuzione è il trasferimento reversibile del farmaco dal flusso sanguigno ai vari tessuti del corpo, per raggiungere il sito d'azione e successivamente quelli di metabolismo ed eliminazione. I vari distretti corporei (ovvero organi, tessuti e fluidi) scambiano il loro contenuto con l'esterno attraverso le membrane. Il passaggio del composto dal plasma, al liquido interstiziale e quello intracellulare dipende dal trasporto attraverso le membrane capillari e cellulari, ed è influenzato dalla portata ematica, dalla permeabilità del letto vascolare, dall'affinità biologica del farmaco (es. presenza di recettori specifici), dalla sua solubilità, dal pH dell'ambiente e dal suo legame con alcune molecole dell'organismo [8]. In particolare, il legame del farmaco ad alcune proteine plasmatiche, come l'albumina, può costituire un ostacolo al suo transito attraverso la membrana. La capacità di una molecola di diffondere nei vari distretti corporei viene riassunta dal parametro farmacocinetico del volume di distribuzione (V_d). Esso esprime la tendenza di un determinato farmaco a rimanere nel plasma o a ridistribuirsi in altri compartimenti tissutali ed è definito come:

$$V_d = \frac{Q(t)}{C_p(t)} \quad (1.2)$$

dove Q è la quantità totale di un farmaco nel corpo e C_p la sua concentrazione plasmatica. Nel caso di farmaci somministrati per via endovenosa, dove l'assorbimento è completo e pressoché immediato, tale formula si può riscrivere come:

$$Vd = \frac{D}{C_p(0)} \tag{1.3}$$

dove D è la dose di farmaco somministrata e $C_p(0)$ è la sua concentrazione plasmatica immediatamente dopo la somministrazione.

Dal punto di vista clinico, il Vd è importante per il calcolo della dose di carico di un farmaco, ovvero per stimare la dose necessaria a raggiungere una data concentrazione plasmatica in un tempo limitato, infatti, il Vd influisce principalmente sulla concentrazione di picco [9]. In particolare:

- Per farmaco con Vd elevato, che tende a migrare dal plasma ai compartimenti extravascolari del corpo, è necessaria una dose maggiore per raggiungere una determinata concentrazione plasmatica;
- Al contrario, per un farmaco con Vd ridotto, che ha una propensione a rimanere nel plasma, è sufficiente una dose inferiore per raggiungere la stessa concentrazione plasmatica.

Trattandosi di un parametro teorico, Vd può essere notevolmente superiore alla somma del volume dei diversi compartimenti corporei [4]. Per spiegare questo concetto, si consideri il volume di distribuzione apparente, Vd , come quello necessario ad immagazzinare la quantità totale di farmaco Q , alla concentrazione plasmatica C_p . Se la concentrazione del farmaco nel tessuto e nel plasma è diversa, il volume apparente può essere diverso dal volume fisico totale $V_{tot} = V_p + V_t$, dove V_p è il volume plasmatico e V_t è il volume del tessuto. La quantità totale di farmaco Q presente nel corpo può essere espressa come somma della quantità che si distribuisce a livello plasmatico Q_p e di quella che diffonde negli altri tessuti Q_{t_i} :

$$Q = Q_p + \sum_i Q_{t_i} \tag{1.4}$$

$$Q = V_p \cdot C_p + \sum_i V_{t_i} C_{t_i} \quad (1.5)$$

dove V_p , C_p sono il volume plasmatico e la concentrazione del farmaco, e V_{t_i} e C_{t_i} sono il volume e la concentrazione raggiunti dal farmaco in ciascun tessuto. Moltiplicando e dividendo l'equazione per la concentrazione plasmatica C_p , si ottiene:

$$Q = \left(V_p + \sum_i \frac{V_{t_i} C_{t_i}}{C_p} \right) C_p \quad (1.6)$$

Nel caso in cui i distretti di diffusione del farmaco siano solo due, V_p e V_t , il volume di distribuzione apparente risulta essere:

$$V_d = V_p + \frac{C_t}{C_p} V_t \quad (1.7)$$

Per alcuni farmaci il rapporto C_t/C_p è molto grande e ne segue che il volume di distribuzione apparente può essere maggiore del volume totale dei liquidi corporei [3]. Questo dipende dalle proprietà fisico-chimiche del farmaco, in particolare dalla sua idrofilicità e del suo legame con le proteine plasmatiche, ma anche dalle condizioni fisio-patologiche del paziente. I soggetti gravemente malati e in condizioni settiche hanno una distribuzione del farmaco alterata a causa di molteplici fattori, tra cui l'elevato scambio di fluidi, l'aumento della permeabilità capillare e il conseguente accumulo di liquidi nello spazio interstiziale.

1.2.3 Metabolismo

Qualsiasi sostanza introdotta all'interno del corpo umano va incontro al metabolismo, ovvero quella serie di reazioni chimiche che permettono di riportare la sua concentrazione ai valori fisiologici per il corretto funzionamento dell'organismo. Anche nel caso di un farmaco, l'organismo tende a semplificarlo a livello del fegato, il principale organo deputato al metabolismo, per ottenere, tramite reazioni enzimatiche, dei composti più semplici chiamati metaboliti. Questo processo, noto con il nome di biotrasformazione, non solo riduce la concentrazione del farmaco attivo, ma può anche alterarne l'attività farmacologica, talvolta producendo metaboliti attivi o inattivi. In alcuni casi, i metaboliti possono addirittura essere più tossici dell'originale. Pertanto, la comprensione del metabolismo dei farmaci è essenziale

per lo sviluppo di terapie sicure ed efficaci, nonché per prevedere possibili interazioni farmacologiche ed effetti collaterali [10].

1.2.4 Eliminazione

L'escrezione di tutte le molecole che non sono state assorbite, avviene tramite la bile, il respiro, la sudorazione, ma soprattutto i reni. In quest'organo, tutte le molecole neutre, di piccole dimensioni e a basso peso molecolare passano attraverso la membrana glomerulare senza essere poi riassorbite o bilanciate a livello tubulare [11].

A mano a mano che il farmaco è eliminato, la sua concentrazione plasmatica diminuisce e il suo effetto svanisce. In farmacocinetica, questo processo di eliminazione viene solitamente descritto da un singolo macroparametro: la clearance del farmaco. Essa è definita come il volume che viene completamente depurato dalla sostanza nell'unità di tempo e può essere espressa come costante di proporzionalità, CL_{drug} , tra la velocità di eliminazione, dQ / dt , e la concentrazione plasmatica del farmaco, Cp :

$$\frac{dQ}{dt} = -CL_{drug} \cdot Cp \tag{1.8}$$

Con $Q = C \cdot Vd$ la formula diventa:

$$V_d \frac{dC}{dt} = -CL_{drug} \cdot Cp \tag{1.9}$$

Nella farmacologia clinica la clearance è il parametro utilizzato per predire la dose di mantenimento, ovvero la dose necessaria a mantenere la concentrazione plasmatica desiderata del farmaco. Al contrario della dose di carico, che raramente deve essere modificata, le dosi di mantenimento devono essere adattate alle caratteristiche del paziente. Ad esempio, i pazienti con insufficienza renale impiegano più tempo per eliminare un farmaco e di conseguenza la dose di mantenimento deve essere corretta in relazione alla funzionalità renale, diminuendo la quantità di farmaco nell'intervallo di tempo o aumentando l'intervallo tra due dosi successive [9].

1.3 Terapia sostitutiva renale

Dal 5% al 10% dei pazienti in terapia intensiva viene trattato con terapia sostitutiva renale (RRT) [12]. La clearance di alcuni farmaci è influenzata in modo anche molto variabile dal contributo di eliminazione extracorporea dovuto alla RRT. Le proprietà fisico-chimiche dei farmaci che condizionano l'entità della rimozione sono: il peso molecolare (PM), l'affinità con le proteine plasmatiche, il volume di distribuzione e l'interazione con la membrana del filtro [13]. La clearance dovuta alla RRT è clinicamente significativa per quei farmaci la cui eliminazione avviene prevalentemente a livello renale, ovvero per i farmaci con un volume di distribuzione limitato ed una bassa affinità con le proteine plasmatiche. In particolare, la maggior parte degli agenti antimicrobici idrofili che si distribuiscono nel plasma e nello spazio extracellulare, come i β -lattamici, vengono facilmente rimosse dalla RRT; perciò possono richiedere una correzione del regime di dosaggio per garantire un effetto terapeutico. Il PM della maggior parte dei farmaci di solito utilizzati nei pazienti critici non supera i 1000 Dalton [13], ovvero sono sufficientemente piccoli da poter attraversare facilmente le membrane delle RRT. Il PM diventa rilevante quando si utilizzano tecniche di RRT che si basano sul meccanismo di diffusione, in quanto il coefficiente di diffusione è inversamente proporzionale al PM. In secondo luogo, è la tipologia di membrana a determinare l'intensità della clearance dovuta alla RRT. Oltre al PM, le dimensioni geometriche e il volume della molecola condizionano il passaggio del farmaco attraverso la membrana. Quest'ultime dipendono dalla forma e dalla carica della molecola secondo l'effetto di Gibbs-Donnan: le proteine, cariche negativamente, trattenute sul lato sangue della membrana, ostacolano il passaggio dei farmaci cationici e aumentano la rimozione delle molecole anioniche. Inoltre, è noto che solo la frazione libera di un farmaco, FL, non legata alle proteine plasmatiche, viene eliminata dalla RRT [13, 14]. Infine, la clearance RRT dipende dalla tecnologia applicata e dalle caratteristiche operative del dispositivo che sono, nello specifico, le velocità di flusso impostate. I meccanismi di depurazione extracorporea più comunemente utilizzati sono tre:

- Emofiltrazione (CVVH).

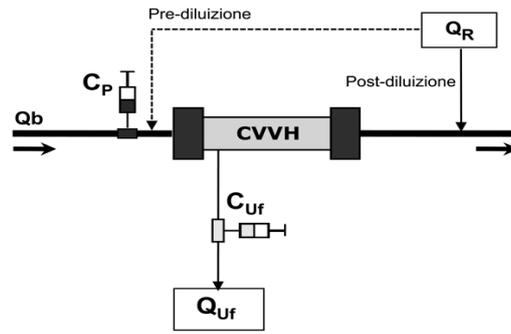


Figura 1. 1: Schema circuito CVVH, con pre e/o post diluizione, dove Q_b è il flusso ematico in ingresso, Q_R il flusso di re infusione e Q_{Uf} il flusso ultrafiltrato in uscita. C_p e C_{Uf} corrispondono rispettivamente alla concentrazione plasmatica e dell'ultrafiltrato. Adattata da [13]

La rimozione di soluti tramite questa tecnica avviene esclusivamente per convezione, grazie a un gradiente di pressione azionato da una pompa. Le molecole più piccole, compresi quasi tutti gli agenti antimicrobici, passano facilmente attraverso il filtro e vengono rimossi. L'eliminazione per convezione dipende dalle caratteristiche della membrana utilizzata e dal suo cut-off, ovvero dalla dimensione massima dei suoi pori che consente il passaggio delle molecole [13]. La composizione dei soluti e dei liquidi corporei deve essere corretta mediante la somministrazione di fluidi sostitutivi prima o dopo la filtrazione, al fine di mantenere un adeguato volume circolatorio ed il corretto equilibrio elettrolitico nell'organismo. L'eliminazione mediante CVVH è influenzata dal metodo di infusione del fluido sostitutivo, pre- o post-filtro. Nel caso di sostituzione post-filtro, la clearance di uno specifico farmaco può essere espressa come prodotto della velocità di ultrafiltrazione Q_{uf} e del coefficiente di *sieving* Sc :

$$CL_{CVVH-POST} = Sc \cdot Q_{uf} \quad (1.10)$$

dove Sc è la misura della capacità di un soluto di attraversare convettivamente la membrana e può essere calcolato come rapporto tra la concentrazione di soluto nell'ultrafiltrato e la concentrazione di soluto nel plasma. In generale, per i farmaci con PM al di sotto del cut-off della membrana, Sc può essere considerato, qualora non noto, pari alla frazione libera del farmaco (FL) [13, 15].

La CL_{CVVH} mediante sostituzione del fluido pre-filtro risulta essere:

$$CL_{CVVH-PRE} = \frac{Sc Q_{uf}}{Q_b + Q_{pre}} Q_b \quad (1.11)$$

dove Qb è la velocità del flusso sanguigno, $Qpre$ la velocità del fluido di sostituzione pre-filtro. Se il farmaco non si distribuisce nei globuli rossi, ma solo a livello extracellulare, il flusso del sangue deve essere corretto per l'ematocrito Htc [15]:

$$CL_{CVVH-PRE} = \frac{Sc Quf}{Qb (1 - Htc) + Qpre} Qb (1 - Htc) \quad (1.12)$$

Ad una data velocità di ultrafiltrazione, l'efficienza depurativa ottenuta con sostituzione del fluido pre-filtro è leggermente inferiore rispetto ai sistemi di re-infusione post-filtro, questo perché, nel secondo caso, l'ultrafiltrato non è diluito. Tuttavia, la sostituzione post-filtro comporta maggiori rischi di coagulazione del filtro e quindi maggiore necessità di anticoagulante [15]. Il liquido di reinfusione può anche essere somministrato in parte pre e in parte post-filtro.

- Emodialisi (CVVHD).

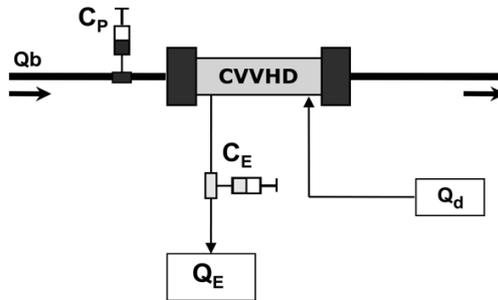


Figura 1. 2: Schema circuito CVVHD, dove Qb è il flusso ematico in ingresso, Qd il flusso del dialisato e $Q_E = Q_{uf} + Qd$ il flusso effluente in uscita. C_p e C_E corrispondono rispettivamente alla concentrazione plasmatica e dell'effluente. Adattata da [13]

In questo processo di depurazione extracorporea i soluti passano dal sangue al dialisato, una soluzione elettrolitica bilanciata, attraverso una membrana semi-permeabile. Il trasporto avviene prevalentemente per diffusione, secondo gradiente di concentrazione. I due fluidi scorrono contro corrente, così da mantenere una differenza di concentrazione distribuita su tutta la membrana e viene utilizzata una superficie filtrante molto grande e compatta per ottimizzare la rimozione delle sostanze di scarto. La convezione può verificarsi, ma in misura minore in quanto la velocità ultrafiltrazione è mantenuta più bassa rispetto alla sola emofiltrazione. La clearance del farmaco che si ottiene tramite CVVHD è pari al prodotto tra il coefficiente di saturazione Sa e la portata del dialisato effluente Qe :

$$CL_{CVVHD} = Sa \cdot Qe \quad (1.13)$$

dove Sa è la misura del grado di saturazione del dialisato e si calcola come rapporto tra la concentrazione di soluto nel dialisato e quella nel plasma [13]. Nel caso in cui la velocità del flusso effluente sia nettamente inferiore rispetto a quella del flusso sangue (come in CVVHD rispetto all'emodialisi intermittente), c'è abbastanza tempo affinché i farmaci passino attraverso la membrana e saturino completamente il dialisato. A queste condizioni, Sa sarà simile a Sc osservato in CVVH [15]. La clearance diffusiva può essere stimata in modo semplificato e con una buona approssimazione, basandosi unicamente su parametri facilmente ottenibili come FL e Q_e .

- Emodiafiltrazione (CVVHDF).

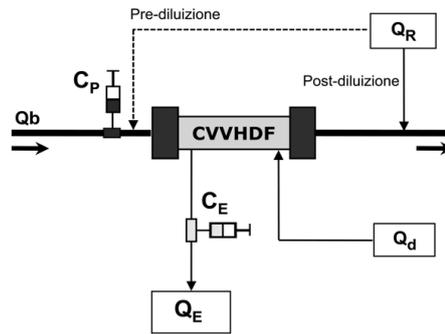


Figura 1. 3: Schema circuito CVVHDF, con pre e/o post diluizione, dove Qb è il flusso ematico in ingresso, Q_R il flusso di re-infusione, Qd il flusso del dialisato e $Q_E = Q_{uf} + Qd$ il flusso effluente in uscita. C_p e C_E corrispondono rispettivamente alla concentrazione plasmatica e dell'effluente. Adattata da [13]

La CVVHDF è una combinazione delle prime due metodiche. Sfrutta la convezione per ottenere maggiori quantità di acqua plasmatica rimossa dai pazienti e allo stesso tempo infonde pari volumi di soluzione dialitica, grazie alle tecniche di pre- e post-diluizione. Come per la CVVH, il calcolo della clearance mediante CVVHDF deve essere distinto a seconda che l'infusione del fluido sostitutivo avvenga pre- o post-filtro:

$$CL_{CVVHDF-POST} = Sa Q_e \quad (1.14)$$

$$CL_{CVVHDF-PRE} = \frac{Sa Q_e}{Q_b + Q_{pre}} Q_b \quad (1.15)$$

In questo caso Q_e è la velocità del flusso effluente totale, dato dalla somma delle portate di dialisato e dell'ultrafiltrato. L'eliminazione del soluto mediante la combinazione di convezione e diffusione è minore rispetto alla somma delle clearance di ciascun processo di trasporto se considerato singolarmente. Questo perché la presenza di soluto derivato per convezione nel dialisato riduce il gradiente di

concentrazione che favorisce la diffusione. Tale effetto può essere mitigato aumentando il flusso del dialisato o diminuendo la velocità dell'ultrafiltrato [15].

