

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Jan Šípek

Farmakokinetický profil a výskyt nežádoucích účinků levobupivacainu během kontinuální kaudální epidurální analgezie u novorozenců.

Pharmacokinetic profile and adverse effects occurrence of levobupivacaine during continuous caudal epidural analgesia of neonates

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Vladimír Mixa, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22. 08. 2024

Jan Šípek

.....

Podpis autora

Poděkování

Tímto bych chtěl vřele poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Vladimíru Mixovi Ph.D., nejenom za odborný dohled během této práce, ale zároveň za vedení a vstřícnou ruku během mých anesteziologických začátků. Nemenší poděkování patří MUDr. Pavle Pokorné Ph.D. a MUDr. Ivanu Berkovi Ph.D. za pomoc při tvorbě designu studie LEVON, která je základem této práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Evě Sarah Al Jamal za výraznou podporu při realizaci klinické studie. V neposlední řadě zasluhují mé veliké poděkování všichni spolupracovníci, kteří se podíleli na sběru a analýze dat.

Farmakokinetický profil a výskyt nežádoucích účinků levobupivacainu během kontinuální kaudální epidurální analgezie u novorozenců.

Abstrakt

Hlavním cílem předložené práce je ověření bezpečnosti levobupivacainu (lokální anestetikum, LVB) během dlouhodobého podávání formou kaudální epidurální analgezie (c-CELA) u novorozenců. V tomto věku je management bolesti komplikovaný a výše zmiňovaná technika je účinná a umožňuje snížit dávku opioidů a tím i jejich nežádoucí účinky. Nezralost metabolických drah a snížené orgánové funkce s sebou přináší obavy z možné kumulace a systémové toxicity lokálních anestetik (LAST). Z technických a etických důvodů je na toto téma velmi málo literatury. Ve studii LEVON, která je součástí této práce, byla laboratorní technika upravena tak, aby odběr krevních vzorků byl pro novorozence bezpečný. Z odebraných mikrovzorků (14 pacientů) byla určena koncentrace celkového a volného LVB a výsledky byly porovnány. Vyšší volný LVB je zodpovědný za LAST. Během c-CELA nebyly zjištěny žádné známky LAST, komplikace byly nezávažného charakteru spojené s používáním c-CELA. Laboratorně nebyla prokázána kumulace. Volný LVB byl vždy v bezpečných hladinách a brzy dosahoval rovnováhy (od 6. hodiny podávání). Celkový LVB dosáhl rovnovážného stavu mezi 12. a 72. hodinou s velmi variabilními koncentracemi (u tří pacientů potenciálně toxické). Vztah mezi celkovou a volnou koncentrací byl pak prvních 12 hodin sporný až nezávislý (tzn. že volnou frakci nelze odvodit od celkové). Prokázaná (pozitivně úměrná) korelace byla až od 36. hodiny a od 72. hodiny byla přímo lineárně úměrná. Výsledky naznačují, že c-CELA i v této věkové skupině může být považována za bezpečnou. Vhodnější laboratorní marker toxicity a kumulace pak představuje měření volného LVB.

Klíčová slova

Pooperační analgezie, novorozenci, kontinuální epidurální analgezie, volný levobupivacaine, celkový levobupivacaine

Pharmacokinetic profile and adverse effects occurrence of levobupivacaine during continuous caudal epidural analgesia of neonates

Abstract

The presented thesis aims to verify the safety of levobupivacaine (a local anesthetic, LVB) during long-term administration via caudal epidural analgesia (c-CELA) in neonates. At this age, pain management is complicated. C-CELA is effective in reducing opioid doses, thereby minimizing their adverse effects. The immaturity of metabolic pathways and reduced organ function raise concerns about the potential accumulation and systemic toxicity of local anesthetics (LAST). The literature is sparse due to technical and ethical limitations. In the LEVON trial (part of this work), the laboratory technique was adjusted to ensure that blood sampling was safe. From the collected micro-samples (14 patients), the concentrations of total and free LVB were determined, and the results were compared. Higher levels of free LVB are responsible for LAST. No accumulation or signs of LAST were detected, only minor complications related to the use of c-CELA. Free LVB levels were safe and reached equilibrium 6th hour after start c-CELA. Total LVB reached a steady state between the 12th and 72nd hours, with highly variable concentrations (potentially toxic in three patients). The correlation between total and free concentrations was questionable or independent during the first 12 hours (i.e., the free fraction could not be inferred from the total concentration). A proven correlation was observed from the 36th hour, and a direct linear correlation was evident from the 72nd hour. The results suggest that c-CELA is safe in this age group. The more suitable laboratory marker for toxicity and accumulation is free LVB.

Keywords

Postoperative analgesia, neonate, continuous epidural analgesia, free levobupivacaine, total levobupivacaine

Seznam zkratek:

AAG	Alfa1- kyselý glykoprotein (Alpha1-acid glycoprotein)
AAR	Anorektální atřezie,
AE	Nežádoucí účinky (adverse effects)
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosintrifosfát
AUC	Plocha pod časově – koncentrační křivkou (Area under the plasma concentration–time curve)
BV	Bupivacaine (druh LA)
c-CELA	Kaudální kontinuální epidurální dlouhodobá analgezie (caudal – Continuous epidural long-term analgesia)
CDH	Vrozená brániční hernie (Congenital diaphragmatic hernia)
CI	Interval spolehlivosti (Confidence interval)
CNS	Centrální nervová soustava
C _{max} , C ₀ , C _{peak}	Maximální dosažená plazmatická koncentrace lokálního anestetika
CYP	Cytochrom P450, skupina hemoproteinových enzymů v játrech, které se účastní detoxifikace
ČSARIM	Česká společnost anestezie, resuscitace a intenzivní medicíny
EK	Etická komise
ELBW	Novorozenec s extrémně nízkou porodní hmotností (pod 1000 g, Extremely Low Birth Weight)
EMLA	Místně znecitlivující krém (Eutectic mixture local anesthetics)
ESI	Elektrosprejová ionizace, technika hmotnostní spektrofotometrie (Electrospray ionization)
FNM	Fakultní nemocnice v Motole
FOA	Otevřené mezišifňové septum v srdci, (<i>Foramen ovale apertum</i>)
GA	Gestační věk (Gestational age)
GER	Gastroesofageální reflux
GCP	Zásady dobré klinické praxe (Good clinical practice)
IVRA	Intravenózní regionální anestezie (také označována jako Bier block)
IS	Interní standard
LA	Lokální anestetikum
LC	Tekutínová chromatografie (Liquid chromatography)
LAST	Systémová toxická reakce na LA (Local anaesthetic systemic toxicity)