1.4 Alterazioni della farmacocinetica nei pazienti critici

Le condizioni estreme dei pazienti ricoverati in terapia intensiva ed i loro quadri clinici in continua evoluzione comportano delle alterazioni fisiologiche importanti che possono influenzare significativamente la cinetica dei farmaci somministrati e rendere più difficile il raggiungimento del dosaggio ottimale. La marcata variabilità farmacocinetica è il risultato di molteplici fattori, tra cui la risposta alla fase acuta della malattia, disfunzioni d'organo, eventuali interazioni farmacologiche con altri principi attivi e l'utilizzo di trattamenti intensivi [3]. La combinazione di questi elementi porta Vd e CL del farmaco a discostarsi anche di molto dai valori normali, con l'effetto che la concentrazione del farmaco non rimane all'interno del range terapeutico. Il Vd di antibiotici idrofilici, come la piperacillina, è solitamente coerente con il volume di acqua corporea extracellulare (circa 0,1-0,3L/kg), tuttavia vi sono delle alterazioni nei pazienti critici. Come riportato da diversi studi [2, 16, 17], nei soggetti critici si registrano volumi di distribuzione più grandi del previsto a causa degli importanti spostamenti di fluidi corporei e, conseguentemente, della fuoriuscita di grandi quantità di liquido nello spazio interstiziale. Per quanto riguarda invece il processo di eliminazione, la CL del farmaco è fortemente influenzata dalla funzionalità degli organi adibiti a tale compito e dalle variazioni di flusso sanguigno negli stessi. Infatti, la ridotta perfusione a livello di fegato e reni può ridurre la velocità di trasporto del farmaco al sito di eliminazione.

Le principali condizioni patologiche che generano alterazioni nella distribuzione e nell'escrezione dei farmaci in pazienti in terapia intensiva sono:

- **Insufficienza cardiovascolare:** i pazienti presentano una diminuzione del flusso sanguigno che viene diretto prioritariamente verso gli organi vitali a discapito degli altri. Questo ridotto afflusso di sangue, in particolare al fegato e ai reni, porta a una riduzione della clearance del farmaco. Lo scompenso cardiocircolatorio, inoltre, causa ritenzione di liquidi che, combinata ai fluidi somministrati durante la rianimazione, può portare ad un aumento del volume di distribuzione del farmaco;
- **Sepsi:** in presenza di grave infiammazione si possono verificare danni endoteliali ed un aumento della permeabilità capillare che causano ipotensione e perdita di fluidi nello spazio extravascolare. Ciò aumenta il volume di distribuzione dei farmaci

idrofili, diminuendo la loro concentrazione plasmatica. Variazioni della gittata cardiaca sono comuni nei soggetti settici. Nella prima fase della malattia, generalmente si riscontra una maggior apporto di sangue a livello renale e, dunque, un aumento della clearance del farmaco. Con il peggioramento delle condizioni del paziente, però, la ridotta distribuzione del sangue nella microcircolazione ed una perfusione tissutale insufficiente, possono incrementare lo sviluppo di sindrome da disfunzione multiorgano. Essa include disfunzioni renali ed epatiche che contribuiscono a ridurre la clearance del farmaco. Per di più, questi soggetti soffrono di ipoalbuminemia per via della ridotta sintesi epatica e del minor apporto di proteine nella dieta. Ciò provoca una maggior frazione di farmaco non legato e, dunque, una crescita del volume di distribuzione apparente e della clearance dei farmaci escreti per via renale [18];

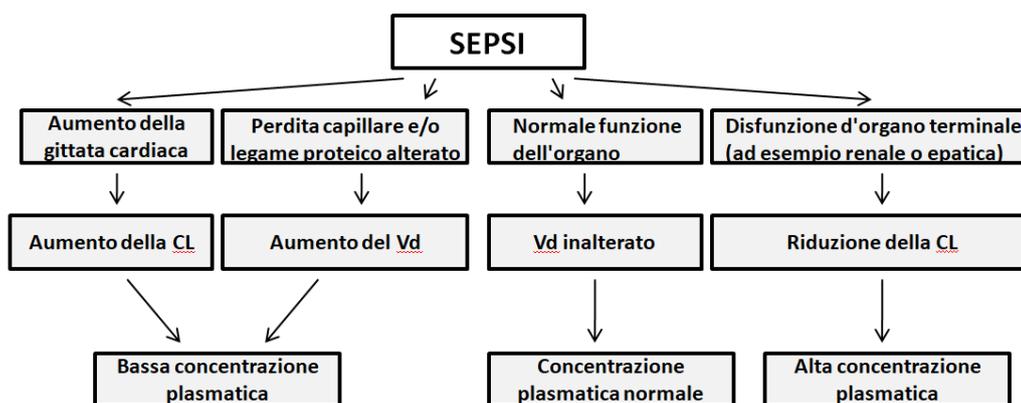


Figura 1. 4: Rappresentazione schematica delle variazioni fisiopatologiche che possono verificarsi durante la sepsi e dei loro successivi effetti farmacocinetici. Adattata da [18]

- **Disfunzione epatica:** la clearance epatica dipende essenzialmente da due fattori: flusso sanguigno e attività degli enzimi epatici. Come discusso in precedenza, il primo può essere alterato in condizioni di insufficienza cardiovascolare e sepsi. Anche la somministrazione di farmaci vasoattivi ha impatto sulla perfusione del fegato. D'altra parte, l'efficienza ed il numero di enzimi epatici è modificata da diversi stati patologici, come l'ipossiemia e l'infiammazione [3].
- **Insufficienza renale:** la disfunzione di questo organo provoca una riduzione dell'eliminazione del farmaco e, di conseguenza, della sua clearance. Inoltre, essa è associata a ritenzione di liquidi, quindi ad un aumento del volume di distribuzione della sostanza, in particolare dei farmaci idrofili. Tuttavia, se questi pazienti sono trattati con terapia sostitutiva renale, dal punto di vista farmacocinetico, accade

l'esatto opposto. Il trattamento rimuove i farmaci solitamente eliminati con l'escrezione renale, aumentando così la clearance totale del farmaco.

Queste anomalie possono produrre concentrazioni inferiori o superiori rispetto a quelle ottimali nel sito d'azione, rendendo più complessa la scelta del dosaggio adeguato.

1.5 Modelli di farmacocinetica della piperacillina

Per migliorare il trattamento delle infezioni nei pazienti critici e quindi ridurre la mortalità, è fondamentale determinare un dosaggio terapeutico adeguato. A tal proposito, un modello matematico della piperacillina, che simuli l'evoluzione della concentrazione plasmatica nel tempo ed esprima i parametri cinetici in funzione delle variabili specifiche del paziente, per un dato dosaggio, faciliterebbe la selezione di una terapia antibiotica personalizzata. In aggiunta, la considerazione di parametri relativi ai trattamenti di RRT per pazienti sottoposti alla terapia, ridurrebbe il rischio di dosaggi sub-ottimali in questi soggetti. Infatti, nonostante l'uso clinico pluridecennale della piperacillina per il trattamento delle infezioni nosocomiali, ci sono ancora molti dubbi sul suo regime posologico ottimale nei malati critici. In letteratura sono stati proposti diversi modelli di popolazione per lo studio della cinetica della piperacillina/tazobactam in questi pazienti. Le prime ricerche su questo farmaco sono state condotte su soggetti sani [4, 19], i cui risultati si discostano notevolmente da quelli riportati per pazienti critici, a causa del loro profilo farmacocinetico alterato ed instabile. È stato dimostrato, infatti, che le dosi standard non siano appropriate per il raggiungimento del target terapeutico in questi soggetti. Successivamente, sono stati proposti altri modelli sviluppati su dati di pazienti ricoverati in terapia intensiva, generalmente affetti da sindrome setticemica [20, 18, 21, 5, 22]. In aggiunta, tre articoli avevano come campione in oggetto pazienti trattati con RRT [23, 24, 25]. I modelli riportati erano a singolo o doppio compartimento e le covariate risultate significative nel descrivere la variabilità dei parametri di popolazione erano generalmente il peso corporeo e la clearance della creatinina. In particolare, lo studio di Asin-Prieto [25] presenta un campionamento frequente del farmaco, con una media di sette misurazioni per paziente, i cui risultati verranno presi come riferimento in questo lavoro. Gli studi in questione erano tutti di tipo monocentrico ed hanno preso in esame coorti piccole e omogenee di pazienti.

1.6 Scopo e contenuti della tesi

Questa tesi nasce all'interno di un progetto più ampio, AbioKIN (AntiBIOTicKINetics) promosso dal gruppo GiViTI (Gruppo italiano per la Valutazione degli interventi in Terapia Intensiva). Si tratta di uno studio prospettico multicentrico, che coinvolge dieci terapie intensive italiane. Lo scopo finale di questo progetto consiste nella realizzazione di un simulatore di farmacocinetica da integrare nella cartella clinica elettronica dei centri coinvolti. Sulla base dei dati clinici del paziente presenti nel registro, il simulatore permetterebbe ai clinici aggiustare la dose di antibiotico secondo le condizioni del soggetto ed identificare la strategia di dosaggio che massimizzi la probabilità di raggiungere la concentrazione terapeutica.

L'obiettivo specifico di questo elaborato consiste nello sviluppo di un modello farmacocinetico di popolazione della piperacillina in pazienti critici. In particolare, sono stati sviluppati diversi modelli, sulla base di quelli esistenti in letteratura, utilizzando la tecnica dei modelli non lineari ad effetti misti. I modelli identificati utilizzano diversi parametri demografici, allometrici e clinici per descrivere la farmacocinetica della piperacillina e talvolta presentano delle componenti che descrivono gli effetti delle tecniche di depurazione extracorporea sull'eliminazione di questo antibiotico. Tutti i modelli sviluppati sono stati confrontati al fine di scegliere quello che meglio descrive il comportamento della piperacillina in questa popolazione. Le analisi sono state eseguite in Monolix (Monolix 2023R1, ©Lixoft) [26], software utilizzato per la stima dei parametri, il confronto e la validazione dei modelli analizzati.

Nel *Capitolo 2* sono riportate le informazioni sul protocollo e sul dataset e come i dati sono stati pre-elaborati per poter essere importati nel software. Nel *Capitolo 3* vengono presentate le tecniche di modellazione selezionate per lo sviluppo del modello. Partendo dalla teoria di base dei modelli non lineari ad effetti misti, vengono poi descritte le fasi della realizzazione di un modello in Monolix, le formulazioni matematiche dei modelli testati e le metodologie per la validazione e il confronto dei modelli. Nel *Capitolo 4* viene presentato il confronto tra i modelli testati e vengono riportati i risultati finali del modello scelto come migliore. Infine, nel *Capitolo 5* si discutono i principali risultati ottenuti, le limitazioni del progetto ed i possibili sviluppi futuri.

2. Dataset e pre-elaborazione dei dati

In questo capitolo vengono riportate le informazioni relative al protocollo dello studio e ai dati raccolti. Successivamente, viene spiegata l'elaborazione e la selezione dei dati che ha permesso l'organizzazione degli stessi in un file utilizzabile dal software Monolix.

2.1 Protocollo

I dati utilizzati per lo sviluppo dei modelli sono stati raccolti mediante la cartella clinica elettronica MargheritaTre, installata in nove reparti di terapia intensiva in Italia. I pazienti arruolati sono stati trattati con quattro diversi antibiotici (linezolid, meropenem, piperacillina, vancomicina), tramite infusione endovenosa. Generalmente l'antibiotico veniva somministrato con una dose di carico iniziale seguita da un'infusione continua [27]. In questa tesi ci si focalizzerà esclusivamente sui pazienti che hanno ricevuto almeno una dose di piperacillina. Da protocollo era previsto il prelievo di campioni ematici secondo le seguenti tempistiche:

- un prelievo 30-60 minuti dopo la fine della somministrazione della prima dose di carico (se presente);
- un prelievo durante la prima giornata di trattamento;
- un prelievo durante la seconda giornata di trattamento;
- due prelievi in giorni diversi tra la terza e l'ottava giornata di trattamento.

Nel caso in cui il paziente fosse sottoposto ad un trattamento di depurazione extracorporea durante la terapia antibiotica, sono stati effettuati dei prelievi aggiuntivi rispetto a quanto descritto sopra, fino ad un massimo di 4, a discrezione del medico [27]. Nel caso della piperacillina, sono stati prelevati fino a sei campioni di sangue dai pazienti durante il periodo di trattamento, per un totale di 903 concentrazioni seriche. Dalle analisi effettuate in seguito, il range di concentrazione misurata è stato di 0 - 436,2 mg/L.

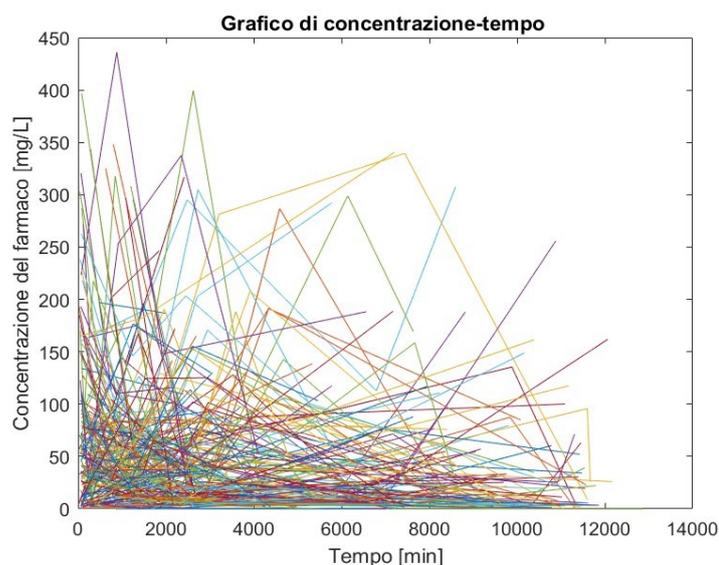


Figura 2. 1: Grafico dell'andamento delle concentrazioni plasmatiche di piperacillina nel tempo nei 247 pazienti in studio. Sull'asse delle ordinate sono rappresentate le concentrazioni di piperacillina [mg/L], mentre sull'asse delle ascisse il tempo [min].

Oltre ai campioni ematici, sono state raccolte diverse variabili rappresentative delle condizioni cliniche dei pazienti (funzionalità renale, epatica, cardiovascolare) e dei trattamenti ricevuti durante il soggiorno in terapia intensiva (ventilazione meccanica, terapia renale sostitutiva). Questi sono stati selezionati da un gruppo di esperti, tra cui interventisti e farmacologi. Tali variabili sono utilizzate in seguito per descrivere la variabilità dei parametri farmacocinetici (clearance e volume di distribuzione) nei modelli di popolazione. Le variabili, testate come potenziali covariate del modello sono riassunte in Tabella 2.1, suddivise in categoriche e continue. Esse comprendono le caratteristiche dei pazienti (es. età, sesso, peso, ...), i parametri vitali (es. frequenza cardiaca, pressione arteriosa media, ...) e i dati relativi agli esami di laboratorio (es. clearance della creatinina, albumina sierica, bilirubina totale...).

Numero di soggetti	247	
Covariata categorica	N°	%
<i>Sesso (maschi/femmine)</i>	147/100	59.5
<i>RRT</i>	23	9.3
<i>VENT</i>	229	92.7
Covariata continua (u.m.)	Media ± S.E. (intervallo)	S.D. ± S.E.
<i>Clearance della creatinina (mL/min)</i>	79.6 ± 3.9 (0.3-387.9)	9.0 ± 0.9
<i>Creatinina sierica (mg/dL)</i>	1.3 ± 0.1 (0.2-4.8)	0.2 ± 0.02

<i>Albumina sierica (g/L)</i>	27.4 ± 0.4 (14-44.3)	1.5 ± 0.13
<i>Età (anni)</i>	66.2 ± 0.9 (18-98)	0 ± 0
<i>Altezza (cm)</i>	168.8 ± 0.6 (150-193)	0 ± 0
<i>Peso (kg)</i>	77.0 ± 1.3 (45-156.1)	0.9 ± 0.1
<i>Globuli bianchi (10³/μL)</i>	12.2 ± 0.4 (0.1-39.5)	2.04 ± 0.1
<i>Ematocrito (%)</i>	32.5 ± 0.3 (22.1-54.7)	1.7 ± 0.08
<i>Piastrine (10³/μL)</i>	216.4 ± 8.9 (30.3-1231.2)	29.9 ± 0
<i>Alanina aminotransferasi (U/L)</i>	65.9 ± 7.2 (0-805.1)	15.3 ± 3.04
<i>Bilirubina totale (mg/dL)</i>	1.0 ± 0.1 (0.1-5.3)	0.2 ± 0.02
<i>Lattato arterioso (mmol/l)</i>	1.8 ± 0.1 (0.5-10.8)	0.5 ± 0.04
<i>pH</i>	7.4 ± 0.003 (7.2-7.5)	0.04 ± 0.002
<i>Pressione arteriosa media (mmHg)</i>	81.4 ± 0.7 (50-108.8)	10.1 ± 0.3
<i>Frequenza cardiaca (min⁻¹)</i>	84.8 ± 0.9 (56.5-120.1)	11.0 ± 0.3
<i>Glicemia (mg/dL)</i>	151.4 ± 1.8 (65.8-259.5)	26.6 ± 1.2
<i>Pressione arteriosa dell'ossigeno (mmHg)</i>	104.9 ± 1.4 (37.9-183.9)	22.1 ± 0.8
<i>Diuresi giornaliera totale (mL)</i>	1258.3 ± 35.0 (0-3071.8)	828.2 ± 22.9
<i>VIS (Vasoactive-Inotropic Score)</i>	11.2 ± 1.2 (0-133.04)	8.7 ± 1.2

Tabella 2. 1: Caratteristiche dei pazienti e trattamenti. Tabella superiore: variabili dicotomiche. Tabella inferiore: variabili continue.