LOQ	Limit měření/kvantifikace (Limit of Quantification)
LVB	Levobupivacaine (druh LA)
MRI	Magnetická rezonance (Magnetic resonance imaging)
MS	Hmotnostní spektrofotometrie (Mass spectrophotometry)
NICU	Novorozenecká jednotka intenzivní péče (Neonatal Intensive Care Unit)
NIPS	Novorozenecko-kojenecké skóre bolesti (Neonate Infant Pain Scale)
N-PASS	Stupnice k hodnocení bolesti, agitace a sedace u novorozenců (Neonatal Pain Agitation Sedation Scale)
NSAID	Nesteroidní antiflogistika (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)
PD	Farmakodynamika (Pharmacodynamics)
PIPP	Skóre k hodnocení bolesti u nedonošených novorozenců a kojenců (Premature Infant Pain profile)
PK	Farmakokinetika (Pharmacokinetics)
pK	Rovnovážná konstanta
PMA	Postmenstruační věk (Postmenstrual age) (PMA = PNA + GA)
PNA	Postnatální věk (Postnatal age)
PPHN	Perzistentní plicní hypertenze (ersistent pulmonary hypertension)
PRAN	Databáze sbírající statistická data u dětí s regionální anestezii v USA (Pediatric Regional Anaesthesia Network)
p-val	P – hodnota (p – value)
RDS	Syndrom respirační tísně (Respiratory distress syndrome)
SAB	Spinální anestezie (Subarachnoid block)
SAEM	druh počítačového algoritmu používaného během populační farmakokinetiky (Stochastic Approximation Expectation Maximization)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SWGFT	Scientific Working Group for Forensic Toxicology
TAP	Anestetická „plošná“ blokáda v oblasti příčného břišního svalu (Transversus abdominis plane block)
TBV	Celkový objem krve v těle (Total blood volume)
Tmax	Čas do dosažení Cmax
ÚPMD	Ústav pro péči o matku a dítě
UPV	Umělá plicní ventilace
V _{ass}	distribuční objem ustáleného stavu (steady state)
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VLBW	Novorození s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1500 g, Very Low Birth Weight)

Obsah:	1
1. Úvod do problematiky	1
1.1 Historie a současný management analgezie novorozenců	1
1.1.1 Vývoj přístupu a znalostí o bolesti novorozenců.....	1
1.1.2 Hodnocení bolesti.....	2
1.1.3 Současný management neonatální bolesti.....	3
1.2 Regionální analgezie u novorozenců (zejména kaudální epidurální podávání).....	4
1.3 Vliv věku a nezralosti na farmakokinetiku a farmakodynamiku analgetik	6
1.4 Farmakokinetika a farmakodynamika levobupivacainu (i bupivacainu) a jejich plazmatické měření během epidurálního podání u novorozenců	8
1.4.1 Obecné vlastnosti levobupivacainu a rozdíly oproti bupivacainu	8
1.4.2 Vazba levobupivacainu na proteiny u novorozenců.....	9
1.4.3 Farmakokinetika	10
1.4.4 Farmakodynamika (zejména nežádoucí účinky)	17
1.4.5 Měření plazmatických hodnot a hranice toxicity	19
1.5 Etické a technické problémy vzniku klinických/farmakokinetických studií u novorozenců.....	26
2. Cíle a hypotézy práce	28
2.1 Pozorováním výskytu komplikací a možných nežádoucích účinků levobupivacainu potvrdit či vyloučit bezpečnost kontinuální epidurální analgezie u novorozenců během dlouhodobého používání a v případě známek toxicity ukončit nabírání dalších pacientů.	28
2.2 Zhodnotit, zdali dojde ke vzniku ustáleného stavu či viditelné kumulaci k toxickým hodnotám levobupivacainu měřením přímých plazmatických koncentrací volného i celkového levobupivacainu. A tím laboratorně potvrdit či vyvrátit jeho bezpečnost dlouhodobého používání	28
2.3 Experimentálně určit vzájemný vztah koncentrací volného a celkového levobupivacainu. Dále zhodnotit obě měření za účelem zjištění, která z metod je vhodnější k měření toxicity a kumulace levobupivacainu.	28
3. Metodika provedení	29
3.1 Experimentální/pilotní studie	29
3.2 Soubor pacientů	30
3.3 Zavedení epidurálního katétru a vedení kaudální kontinuální epidurální analgezie (c-CELA)	32
3.4 Doba pozorování, sběr dat a odběr a skladování krevních vzorků.....	32
3.5 Úprava biochemické analýzy za účelem minimalizování velikosti odebíraného vzorku.....	35
3.6 Metody hodnocení farmakodynamických účinků (účinnosti, pozorování komplikací, včetně známek toxicity)	36

4.	Výsledky	38
4.1	Základní data a měření plazmatických koncentrací.....	38
4.2	Korelace mezi plazmatickou koncentrací celkového a volného levobupivacainu.....	42
5.	Diskuze	47
5.1	Ověření klinické účinnosti a bezpečnosti.....	48
5.2	Hodnocení farmakokinetiky plazmatických koncentrací celkového a volného levobupivacainu.....	49
5.3	Hodnocení vztahu celkového a volného levobupivacainu v plazmě.....	51
6.	Závěr	53
7.	Shrnutí	55
8.	Summary	57
9.	Literatura	59
10.	Seznam publikací	85
11.	Přílohy	86

Obsah:

1. Úvod do problematiky

1.1 Historie a současný management analgezie novorozených

1.1.1 Vývoj přístupu a znalostí o bolesti novorozených

Navzdory razantnímu vývoji v posledních dekádách¹, zůstává léčba bolesti novorozených nadále komplikovaná, nedostatečná a do nedávné doby i přehlížená.

Dle původních představ popisovaných od 19. století až do druhé poloviny 20. století se věřilo, že novorození a velmi malé děti bolest necítí ani si ji nepamatují, a proto mohou být operováni bez anestezie, která byla podávána jen v případě potřeby „znehynění“ pacienta a zvýšení komfortu pro chirurga². Základem tohoto přístupu byla ještě do 19. století trvající „původní křesťanská představa“, která bolest nadále považovala za věc pozitivní a očišťující. I v druhé polovině 19. století, kdy se obor anestezie teprve začal zásadně rozvíjet, byla bolest v lékařských kruzích vnímána spíše kladně, a to jako prostředek diagnózy, i jako proces napomáhající léčení². Rané začátky anestezie byly spjaté s četnými komplikacemi (někdy i fatálními), které přispívaly ke zpochybňování jejího přínosu^{2,3}.

Z historické analýzy vyplynuly další 4 předpoklady, které zformovaly názor zpochybňující přínos analgezie pro novorozené:^{1,2}

- 1) Darwinistický pohled na dítě jako na méně vyvinutého jedince,
- 2) velká opatrnost a nedůvěra ke studiím, pokusům a objevům naznačujícím přítomnost bolesti novorozenců,
- 3) behavioristický přístup v psychologii (ovlivněný Watsonovým Manifestem, z roku 1913), kdy bolest a veškeré projevy byly považovány za „sporný“ či „jednoduchý“ reflex^{4,5},
- 4) pozdější důraz na postupný postnatální vývoj mozku a reakcí na bolestivý stimulus⁶.

Dr. Peiper, který taktéž zkoumal reflexy a reakční časy na bolest u novorozených, vždy odpověď pozoroval, i když s latencí^{7,8}. Dospěl k následujícímu závěru – navzdory tomu, že se mozek nadále vyvíjí, není vnímání bolesti řízeno z mozkových hemisfér, ale již z mozkového kmene⁹. Tímto pak vnesl velkou etickou kontroverzi a zpochybnil běžnou praxi nepodávání anestezie novorozeným (včetně velkých chirurgických výkonů)⁹. Až po nashromáždění dalších důkazů (zejména o akcentované stresové reakci, která byla úspěšně tlumena anestezií) se podařilo lékařskou komunitu přesvědčit o jejím opodstatnění. Bohužel až zhruba od konce 80. let 20. století se konečně anestezie a analgezie stala u novorozených

standardem^{1,10-15}. Řada studií potvrzuje, že snížený rozsah stresové reakce kvalitní analgézií,¹⁶ může mít pozitivní dopad na celkový výsledek pacienta^{11,12,17,18}. Zároveň i recipročně přibývají důkazy o dlouhodobých následcích (např.: změna vývoje CNS, trvalé snížení prahu bolesti, neuropatie, behaviorální změny) způsobených bolestí, a to jak u mláďat^{19,20,21}, tak u lidských novorozenců^{22,23,24}.

1.1.2 Hodnocení bolesti

Základním problémem dosažení adekvátní analgezie je právě hodnocení bolesti, a to u všech věkových skupin. Bolest je vždy subjektivní na straně pacienta (ať už akutní, či chronická), a reálné či potenciální poškození tkání, působící bolest je modulováno mnoha faktory jako věk, komorbidity, pohlaví, psychické a emocionální nastavení, ale i sociální a kulturní prostředí. U novorozenců pak ztěžuje její hodnocení nejen nespokojenost, ale i nezralost CNS. Ta zapříčiňuje snížené (či nepřítomné) reflexy i sníženou či netypickou reakci vitálních funkcí.

Hodnocení bolesti se také ukázalo jako velmi subjektivní na straně hodnotícího personálu, kdy se prokázaly velké rozdíly mezi jednotlivými směny zdravotnického personálu²⁵. Proto se v dnešní klinické praxi používají objektivizované skórovací systémy (někdy i více najednou), které sledují několik parametrů (např. vitální funkce, faciální exprese, variace pulzů, neklid, tlak, mrkání očí, pocení a jiné). To se snaží nezávisle popsat a kvantifikovat možnou bolest a při změně může doporučit, kdy a jak podávat analgezií (většinou ve spolupráci s lokálním protokolem daného oddělení). Používanými jsou např.: Neonatal Infant Pain scale (NIPS)²⁶ Premature Infant Pain profile (PIPP)²⁷, Comfort Neo Score²⁸, Neonatal Pain Agitation Sedation Scale (N-PASS)²⁹. Na pracovištích, kde probíhal sběr dat pro tuto práci, jsou již delší dobu zavedeny Comfort Neo Score (u analgosedovaných a ventilovaných pacientů) a NIPS (u pacientů po extubaci). Po retrospektivní analýze (2 multicentrické studie, 12 novorozeneckých jednotek intenzivní péče (NICU)) byly identifikovány četné limitace těchto skórovacích systémů³⁰:

- přetrvávající subjektivita hodnocení bolesti
- některá přístrojová či laboratorní měření se nedají dělat u přímo u lůžka pacienta („bed-side“)
- přítomná neuromuskulární blokáda
- všechny validovány na akutní pooperační bolest
- nadále neexistuje validní hodnocení chronické či neuropatické bolesti¹

Vývoj nových postupů a úsilí vedoucí ke zlepšení hodnocení neonatální analgezie proto pokračuje. Jako jednou z možností se jeví vývoj neuromonitoringu³¹ či se uvažuje o bedside „pain monitorech“, přestože jejich výsledky a použití jsou místy považovány za sporné³².

1.1.3 Současný management neonatální bolesti

Analgezii lze rozdělit na nefarmakologickou a farmakologickou.

Nefarmakologická léčba bolesti u novorozenců (a nejenom u nich) je v současnosti spíše upozaďována. Její uplatňování podstatně závisí na přístupu daného centra (popřípadě státu). Občasně převládá nedůvěra a nedostatek kvalitních studií, které by prokazovaly žádoucí efekt¹. K jejím nesporným výhodám patří neinvazivnost a minimum nežádoucích účinků. Nefarmakologickou léčbu lze doporučit spíše jako doplněk nebo řešení mírné bolesti. Často používanými technikami s prokázanou účinností jsou: omezování počtu bolestivých procedur (odběrů, výkonů, invazí, velikosti krevních vzorků), přímý kontakt a opora během bolestivých procedur i mimo ně (kangaroo care, tucking)^{33,34}, perorální podávání sladkých roztoků (nejčastěji sacharóza či glukóza)³⁵⁻³⁷ či masáže^{38,39}.

Farmakologická analgezie je u novorozenců (oproti dospělým pacientům) limitována z důvodu opožděného výzkumu (oproti dospělým pacientům), nízkého počtu prováděných studií, zčásti z rozdílné farmakokinetiky a dynamiky (viz 1.5 Etické a technické problémy vzniku klinických studií).

Nejpoužívanějším neopioidním lékem je paracetamol pro svou účinnost a bezpečnost. Pro sníženou clearance je však potřeba dodržovat snížené dávkování, jinak hrozí riziko kumulace a jaterního poškození⁴⁰. NSAID (ibuprofen, indometacin)^{41,42} se u novorozenců používá k uzavření *ductus arteriosus*⁴¹. Z důvodů nedostatku dat a kvůli obavám z nežádoucích účinků (které jsou známé u dospělých pacientů)⁴³ se v pain managementu nepoužívají.

U závažnější bolesti jsou metodou volby opioidní analgetika. Morfin zůstává nejpoužívanějším (v menší míře se aplikují fentanyl, sufentanil, remifentanyl) ze všech pro svou ověřenou účinnost^{1,44}. Zároveň to není lék ideální pro své známé nežádoucí účinky (AE) jako útlum dechového centra, zhoršené vědomí, delší UPV, pruritus, snížená peristaltika střev, bradykardie, zástava⁴⁵⁻⁴⁹. U novorozenců existuje z důvodů nezralosti jaterních enzymů a jiné farmakokinetiky (detaily viz 1.3 Vliv věku na farmakodynamiku a farmakokinetiku analgetik) vyšší riziko tolerance či syndromu z odnětí (withdrawal syndrome)⁵⁰⁻⁵². Negativní vliv na pozdější neurologický vývoj u dětí nebyl dosud

prokázán^{1,53}. Při vhodném použití potlačuje právě dlouho trvající bolest, jejíž negativní vliv na pozdější vývoj jedince / dítěte byl už prokázán (viz 1.1.1 Vývoj přístupu a znalostí o bolesti novorozenců).

Další skupinou léků, která se uplatňuje během analgezie, jsou lokální anestetika, která se aplikují během perioperační (či jiné invazivní procedury) analgezie. U menších zákroků se dají použít ve formě EMLA krémů či topicky^{54,55} s dobrou účinností. U novorozenců by mělo pamatovat na vysoké riziko methemoglobinémie^{56,57} a časté alergické reakce⁵⁸. U větších výkonů nachází uplatnění během regionální anestezie (viz níže).

1.2 Regionální analgezie u novorozenců (zejména kaudální epidurální podávání)

V průběhu vývoje byla regionální anestezie (neuroaxiální blokády, případně periferní nervové blokády) ve větší či menší oblibě oproti celkové anestezii. S rozvojem sonografie (umožnila cíleně podávat LA a tím snížit celkové dávky a omezit AE) pak dochází v současné době k dalšímu vzestupu preference zejména periferních nervových blokad, a to i u nejnižších věkových kategorií⁵⁹. Na popularitě získávají i tzv. „plane“ bloky⁶⁰, technika, kdy se (pod ultrazvukovou kontrolou) podá mezi svalové fascie LA, které mezi nimi šíří a poskytuje analgezi v místě operace (TAP block⁶¹, *quadratus lumborum*⁶²) či v příslušné poraněné oblasti (erector spinae block⁶³, serratus anterior block⁶⁴). Ačkoliv u dětí jsou nadále data neúplná, co se týče efektivity a bezpečnosti ve srovnání s „klasickými“ blokádami^{65,66}. Zřejmou výhodou u dětí (i novorozenců) představuje kvalitní analgezie (během operace i po ní), která umožňuje snižovat dávky celkových anestetik, svalových relaxancií i systémově podávaných opioidů⁶⁷. To má za následek zlepšení hemodynamické stability během operace⁶⁸. Do současné doby není zcela prokázán přímý vliv celkových anestetik na následný neurologický vývoj dítěte, i když experimentálně byla u některých druhů mláďat pozorována indukce apoptózy^{67,69-73}. Předpokládá se, že riziko zhoršení postnatálního vývoje je úměrné dávce a celkovému trvání anestezie⁶⁰. Proto FDA (U.S. Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA, 2016) vydal prohlášení upozorňující na možná rizika anestezie u dětí do věku tří let (zvláště u opakovaných výkonů či nad 3 hodiny)⁷⁴. Nicméně studie jednorázových krátkých (do 1 hodiny) celkových anestezí nenaznačují zhoršení (oproti regionální anestezii) u 2 a 5letých dětí^{75,76}. Snížením dávek opioidů (jejichž AE byly popsány výše) zkracuje počet dní na UPV, redukuje riziko apnoe (včetně pozitivního vlivu na morbiditu a mortalitu)⁷⁷⁻⁷⁹, vasodilatací splanchniku zlepšuje střevní peristaltiku s možností časnějšího nasazení enterální výživy⁸⁰⁻⁸².