Dei 247 pazienti trattati con piperacillina, 147 erano maschi (59.5 %), l'età media era di 66.2 anni, 23 hanno ricevuto terapia sostitutiva renale (9.3 %) e 229 ventilazione meccanica (92.7 %). Per ogni trattamento, sono state registrate le date e gli orari iniziali e finali. La ventilazione meccanica è stata testata nel modello come variabile dicotomica. Per quanto riguarda, invece la terapia renale sostitutiva continua non è stata valutata nel modello come semplice covariata categorica, ma è stata aggiunta una nuova variabile continua, la clearance extracorporea (CLex), che esprime l'eliminazione del farmaco deputata ai trattamenti di depurazione extracorporea. Il suo calcolo, a partire dai dati relativi ai trattamenti RRT, verrà esplicitato nel paragrafo 2.2. L'impatto del supporto cardiovascolare farmacologico è stato quantificato tramite il punteggio inotropico vasoattivo (VIS). Il punteggio pesa il dosaggio di ogni molecola secondo la seguente formula [3]:

$$\begin{aligned}
VIS = & \frac{dopamine}{\mu g/kg/min} + \frac{dobutamine}{\mu g/kg/min} + 10 \frac{milrinone}{\mu g/kg/min} + 100 \frac{epinephrine}{\mu g/kg/min} \\
& + 100 \frac{norepinephrine}{\mu g/kg/min} + 10\,000 \frac{vasopressin}{U/kg/min}
\end{aligned}
\tag{2.1}$$

2.2 Pre-elaborazione dei dati

I dati grezzi, scaricati direttamente dalla cartella clinica elettronica, sono stati elaborati in un file strutturato adatto per essere importato in Monolix, software selezionato per le analisi di popolazione dei modelli presentati in questo lavoro. Nello specifico, i dati erano organizzati in modo tale che ad ogni riga corrispondesse un diverso istante temporale per uno specifico soggetto. Nelle colonne, invece, erano raccolte le diverse informazioni: ID del soggetto, tempo, dose, velocità di somministrazione, concentrazione osservata e le covariate. Il dataset è stato creato e manipolato in R al fine di esportarlo in un formato utilizzabile in Monolix.

In primo luogo sono stati gestiti i dati mancanti. L'assenza di tali valori per alcune variabili era dovuta al fatto che le stesse non erano state misurate per lo specifico paziente. Poiché Monolix non gestisce covariate con dati mancanti, per non scartare completamente l'intera colonna, questi dati sono stati imputati alla mediana della popolazione se questi erano mancanti in meno del 3.2% dei soggetti. Tutte le misurazioni di piperacillina al di sotto di 1mg/L, circa il 3.1% delle osservazioni complessive, sono state scartate perché considerate al di sotto del limite di quantificazione. Sono state introdotte tre nuove covariate continue derivate da quelle già disponibili nella cartella elettronica: l'indice di massa corporea (BMI), la clearance della creatinina ottenuta con la formula di Cockcroft-Gault (CLCR_CG) [28] e la clearance extracorporea (CLex) per i pazienti sottoposti a RRT. Il BMI è stato calcolato come di seguito:

$$BMI = \frac{WT}{HT^2} \left[\frac{kg}{m^2} \right]
\tag{2.2}$$

dove WT è il peso corporeo e HT è l'altezza. La clearance della creatinina già presente nel dataset era stata stimata sulla base della raccolta di urina nelle 8, 12 e 24 ore. La formula di Cockcroft-Gault fornisce anch'essa una stima di popolazione di tale parametro sulla base dell'età (AGE), del peso corporeo e del valore della creatinina serica (CREA), come segue [28]:

$$CLCR_{CG} = \frac{(140 - AGE)WT [kg]}{72 CREA \left[\frac{mg}{dL} \right]} \quad (2.3)$$

tale valore deve essere ridotto del 15% per le donne.

Per ogni covariata tempo-variante (che in Monolix prende il nome di regressore) è stata associata una covariata costante calcolata come media delle realizzazioni per soggetto. Questo passaggio è stato necessario nella fase di test delle covariate all'interno del modello, poiché Monolix non accetta covariate che siano tempo varianti nell'analisi automatica fornita dal software che verrà approfondita nella sezione 3.3.4.

Un pre-elaborazione più laboriosa si è resa necessaria per i dati relativi ai trattamenti di RRT, utilizzati per il calcolo della clearance extracorporea (CLex). Le informazioni riguardanti la metodologia applicata, il dispositivo selezionato e le velocità dei flussi erano raccolte in file (.xlsx), uno diverso per ogni centro. I dati sono stati caricati e ordinati in un data frame R. Anche in questo caso, ad ogni riga corrispondeva un paziente ed un intervallo temporale in cui le velocità rimanevano invariate. Tra le portate registrate vi erano: il flusso di sangue, la rimozione del fluido, il flusso del dialisato, la reinfusione e flussi minori come quelli degli anti-coagulanti. Al fine di identificare il corretto trattamento ricevuto dal paziente e il dispositivo utilizzato, ad ogni riga è stata associata una “scheda” per il calcolo della frazione di filtrazione (FF) e quindi della CLex. La FF corrisponde alla percentuale di acqua plasmatica filtrata in un periodo di tempo ed è l'indicatore che meglio descrive il processo di eliminazione di una sostanza. Il calcolo della FF differisce a seconda del tipo di trattamento scelto: CVVH, CVVHD e CVVHDF. Nel caso di CVVH:

$$FF_{CVVH} = \frac{Sc Quf}{Qb (1 - Hct) \eta + Qpre} \quad (2.4)$$

dove Sc è il coefficiente di *sieving*, Quf è la velocità del flusso ultrafiltrato. La portata di acqua plasmatica è determinata dal prodotto tra il flusso sangue, Qb , corretto per l'ematocrito, Hct , e la percentuale di acqua plasmatica, η (circa 1). $Qpre$ corrisponde al contributo della somministrazione del fluido sostitutivo pre-filtro ed è nullo in caso di infusione post-filtro. Come discusso nella sezione 1.3, Sc può essere ragionevolmente approssimato alla frazione libera del farmaco quando non sono disponibili le misure delle concentrazioni di soluto nel plasma e nell'ultrafiltrato [15]. La frazione di piperacillina non legata alle proteine

plasmatiche, in grado di attraversare facilmente le membrane delle RRT, è intorno al 70% [29, 15]. Inoltre, essendo un antibiotico di tipo idrofilo, con un ridotto peso molecolare (517,555 Da), viene facilmente rimosso mediante questi processi depurativi. A fronte di queste considerazioni, la formula della FF_{CVVH} può essere semplificata come di seguito:

$$FF_{CVVH} = \frac{0.7 Q_{uf}}{Q_b (1 - Hct) + Q_{pre}} \quad (2.5)$$

Per ottenere la clearance extracorporea la FF deve essere moltiplicata per la portata di sangue corretta per l'ematocrito:

$$CLex_{CVVH} = \frac{0.7 Q_{uf}}{Q_b (1 - Hct) + Q_{pre}} Q_b (1 - Hct) \quad (2.6)$$

Per quanto riguarda la CVVHD e la CVVDF, la FF viene così calcolata:

$$FF_{CVVHD-CVVHDF} = \frac{Sa Q_e}{Q_b (1 - Hct)\eta + Q_{pre}} \quad (2.7)$$

dove Sa è il coefficiente di saturazione e Q_e è la portata dell'effluente. Valgono anche in questo caso, tutte le approssimazioni fatte in precedenza. Dunque, la $FF_{CVVHD-CVVHDF}$ diventa:

$$FF_{CVVHD-CVVHDF} = \frac{0.7 Q_e}{Q_b (1 - Hct) + Q_{pre}} \quad (2.8)$$

e la rispettiva CLex:

$$CLex_{CVVHD-CVVHDF} = \frac{0.7 Q_e}{Q_b (1 - Hct) + Q_{pre}} Q_b (1 - Hct) \quad (2.9)$$

Oltre alla tecnica di depurazione, la FF varia a seconda della macchina dialitica utilizzata. In particolare, nelle terapie intensive dei pazienti in studio sono stati identificati tre diversi dispositivi (AMPLYA Acute Multitherapeutic system™ - Mozarc Medical, Prismaflex -

Baxter e Fresenius Medical Care). Nello specifico, differiscono i valori del flusso di pre-infusione, Q_{pre} , pari al fluido di sostituzione infuso a monte dell'emofiltro, se presente, e del flusso effluente, Q_e o Q_{uf} , corrispondente al volume per unità di tempo dei fluidi di scarto provenienti dall'uscita del comparto dialisato-ultrafiltrato dell'emofiltro. Per determinare questi valori in relazione al tipo macchina, al trattamento effettuato e all'eventuale scelta anticoagulante sono state implementate delle funzioni in R, basate sulle indicazioni del costruttore. Esse prevedono in input i dati settati sulla macchina e restituiscono i valori di flusso necessari al calcolo della frazione di filtrazione.

I dati relativi alle portate in ingresso e in uscita dal dispositivo non sempre erano disponibili. Per questo motivo è stato opportuno procedere ad un recupero dai database gestiti dai singoli reparti o, eventualmente, all'imputazione di tali valori prima di procedere al calcolo della FF. Se mancanti, i flussi minori sono stati settati a zero, mentre le portate più significative sono state imputate utilizzando la mediana di quel valore in trattamenti simili per macchina e metodologia dialitica. In questo modo è stato possibile aggiungere la colonna relativa al parametro C_{Lex} nel database finale, che potrà essere utilizzato come descrittore nei pazienti sottoposti a RRT.

Infine, è stato scritto un file (.csv) da importare in Monolix, riducendo l'intervallo temporale per ogni paziente ai dati relativi al periodo che intercorre tra la prima somministrazione di piperacillina e l'ultima misurazione disponibile della concentrazione plasmatica.

2.3 Selezione del dataset

Prima di procedere allo sviluppo del modello, si è deciso di ridurre il campione in studio e selezionare solo quei pazienti per cui erano presenti dati certi e profili farmacocinetici fisiologicamente plausibili. In primo luogo, sono stati esclusi 38 soggetti per cui risultava assente l'informazione riguardante la durata della somministrazione. Successivamente sono stati rimossi 58 soggetti che hanno ricevuto una terapia con infusioni multiple, perché il profilo seghettato presenta dei dati più difficili da descrivere attraverso il modello andando così ad introdurre un'eccessiva variabilità nei parametri. Infine, è stata fatta un'ispezione visiva dei fit individuali del modello (Modello 0M, Sezione 3.3.1.1) delle concentrazioni plasmatiche di piperacillina nei pazienti per escludere i soggetti (32) che presentavano dati molto rumorosi e/o profili che non potevano essere spiegati dal regime di infusione a cui era stato sottoposto il soggetto. Questa scrematura ha comportato una riduzione del dataset a 119 soggetti, utilizzati per la realizzazione dei modelli. L'obiettivo è sviluppare il modello nel

dataset ridotto, che presenta dati più affidabili, e successivamente applicarlo al dataset completo per controllare che presenti delle proprietà predittive adeguate anche sui dati più incerti.

3. Modelli

In questo capitolo sono descritte le tecniche di modellazione selezionate per lo sviluppo del modello farmacocinetico. In ordine, vengono presentati, i principi teorici dei modelli non lineari a effetti misti (NLEM), il software utilizzato, Monolix, e i passaggi per la costruzione di un modello: definizione del modello strutturale, scelta del modello d'errore, determinazione del modello stocastico e del modello delle covariate. Infine, vengono esposte le strategie utilizzate per la validazione del modello e per la selezione del migliore tra quelli testati.

3.1 Modelli non lineari ad effetti misti

L'approccio scelto per lo sviluppo dei modelli è la tecnica di modellazione NLEM. Tali modelli si dicono ad effetti 'misti' poiché includono sia effetti fissi, che effetti casuali, dove i primi rappresentano valori tipici della popolazione, uguali per tutti gli soggetti, mentre i secondi sono la realizzazione di variabili aleatorie che definiscono di quanto si discosti ciascun individuo dal soggetto tipico per quella popolazione. In quest'ottica possiamo definire una struttura gerarchica di variabilità, che solitamente prevede i seguenti livelli:

- Il "valore tipico della popolazione" che si riferisce all'andamento centrale di un insieme di dati raccolti per una determinata popolazione indipendentemente dal centro di ricerca dove avviene lo studio, la strumentazione specifica o le condizioni ambientali;
- La "variabilità inter-individuale" che è determinata dalle differenze fisiologiche di ciascun individuo coinvolto nello studio rispetto agli altri individui;
- La "variabilità intra-individuale" che si genera poiché lo stesso individuo varia nel tempo a causa dell'invecchiamento, di cambiamenti di stato patologici e di variazioni note come cicli ultradiani e circadiani, che fanno sì che la risposta di uno stesso soggetto ad un particolare stimolo sia diversa da un'occasione all'altra. Viene anche chiamata "variabilità inter-occasionale";
- La "variabilità residua", infine, che è quella attribuibile al rumore di misurazione o ad altri fattori esterni non considerati nel modello.

Potenzialmente, in un approccio NLEM è possibile definire anche ulteriori gerarchie, ad esempio se i dati sono raccolti durante diversi studi effettuati in diversi laboratori, sarebbe possibile definire una variabilità inter-laboratorio. Quelle presenti in elenco sono solo quelle

più comuni e più rilevanti ai fini della creazione di un modello di popolazione per dati di farmacocinetica/farmacodinamica. Ad esempio, in un gruppo di pazienti a cui viene somministrato lo stesso farmaco, ci si aspetta che esso generi una risposta simile (andamento di popolazione). Ogni individuo però presenterà una risposta leggermente diversa a causa di fattori come l'età, il sesso, il peso, il particolare corredo genetico, o lo stato di salute al momento dello stimolo (variabilità inter-individuale). Inoltre, all'interno dello stesso soggetto possono verificarsi delle risposte diverse nel tempo, dovute ad una serie di elementi, tra cui differenze nelle condizioni fisiologiche, come lo stato di salute o il livello di stress, e variazioni ultradiane e circadiane (variabilità intra-individuale). Infine, potrebbero esserci altri fattori non considerati dal modello come ad esempio errori di misurazione dello strumento, errori nella registrazione del dosaggio o del tempo di somministrazione, o mismatch del modello rispetto al complesso sistema biologico sottostante, che impediscono di andare a descrivere perfettamente il profilo della risposta (variabilità residua). Per le nostre analisi si considererà una gerarchia semplificata a tre livelli: la popolazione complessiva e i singoli soggetti, mentre le restanti fonti di variabilità saranno modellate come variabilità residua.

Un modello non lineare a effetti misti è costituito da due componenti principali: il modello intra-individuale (detto anche modello strutturale), che descrive la risposta individuale allo stimolo ed il modello di inter-individuale (o modello stocastico) che spiega la variabilità inter-individuale dei parametri del modello intra-individuale. A quest'ultimo può essere aggiunto un modello delle covariate, per descrivere, almeno in parte, la variabilità inter-individuale in modo deterministico. Nel nostro caso, il modello strutturale è un modello cinetico compartimentale che descrive l'andamento della concentrazione plasmatica di piperacillina nel tempo. Può essere così espresso:

$$z_{ij} = f(x_{ij}, \psi_j) + v_{ij} \tag{3.1}$$

dove z_{ij} è la misura i -esima ($i=1\dots N_j$) per il soggetto j -esimo ($j=1\dots K$), x_{ij} è il vettore che incorpora variabili come tempo, dose, concentrazione dell'analita, e ψ_j è il vettore dei parametri del modello strutturale per il soggetto j . Infine, v_{ij} rappresenta la variabilità residua non spiegata dal modello ed è assunta distribuita in modo gaussiano con media nulla e matrice di covarianza R : $v_j | \psi_j \sim N(0, R_j)$. Nel nostro caso i residui sono anche assunti non correlati, quindi R è diagonale.

Per descrivere la variabilità inter-individuale dei parametri del modello strutturale, deve essere specificato un modello stocastico, che esprima la relazione tra gli effetti fissi, gli effetti casuali ed eventuali covariate:

$$\psi_j = d(a_j, \phi, \eta_j) \tag{3.2}$$

dove a_j è il vettore delle covariate, η_j il vettore degli effetti casuali associati al soggetto j , ϕ è il vettore degli effetti fissi. Si presume che gli errori inter-individuali, η_j , siano definiti secondo una distribuzione gaussiana a media nulla e matrice di covarianza Ω : $\eta_j \sim N(0, \Omega)$. La matrice Ω può descrivere la presenza di correlazioni tra gli effetti casuali, η , e quindi presentare elementi al di fuori della diagonale.

Nell'ambito della modellistica fisiologica, si adottano comunemente modelli stocastici che seguono una distribuzione log-normale per i parametri di clearance e volume di distribuzione. Questo perché la distribuzione log-normale consente di implementare il vincolo di positività, ovvero garantisce che i valori generati siano sempre maggiori di zero, requisito fondamentale per questi parametri fisiologici. Per quanto riguarda, invece, i coefficienti che correlano gli effetti casuali alle covariate, si utilizza una distribuzione normale.

3.2 Monolix

Monolix [26] è il software selezionato per le analisi di popolazione e lo sviluppo del modello di farmacocinetica della piperacillina. Progettato specificatamente per modellare dati di studi di farmacocinetica e farmacodinamica, Monolix rappresenta uno strumento intuitivo, efficiente e robusto per la stima dei parametri in modelli non lineari ad effetti misti. Il software si basa sull'algoritmo Stochastic Approximation Expectation Maximization (SEAM) [30] per la stima dei parametri di popolazione, θ , e un algoritmo Markov-Chain Monte Carlo (MCMC) [31] per la stima degli effetti casuali, η . Il software facilita la diagnosi e la valutazione dei modelli tramite una serie di strumenti integrati come, i plot diagnostici per le distribuzioni dei residui e dei parametri individuali, il calcolo della precisione di stima attraverso la matrice di Fisher, e la valutazione della predizione del modello tramite il grafico del Visual Predictive Check (VPC) e permettendo il confronto dei modelli mediante criteri informativi quali l' Akaike Information Criterion (AIC), il Bayesian Information Criterion (BIC) e una versione del BIC corretta per il caso dei modelli NLEM (BICc). I vantaggi

dell'impiego di Monolix includono la presenza di un'interfaccia grafica intuitiva, la generazione automatica di grafici diagnostici interattivi, l'analisi automatica dei risultati per il suggerimento di covariate e correlazioni da aggiungere al modello e la semplicità nella descrizione dei modelli farmacocinetici attraverso una libreria di modelli precompilati in linguaggio Mlxtran [32].