Z hlediska komplikací jsou rizika během provádění (podání LA do jiného prostoru, ohnutí katétru a malpozice či krvácení), infekce (je-li zaveden katétre), dislokace katétru a nebezpečí předávkování, které může vyústit až ve známky systémové toxicity (LAST) (detaily viz 1.3 Vliv věku a nezralosti na farmakokinetiku a farmakodynamiku a 1.4 Farmakokinetika a farmakodynamika levobupivacainu (i bupivacainu) a jejich plazmatické měření během epidurálního podání u novorozenců). Dle poslední zprávy databáze PRAN (Pediatric Regional Anesthesia Network, 2018, více než 100 000 bloků u pediatrických pacientů mezi 2007 – 2015)⁸³ jsou rizika komplikací během současné praxe nízká (myšleno u všech věkových skupin pediatrických pacientů). Nebyl zaznamenán žádný případ trvalých následků (1 případ epidurálního hematomu u paravertebrálního katétru bez následků), riziko infekce u katéetrových technik u 55 případů na 10 000 (18-99:10 000 dle typu katétru, 57:10 000 u kaudálních katétrů) s 1 případem epidurálního abscesu s nutností laminektomie (0,76:10 000), riziko přechodného neurologického postižení 2,4:10 000 bloků a riziko systémové toxicity 0,76:10 000 (celkem 7 závažných případů, 5 případů u kojenců, žádný u novorozence). V této databázi je také zaznamenáno 705 bolusových technik, z nichž nejčastější byl kaudální blok (méně již TAP, paravertebrální axilární, rectus sheath, SAB), a 353 kontinuálních katéetrových technik (s dominancí epidurálů z kaudálního přístupu a méně již přímý hrudní epidurální katétre). Případ LAST nebyl hlášen u novorozenců ani jednou. V minulosti byly hlášeny těžké komplikace zavedených epidurálních katétrů u novorozenců^{84,85}, které rozvířily debatu o přínosnosti kontinuálních epidurálních katétrů⁸⁶. Nedostatek dat a jistá nejistota přetrvává dodnes, ale předpověď, že kontinuální epidurální blokáda vymizí⁸⁷ se nepotvrdila. Spíše se, s postupem času a revizemi postupu, klinická praxe přiklání k tomu, že v rukách zkušeného specialisty na specializovaném pracovišti obnáší nízká rizika závažných komplikací.⁸⁸ Dle PRAN v posledních letech procentuální zastoupení epidurálních katétrů z kaudálního přístupu zase vzrůstá⁸³.

První kaudální blokáda byla vysvětlena již Campbellem v roce 1933⁸⁹. Ruston na základě svých zkušeností s prováděním epidurální anestezie vojákům během druhé světové války v 50. letech poprvé zdokumentoval zavádění kaudálních bloků u dětí i novorozenců⁹⁰. Později charakterizoval zavádění epidurálních bloků pomocí metody „visící kapky“⁹¹ (definuje další 3 metody, jak ozřejmit epidurální prostor)⁹². K popularizaci a velkému rozvoji zmíněné techniky došlo až v 80. letech^{93,94}. Bösenberg et al. v roce 1988 v rámci zjednodušení a eliminace rizik popsali hrudní epidurální katétre zavedený z kaudálního přístupu⁹⁵. Chawathe et al. (2003) provedli první kaudální bloky za pomoci ultrazvuku⁹⁶. „Klasický“ anatomický přístup je nadále považován za bezpečný a vzhledem k tomu, že není

prokázán vyšší výskyt závažných komplikací, je proto preferován některými autory⁹⁷. Nicméně se potvrzuje, že pod sonografickou kontrolou se daří omezit počet pokusů (vpichů) a tím snížit riziko punkce dury. Lze to přímo pozorovat během zasouvání katétru a tím zabránit malpozici (a malfunkci) i šíření podaného LA v epidurálním prostoru⁹⁸. Z těchto důvodů se používání ultrazvuku začíná objevovat v doporučeních a je to pravděpodobně jeden z důsledků, proč v posledních letech obliba této techniky opět stoupá (viz výše)⁹⁸. Technicky se jehlou skrz membránu sacrococcygea (ať už ozřejměním anatomických struktur či pomocí ultrazvuku) podá lokální anestetikum (LA) či zavede katétru. Respektovat by se měla velká anatomická variabilita ohraničující kaudální prostor (chrupavčitý kanál kraniálně ohraničený durálním vakem v oblasti S2-S3, kaudálně kůží, a právě membrána sacrococcygea)⁹⁹, která u novorozenců není ovlivněna věkem, velikostí ani výškou¹⁰⁰. V kraniokaudálním rozměru měří 13–57 mm, v předozadním 2–10 mm⁹⁹. Účinkem je analgezie hypogastria a dolních končetin (indikace: korekce hypospadie, hernie, atrezie anu či střev a jiné). V případě zasunutí katétru anestezie sahá až do hrudní oblasti (analgezie během operace brániční hernie, gastroschízy, jícnová atrezie a.j.). Hemodynamický efekt je jen malý (třebaže byl zaznamenán menší pokles mozkového flow)¹⁰¹. Navzdory rizikům plynoucím ze zavádění (viz výše) a intenzivnímu rozvoji periferních blokády patří tato metoda právě díky své jednoduché osvojitelnosti a účinnosti mezi nejčastěji používané blokády u novorozenců. V PRAN⁸³ databázi u novorozenců tvořily 73,7 % všech single-shotů a 55,8 % všech katéetrových technik (epidurální katétru z hrudního přístupu činil dalších 29,7 %). Komplikace již byly zmíněny výše. V průběhu času bylo dávkování kontinuální epidurální analgezie postupně snižováno (u levobupivacainu na dnešních 0,2–0,3 mg/kg/hod u novorozenců) kvůli případům hlášené toxicity. Pro nedostatek studií stále přetrvávají obavy ohledně možné kumulace tohoto LA, a proto není doporučováno používat kontinuální epidurální analgezi u novorozenců déle než dva dny (detaily viz 1.4.3 Farmakokinetika).

1.3 Vliv věku a nezralosti na farmakokinetiku a farmakodynamiku analgetik

Podstatné změny fetální i neonatální metabolismu ve vztahu k dospělému nevedou jen ke změně farmakokinetických parametrů (které ovlivněny místem podání a dávkou), ale mnohdy také přispívají ke vzniku jiných metabolitů nebo jiných farmakodynamických účinků / vlivů, nedostatku efektu či nežádoucím účinkům (např. NSAID uzavírají *ductus arteriosus*). Komplikované provádění klinických studií v této věkové kategorii (viz 1.5 Etické a technické problémy vzniku klinických/farmakokinetických studií u novorozenců) omezuje i výčet léků použitelných v analgezi anebo často směřuje k podání léku mimo

věkovou indikaci (off-label)¹⁰². Farmakokinetiku a farmakodynamiku novorozenců ovlivňuje váha, povrch těla, postnatální věk (PNA), ale i gestační věk (GA) během porodu (nebo spojením PNA + GA dohromady postmenstruační věk – PMA)¹⁰³.

Následující popis se vztahuje především k používaným analgetikům u novorozenců. Z hlediska absorpce pacienti této věkové kategorie (často s nutností vysokých dávek analgezie) dostávají většinu léků intravaskulární formou, případně extravaskulárně ve formě regionální analgezie. Detailní deskripce neonatální farmakokinetiky a farmakodynamiky lokálních anestetik (specificky bupivacainu a levobupivacainu) je popsána níže (viz oddíl 1.4 Farmakokinetika a farmakodynamika levobupivacainu (i bupivacainu) a jejich plazmatické měření během epidurálního podání u novorozenců).

Již samotný distribuční prostor se liší vyšším obsahem vody ve tkáních a sníženým obsahem tuku. Čím nezralejší pacient, tím je obsah vody větší. Donošený novorozenec má zhruba 75 % vody k váze (extracelulárně 35-44 % váhy), fetus s GA 3 měsíce obsahuje 90 % váhy vodu (extracelulárně 65 %) a dospělý 50-60 % (23 % extracelulárně)¹⁰⁴. Tím se podstatně zvyšuje distribuční prostor pro hydrofilní léky a relativně snižuje pro lipofilní léky¹⁰⁵. Nižší koncentrace albuminu a kyselého alfa 1 glykoproteinu (AAG) mohou vést k vyšším koncentracím volného léčiva (a tím zvýšit toxicitu)¹⁰³. Vysoké koncentrace volného bilirubinu a volných mastných kyselin mohou také vytěšňovat jiná léčiva z vazby na albumin¹⁰⁶. Během zánětu či stresové reakce se zvyšuje produkce AAG jako proteinu akutní fáze, který naopak může snižovat volné frakce některých léčiv a působit tak protektivně¹⁰⁷ (detaily viz 1.4 Farmakokinetika a farmakodynamika levobupivacainu (i bupivacainu) a jejich plazmatické měření během epidurálního podání u novorozenců).

Biotransformace léčiv z většiny probíhá u novorozenců v játrech. Enzymatické procesy Fáze I (oxidace, redukce, hydrolyza, hydroxylace...) a Fáze II (glukuronizace, sulfatace, metylace, acetylace) jsou významně ovlivněny věkem i zralostí novorozence¹⁰⁸. Fáze I je prováděna pomocí různorodé rodiny enzymů cytochromu P450 (CYP), jehož kapacita po narození bývá 50-70 % dospělého jedince¹⁰⁹. Zajímavá je skupina CYP 3A-, která metabolizuje např.: opioidy, benzodiazepiny, lokální anestetika, některá antibiotika. CYP 3A7 je aktivní ve fetálním až kojeneckém věku, kdy má vysokou genovou expresi mezi 15. - 26. týdnem GA. Při narození dosahuje zhruba polovičních hodnot. Oproti tomu CYP 3A4 se začíná exprimovat v období okolo porodu a postupně roste, až cca kolem 6. měsíce po narození začíná převyšovat expresi CYP 3A7¹¹⁰ (který před tím nahrazoval jeho funkci). CYP 3A5 má největší expresi v kojeneckém a dětském věku.¹¹⁰

Skupina CYP 1A2 (metabolizuje teofylin, paracetamol a kofein) zvyšuje svou expresi až po narození (zhruba od 1. - 3. měsíce) a dosahuje výkonnosti 50 % dospělého okolo 1. roku života¹⁰⁸. Skupiny CYP 2C, 2E a 2D6 (přeměna codeinu na morfin, benzodiazepiny, fenytoin) také zahajují genovou expresi postnatálně a aktivitou se blíží dospělému až v dětství¹⁰⁸. Ve Fázi II je také snížena enzymatická aktivita zejména glukuronizace (ta dosahuje dospělé aktivity mezi 2. a 6. měsícem života)¹¹¹, která má za vliv zpomalené vylučování metabolitů (paracetamol, morfin). Zároveň nezralost těchto drah má za následek během biotransformace preferenční vznik morfinu-3-glukuronidu namísto morfinu-6-glukuronidu. Ten má delší poločas eliminace a je méně analgeticky potentní. Vzniklá kompetitivní inhibice je jednou z příčin časné tolerance novorozenců k opioidům (a nutnosti navyšovat dávky s příslušným rizikem zhoršení specifických AE)¹¹²⁻¹¹⁴.

Eliminace ledvinami (krevní průtok tubulární exkrece, glomerulární filtrace) je závislá na GA (gestační věk), PNA (post-natální věk), PMA (GA + PNA), váze, velikosti i na dalších patologických situacích (perinatální asfyxie, předčasný porod, růstová retardace, ledvinné malformace), které mohou významně prodloužit vylučování některých léčiv z organismu, či způsobit nárůst plazmatických koncentrací¹¹⁵. Již prenatálně se renální clearance zvyšuje úměrně k GA a postnatálně pak během prvních 4 týdnů vzroste 2-4x¹¹⁶, dospělých hodnot dosahuje až kolem 1. roku¹⁰⁸.

1.4 Farmakokinetika a farmakodynamika levobupivacainu (i bupivacainu) a jejich plazmatické měření během epidurálního podání u novorozenců

1.4.1 Obecné vlastnosti levobupivacainu a rozdíly oproti bupivacainu

Lokální anestetika se především používají pro svoji schopnost působit blokádu Na⁺/K⁺ pump vzrušivých tkání zejména v místě míchy a periferních nervů a tím tak dosáhnout analgezie až anestezie. Někteří zástupci LA se používají jako antiarytmika, ojedinele i jako antiepileptika. Příliš vysoká plazmatická hladina může navodit neurotoxické či kardiotonické příznaky, které mohou být provázeny hemodynamickou nestabilitou až fatálními následky.

Levobupivacaine je představitelem amidové skupiny lokálních anestetik (LA) s dlouhodobým působením (dalšími jsou mepivacaine, bupivacaine, ropivacaine). Jedná se o potentní skupinu slabých bází (s molekulovou hmotností 270 – 320 Da)¹¹⁷ LA, která se vyznačuje asymetrickým (chirálním) uhlíkem, který může existovat v levotočivé (S (-) - isomer) či pravotočivé (R (+) - isomer) formě (stereoisomerismus). Bupivacaine objevený

v roce 1957¹¹⁸ je racemickou směsí těchto enantiomerů (poměr R (+) a S (-) isomerů je 50:50). Pro svou účinnost, délku působení a cenu je bupivacaine velmi rozšířen v regionální anestezii.