3.3 Sviluppo del modello

Dopo aver importato il dataset, selezionato le variabili che si intende utilizzare e definita la loro tipologia (ID, TIME, osservazione, covariata categorica o continua, regressore, ...), si può procedere all'implementazione del modello. Il primo passo consiste nella formulazione del modello strutturale, ovvero nell'implementazione del modello e la definizione dei parametri da stimare. Monolix consente di selezionare un modello dalle librerie disponibili o editarlo manualmente utilizzando il linguaggio Mlxtran. In quest'ultimo modo è possibile introdurre nel modello anche eventuali covariate tempo-varianti.

Lo step successivo consiste nell'inizializzazione dei valori iniziali per i parametri da stimare, ovvero gli effetti fissi, le deviazioni standard degli effetti casuali, la dipendenza dei parametri della popolazione sulle covariate e i parametri dell'errore residuo. Dopodiché si passa alla scelta della legge d'errore che può essere definita attraverso quattro modelli diversi integrati nel software. L'ultimo passaggio consiste nella definizione del modello statistico, impostando la distribuzione dei parametri da stimare, selezionando potenziali correlazioni tra gli effetti casuali ed includendo la dipendenza dalle covariate continue. Infine, si può procedere con la stima dei parametri attraverso gli algoritmi SAEM e MCMC.

3.3.1 Modello strutturale

L'evoluzione di una certa variabile $y(t)$ nel tempo, t , come l'andamento della concentrazione plasmatica di piperacillina, può essere così espressa:

$$y_j(t) = f(x_j, \psi_j) \tag{3.3}$$

$$z_j(t) = y_j(t) + v_j(t) \tag{3.4}$$

dove $y_j(t)$ è l'output del modello compartimentale per il soggetto j -esimo. Per la definizione del modello strutturale, $f(x_j, \psi_j)$, basandosi su quanto presente in letteratura, sono stati messi a confronto modelli lineari a singolo e a doppio compartimento.

3.3.1.1 Modello mono-compartimentale

Nel caso più semplice del modello mono-compartimentale, l'intero sistema può essere schematizzato come flusso di farmaco in entrata e uscita dal compartimento centrale, che solitamente rappresenta il volume sanguigno, dove si distribuisce con una concentrazione C .

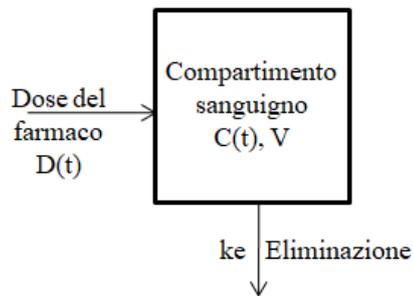


Figura 3. 1: Rappresentazione a blocchi del modello mono-compartimentale. Una dose di farmaco, $I(t)$, viene infusa nel volume sanguigno, V , dove si distribuisce con una certa concentrazione $C(t)$. L'eliminazione è regolata dalla costante di eliminazione k_e .

Le equazioni del modello che esprimono la variazione della quantità di farmaco rispetto al tempo $Q(t)$, sono:

$$\begin{cases} \frac{dQ(t)}{dt} = -k_e Q(t) + D(t) \\ y(t) = \frac{Q(t)}{V} \end{cases}, \text{ con } Q(0) = D(0) \quad (3.5)$$

dove k_e è la costante di eliminazione ($k_e = CL/V$, con V uguale al volume di distribuzione del farmaco e CL pari alla sua clearance), mentre $D(t)$ rappresenta la dose di farmaco somministrata al tempo t .

Di seguito sono riportati tutti i modelli mono-compartimentali testati:

- Modello 0M (dove M sta per mono-compartimentale):

$$f(x, \psi): \begin{cases} \frac{dQ(t)}{dt} = -\frac{CL}{V} Q(t) + D(t) \\ y(t) = \frac{Q(t)}{V} \end{cases}$$

(3.6)

dove i parametri da stimare sono volume di distribuzione V e clearance CL ;

- Modello 1M: uguale al Modello 0M, ma la clearance, CL_{model} , è descritta dal contributo della creatinina serica $CREA$, nel seguente modo:

$$CL = CL_{paz} e^{\beta_{CREA} (CREA_i - medCREA)}$$

(3.7)

dove $medCREA$ rappresenta la mediana della popolazione della media delle misurazioni della $CREA$ per ogni individuo, mentre CL_{paz} e β_{CREA} sono parametri del modello da stimare insieme a V .

- Modello 2M: uguale al Modello 1M, tuttavia, la clearance del farmaco, CL_{model} , è caratterizzata dal contributo della clearance della creatinina, $CLCR_u$, misurata sulla base della raccolta di urina:

$$CL = CL_{paz} e^{\beta_{CLCR_u} (CLCR_{u_i} - med CLCR_u)}$$

(3.8)

dove $medCLCR_u$ è pari alla mediana della popolazione della media delle realizzazioni per soggetto della $CLCR_u \cdot V$, CL_{paz} e β_{CLCR_u} sono i parametri del modello da stimare.

- Modello 3M: uguale al Modello 2M, ma al posto della clearance della creatinina misurata, si sfrutta la $CLCR_{CG}$ calcolata con la formula di Cockcroft-Gault (Equazione 2.3):

$$CL = CL_{paz} e^{\beta_{CLCR_{CG}} (CLCR_{CG_i} - med CLCR_{CG})}$$

(3.9)

con $medCLCR_{CG}$ uguale alla mediana della popolazione della media delle realizzazioni per soggetto della $CLCR_{CG} \cdot V$, CL_{paz} e $\beta_{CLCR_{CG}}$ sono i parametri del modello da stimare.

- Modello 4M: uguale al Modello 0M, ma la clearance è suddivisa in una componente non renale, CL_{nr} , interamente stimata ed una componente renale, CL_r , descritta attraverso il contributo della $CLCR_{CG}$:

$$CL_r = \theta_{CLCR_{CG}} CLCR_{CG}$$

(3.10)

$$CL = CL_{nr} + CL_r \quad (3.11)$$

con $V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}$ da stimare.

- Modello 5M: uguale al Modello 4M, con l'unica differenza che la clearance renale è ottenuta come:

$$CL_r = \theta_{CLCR_CG} \left(\frac{CLCR_CG_i}{medCLCR_CG} \right)^{\beta_{CLCR_CG}} \quad (3.12)$$

$$CL = CL_{nr} + CL_r \quad (3.13)$$

con $V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}$ e β_{CLCR_CG} parametri del modello da stimare.

- Modello 6M: uguale al Modello 0M, ma la clearance del farmaco è calcolata come somma di CL_{nr} , di CL_r (come nel Modello 4M e 5M) e di un eventuale contributo della clearance extracorporea CL_{ex} per i pazienti sottoposti a RRT (nullo in assenza di tale trattamento):

$$CL_{paz} = CL_{nr} + CL_r \quad (3.14)$$

$$CL = CL_{paz} + CL_{ex} \quad (3.15)$$

con V e CL_{paz} da stimare.

- Modello 7M: uguale al modello 1M, introducendo il contributo della CL_{ex} sul calcolo della clearance totale del farmaco:

$$CL = CL_{paz} e^{\beta_{CREA} (CREA_i - medCREA)} \quad (3.16)$$

$$CL_{model} = CL + CL_{ex} \quad (3.17)$$

dove $V, CL_{paz}, \beta_{CREA}$, sono i parametri del modello da stimare.

- Modello 8M: uguale al Modello 4M, sommando alla clearance totale la clearance extracorporea:

$$CL_r = \theta_{CLCR_CG} CLCR_CG \quad (3.18)$$

$$CL = CL_{nr} + CL_r + CL_{ex} \quad (3.19)$$

con $V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}$ da stimare.

- Modello 9M: uguale al Modello 5M, con l'aggiunta della CL_{ex} alla clearance totale:

$$CL_r = \theta_{CLCR_CG} \left(\frac{CLCR_CG_i}{medCLCR_CG} \right)^{\beta_{CLCR_CG}} \quad (3.20)$$

$$CL = CL_{nr} + CL_r + CL_{ex} \quad (3.21)$$

con $V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}$ e β_{CLCR_CG} parametri del modello da stimare.

- Modello 10M: la clearance è scomposta nelle componenti renale, non renale ed extracorporea (come nel Modello 6M) e la CL_r , descritta dal contributo della $CREA$ (come nel Modello 7M):

$$CL_r = CL_{paz} e^{\beta_{CREA} (CREA_i - medCREA)} \quad (3.22)$$

$$CL_{model} = CL_{nr} + CL_r + CL_{ex} \quad (3.23)$$

dove $V, CL_{nr}, CL_{paz}, \beta_{CREA}$ sono i parametri del modello da stimare.

- Modello 11M: la clearance del paziente è calcolata come somma di una componente non renale, stimata, e di una renale, descritta mediante la $CLCR_CG$ (come nel Modello 5M). La clearance risultante viene influenzata dal contributo della $CREA$, a cui viene sommata infine la CL_{ex} :

$$CL_r = \theta_{CLCR_CG} \left(\frac{CLCR_CG_i}{medCLCR_CG} \right)^{\beta_{CLCR_CG}}$$

(3.24)

$$CL_{paz} = CL_{nr} + CL_r$$

(3.25)

$$CL = CL_{paz} e^{\beta_{CREA} (CREA_i - medCREA)}$$

(3.26)

$$CL_{model} = CL + CL_{ex}$$

(3.27)

dove V , CL_{nr} , θ_{CLCR_CG} , β_{CLCR_CG} , CL_{paz} , β_{CREA} , sono i parametri del modello da stimare.

3.3.1.2 Modello bi-compartmentale

Nel modello bi-compartmentale entrano in gioco due diversi volumi: uno centrale V_1 , che rappresenta il flusso sanguigno ed uno periferico V_2 , identificabile nel nostro caso con il volume extracellulare, in cui il farmaco distribuisce con una concentrazione C_2 . La dose in ingresso, $D(t)$, viene infusa nel compartimento plasmatico, dove avvengono le misurazioni della concentrazione.

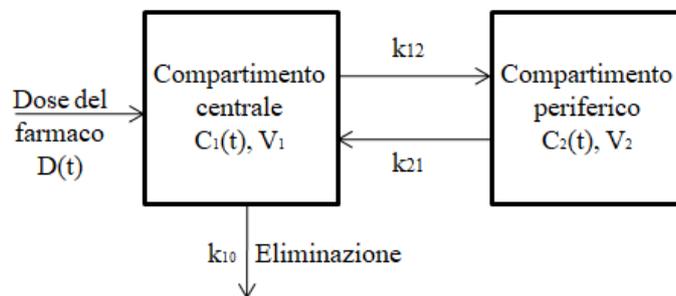


Figura 3. 2: Schema a blocchi del modello bi-compartmentale. Una dose di farmaco, $I(t)$, viene infusa nel compartimento centrale, V_1 , dove si distribuisce con una certa concentrazione $C_1(t)$. Il farmaco si trasferisce dal volume centrale, V_1 , al volume periferico, V_2 , e viceversa, rispettivamente con velocità k_{12} e k_{21} . L'eliminazione è regolata dalla costante di eliminazione k_{10} .

Le equazioni che descrivono il flusso del farmaco tra questi due compartimenti sono le seguenti:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dQ_1(t)}{dt} = -(k_{01} + k_{12})Q_1(t) + k_{21}Q_2(t) + D(t) \\ \frac{dQ_2(t)}{dt} = k_{12}Q_1(t) - k_{21}Q_2(t) \\ y(t) = \frac{Q(t)}{V_1} \end{array} \right. , \text{ con } Q_1(0) = D(0) \text{ e } Q_2(0) = 0 \quad (3.28)$$

dove k_{12} e k_{21} sono le costanti di velocità che rappresentano rispettivamente il tasso di trasferimento del farmaco da V_1 a V_2 e viceversa, mentre k_{01} è la costante di eliminazione dal compartimento centrale. Tra i modelli bi-compartimentali analizzati vi sono:

- Modello 0B (dove B sta per bi-compartimentale):

$$f(x, \psi): \left\{ \begin{array}{l} \frac{dQ_1(t)}{dt} = -\left(\frac{CL_1}{V_1} + \frac{CL_2}{V_1}\right)Q_1(t) + \frac{CL_2}{V_2}Q_2(t) + D(t) \\ \frac{dQ_2(t)}{dt} = \frac{CL_2}{V_1}Q_1(t) - \frac{CL_2}{V_2}Q_2(t) \\ y(t) = \frac{Q(t)}{V_1} \end{array} \right.$$

dove, V_1, V_2, CL_1 e CL_2 sono i parametri del modello stimati con effetti casuali.

Per poter preservare la struttura bi-compartimentale, sono state apportate modifiche alla parte stocastica del modello, valutando la presenza di effetti casuali sui parametri di popolazione, come nei modelli seguenti:

- Modello 1B: uguale al Modello 0B, con CL_2 senza effetti casuali;
- Modello 2B: come il Modello 0B, con V_2 senza effetti casuali;
- Modello 3B: identico al Modello 0B, con CL_2 e V_2 stimati senza effetti casuali.

Prendendo come riferimento il modello a doppio compartimento di Asin Prieto [25], sono state fatte ulteriori prove fissando alcuni parametri ai valori identificati dallo stesso.

- Modello 4B: come il Modello 0B, con CL_2 fissato al valore stimato in [25];
- Modello 5B: identico al Modello 0B, con V_2 fissato al valore stimato in [25];
- Modello 6B: uguale al Modello 0B, con CL_2 e V_2 fissati ai valori stimati in [25];
- Modello 7B: c come il Modello 7.M (Equazioni 3.16 e 3.17), ma con aggiunta di un secondo compartimento con V_2 , e CL_2 fissati ai valori stimati in [25].

3.3.2 Modello d'errore

In Monolix, è possibile definire il modello di errore residuo attraverso quattro funzioni standard:

1. Costante: $z_j = f_j(x_j, \psi_j) + a \varepsilon_j$
2. Proporzionale: $z_j = f_j(x_j, \psi_j) + b f_j(x_j, \psi_j)^c \varepsilon_j$
3. Combinato 1: $z_j = f_j(x_j, \psi_j) + (a + b f_j(x_j, \psi_j)^c) \varepsilon_j$
4. Combinato 2: $z_j = f_j(x_j, \psi_j) + \sqrt{a^2 + b^2 (f_j(x_j, \psi_j)^c)^2} \varepsilon_j$

Dove a e b sono valori costanti da stimare, c è un parametro che nel nostro caso è sempre fisso uguale a 1 ed ε_j è una variabile casuale distribuita in modo normale standard $\varepsilon_j \sim N(0,1)$. In letteratura sono state proposte diverse leggi d'errore per modellare la variabilità residua: in [21] l'errore residuo è stato assunto proporzionale, in [25] additivo su scala logaritmica, mentre in [23] è stata scelta una combinazione di errore additivo e proporzionale. Nel nostro caso, la scelta del modello più adeguato si è basata sulle deviazioni standard delle concentrazioni di piperacillina misurate da prelievi ematici ripetuti, riportati in Tabella 3.1. Tali campioni sono stati analizzati con tecniche di cromatografia liquida ad alta prestazione.

Da questi dati si può notare l'andamento crescente della deviazione standard dell'errore al crescere della concentrazione misurata. Tra quelli disponibili il modello più simile all'andamento della deviazione standard in Tab 3.1 è risultato il Combinato 1, che è stato scelto come modello d'errore per i modelli NLEM testati.

Concentrazione misurata \pm S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	Accuratezza (%)	CV (%)
8.77 ± 1.83	10.30	13.49
95.14 ± 6.39	7.16	7.90
390.60 ± 10.86	5.35	6.41

Tabella 3. 1: Dati di laboratorio sulle misurazioni delle concentrazioni di piperacillina. A partire da sinistra: la concentrazione misurata dell'antibiotico ($\mu\text{g/ml}$) \pm la sua standard deviation, l'accuratezza e il coefficiente di variazione delle osservazioni (%).

3.3.3 Modello stocastico

Il modello stocastico viene introdotto per descrivere la variazione individuale dei parametri del modello strutturale rispetto ai valori di popolazione. La distribuzione di questi parametri, le correlazioni tra di essi, la presenza di effetti casuali e il loro rapporto con le covariate sono specificati in questo modello. Ogni parametro deve essere descritto da una distribuzione. Quelle disponibili in Monolix sono la distribuzione normale, log-normale, logit-normale e probit-normale. Nel nostro caso, la variabilità interindividuale è stata modellata con una distribuzione log-normale per i parametri V , CL e $\theta_{CLCR_{CG}}$, così da garantirne la positività:

$$\psi_j = \phi \exp(\eta_j) \quad (3.30)$$

in questo modo:

$$\log(\psi_j) \sim N(\log(\phi_i), \Omega) \quad (3.31)$$

dove $\eta_j \sim N(0, \Omega)$. Mentre, β_{CLCR_u} , $\beta_{CLCR_{CG}}$, β_{CREA} sono definiti secondo una distribuzione normale $\psi_i \sim N(\phi_i, \Omega)$, con $\eta_i \sim N(0, \Omega)$. Nel modello stocastico è possibile introdurre, inoltre, correlazioni tra gli effetti casuali, η . Nei modelli considerati in questo lavoro, η sono stati inizialmente assunti non correlati. In seguito, sono state testate diverse correlazioni tra gli effetti casuali introducendo i termini non-diagonali nella matrice covarianza. Attraverso la validazione del modello, si può determinare se tale correlazione contribuisce in modo significativo al miglioramento delle performance del modello e quindi se va mantenuta oppure no.