Levobupivacaine je levotočivou formou bupivacainu s velkou rozpustností v tucích, molekulovou hmotností 288 g/mol a pK 8,4, kdy je při standardním pH 7,4 ionizován, což má za následek pomalejší nástup jeho účinnosti oproti lidocainu (pK 7,7)¹¹⁹. V posledních letech se dostává do popředí zájmu a především v dětské anestezii začíná nahrazovat bupivacaine zejména pro menší výskyt toxických nežádoucích účinků. Účinnost a farmakokinetické vlastnosti bupivacainu a levobupivacainu jsou velmi podobné (sporně se někdy připisuje větší účinnost bupivacainu¹¹⁹). Ve srovnání s dextrobupivacainem byla u levobupivacainu zaznamenána delší blokáda způsobená právě silnější vazokonstrikcí^{120,121}. U obou forem (i dalších LA) bylo popsáno spíše bifázické působení¹²²⁻¹²⁵, které u analgetických a anestetických dávek způsobilo vasodilataci a při sub-terapeutické hladině pak vazokonstrikci, která byla znovu potvrzena v silnějším rozsahu u levobupivacainu¹²⁶. Toto zjištění zároveň podporuje přidávání adrenalinu do vyšších dávek levobupivacainu (ke snížení možné toxicity namísto k prodloužení efektu během vysokých dávek v infiltrační/svodné anestezii)¹²⁶.

Dalším rozdílem ve farmakokinetice (PK) jsou vyšší plazmatické koncentrace u volné frakce dextrobupivacainu oproti vyšším plazmatickým hladinám levobupivacainu při ekvivalentních i.v. dávkách, které byly vysvětleny rozdílnou vazbou těchto enantiomerů na plazmatické proteiny¹²⁷. Tím je vysvětlena vyšší toxicita racemické směsi ve srovnání s levobupivacainem.

1.4.2 Vazba levobupivacainu na proteiny u novorozenců

Vazba na proteiny (především AAG a albumin) u levobupivacainu je vyšší (97 %) než u racemického bupivacainu (95 %) a volná frakce pak činí 3 %¹¹⁹. Preferenčně se váže levobupivacaine na AAG, který je na 20 – 50 % hodnotách koncentrace u dospělého¹²⁸. Je zároveň proteinem akutní fáze a má tendenci při stresu, zánětu, popáleninách, nádorech či bolesti růst¹²⁹⁻¹³³, naopak jeho snížená koncentrace (nefrotický syndrom, malnutrice, diluce, novorození, jaterní onemocnění) může přispívat k potenciální toxicitě.¹¹⁹ U novorozenců je plazmatická koncentrace 0,3 g/l¹¹⁷. Ta se ukázala být velmi závislá na gestačním stáří i na typu porodu (vaginální porod představuje větší hormonální stres pro dítě), přičemž u nezralých novorozenců byly mediány 0,110 g/l u sekce a 0,189 g/l u vaginálního porodu¹³⁴. Postupně koncentrace vzrůstá a dosahuje hodnot dospělých po 10 měsících¹²⁹, okolo jednoho

roku bylo naměřeno 0,9-1,0g/l¹¹⁷. U kojenců byl přímo prokázán vliv velkých operací na vzestup AAG pooperačně¹³⁵ a tím potenciální protektivní efekt na toxicitu LA.

Albumin má ve srovnání s AAG asi o 5 000 – 10 000 nižší afinitu, a i přes jeho mnohem vyšší plazmatickou koncentraci se mnohem méně uplatňuje, v podstatě až při saturaci AAG¹¹⁷.

Lokální anestetika mají tendenci difuzně procházet červenými krvinkami, kde se pasivně váží v závislosti na dávce. Zvláště u novorozenců, kde jsou koncentrace AAG a albuminu snižené, byl vysokému hematokritu byl přisuzován význam¹¹⁷, který se však prokázal být marginální u novorozenců^{136,137}.

Je známo několik faktorů, které mohou ovlivňovat vazbu levobupivacainu na proteiny, a tím hrát (byť ne zcela jasnou) roli ve výskytu toxicity. Acidóza má několik protichůdných efektů. Prokazatelně snižuje afinitu bupivacainu i levobupivacainu k proteinům^{138,139}. Zároveň má tendenci ionizovat levobupivacaine (slabá báze, viz výše) a tím snižovat jeho potenci^{140,141}. V úvahu se bere i vasodilatační schopnost acidózy¹⁴², která teoreticky může oponovat i vasokonstrikčním vlastnostem levobupivacainu. Hyperkapnie, hypoxie a acidóza mohou vasodilatací zvyšovat průtok krve mozkem a tím zvyšovat neurotoxicitu^{141,142}. Současná hepatální, kardiální onemocnění, diabetes mellitus, sarkopenie taktéž představují významná rizika¹⁴³. Lékové interakce jako další faktor ovlivňující účinnost levobupivacainu jsou v literatuře sice popisovány (betablokátory, blokátory kalciových kanálů), ale v klinické praxi mají jen malý význam, obzvláště u novorozenců¹¹⁷.

1.4.3 Farmakokinetika

Ačkoliv bylo provedeno vícero klinických studií zkoumajících farmakokinetiku epidurálního podávání bupivacainu, většinou se jednalo o dospělé pacienty či starší děti. O levobupivacainu je ještě mnohem méně studií, zejména kvůli podobné farmakokinetice. Podrobný přehled publikoval Heppolette et al. (2020)¹¹⁹. V rámci této práce byla provedena rešerše v databázích MEDLINE, PubMed a Scopus:

Byla prohledána literatura od roku 1966 – březen 2024. Zadání bylo (((pharmacokinetic levobupivacaine) OR (pharmacokinetics levobupivacaine) OR (pharmacokinetic bupivacaine) OR (pharmacokinetics bupivacaine) OR (pharmacokinetic local anesthetics) OR (pharmacokinetics local anesthetics)) OR (disposition levobupivacaine)) OR (disposition bupivacaine).

Byly vyhledávány review articles / odborné recenzované články či původní práce. Byl zadán věkový filtr na novorozence (od narození do 1 měsíce) a kojence (infant, 1 měsíc až 23 měsíců).

Vybírány byly všechny farmakokinetické studie, které se týkaly novorozenců a kojenců mladších 7 měsíců (pozn. dle některých studií se farmakokinetika významně mění u dětí 3 – 6 měsíců starých). V případě studií u dětí starších než 7 měsíců byla použita data u dětí splňující kritéria (při nesplnění kritérií byly studie vyřazeny). U studií zaměřených na farmakokinetiku několika věkových kategorií byly vybrány ty subjekty, které splňují věková kritéria, a spočítány jejich střední hodnoty (pokud to bylo možné).

Primární parametry: věk narození až 7 měsíců života a farmakokinetika levobupivacainu či bupivacainu

Sekundární parametry: clearance či distribuční objem či poločas eliminace $t_{1/2}$ či T_{max}

Výsledky:

Objeveno 271 článků. Kritéria splnilo 14 článků.

Pro předpokládanou různorodost farmakokinetiky pacientů byly vytvořeny 2 tabulky: Kojenci (31 dní – 210 dní (7 měsíců) PNA, Tab.1) a novorozenci (PNA 0 – 30 dní, Tab. 2, pokud byli součástí i kojenci do 3 měsíců, tak byly začleněny do skupiny kojenců, pokud nebyli rozlišitelní, byla data ponechána ve skupině). Pokud to bylo možné, byly farmakokinetické parametry přepočítány na jednotku váhy (distribuční objem, clearance) a u ostatních parametrů byly sjednoceny jednotky (časové veličiny na hodiny a koncentrace na $\mu\text{g/ml}$).

Farmakokinetická studie zabývající se epidurálním podáváním kontinuálního levobupivacainu u novorozenců nebyla objevena ani jedna, vyjma námi provedeného case reportu v rámci klinické studie LEVON¹⁴⁴.