3.3.4 Modello delle covariate

Il modello stocastico può essere migliorato ulteriormente introducendo specifiche covariate del soggetto per descrivere i parametri individuali. La selezione delle covariate da testare può avvenire attraverso il test di correlazione di Pearson che viene eseguito per determinare se esistono forti correlazioni tra gli effetti casuali, η , e le covariate dei soggetti. Se il test restituisce un valore di p-value sufficientemente piccolo (< 0.05) vale la pena testare la covariata nel modello. In aggiunta, Monolix offre la possibilità di costruire modelli di covariate mediante tre algoritmi automatici: COSSAC (COnditional Sampling use for Stepwise Approach based on Correlation tests), SAMBA (Stochastic Approximation for Model Building Algorithm) e SCM (Stepwise Covariate Model-building) [33]. Nel nostro caso, si è utilizzato il metodo SCM che consiste nella selezione iterativa delle covariate da introdurre nel modello secondo due fasi: una prima serie di iterazioni, chiamata “selezione in avanti”, in cui a ogni step (i) vengono testate una alla volta tutte le possibili relazioni η parametro-covariata, (ii) si seleziona la relazione η -covariata migliore secondo un determinato criterio tra Likelihood Ratio Threshold (LRT) e Bayesian Information Criterion corrected (BICc), (iii) si mantiene la relazione migliore nel modello e si ripete il passo (i) finché nessuna delle relazioni testate migliora le performance del modello. A questa fase segue una seconda serie di iterazioni, “eliminazione a ritroso”, in cui (i) si eliminano una alla volta tutte le relazioni introdotte, (ii) si rimuove dal modello la relazione quando rimossa ha prodotto il miglior valore del criterio selezionato (LRT o BICc) (iii) si ripete dal passo (i) finché nessuna rimozione produce miglioramenti nel criterio selezionato.

Per poter sfruttare i test statistici e gli algoritmi automatici integrati in Monolix, ciascuna covariata deve essere costante nel tempo. A questo scopo, delle covariate tempo-varianti è stata calcolata anche la media delle realizzazioni per ciascun soggetto in modo da poter utilizzare i metodi integrati almeno in questa espressione. Tutte le covariate sono state trasformate in modo da essere centrate rispetto alla mediana, così da non introdurre nessun bias nelle stime di popolazione e imputare i soggetti con covariate mancante con la mediana stessa, così da avere un effetto dovuto alla covariata che fosse nullo per quei soggetti. Le trasformazioni provate sono due: il delta rispetto al valore mediano e il logaritmo della covariata normalizzata per il valore mediano. Quelle risultate significative, sono state aggiunte al modello stocastico nel modo seguente:

$$\psi_{ij} = \phi_i \cdot \exp(\beta_{k,j} a_{k,i} + \eta_{i,j})$$

dove $\beta_{k,j}$ è il coefficiente che lega la covariata agli effetti random.

3.4 Valutazione e confronto dei modelli

Al termine dell'identificazione del modello, Monolix offre una serie di strumenti integrati per valutare le performance del modello, ovvero per verificare che il modello sia adeguato e descriva correttamente i dati osservati. La bontà dei modelli presentati in questo lavoro verrà valutata attraverso: la distribuzione dei residui individuali e di popolazione, la precisione di stima dei parametri del modello, la plausibilità fisiologica dei valori dei parametri stimati, e il VPC. I modelli che superano in modo soddisfacente le analisi precedenti, vengono poi confrontati attraverso i criteri di parsimonia disponibili in Monolix che permettono di scegliere all'interno di una batteria di modelli quello più parsimonioso, ovvero quello che descrive meglio i dati utilizzando il minor numero di gradi di libertà. A seguito di quest'analisi è possibile selezionare il modello migliore tra quelli testati.

3.4.1 Analisi dei residui

I residui pesati individuali (IWRES) ed i residui pesati di popolazione (PWRES) sono metriche importate per valutare l'abilità del modello nel descrivere i dati osservati [34]. Idealmente, se il modello è appropriato, la distribuzione degli IWRES e dei PWRES dovrebbe avvicinarsi a una distribuzione normale standard $\varepsilon_j \sim N(0,1)$. I PWRES sono i residui tra i dati e il fit del modello, determinato utilizzando i parametri della popolazione e le covariate individuali, mentre gli IWRES utilizzando sia i parametri che le covariate individuali. Nel caso di errore di misurazione non correlato, il residuo individuale per il campione i -esimo del soggetto j -esimo, $IWRES_{ij}$, si calcola come:

$$IWRES_{ij} = \frac{z_{ij} - \hat{f}(x_{ij}; \hat{\psi}_i)}{\hat{g}(x_{ij}; \hat{\psi}_i)}$$

(3.33)

dove $\hat{\psi}_i$ sono i parametri stimati e g è la funzione che definisce il modello di errore residuo, nel nostro caso:

$$z_j = f_j(x_j, \psi_j) + (a + bf_j(x_j, \psi_j)^c) \varepsilon_j$$

(3.34)

I $PWRES_{ij}$ sono definiti come la differenza normalizzata tra le osservazioni e la loro aspettazione attesa e sono calcolati utilizzando i parametri di popolazione e la matrice di covarianza delle osservazioni V_{ij} :

$$PWRES_{ij} = V_{ij}^{-\frac{1}{2}}(z_{ij} - E(z_{ij}))$$
(3.35)

dove z_i è il vettore di osservazioni per l' i -esimo soggetto ($z_{io} = (z_{ij}, 1 \leq j \leq n_{io})$) e la media di z_i è tale che:

$$E(z_{ij}) = (E(f(x_{ij}; \psi_j), 1 \leq j \leq n_i)$$
(3.36)

Inoltre, in Monolix viene fornita una versione non parametrica degli PWRES, gli errori di distribuzione di previsione normalizzati (NPDE). Sia $F_{ij} = F_{PWRES_{ij}}(PWRES_{ij})$, dove $F_{PWRES_{ij}}$ è la funzione di distribuzione cumulativa degli $PWRES_{ij}$, gli NPDE $_{ij}$ sono ottenuti applicando l'inverso della funzione di distribuzione cumulativa di una distribuzione normale:

$$NPDE_{ij} = \Phi^{-1}(\hat{F}_{ij})$$
(3.37)

dove F_{ij} può essere stimato utilizzando l'insieme dei dati simulati $z_j^{(k)}$, nel seguente modo:

$$\hat{F}_{ij} = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \delta_{ijk}$$
(3.38)

dove K è il numero totale di simulazioni e δ_{ijk} è una funzione indicatrice che vale 1 se la $z_{ij}^{(k)} < z_i$, altrimenti vale 0.

3.4.2 Precisione delle stime

Un altro aspetto fondamentale da valutare per la validazione di un modello è la precisione delle sue stime. Gli errori standard (SE) rappresentano l'incertezza associata ai parametri

stimati della popolazione. In Monolix sono calcolati tramite la stima della matrice di Informazione di Fisher (FIM) [35], definita come:

$$FIM(\hat{\theta}) = -\frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \log(\mathcal{L}_y(\hat{\theta})) \quad (3.39)$$

dove $\mathcal{L}_y(\hat{\theta})$ rappresenta la log-verosimiglianza del modello. In Monolix, la FIM può essere stimata per linearizzazione, più veloce ed applicabile solo a dati continui, o per approssimazione stocastica, tramite l'algoritmo MCMC, più precisa e applicabile per qualsiasi tipo di dato. In questo progetto è sempre stato utilizzato il secondo metodo essendo più accurato, poiché i modelli testati erano abbastanza semplici da non richiedere un costo computazionale troppo oneroso. Una volta calcolata la FIM, gli SE possono essere calcolati come radice quadrata degli elementi diagonali dell'inversa della FIM, corrispondente alla matrice di covarianza $\hat{C}(\hat{\theta})$ del parametro $\hat{\theta}$:

$$SE(\hat{\theta}_k) = \sqrt{\tilde{C}_{kk}(\hat{\theta})} \quad (3.40)$$

dove \tilde{C} è ottenuta dalla matrice jacobiana: $\tilde{C} = J^T C J$. Dividendo l'errore standard per la stima del parametro, si ottiene l'errore standard relativo (RSE):

$$RSE(\hat{\theta}_k) = \frac{SE(\hat{\theta}_k)}{\hat{\theta}_k} \quad (3.41)$$

Un RSE elevato indica una maggiore incertezza nella stima del parametro, mentre un valore più basso indica una stima più precisa. Indicativamente, RSE maggiori del 100% sono da considerarsi non accettabili, e causano l'esclusione del modello testato.

3.4.3 VPC

Il VPC è uno strumento diagnostico informativo che consente di valutare le prestazioni predittive di modelli farmacocinetici di popolazione [36]. In un modello ad effetti misti, il VPC rappresenta graficamente sia gli effetti fissi che quelli casuali, confrontando i percentili dei dati osservati ed i percentili dei profili simulati. L'obiettivo del VPC è quello di

analizzare, attraverso delle rappresentazioni grafiche, se le simulazioni del modello sono in grado di riprodurre sia l'andamento centrale dei dati osservati (effetti fissi) che la loro variabilità (effetti casuali). In altre parole, permette di verificare se il modello d'interesse è rappresentativo dei dati utilizzati per identificarlo. Per far ciò, si raggruppano le osservazioni per diversi intervalli temporali e per ognuno si confrontano i percentili empirici dei dati osservati, con i percentili simulati, calcolati attraverso simulazioni di Monte Carlo del modello appena identificato. Solitamente per rappresentare la distribuzione delle osservazioni si prendono il 10°, il 50° e il 90° percentile di ciascun intervallo temporale, mentre per i dati simulati si utilizza l'intervallo di confidenza al 90% del 10°, il 50° e il 90° percentile di ciascun intervallo temporale, e sono rappresentati come aree. Se i percentili osservati si mantengono entro le aree di previsione corrispondenti, questo significa che il modello è capace di catturare correttamente il trend centrale dei dati e la loro variabilità. Per impostazione predefinita, il VPC è rappresentato in funzione dei tempi assoluti (asse x) registrati nel dataset, ma in alcuni casi, può essere conveniente visualizzare il VPC allineando i dati rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose, per poter osservare la forma della curva di assorbimento. Ad esempio, i pazienti di questo studio hanno ricevuto dosi multiple di piperacillina, con diversi regimi di dosaggio e per periodi di somministrazione anche molto lunghi. Per questo motivo gli individui presentano misure sparse in tempi diversi ed il VPC risulta uniforme sul periodo di osservazione. Selezionando la visualizzazione “time after last doses”, Monolix ricostruisce il grafico utilizzando per ciascuna misura osservata e simulata il tempo trascorso dall'ultima dose prima di tale misurazione, mostrando meglio la curva di assorbimento del farmaco evidenziando eventuali problematiche del modello strutturale.

3.4.4 Stima della verosimiglianza e criteri di parsimonia

La funzione obiettivo ed i criteri di parsimonia sono indici utili per confrontare modelli di popolazione che abbiano ottenuto risultati soddisfacenti durante la fase di valutazione. Il calcolo dei criteri di parsimonia per un determinato modello richiede la stima della verosimiglianza:

$$\mathcal{L}(\hat{\theta}) \equiv p(y; \hat{\theta}) \tag{3.42}$$

dove $p(y; \hat{\theta})$ indica la funzione di distribuzione di probabilità dei dati osservati, basata sulle stime dei parametri di popolazione [37]. In Monolix, la verosimiglianza può essere stimata per

linearizzazione o tramite un algoritmo stocastico attraverso campionamento con MCMC. Il secondo metodo sarà quello utilizzato in questo lavoro in quanto offre stime più precise.

Oltre al valore della verosimiglianza, Monolix fornisce il calcolo del Criterio di Informazione di Akaike (AIC) e del Criterio di Informazione Bayesiano (BIC), calcolati come di seguito:

$$AIC = -2\log(\hat{\mathcal{L}}_z(\theta)) + 2P \quad (3.43)$$

$$BIC = -2\log(\hat{\mathcal{L}}_z(\theta)) + 2 \log(N) P \quad (3.44)$$

dove P è il numero totale di parametri da stimare e N il numero di soggetti. Il software calcola, inoltre, il BICc che aggiunge un termine correttivo al BIC classico nel caso di modelli NLEM, in cui i parametri relativi al modello strutturale sono penalizzati in modo diverso dai parametri del modello stocastico:

$$BICc = -2\log(\hat{\mathcal{L}}_z(\theta)) + \dim(\theta_F)\log(n_{tot}) + \dim(\theta_R)\log(N) \quad (3.45)$$

dove $\dim(\theta_F)$ è il numero di parametri stimati del modello strutturale (cioè i parametri del modello compartimentale ed i coefficienti di errore), n_{tot} è il numero totale di osservazioni, $\dim(\theta_R)$ è il numero di parametri stimati del modello stocastico (ovvero le deviazioni standard degli effetti casuali, eventuali correlazioni e covariate), ed N è il numero totale di soggetti [37].

Una verosimiglianza maggiore indica una probabilità maggiore che il modello rifletta con precisione i dati osservati, senza tener conto del numero di gradi di libertà del modello. Gli indici di parsimonia, invece, offrono una metrica che penalizzi i modelli che utilizzano più parametri (e quindi gradi di libertà) per descrivere i dati. Pertanto, in un'analisi comparativa dei modelli, si prediligerà il modello che presenta il criterio di informazione più basso, indice di un buon trade-off tra complessità del modello e performance descrittive.

3.5 Strategia di sviluppo del modello

La strategia adottata per lo sviluppo del modello in Monolix è stata la seguente:

1. Selezione a priori della legge d'errore: in questa fase è stato selezionato il modello di errore più appropriato tra quelli disponibili nel software e sono stati determinati (nel nostro caso fissati) i valori dei parametri a e b ;
2. Definizione della configurazione strutturale: questo passaggio ha comportato la formulazione del modello strutturale e l'identificazione dei parametri da stimare. In questo progetto sono stati sfruttati sia i modelli disponibili nelle librerie di Monolix, sia il linguaggio Mlxtran, per l'implementazione di modelli più complessi che includessero anche eventuali covariate tempo-varianti. Sono state testate diverse configurazioni e confrontati i risultati della validazione per selezionare il modello migliore;
3. Determinazione del modello stocastico: in questo step sono state definite le distribuzioni di probabilità dei parametri da stimare, le potenziali correlazioni tra di essi e la presenza di effetti casuali. Nel nostro caso, la correlazione tra i parametri di popolazione è stata testata prima e dopo l'inclusione delle covariate nel modello;
4. Sviluppo del modello delle covariate: in questa fase sono state selezionate le covariate più significative a spiegare parte della variabilità dei parametri farmacocinetici. In prima battuta, le covariate costanti sono state tutte testate mediante l'utilizzo di SCM. A questo punto, se l'aggiunta della covariata ha contribuito ad un miglioramento significativo del modello, è stata testata anche la versione tempo-variante di quella covariata (se presente). Per fare ciò, è stato necessario selezionare nel dataset iniziale la covariata come regressore ed inserirla manualmente nella fase di definizione del modello strutturale utilizzando il linguaggio Mlxtran. Infine è stata valutata nuovamente la bontà del modello aggiornato. Se quest'ultimo era migliore di quello precedente, si è proceduto iterativamente selezionando ulteriori covariate da inserire nel modello.

3.6 Applicazione del modello al dataset completo

Per i motivi spiegati nella sezione 2.3, tutti i modelli analizzati in questo lavoro sono stati sviluppati a partire dal dataset ridotto ai 119 soggetti più affidabili. Dopo aver identificato il modello più appropriato per descrivere questi dati, questo è stato poi applicato al dataset completo, fissando le stime iniziali ai valori risultanti dalle stime dei parametri della popolazione. In tal modo sono state valutate le performance di simulazione del modello sul dataset completo.

4. Risultati

In questo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti dalle analisi per i modelli testati in Monolix. Nella prima parte sono messi a confronto i modelli più significativi, mentre nella seconda vengono riportati nel dettaglio i risultati del modello finale, selezionato sulla base tecniche di validazione descritte nel capitolo precedente. Infine, sono riportati i risultati del modello migliore anche sul dataset completo.

4.1 Selezione del modello d'errore

Come riportato nel paragrafo 3.3.2, è stato ipotizzato che la variabilità residua venga modellata tramite la legge d'errore “combinato1”, che è la somma di un termine costante, a , e di un termine proporzionale, b , alla concentrazione misurata.

Inizialmente i parametri a e b sono stati predetti mediante lo stimatore di massima verosimiglianza. Dai risultati, riportati in Tabella 4.1, si può notare, però, che la stima di b (modello 0E) è molto alta (circa il 60% del valore della concentrazione misurata), anche quando a è fissato uguale a 0 (modello 1E). Ciò indica un'incertezza delle misure è eccessivamente elevata. Inoltre, le distribuzioni degli IWRES (Figura 4.1) si discostano dall'andamento di una normale standard, ma producono invece una distribuzione troncata. Questo perché, gli IWRES sono calcolati a partire dall'Equazione 3.34, e nel caso di $g(x_{ij}; \hat{\psi}_{io}) = bf(x_{ij}; \hat{\psi}_{io})$, imponendo il vincolo che le misure siano sempre positive, $z_{ij} > 0$ si ottiene che $IWRES_{ij} > -\frac{1}{b}$. Se b è dell'ordine di 0.6 (come quando viene stimato), allora gli IWRES non possono essere inferiori a -1.67 (Figura 4.1).

Per ovviare a tale problema, a e b sono stati fissati a dei valori plausibili. Sono stati confrontati diversi valori ed i risultati riassunti in Tabella 4.1. Il valore finale di tali parametri è stato selezionato conformemente alla distribuzione dei residui pesati individuali. Nello specifico, è stato selezionato il modello 5E, in quanto produce un andamento dei IWRES (Figura 4.2) ragionevolmente approssimabile ad una gaussiana. In questo modello, i valori a e b risultano non troppo elevati. Inoltre, nella definizione del modello d'errore è importante selezionare una variabilità adeguata: un modello con varianza troppo ampia, non sarà in grado di fornire stime precise; al contrario, un modello d'errore con varianza troppo bassa potrebbe

portare ad una sovrastima dei parametri. Il modello 5E, risulta essere il giusto compromesso in questo trade off.

Modello d'errore n°	a [RSE %]	b [RSE %]	V (L) [RSE %]	CL (L/h) [RSE %]	ω_V C.V. [RSE %]	ω_{CL} C.V. [RSE %]
0E	0.048 [1.20e ³]	0.62 [6.08]	53.85 [20.5]	14.01 [11.8]	219.65 [12.0]	160.63 [8.13]
1E	0	0.63 [5.16]	51.38 [20.9]	13.94 [11.7]	226.96 [12.3]	159.23 [8.17]
2E	7	0.2	33.5 [25.6]	8.58 [11.3]	440.99 [11.3]	155.7 [8.05]
3E	7	0.25	32.26 [25.7]	14.31 [11.2]	408.68 [11.2]	151.72 [8.16]
4E	7	0.3	35.5 [24.1]	14.61 [11.3]	288.04 [12.1]	153.51 [8.22]
5E	10	0.2	32.58 [26.3]	14.89 [11.4]	344.26 [11.7]	153.79 [8.54]
6E	10	0.25	34.27 [26.6]	15.06 [11.4]	320.23 [12.7]	152.54 [8.76]
7E	10	0.3	33.71 [27.1]	15.15 [11.3]	324.13 [13.8]	149.74 [8.78]
8E	20	0.2	29.93 [27.8]	17.89 [12.6]	220.07 [23.9]	146 [10.3]
9E	20	0.25	26.62 [28.0]	18.61 [13.1]	182.56 [37.2]	145.26 [10.3]
10E	20	0.3	29.02 [30.8]	18.76 [16.1]	185.08 [69.3]	145.91 [10.8]

Tabella 4. 1: Risultati dalla validazione dei modelli per la selezione della legge d'errore. Da sinistra: i valori di a e b stimati/fissati e gli eventuali errori standard relativi, le stime di popolazione del volume di distribuzione e della clearance della piperacillina, con i rispettivi RSE ed i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE. La riga riquadrata corrisponde al modello selezionato.

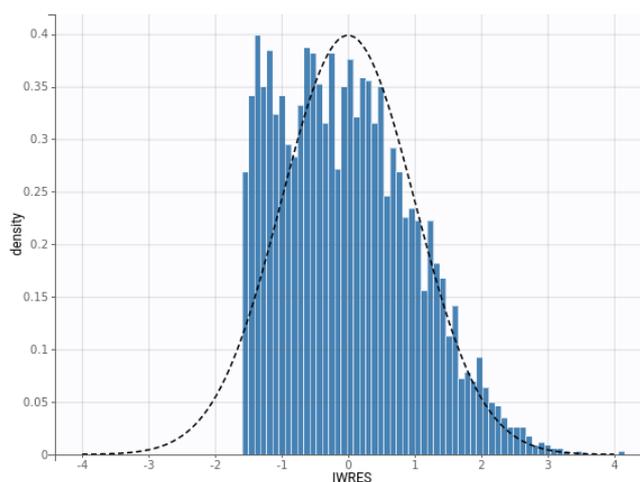


Figura 4. 1: Distribuzione dei residui pesati individuali (IWRES) utilizzando il modello d'errore "combinato 1", con i parametri a e b stimati (Modello 0E).

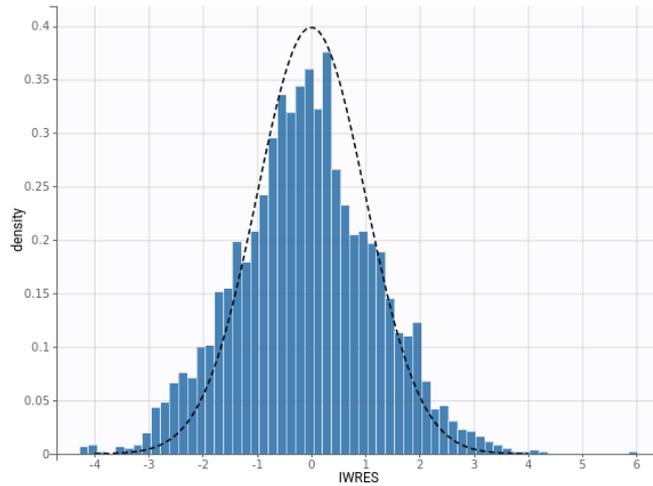


Figura 4. 2: Distribuzione dei residui pesati individuali (IWRES) utilizzando il modello d’errore “combinato 1”, con i parametri a e b fissati rispettivamente ai valori 10 e 0.2 (Modello 5E).

4.2 Sviluppo del modello strutturale

La selezione del modello strutturale, si è basata principalmente sugli RSE dei parametri stimati, la deviazione standard degli effetti casuali (ω_V e ω_{CL}) e sulla diminuzione del valore del Corrected Bayesian Information Criteria (BICc).

4.2.1 Modello mono-compartmentale

In tabella 4.2, sono riportati i modelli mono-compartmentali testati e descritti nel paragrafo 3.3.1.1.

Modello n°	Parametri stimati	V (L) [RSE %]	CL (L/h) [RSE %]	ω_V C.V. [RSE %]	ω_{CL} C.V. [RSE %]	BICc	OFV
0M	$V, CL, \omega_V, \omega_{CL}$	32.58 [26.3]	14.89 [11.4]	344.26 [11.7]	153.79 [8.54]	3979.3	3957.9
1M	$V, CL_{paz}, \beta_{CREA}, \omega_V, \omega_{CL}$	35.17 [25.0]	17.26 [11.2]	304.67 [13.1]	145.79 [8.50]	3946.5	3919.1
2M	$V, CL_{paz}, \beta_{CLCR_u}, \omega_V, \omega_{CL}$	32.91 [26.2]	13.58 [11.0]	393.18 [12.5]	141.6 [8.58]	3975.2	3947.8
3M	$V, CL_{paz}, \beta_{CLCR_{CG}}, \omega_V, \omega_{CL}$	36.01 [25.8]	12.96 [11.1]	358.52 [13.4]	143.76 [8.74]	3952.5	3925.1
4M	$V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_{CG}}, \omega_V, \omega_{CL}$	28.68 [26.8]	12.69 [13.1]	359.67 [13.0]	196.91 [8.57]	3975.2	3947.8
5M	$V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_{CG}}, \beta_{CLCR_{CG}}, \omega_V, \omega_{CL}$	35.99 [26.4]	12.38 [13.0]	374.86 [13.2]	195.25 [8.61]	3974.0	3940.6

ω_V, ω_{CL}							
6M	$V, CL_{paz}, \omega_V, \omega_{CL}$	36.64 [24.9]	14.38 [11.7]	347.48 [12.9]	156.55 [8.87]	3976.4	3955
7M	$V, CL_{paz}, \beta_{CREA}, \omega_V, \omega_{CL}$	32.04 [26.5]	16.65 [11.0]	373.66 [13.5]	142.45 [8.52]	3943.1	3915.8
8M	$V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}, \omega_V, \omega_{CL}$	31.02 [28.0]	12.53 [13.3]	417.79 [13.8]	202.83 [8.76]	3971.8	3944.4
9M	$V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}, \beta_{CLCR_CG}, \omega_V, \omega_{CL}$	30.25 [28.7]	12.53 [13.1]	433.23 [15.4]	190.87 [8.36]	3971.3	3938.0
10M	$V, CL_{paz}, CL_{nr}, \beta_{CREA}, \omega_V, \omega_{CL}$	32.61 [27.0]	13.6 [12.4]	399.3 [14.4]	171.34 [8.62]	3979.6	3946.3
11M	$V, CL_{nr}, \theta_{CLCR_CG}, \beta_{CLCR_CG}, \beta_{CREA}, \omega_V, \omega_{CL}$	33.7 [26.8]	14.94 [11.7]	454.47 [13.8]	151.24 [8.47]	3951.0	3911.7

Tabella 4. 2: Risultati dalla validazione dei modelli per la selezione della configurazione strutturale mono-compartmentale. Da sinistra: i parametri di popolazione stimati, i valori delle stime, con i rispettivi RSE, i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE, gli indici BICc e OFV. I valori evidenziati in grassetto rappresentano i risultati migliori, mentre la riga riquadrata corrisponde al modello selezionato.

Il modello selezionato per descrivere la struttura mono-compartmentale è stato il 7M. Un valore minore di BICc suggerisce che il modello 7M è preferibile rispetto agli altri modelli testati, offrendo il miglior equilibrio tra la complessità del modello e l'adattamento ai dati. Inoltre, i parametri stimati per la popolazione mostrano, al contempo, un'elevata precisione nelle stime ed una variabilità accettabile. Tale modello viene testato anche nella sua forma bi-compartmentale (Modello 7B descritto nella sezione 3.3.1.2).

4.2.2 Modello bi-compartmentale

I modelli a doppio compartimento, presentati nella sezione 3.3.1.2, sono stati testati sul nostro dataset e i risultati sono riassunti in Tabella 4.3.

Modello n°	Parametri stimati	CL_1 (L/h) [RSE%]	V_1 (L) [RSE%]	CL_2 (L/h) [RSE%]	V_2 (L) [RSE%]	ω_{CL1} C.V. [RSE%]	ω_{V1} C.V. [RSE%]	ω_{CL2} C.V. [RSE%]	ω_{V2} C.V. [RSE%]	BICc	OFV
0B	$V_1, CL_1, CL_2, V_2, \omega_{CL1}, \omega_{V1}, \omega_{CL2}, \omega_{V2}$	14.34 [14.0]	21.32 [50.4]	3918.48 [1.75e ³]	0.047 [438]	145.76 [11.1]	268.58 [24.7]	1.6e ⁹ [63.9]	9.9e ⁸ [37.9]	4000.8	3957.9
1B	$V_1, CL_1, CL_2, V_2, \omega_{CL1}, \omega_{V1}, \omega_{V2}$	14.45 [11.3]	23.68 [37.5]	2.5e ⁶ [0.955]	0.049 [194]	145.63 [8.36]	429.99 [15.8]	2.6e ⁶ [17.7]		3996.0	3957.9

2B	$V_1, CL_1,$ CL_2, V_2 $\omega_{CL1}, \omega_{V1},$ ω_{CL2}	14.64 [11.1]	31.27 [25.9]	19.74 [240]	0.0001 [55.8]	146.17 [8.47]	388.06 [14.3]	1.9e ⁵ [37.3]	3995.7	3957.6
3B	$V_1, CL_1,$ CL_2, V_2 $\omega_{CL1}, \omega_{V1}$	14.63 [11.3]	34.07 [24.8]	3.1e ⁻¹⁴ [5.32e ⁷]	3.2e ¹¹ [NaN]	148.6 [8.34]	357.55 [13.2]		3990.6	3957.3
4B	V_1, CL_1, V_2 $\omega_{CL1}, \omega_{V1}$	14.49 [11.5]	34.92 [25.1]	20.53	0.0057 [1.21e ⁴]	150.24 [8.40]	392.14 [13.6]		3984.9	3957.5
5B	$V_1, CL_1,$ $CL_2, \omega_{CL1},$ ω_{V1}	14.51 [11.4]	35.64 [24.2]	6.7e ⁻¹³ [2.84e ⁶]	21.41	151.08 [8.34]	371.9 [12.8]		3984.9	3957.5
6B	$V_1, CL_1,$ $\omega_{CL1}, \omega_{V1}$	12.91 [12.2]	3.97 [77.3]	20.53	21.41	164.46 [8.61]	50326.7 [18.2]		4139.7	4118.2
7B	$V_1, CL_{paz},$ $\beta_{CREA},$ $\omega_{CL1}, \omega_{V1},$	14.38 [12.5]	5.47 [71.0]	20.53	21.41	158.19 [9.29]	13475.4 [18.7]		4110.5	4083.1

Tabella 4. 3: Risultati dalla validazione dei modelli per la selezione della configurazione strutturale bi-compartmentale. Da sinistra: i parametri di popolazione stimati, i valori delle stime, con i rispettivi RSE, i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE, gli indici BICc e OFV.

Purtroppo, qualsiasi prova fatta con il modello bi-compartmentale non soddisfa i criteri di validazione del modello. La presenza di un'elevata variabilità interindividuale in alcuni parametri e l'inadeguata precisione nelle stime parametriche costringono ad abbandonare la struttura a due compartimenti. Pertanto, si opterà per un modello mono-compartmentale per descrivere la cinetica della piperacillina nei pazienti analizzati. Questo modello fornisce una rappresentazione semplificata ma più parsimoniosa rispetto ad un modello bi-compartmentale.

4.3 Sviluppo del modello stocastico

Dopo aver fissato la legge d'errore e delineato struttura del modello, è possibile migliorare le sue performance modificandone la componente stocastica introducendo eventuali elementi fuori dalla diagonale nella matrice di covarianza degli effetti casuali, Ω . L'attenzione si è quindi rivolta all'esame delle potenziali correlazioni tra i parametri di popolazione. In particolare, dal modello 7M l'unica correlazione stimabile era quella tra V e CL_{paz} .

Modello n°	Parametri correlati	Correlazione [RSE %]	V (L) [RSE %]	CL (L/h) [RSE %]	ω_V C.V. [RSE %]	ω_{CL} C.V. [RSE %]	BICc	OFV
7M	/	/	32.04 [26.5]	16.65 [11.0]	373.66 [13.5]	142.45 [8.52]	3943.1	3915.8
7.1M	V, CL_{paz}	0.15 [202]	35.7 [45.8]	16.8 [11.2]	350.09 [23.5]	134.45 [8.78]	3947.4	3915.2

Tabella 4. 4: Risultati della validazione dei modelli per valutare la correlazione tra gli effetti casuali. Da sinistra: i parametri di popolazione correlati, il valore della stima di tale correlazione, con il rispettivo RSE, i parametri di

popolazione stimati, con i rispettivi RSE, i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE, gli indici BICc e OFV.

Dai risultati riportati in Tabella 4.4, si evince che il modello peggiora con l'introduzione della correlazione, che non viene stimata con precisione. Inoltre, il BICc aumenta e le stime dei parametri sono meno precise. Pertanto, la correlazione tra V e CL_{paz} non è stata mantenuta nel modello. In seguito, la correlazione tra V e CL_{paz} è stata testata nuovamente sul modello finale dopo l'introduzione delle covariate.

4.4 Sviluppo del modello delle covariate

Le covariate selezionate dall'algoritmo SCM o con p-value sufficientemente basso in seguito al test di correlazione di Pearson, sono state testate dapprima nella loro forma continua calcolata come media delle realizzazioni per soggetto (es. \overline{MAP} , \overline{PH} , \overline{ALB} , ...), e poi come regressore tempo-variante (es. $MAP(t)$, $PH(t)$, $ALB(t)$, ...) nel modello strutturale. In tal modo è stato possibile avere una panoramica più ampia delle covariate che apportano un miglioramento del modello. In Tabella 4.5 sono sintetizzati i risultati salienti delle prove effettuate.

Modello n°	Parametro di covariata	V (L) [RSE %]	CL (L/h) [RSE%]	ω_V C.V. [RSE%]	ω_{CL} C.V. [RSE%]	BICc	OFV
7M	/	32.04 [26.5]	16.65 [11.0]	373.66 [13.5]	142.45 [8.52]	3943.1	3915.8
7.2M	$\beta_{\overline{MAP}, V}$	34.86 [25.7]	16.93 [10.9]	289.88 [12.6]	142.94 [8.47]	3945.8	3913.7
7.3M	$\beta_{MAP(t), V}$	35.16 [24.9]	16.42 [11.1]	350.86 [13.0]	142.75 [8.45]	3947.4	3914.1
7.4M	$\beta_{\overline{MAP}, CL}$	33.14 [25.3]	16.58 [10.7]	348.22 [13.4]	131.98 [8.42]	3942.4	3910.3
7.5M	$\beta_{MAP(t), CL}$	36.97 [28.3]	15.39 [11.1]	572.39 [13.3]	137.88 [9.29]	3931.8	3898.5
7.6M	$\beta_{\overline{PH}, CL}$	32.92 [27.4]	16.76 [10.6]	389.27 [14.3]	131 [8.74]	3942.1	3909.9
7.7M	$\beta_{PH(t), CL}$	35.12 [25.6]	16.48 [11.0]	362.44 [14.6]	128.35 [9.02]	3933.1	3899.8
7.8M	$\beta_{\overline{WT}, CL}$	32.2 [26.7]	16.63 [10.6]	386.06 [13.7]	134.06 [8.74]	3944.4	3912.3
7.9M	$\beta_{WT(t), CL}$	31.35 [25.7]	18.45 [11.0]	361.99 [13.6]	138.12 [8.55]	3949.8	3916.5
7.10M	$\beta_{\overline{ALB}, CL}$	32.27 [26.2]	16.29 [10.6]	349.26 [12.6]	134.11 [8.79]	3944.3	3912.1
7.11M	$\beta_{ALB(t), CL}$	30.54	16.42	409.18	133.3	3947.5	3914.1