V případě nedostatku dat či pro srovnání jsou farmakokinetická data srovnávána v textu i se staršími skupinami, v některých případech až s dospělými dobrovolníky. I když jsou zde rozdíly očekávány, tak se velmi často i v praxi tato data používají u mladších skupin.

Tab. 1 Farmakokinetické parametry bupivacainu a levobupivacainu u kojenců mladších než 7 měsíců – výsledky rešerše

Kojenci (PNA 31-210dní)	Místo podání	LA + dávkování	C _{peak} (µg/ml)	T _{max} (h)	V _T /F (L/kg)	V _U /F (L/kg)	T _{1/2} (h)	Cl/F (ml/min/kg)	Literatura
N=22, PNA 1-7měsíců,(3,4- 7,8kg)	L ₃₋₅ Epi.	BV 0,125% 0,375 mg/kg/h				16,1 (17% CV)		5,54-7,53 po 24h ,3,47-3,94 po 48h,(36,3-73,1 volný)	Meuner (2001) ¹⁵³
N=23 PNA pod 3 měsíce	Kaud.	LVB 0,25% 2mg/kg	0,69 (0,09 volný)	0,81	2,89 (BSV 31%)	24,29 (BSV44%)		3,05 BSV 50,6% (25,4 volný, BSV 43,5%)	Chalkiadis (2005) ¹⁵⁴
N= 11 PNA pod 6 měsíců 4,17kg (SD 0,77)	Interko st.	BV 1,5mg/kg	0,91 (SD 0,27)		2,00 (SD 0,61) V _d SS 2,17 (SD 0,71)		1,7 (SD 0,65)	17,71(SD 6,99)	Simon Bricker (1989) ¹⁵⁵
N=8 (1 vyloučen) PNA 3-6 měsíců 6,9kg (SD 0,97)	Kaud.	LVB 0,25% 2mg/kg, pak 0,2mg/kg/h				1,05 L (CI 0,62-1,27)		61,3 L/h = 1021,7ml/min (CV 28,1% volný)	Vashisht (2018) ¹⁵⁶
N= 11 PMA 40-59 týdnů 4,3kg (3-6,6)	Epi.	BV 0,25% 1,5mg/kg a 5 pac. poté 0,2mg/kg/h			2,97	55,71		1,80 (38,33 volný)	Calder (2012) ¹⁵⁷
N=7 PNA max. 22 týdnů 4,9kg(2,5-7,3)	Kaud.	BV 0,25% 2,5mg/kg (bez adr.)	1,109 (207- 2195)	1 (0,5-4)			2,75 (1,7-4,4)		Hansen (2001) ¹⁵⁸
N=3 (PNA 1-2měsíce, 4,8 kg (4,5-5,2)	Kaud.	LVB 0,25% 2,5mg/kg	1,9 (1,8-2,4)	0,75(0,5-1,0)					Cortínez (2008) ¹⁶³
N=4, PNA 3-6měsíců, 5,95kg (5,2-6,8)	Interko st.	BV 2-4mg/kg	1,66(1,23- 2,05)		2,45(1,2-3,3) V _d SS 2,33 (1,2-3,1)		1,78(1,6- 1,92)	15,8(9,3-20)	Rothstein (1986) ¹⁶⁵
N= 9 (PNA pod 3 měsíce), váha neznámá	Kaud.	LVB 0,25% 2,0mg/kg	0,97 (0,57- 1,38)	0,83(0,25 -1,0)					Chalkiadis (2004) ¹⁶⁴
N=13 PNA 1-6 měsíců 5,7kg (SD 1,4)	Kaud.	BV 0,5% 2,5mg/kg	0,97 (SD 0,42) Volný 0,15	0,47 (SD 0,22)	V _d SS 3,9 (SD 2)		7,7 (SD 2,4)	7,1(SD 3,2)	Mazoit ¹⁵⁹ (1988)

Adr. – adrenalin, LVB - Levobupivacaine, BV - Bupivacaine, CV -koeficient odhadované variance (=BSV interindividuální variabilita), VT/F - Distribuční objem celkového LA, V_T/F - Distribuční objem celkového LA, V_U/F - Distribuční objem volného LA, Cl/F - Clearance LA, Cl_T/F - Clearance celkové koncentrace LA, Cl_U/F - Clearance Volné frakce LA, SD - směrodatná odchylka, T_{1/2}-Poločas eliminace (průměr), V_dSS- distribuční objem ustáleného stavu (steady state), CI – confidence interval, C_{peak} - (peaková koncentrace, první naměřená, taky C₀, C_{max}), T_{max} -čas od podání LA do C_{max}, VLBW - novorozený s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1 500)g, ELBW - novorozený s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1 000g), N – počet subjektů

Zdroj: vlastní zpracování dle databází MEDLINE, Pubmed a Scopus

Tab. 2 Farmakokinetické parametry bupivacainu a levobupivacainu u novorozenců – výsledky rešerše

Novorozenci PNA 0-30dní	Místo podání	LA + dávkování	C _{peak} (µg/ml)	T _{max} (h)	V _T /F (L/kg)	V _U /F (L/kg)	T _{1/2} (h)	Cl/F (ml/min/kg)	Literatura
N=25 (PMA 37-49, 2,4-6kg), součástí kojenci (nešli odlišit)	Spin. +rescue Kaud. Či spin.	LVB 0,5% 1mg/kg + rescue 1,5- 2,5mg/kg	0,37 (SD 0,11)	0,34 (SD 0,09)	2.998 (SD 1,488)		8,02 (SD 3,62)	4,5 (SD 1,5)	Frawley (2021) ¹⁶⁰
N= 25 PMA 36- 52 4,19kg (SD 0,19), součástí kojenci, nešli odlišit	Spin.	LVB 0,5% 1mg/kg	0,34	0,5					Frawley (2016) ¹⁶¹
N= 11 (donošení PNA do 28dní) 3,17kg (SD 0,63)	Interko st.	BV 1,5mg/kg	0,82 (SD 0,56)		2,65 (SD 0,89) V _d SS 2,56 (SD 0,76)		2,2 (SD 0,983)	16,93 (SD 9,32)	Simon Bricker (1989) ¹⁵⁵
N=1 (PMA 35+5, 2,14kg)	Kaud.	LVB 0,25% + 1,694mg/kg, 0,34mg/kg/min - se snižujícím se dávkováním			0,42 (V _T /F=0.9 L)		7,3	0,670 (Cl/F 0.086 L/h)	Sipek ¹⁴⁴ (2024)
N= 8 ELBW a VLBW (0,7-1,022 kg) PNA 3-15dní	Interko st.	BV 2mg/kg	0,54 (0,24- 1,22)		4,67 (SD 1,753, 1,64- 8,2)		7,54 (SD 1,9; 5,07-11)	7,9 (SD 4,6, 2,45-18,69)	Weston (1995) ¹⁶²

LVB - Levobupivacaine, BV - Bupivacaine, CV - koeficient odhadované variance (=BSV interindividuální variabilita), VT/F - Distribuční objem celkového LA, V_T/F - Distribuční objem celkového LA, V_U/F - Distribuční objem volného LA, Cl/F - Clearance LA, Cl_T/F - Clearance celkové koncentrace LA, Cl_U/F - Clearance Volné frakce LA, SD - směrodatná odchylka, T_{1/2} - Poločas eliminace (průměr), V_dSS - distribuční objem ustáleného stavu (steady state), CI - confidence interval, C_{peak} - (peaková koncentrace, první naměřená, taky C₀, C_{max}), T_{max} - čas od podání LA do C_{max}, VLBW - novorozený s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1 500)g, ELBW - novorozený s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1 000)g, N - počet subjektů