		[27.2]	[10.7]	[13.6]	[8.36]		
7.12M	$\beta_{\text{VENT, CL}}$	32.51 [26.2]	11.15 [24.3]	367.4 [13.3]	136.44 [8.62]	3945.7	3913.5
7.13M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{WT, CL}}$	36.7 [27.8]	15.84 [11.1]	543.05 [12.5]	131.87 [9.17]	3934.2	3896.1
7.14M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{WT (t), CL}}$	38.96 [29.1]	15.05 [11.1]	646.98 [13.9]	132.72 [9.27]	3936.0	3896.7
7.15M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH, CL}}$	40.02 [26.3]	15.72 [11.0]	501.89 [12.0]	128.84 [9.38]	3933.0	3894.9
7.16M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}}$	42.16 [29.4]	15.34 [11.1]	558.31 [14.5]	130.15 [9.19]	3926.3	3887
7.17M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{LAC, CL}}$	41.74 [27.4]	15.04 [10.7]	599.38 [11.5]	124.01 [9.12]	3932.0	3893.6
7.18M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{LAC (t), CL}}$	38.2 [28.2]	15.41 [11.0]	541.88 [13.4]	133.76 [9.03]	3937.5	3898.3
7.19M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{BMT, CL}}$	36.38 [29.1]	14.96 [11.6]	577.33 [13.2]	132.82 [8.80]	3933.9	3895.9
7.20M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{BMT (t), CL}}$	41.11 [27.1]	13.05 [11.2]	542.73 [12.3]	135.15 [9.03]	3938.2	3899.0
7.21M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{ALB, CL}}$	39.45 [26.5]	15.37 [11.0]	522.17 [11.8]	132.21 [9.36]	3934.1	38956
7.22M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{ALB (t), CL}}$	39.52 [27.0]	15.49 [11.1]	540.17 [12.9]	134.02 [8.96]	3936.8	3897.6
7.23M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{ALT, V}}$	42.56 [26.5]	15.54 [10.8]	383.69 [14.6]	130.24 [9.16]	3928.1	3884.1
7.24M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{ALT (t), V}}$	36.61 [29.0]	15.61 [11.4]	569.93 [13.5]	136.31 [9.33]	3944.2	3899.0
7.25M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{BILTOT, V}}$	47.63 [22.5]	15.72 [11.1]	316.09 [13.0]	133.89 [9.23]	3928.5	3884.5
7.26M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{BILTOT (t), V}}$	37.65 [26.5]	15.65 [11.1]	507.71 [13.2]	134.91 [9.51]	3942.2	3897
7.27M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{WT, CL}}$	48.49 [26.4]	15.73 [10.8]	477.4 [14.3]	128.75 [9.16]	3929.6	3885.6
7.28M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{WT (t), CL}}$	36.96 [26.0]	15.54 [11.0]	505.58 [13.0]	136.62 [8.97]	3943.9	3898.7
7.29M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{ALT, CL}}$	48.32 [25.7]	15.05 [11.0]	543.19 [12.9]	128.02 [9.44]	3928.9	3884.8
7.30M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{ALT (t), CL}}$	37.87 [26.5]	12.83 [11.1]	521.04 [12.7]	132.95 [9.29]	3944.6	3899.4
7.31M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{LAC, CL}}$	42.43 [27.9]	16.13 [10.9]	590.75 [12.8]	122.24 [8.98]	3925.8	3881.7
7.32M	$\beta_{\text{MAP (t), CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}} \beta_{\text{LAC (t), CL}}$	44.76 [25.9]	15.62 [11.0]	401.26 [14.6]	130.3 [9.61]	3931	3885.8
7.33M	$\beta_{\text{MAP, CL}} \beta_{\text{PH (t), CL}}$	40.27 [28.2]	16.69 [10.3]	415.86 [16.0]	114.63 [8.91]	3934.3	3891.4

$$\beta_{\text{LAC}, \text{CL}}$$

7.34M	$\beta_{\text{PH}(\text{C}), \text{CL}}$ $\beta_{\text{LAC}, \text{CL}}$	42.44 [25.5]	17 [10.7]	361.62 [13.1]	118.18 [8.84]	3931.5	3893.5
-------	--	-----------------	--------------	------------------	------------------	--------	--------

Tabella 4. 5: Risultati della validazione dei modelli per la selezione delle covariate da includere nel modello. Da sinistra: i parametri di covariata (β_{COV} per le covariate continue, $\beta_{(\text{COV})\text{T}}$ per i regressori tempo varianti), i parametri di popolazione stimati, con i rispettivi RSE, i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE, gli indici BICc e OFV. Il valore evidenziato in grassetto rappresenta il BICc minore, mentre la riga riquadrata corrisponde al modello selezionato.

La selezione delle covariate si è inizialmente basata sulla riduzione del valore del Corrected Bayesian Information Criteria (BICc). Secondo il criterio d'informazione bayesiano, il modello preferenziale è il 7.31M, che prevede l'inclusione del contributo della pressione arteriosa media (MAP), del PH sanguigno (PH) e della media del lattato arterioso (LAC) sulla clearance del farmaco. Tuttavia, questo modello genera una variabilità sul volume di distribuzione piuttosto elevata, che comporta una grande incertezza nella determinazione di tale parametro. Si osserva invece che, il modello 7.25M produce una notevole diminuzione del coefficiente di variazione, addirittura inferiore a quello del modello senza covariate (modello 7M), mantenendo un BICc non troppo elevato. Per tale motivo, il modello 7.25M è stato identificato come migliore tra quelli testati. Questo modello presenta in aggiunta la bilirubina totale (BILTOT) introdotta come covariata continua sul volume di distribuzione.

Selezionato il modello delle covariate, è stata nuovamente valutata la correlazione tra V e CL_{paz} (Tabella 4.6). Nel modello 7.35M, viene stimato, in modo non preciso, un coefficiente di correlazione molto piccolo, indicando una relazione inesistente tra i parametri. Inoltre, si osserva un aumento della variabilità del volume di distribuzione e del BICc. Di conseguenza tale correlazione non è stata inclusa nel modello finale.

Modello n°	Parametri correlati	Correlazione [RSE %]	V (L) [RSE %]	CL (L/h) [RSE%]	ω_V C.V. [RSE%]	ω_{CL} C.V. [RSE%]	BICc	OFV
7.25M	/	/	47.63 [22.5]	15.72 [11.1]	316.09 [13.0]	133.89 [9.23]	3928.5	3884.5
7.35M	V, CL_{paz}	-0.023 [873]	39.9 [33.4]	15.52 [11.1]	488.44 [15.9]	123.97 [8.71]	3934.41	3885.61

Tabella 4. 6: Confronto tra i risultati dalla validazione del modello 7.25M e 7.35M per valutare la presenza di correlazione tra gli effetti casuali. Da sinistra: i parametri di popolazione correlati, il valore della stima di tale correlazione, con il rispettivo RSE, i parametri di popolazione stimati, con i rispettivi RSE, i coefficienti di variazione delle deviazioni standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE, gli indici BICc e OFV.

4.5 Risultati del modello migliore

In questo paragrafo, vengono riportati nel dettaglio i risultati del processo di validazione del modello finale, ovvero il 7.25M. Riassumendo, la legge d'errore è stata modellata utilizzando

la funzione che combina un termine costante, a fissato a 10, e di un termine proporzionale, b fissato a 0.2, alla concentrazione misurata. La configurazione strutturale del modello è stata definita da un sistema mono-compartmentale, in cui la clearance del farmaco è calcolata come somma di una componente propria del paziente, CL_{paz} , descritta dal contributo della creatinina serica e della clearance extracorporea deputata alle terapie renali sostitutive. Infine, il modello è stato migliorato dall'inclusione dell'effetto della pressione arteriosa media e del pH ematico sulla clearance del paziente; mentre la bilirubina totale ha mostrato un impatto significativo sul volume di distribuzione della piperacillina. Nessuna correlazione tra i parametri è risultata rilevante.

In Tabella 4.7, sono riportate le stime dei parametri di popolazione, effetti fissi e deviazione standard degli effetti casuali, con i rispettivi RSE. Le stime sono complessivamente precise. Solo $\beta_{\overline{BILTOT}, v}^{POP}$ presenta un RSE maggiore del 50%, ma comunque inferiore del 100% e quindi accettabile.

Stime dei parametri di popolazione					
Effetti fissi					
$V^{POP}(L)$ [RSE %]	$CL_{paz}^{POP}(L/h)$ [RSE%]	$\beta_{CREA(t), CL}^{POP}$ [RSE %]	$\beta_{MAP(t), CL}^{POP}$ [RSE %]	$\beta_{PH(t), CL}^{POP}$ [RSE %]	$\beta_{\overline{BILTOT}, v}^{POP}$ [RSE %]
47.63 [22.5]	15.72 [11.1]	- 0.37 [0.594]	0.017 [1.06]	4.2 [1.95]	0.41 [70.3]
Deviazione standard degli effetti casuali					
ω_V [RSE %]			ω_{CL} [RSE %]		
1.55 [13.0]			1.01 [9.23]		

Tabella 4. 8: Stime dei parametri di popolazione del modello finale. Sopra: gli effetti fissi stimati, con i rispettivi

La Figura 4.3 mostra la distribuzione dei residui pesati individuali generata dal modello 7.25M. Il profilo si avvicina a quello teorico di una curva normale.

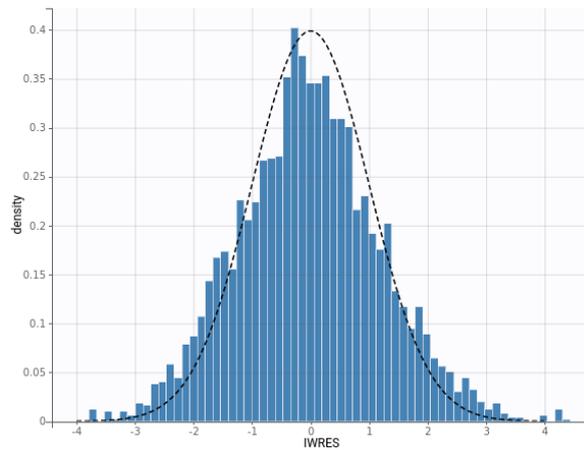


Figura 4. 3: Distribuzione dei residui pesati individuali del modello finale.

Di seguito (Figura 4.4) è riportato il grafico del VPC, a sinistra rappresentato in funzione dei tempi assoluti, a destra visualizzato rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose. Nel primo caso, si osserva che la maggioranza dei dati osservati cadono all'interno degli intervalli di confidenza previsti; mentre selezionando la visualizzazione "time after last doses", il modello sovrastima i dati per il 90° percentile. Il grafico mostra anche un bias dovuto al campionamento, perché la maggior parte dei pazienti ha tempi di trattamento significativamente inferiori a 120 ore, pertanto il grafico risultante non riflette accuratamente la distribuzione dei dati per questi soggetti, ma si basa solo su quelli che arrivano così in là nel tempo senza ricevere una nuova dose. Infatti, solo 19 soggetti raggiungono o superano le 120 ore di trattamento. In generale, il VPC è soddisfacente. Infatti, eccetto per la sovrastima del 90° percentile dei dati dopo 20 ore, il modello riesce a simulare correttamente i dati.

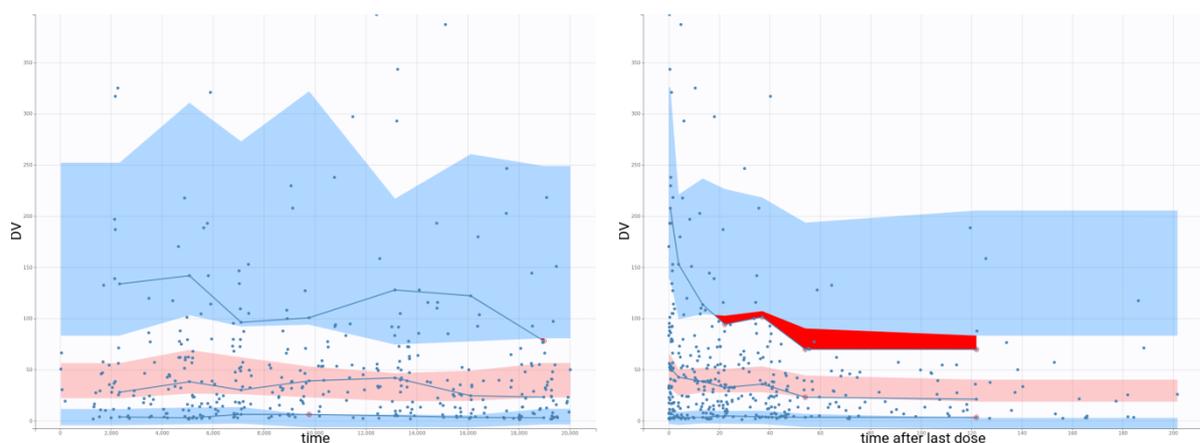


Figura 4. 4 Visual Predictive Check del modello finale. Le concentrazioni misurate (asse y) sono rappresentate in funzione del tempo (asse x). A sinistra il VPC in funzione dei tempi assoluti, a destra rispetto ai tempi trascorsi dall'ultima dose.

4.6 Applicazione del modello finale sul dataset completo

Infine, sono riportati l'andamento degli IWRES (Figura 4.5) ed il VPC (Figura 4.6) ottenuti dalla validazione del modello 7.25M applicato al dataset completo con 247 pazienti, fissando le stime dei parametri ai valori in Tabella 4.7. Anche in questo caso, i risultati sono stati soddisfacenti: la distribuzione dei residui pesati individuali segue un andamento approssimabile ad una gaussiana e dal VPC si osserva che la maggior parte dei dati osservati si situano all'interno degli intervalli di confidenza previsti dal modello, indicando una corretta simulazione dei dati da parte del modello.

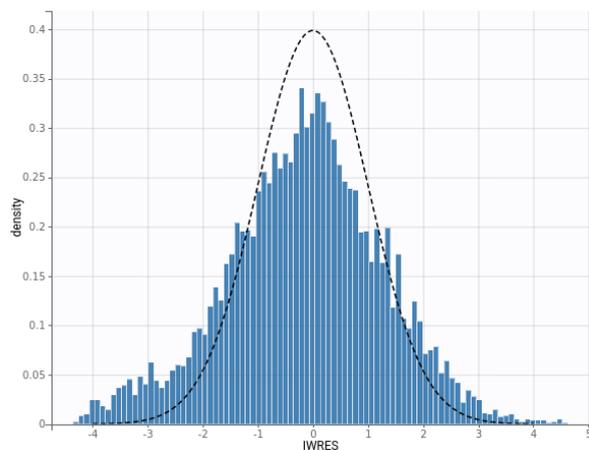


Figura 4. 5: Distribuzione dei residui pesati individuali del modello finale applicato al dataset completo.

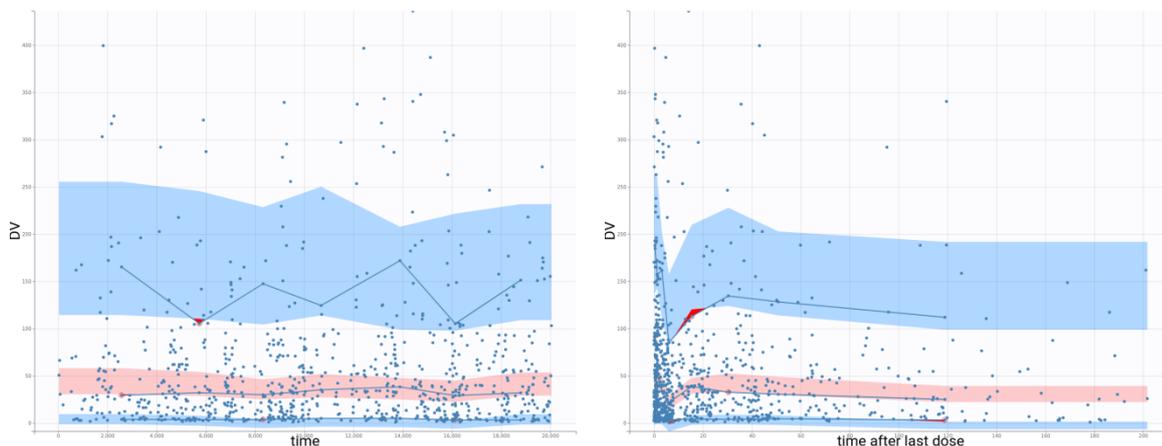


Figura 4. 6 Visual Predictive Check del modello finale applicato al dataset completo. Le concentrazioni misurate (asse y) sono rappresentate in funzione del tempo (asse x). A sinistra il VPC in funzione dei tempi assoluti, a destra rispetto ai tempi trascorsi dall'ultima dose.

5. Discussione

In questo capitolo vengono discussi i risultati e le metodologie adottate in questo lavoro. In primo luogo, viene effettuata una sintesi del progetto e degli obiettivi prefissati. Successivamente, vengono discussi i risultati prodotti dal modello finale, con particolare attenzione alle loro implicazioni cliniche. Infine, viene valutato il raggiungimento degli scopi in relazione ai risultati conseguiti, specificando le limitazioni di tale lavoro e delineando potenziali sviluppi futuri.

5.1 Sintesi del progetto

L'obiettivo di questo progetto di Tesi è quello di sviluppare un modello di popolazione in grado di descrivere la cinetica della piperacillina nei pazienti ricoverati in terapia intensiva. In primo luogo, il modello mira ad identificare i parametri clinici che influenzano la cinetica dell'antibiotico, includendo l'influenza delle procedure di depurazione extracorporea sulla clearance del farmaco. L'intento è quello di facilitare la selezione di un trattamento immediatamente efficace e personalizzato tenendo conto della variabilità inter-individuale. Questo lavoro è parte di un progetto più esteso che consiste nell'implementare un simulatore farmacocinetico all'interno della cartella clinica elettronica di pazienti in terapia intensiva. Questo strumento permetterà ai medici di modulare le dosi di antibiotico in base alle condizioni cliniche del paziente e definire il regime posologico ottimale che massimizzi la probabilità di ottenere la concentrazione terapeutica desiderata, minimizzando il rischio di superare la soglia di tossicità. Ciò è fondamentale per migliorare il trattamento delle infezioni nosocomiali nei soggetti critici e ridurre la mortalità ad esse associata, oltre a limitare l'insorgenza di resistenze batteriche agli antibiotici, una delle maggiori problematiche della medicina contemporanea.

Per lo sviluppo dei modelli farmacocinetici è stata adottata la tecnica di modellazione NLEM. Questo tipo approccio viene applicato per poter considerare sia gli effetti fissi che gli effetti casuali, ed è particolarmente adatto per descrivere dati longitudinali, come quelli raccolti in questo studio. Le simulazioni dei parametri sono state realizzate attraverso il software Monolix. I modelli testati sono stati sottoposti a validazione e confronto mediante tecniche di analisi sia standard che di popolazione, selezionando infine il modello più adatto a descrivere i dati considerati. Monolix si è rivelato essere uno strumento valido e potente per la stima dei

parametri, la diagnosi e la valutazione dei modelli. Tra i vantaggi dell'impiego di questo software troviamo la presenza di un'interfaccia grafica intuitiva, la generazione automatica di grafici diagnostici interattivi e la facilità di definizione dei modelli attraverso il linguaggio Mlxtran. Tuttavia, Monolix ha mostrato alcune limitazioni nella gestione dei regressori. Il software, infatti, non consente di sfruttare i test statistici e gli algoritmi per la selezione automatica delle covariate tempo variabili all'interno del modello.

5.2 Risultati del modello finale

I risultati della validazione del modello finale sono stati soddisfacenti. Le stime dei parametri ottenuti in questo lavoro sono paragonabili ai valori ottenuti in letteratura. Nello specifico, il valore stimato della clearance della piperacillina, è simile a quella dei lavori [18][5], mentre il volume di distribuzione è risultato superiore rispetto a quello stimato dagli altri modelli considerati. La differenza osservata potrebbe essere dovuta al fatto che la configurazione mono-compartmentale non sia esattamente la più adatta a descrivere la farmacocinetica della piperacillina che, infatti, diffonde anche nel fluido extracellulare. Nei soggetti critici, inoltre, si verifica un significativo trasferimento di fluidi corporei, causato da vari fattori come l'infiammazione, le terapie farmacologiche o le procedure mediche, che porta a un marcato incremento del volume interstiziale, che nel nostro caso è stato compensato da un volume centrale più elevato. Pertanto, per riflettere con maggiore precisione la cinetica di questo antibiotico in tali condizioni, potrebbe essere necessario considerare un modello a più compartimenti che tenga conto della complessa distribuzione dei liquidi in questi pazienti. Per sviluppare tale modello, però, si richiede che il campionamento plasmatico avvenga con maggior frequenza (come ad esempio in [25]), che però non è facilmente attuabile nei pazienti in terapia intensiva, a causa delle loro condizioni critiche. Per quanto riguarda la selezione delle covariate da includere nel modello, la creatinina serica è stata impiegata come descrittore della clearance del farmaco come riportato in [22], mentre in [6] è stata introdotta la pressione arteriosa media come covariata sulla clearance. Rispetto agli studi presenti in letteratura, il modello include l'effetto di nuove covariate: la bilirubina totale su V e il pH sulla CL .

In generale, la precisione delle stime dei parametri di popolazione è buona: tutti i parametri stimati, presentano RSE inferiori al 100%. In merito alla variabilità associata agli effetti casuali, si osserva che quella generata dal modello finale è considerevolmente superiore rispetto a quella documentata in altri studi [25]. Un campionamento molto sparso ed una

registrazione imprecisa delle somministrazioni potrebbero aver contribuito a un incremento della variabilità osservata nei dati, con conseguente riflessione sulla variabilità dei parametri stimati.

5.3 Interpretazione clinica dei risultati

Secondo i risultati del modello finale, la concentrazione di creatinina plasmatica, la pressione arteriosa media ed il pH sanguigno sono descrittori significativi della clearance della piperacillina, mentre il suo volume di distribuzione è influenzato dalla concentrazione di bilirubina totale.

L'eliminazione della piperacillina avviene principalmente attraverso i reni, per cui la clearance del farmaco dipende fortemente dalla funzionalità renale del paziente. Generalmente, nei soggetti non affetti da insufficienza renale, la funzione di questo organo è descritta dalla velocità di filtrazione glomerulare (GFR), che può essere stimata in modo affidabile dalla misura della clearance della creatinina. Così come la clearance, anche la concentrazione di questa sostanza nel siero contribuisce a fornire informazioni sulla clearance del farmaco. Valori elevati di creatinina a livello plasmatico possono indicare una ridotta funzionalità renale ed una minor eliminazione della sostanza. Questo discorso non è applicabile ai pazienti che presentano grave insufficienza renale e sottoposti a metodi esterni di filtraggio del sangue. In questo caso, la rimozione dell'antibiotico è deputata principalmente alla RRT: la tecnica depurativa selezionata ed il dispositivo impiegato determinano il valore della clearance extracorporea. La modellazione della RRT tramite la clearance extracorporea ha apportato un significativo miglioramento al modello farmacocinetico. Pertanto, l'adeguamento del dosaggio della piperacillina tenendo conto della RRT può ottimizzare l'efficacia terapeutica.

La pressione arteriosa, inclusa nel modello come covariata sulla clearance del paziente, è strettamente correlata alla sua funzionalità renale. L'ipertensione può essere sia causa che conseguenza della malattia renale. Infatti, un aumento della pressione sanguigna comporta un maggior apporto di sangue ai reni, quindi una filtrazione più efficace ed una maggiore rimozione del farmaco. Al contrario, una perfusione alterata, che si verifica in caso di insufficienza cardiovascolare e sepsi, può compromettere la funzionalità di questo organo e quindi ridurre la clearance del farmaco. D'altra parte, i reni sono regolatori della pressione arteriosa, quindi se funzionano correttamente, mantengono la pressione entro i limiti fisiologici. Inoltre, questo parametro, misurato più frequentemente, offre un contributo

significativo nella descrizione della clearance con una risoluzione temporale maggiore rispetto ad altre misure che richiedono analisi di laboratorio.

Per quanto riguarda il pH, esso è un indicatore dell'equilibrio acido-base nel sangue. Nell'insufficienza renale, questo equilibrio può essere compromesso a causa della ridotta capacità dei reni di filtrare e rimuovere gli acidi dal flusso ematico. Questo può causare un accumulo di acidi nel sangue, riducendo il pH e portando alla condizione nota come acidosi metabolica [38, 39]. Pertanto anche il pH entra nel modello come descrittore della clearance renale del farmaco in quanto è anch'esso un indicatore della funzionalità dei reni.

Per quanto riguarda il volume di distribuzione, nel modello finale non sono stati trovati altrettanti descrittori come per il parametro della clearance, infatti, solo la concentrazione di bilirubina totale viene impiegata per spiegare parte della variabilità del volume. La bilirubina è un prodotto di scarto derivante dal catabolismo dei globuli rossi, in particolare dalla degradazione del gruppo EME dell'emoglobina. Questa sostanza può influenzare il legame dei farmaci con le proteine plasmatiche. Infatti, le proteine plasmatiche, come l'albumina, hanno siti di legame specifici per diverse sostanze, tra cui la bilirubina. Quando la bilirubina è presente in quantità elevate, può competere con i farmaci per i siti di legame sull'albumina, potenzialmente riducendo la quantità di farmaco legato ed aumentando la frazione libera nel plasma [40, 41]. Questo può alterare la farmacocinetica del farmaco, influenzando la sua distribuzione: più il farmaco è libero dal legame con le proteine, più tenderà a diffondersi nei tessuti, portando ad un aumento del volume di distribuzione.

5.4 Limitazioni del progetto e prospettive future

La principale limitazione riscontrata in questo lavoro è stata la frequenza di campionamento relativamente bassa, che non ha permesso di descrivere in modo dettagliato il profilo della farmacocinetica della piperacillina. Inoltre, abbiamo osservato una registrazione non accurata delle modalità di somministrazione, insieme all'assenza di alcune informazioni rilevanti come la durata dell'infusione, comprensibile visto che i dati sono stati raccolti in condizioni reali su pazienti critici. Questi fattori, insieme alla forte variabilità già presente nei pazienti in terapia intensiva, hanno aumentato ulteriormente la variabilità nei dati, influenzando così la variabilità dei parametri farmacocinetici stimati. Per ovviare a tale problema, una possibile direzione futura di ricerca potrebbe includere l'incremento del numero di campioni ematici raccolti per ciascun paziente. Questo approccio potrebbe aiutare migliorare la stima dei parametri del modello e fornire una rappresentazione più fedele della variabilità inter- e intra-

individuale, contribuendo così a creare uno strumento più preciso per ottimizzare le strategie di dosaggio personalizzato. Un ulteriore aspetto critico da considerare è stato la stima di un volume di distribuzione superiore rispetto a quello risultante dai modelli riportati nella letteratura scientifica. Per questo motivo, come già discusso in precedenza, potrebbe essere necessario considerare un modello farmacocinetico a due o più compartimenti, che però non sono identificabili sui dati presentati in questo studio.

6. Conclusioni

In questo elaborato è stato presentato lo sviluppo di un modello di popolazione per descrivere la cinetica della piperacillina in pazienti critici. Il modello è stato costruito a partire dai dati raccolti mediante la cartella clinica elettronica MargheritaTre, installata in nove reparti di terapia intensiva in Italia. Questo modello matematico è in grado di predire con precisione l'evoluzione della concentrazione plasmatica di questo antibiotico in questi pazienti che, a causa della loro malattia critica, presentano un profilo farmacocinetico alterato. Dal confronto di diverse configurazioni, la struttura del modello è stata definita da un sistema mono-compartimentale. L'impiego della modellazione NLME ha permesso di modellare sia il profilo tipico della popolazione che la variabilità presente, migliorando la comprensione dei fattori che incidono su tale processo grazie all'impiego di covariate nel modello. Sono stati, quindi, identificati i parametri clinici chiave ed è stato valutato l'impatto delle procedure di depurazione extracorporea sulla clearance del farmaco. L'impiego di questo modello mira ad ottimizzare la terapia antibiotica, personalizzando il trattamento in base alle condizioni cliniche del paziente così da aumentare il tempo di permanenza nella finestra terapeutica minimizzando la comparsa di effetti collaterali. In aggiunta, l'implementazione futura di un simulatore farmacocinetico integrato nella cartella clinica elettronica rappresenterà un passo avanti verso la medicina di precisione, fornendo ai medici suggerimenti in tempo reale per adattare le dosi di piperacillina alle condizioni specifiche del paziente. Questo simulatore sarà uno strumento essenziale per massimizzare l'effetto terapeutico, minimizzare la tossicità del farmaco e combattere la resistenza agli antibiotici.

Bibliografia

- [1] Felton, T. W., et al. "Individualization of piperacillin dosing for critically ill patients: dosing software to optimize antimicrobial therapy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58.7 (2014): 4094-4102.
- [2] Ulldemolins, Marta, and Jordi Rello. "The relevance of drug volume of distribution in antibiotic dosing." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12.12 (2011): 1996-2001.
- [3] Finazzi, Stefano. *Mathematical Models for Optimisation of Drug Administration in Intensive Care Units*. Open University (United Kingdom), 2019.
- [4] Bulitta, Jürgen B., et al. "Nonlinear pharmacokinetics of piperacillin in healthy volunteers—implications for optimal dosage regimens." *British journal of clinical pharmacology* 70.5 (2010): 682-693.
- [5] Udy, Andrew A., et al. "Are standard doses of piperacillin sufficient for critically ill patients with augmented creatinine clearance?." *Critical Care* 19 (2015): 1-9.
- [6] Sukarnjanaset, Waroonrat, Sutep Jaruratanasirikul, and Thitima Wattanavijitkul. "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin in critically ill patients during the early phase of sepsis." *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 46 (2019): 251-261.
- [7] Le J. , PharmD, MAS, BCPS-ID, FIDSA, FCCP, FCSHP, Manuali MS, Assorbimento del farmaco, 2020: <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/farmaci/somministrazione-dei-farmaci-e-farmacocinetica/assorbimento-del-farmaco>
- [8] Le J. , PharmD, MAS, BCPS-ID, FIDSA, FCCP, FCSHP, Manuali MS, Distribuzione del farmaco, 2020: <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/farmaci/somministrazione-dei-farmaci-e-farmacocinetica/distribuzione-del-farmaco>
- [9] A. Mansoor and N. Mahabadi. Volume of distribution. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2021.
- [10] Le J. , PharmD, MAS, BCPS-ID, FIDSA, FCCP, FCSHP, Manuali MS, Metabolismo dei farmaci, 2020: <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/farmaci/somministrazione-dei-farmaci-e-farmacocinetica/metabolismo-dei-farmaci>

- [11] Le J. , PharmD, MAS, BCPS-ID, FIDSA, FCCP, FCSHP, Manuali MS, Eliminazione dei farmaci, 2020: <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/farmaci/somministrazione-dei-farmaci-e-farmacocinetica/eliminazione-dei-farmaci>
- [12] Tiziano Garbin, Nurse24, "Terapia renale sostitutiva nel paziente critico": <https://www.nurse24.it/specializzazioni/emergenza-urgenza/terapia-renale-sostitutiva-paziente-critico.html>
- [13] Morabito, Santo, et al. "Farmacocinetica degli antibiotici nelle terapie sostitutive renali continue (CRRT)." *Gionale Italiano di Nefrologia* 29 (2012): 425-444.
- [14] Canepari, G., Inguaggiato, P., Gigliola, G., Bainotti, S., & Formica, M. Terapie sostitutive renali continue (RRT).
- [15] Mueller, Bruce A., Thomas A. Golper, and Paul M. Palevsky. "Drug removal in continuous renal replacement therapy." *UpToDate*. www.uptodate.com. Accessed 1 (2019).
- [16] Boucher, Bradley A., G. Christopher Wood, and Joseph M. Swanson. "Pharmacokinetic changes in critical illness." *Critical care clinics* 22.2 (2006): 255-271.
- [17] Power, Bradley M., et al. "Pharmacokinetics of drugs used in critically ill adults." *Clinical pharmacokinetics* 34 (1998): 25-56.
- [18] Roberts, Jason A., and Jeffrey Lipman. "Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient." *Critical care medicine* 37.3 (2009): 840-851.
- [19] Sörgel, F., and M. Kinzig. "Pharmacokinetic characteristics of piperacillin/tazobactam." *Intensive care medicine* 20 (1994): S14-S20.
- [20] Sukarnjanaset, Waroonrat, Sutep Jaruratanasirikul, and Thitima Wattanavijitkul. "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin in critically ill patients during the early phase of sepsis." *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 46 (2019): 251-261.
- [21] Klastrop, Vibeke, et al. "Population pharmacokinetics of piperacillin following continuous infusion in critically ill patients and impact of renal function on target attainment." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64.7 (2020): 10-1128.
- [22] Öbrink-Hansen, Kristina, et al. "Population pharmacokinetics of piperacillin in the early phase of septic shock: does standard dosing result in therapeutic plasma concentrations?." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59.11 (2015): 7018-7026.

- [23] Ulldemolins, Marta, et al. "Piperacillin population pharmacokinetics in critically ill patients with multiple organ dysfunction syndrome receiving continuous venovenous haemodiafiltration: effect of type of dialysis membrane on dosing requirements." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71.6 (2016): 1651-1659.
- [24] Roberts, Darren M., et al. "A multicenter study on the effect of continuous hemodiafiltration intensity on antibiotic pharmacokinetics." *Critical Care* 19 (2015): 1-9.
- [25] Asín-Prieto, Eduardo, et al. "Population pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy: application to pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69.1 (2014): 180-189.
- [26] Documentation of Monolix, version 2024: <https://monolix.lixoft.com/>
- [27] Protocollo di Abiokin, versione 1.2 del 7 marzo 2019: <https://giviti.marionegri.it/portfolio/abiokin/>
- [28] Cockcroft, Donald W., and Henry Gault. "Prediction of creatinine clearance from serum creatinine." *Nephron* 16.1 (1976): 31-41.
- [29] Morabito, S., et al. "Principi di farmacocinetica e aggiustamento posologico dei farmaci nelle terapie sostitutive renali continue (RRT)." *Giornale Italiano di Nefrologia* 36 (2006): S127-S138.
- [30] Bernard Delyon, Marc Lavielle and Eric Moulines, "Convergence of a Stochastic Approximation Version"
- [31] W. K. Hastings, "Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications," *Biometrika*, vol. 57, no. 1, pp. 97–109, 1970.
- [32] Mlxtran Documentation and Language Reference: <http://mlxtran.lixoft.com/>
- [33] Automatic covariate model building: <https://monolix.lixoft.com/model-building/automatic-covariate-model-building/>
- [34] Scatter plot of the residuals: <https://monolix.lixoft.com/graphics/residuals/>
- [35] Standard error using the Fisher Information Matrix: <https://monolix.lixoft.com/tasks/standard-error-using-the-fisher-information-matrix/>
- [36] Visual Predictive Check: <https://monolix.lixoft.com/graphics/vpc/>
- [37] Log Likelihood estimation: <https://monolix.lixoft.com/tasks/log-likelihood-estimation/>
- [38] James L. Lewis III, MD, Brookwood Baptist Health and Saint Vincent's Ascension, "Acidosis": <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-ormonali-e-metabolici/equilibrio-acido-base/acidosi>

- [39] Regolisti, Giuseppe, et al. "Acidosi metabolica." *GIORNALE ITALIANO DI NEFROLOGIA* 33.6 (2016): 1-39.
- [40] Chiara Vannini, "Bilirubina": <https://www.nurse24.it/studenti/indagini-diagnostiche/bilirubina.html>
- [41] Giulia Bertelli, "Bilirubina Alta – Iperbilirubinemia": <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/bilirubina-alta.html>
- [42] Kanji, Salmaan, et al. "Piperacillin population pharmacokinetics in critically ill adults during sustained low-efficiency dialysis." *Annals of Pharmacotherapy* 52.10 (2018): 965-973.
- [43] Arzuaga, Alazne, et al. "Influence of renal function on the pharmacokinetics of piperacillin/tazobactam in intensive care unit patients during continuous venovenous hemofiltration." *The Journal of Clinical Pharmacology* 45.2 (2005): 168-176.
- [44] Arzuaga, A., et al. "Elimination of piperacillin and tazobactam by renal replacement therapies with AN69 and polysulfone hemofilters: evaluation of the sieving coefficient." *Blood purification* 24.4 (2006): 347-354.
- [45] Awissi, Don-Kelena, et al. "Pharmacokinetics of an extended 4-hour infusion of piperacillin-tazobactam in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy." *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 35.6 (2015): 600-607.
- [46] Richter, Daniel C., et al. "Therapeutic drug monitoring-guided continuous infusion of piperacillin/tazobactam significantly improves pharmacokinetic target attainment in critically ill patients: a retrospective analysis of four years of clinical experience." *Infection* 47 (2019): 1001-1011.
- [47] Chen, Rong, et al. "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin/tazobactam in patients with nosocomial infections." *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 41 (2016): 363-372.
- [48] Wang, Jianling, Yihui Luan, and Jiming Jiang. "A Two-Step Method of Estimation for Non-Linear Mixed-Effects Models." *Mathematics* 10.23 (2022): 4547.