Zdroj: vlastní zpracování dle databází MEDLINE, Pubmed a Scopus

Celková dávka, objem a místo podání (či spíše prokrvení místa podání) LA determinuje absorpci a následné farmakokinetické parametry. Pro srovnání u části vybraných klinických studií, kde se podal levobupivacaine i.v. (jen u zdravých dospělých dobrovolníků), byla rychlost absorpce a následné T_{max} 10,2–12 min (C_{max} celkového levobupivacainu 0,557-2,7 $\mu\text{g/ml}$, AUC 54,7-69 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$)¹¹⁹. U jiných míst podání (TAP, epidurální, fascia iliaca, scalp, hrudní paravertebrální, hluboký a povrchový krční, axilární blok) se T_{max} pohybovalo mezi 10–55 min¹⁴⁵⁻¹⁵¹, kdy epidurální absorpce byla charakterizována C_{max} 0,58-1,02 $\mu\text{g/ml}$, T_{max} 17,4-24 min a AUC 213,6-319,2 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$ ¹¹⁹ pro levobupivacaine a pro bupivacaine obdobných T_{max} 21-26 min a C_{max} 0,42-1,18 $\mu\text{g/ml}$ ¹¹⁷.

V kategorii dětí jsou výsledky velmi podobné od třetího měsíce života^{117,152}. U dětí mladších tří měsíců byl C_{max} 0,69 -1,9 (0,09 volný) $\mu\text{g/ml}$, T_{max} 30-60 min^{154,163}. V případě Bupivacainu ve dvou farmakokinetických studiích vycházely C_{max} 0,97-1,109 $\mu\text{g/ml}$, T_{max} 28,2-60 min^{158,159}. Z hlediska novorozenců momentálně není dostupná podobná studie u kaudálního (či epidurálního) podávání. U kategorie novorozenců nebyla v době vytváření této rešerše (viz výše) zjištěna obdobná studie u epidurálního/kaudálního podávání, pouze u spinální aplikace (+ rescue kaudální dávky a s výsledky T_{max} 20,4-30 min při C_{max} 0,34-0,37 $\mu\text{g/ml}$ ^{160,161}) a interkostálního bloku. U posledně jmenovaného byly provedeny 2 studie, které porovnávají nálezy u tří věkových skupin (11 kojenců s PNA pod 6 měsíců s mediánem váhy 4,17 kg, 11 donošených novorozenců s mediánem váhy 3,17 kg¹⁵⁵ a 8 nedonošených s ELBW a VLBW, neznámou PMA, PNA 3 – 15 dní a váhou 0,7-1,0 kg)¹⁶², kdy bylo interkostálně podáno 1,5mg/kg bupivacainu, u skupiny nedonošených 2 mg/kg. U nedonošených dětí byly výsledky C_0 0,54 (0,24-1,22) $\mu\text{g/ml}$ a AUC 342 min.ug/ml oproti skupině kojenců s C_0 0,91 (SD 0,27) $\mu\text{g/ml}$ a AUC 129 min.ug/ml a donošených jedinců s C_0 0,82 (SD 0,56) $\mu\text{g/ml}$ a AUC 128 min.ug/ml^{155,162}.

Odhadnutí absorpce po epidurálním/kaudálním podání LA včetně následného výpočtu ostatních farmakokinetických parametrů záleží na několika faktorech a může být komplikované (pro všechny věkové kategorie pacientů). Za změnou biologické dostupnosti se současně i horší předpověditelností stojí velká variabilita páteřního kanálu (epidurálního prostoru), která přetrvává i v neonatálním věku, a tím ztěžuje odhad šíření podávaného LA^{99,100}. Snižující se (úměrně s nezralostí, nepřímo úměrně s věkem) množství tukové tkáně v kaudálním prostoru zlepšuje šíření LA kranálněji, čímž umožňuje obsáhnout větší prostor^{166,167} a teoreticky vést k rychlejší absorpci LA a díky tomu v kratším čase dosáhnout vyšších koncentrací.

Ukazuje se však, že technika (rychlost podání) má na toto šíření minimální dopad a mnohem větší roli hraje celkový podaný objem^{166,167}. Paradoxně u levobupivacainu (jak již bylo uvedeno

výše) míra absorpce probíhá pomaleji nebo se hůře odhaduje. Jeho vysoká ionizace, liposolubilita a vasokonstrikčně vasodilatační vlastnosti s bifázickou absorpcí byly již charakterizovány v úvodní části (viz 1.4.1 Obecné vlastnosti levobupivacainu a rozdíly oproti bupivacainu). Vysoká liposolubilita amidových LA (mj. levobupivacainu) oproti esterovým LA (lidocaine) působí vyšší retenci objemu LA v místě, čímž také prodlužuje T_{max} a snižuje C_{max} . Pomocí radioizotopové metody se podařilo ověřit, že se po 3 hodinách v místě epidurálního podání zdržuje 30 % objemu podaného lidocainu, oproti 50 % u bupivacainu^{117,168}. Po validaci isotopové metody¹⁶⁹ bylo prokázáno podobné zpoždění absorpce i u epidurálního levobupivacainu u dospělých¹⁷⁰. Touto metodou bylo také popsáno bifázické vstřebávání s rychlejší absorpcí na začátku a s pomalejší pozdní další absorpcí.

V případě probíhající větší redistribuce, metabolizace či clearance (při prodloužené absorpci) se může dále falešně prodlužovat absorpce a významně se nadohodnotit vypočítané farmakokinetické parametry, pokud není rozpoznán. Tento „flip-flop“ fenomén byl popsán i u amidových lokálních anestetik.¹⁷¹ Zároveň se používá jako možné vysvětlení jiné farmakokinetiky LA u zvířat¹⁷¹. Tento fenomén se daří v praxi omezit srovnáním farmakokinetiky po i.v. a epidurálním podání, což je zejména významný technický i etický problém u nejnižších věkových skupin.

Pro vysokou rozpustnost v tucích a tím i redistribuci (i přes silnou vazbu k plazmatickým proteinům) se dá předpokládat velký distribuční objem u levobupivacainu/bupivacainu, který by se ale v ustáleném stavu měl pohybovat okolo 1 L/kg (u vyšších hodnot je již pravděpodobný „flip flop“ efekt¹¹⁷).

U dospělých dobrovolníků v preklinických studiích po i.v. podání byl distribuční objem celkového levobupivacainu 66 L (u celkového bupivacainu 60 – 73 L, u volného bupivacainu 1 028 L)^{83,84}. Ve srovnávací studii R – Bupivacainu a S – Bupivacainu (levobupivacainu) byly rozdílné distribuční objemy celkového LA v ustáleném stavu (V_{dss} – steady state) 84 L a 53 L oproti stejným hodnotám volné frakce V_{dss} (1 576 L vs. 1 498 L)¹²⁷. V dalších studiích dobrovolníků v případě kombinovaného podání (epidurální analgezie následovaná i.v. podáním), kde byl V_{dss} standardizován na jednotku váhy (L/kg), se pohyboval V_{dss} celkového bupivacainu 0,85 – 1,13 L/kg^{117,174-176} a celkového levobupivacainu 0,84 – 0,917 L/kg (jen u i.v. podání 62 – 67 L v závislosti na metodě u střední hodnoty váhy 73 kg)¹⁷¹ a 0,75 L/kg (56 L u střední hodnoty váhy 74 kg) u kombinovaného epidurálního a i.v. podání¹⁷¹. U epidurálního podání byly průměrné distribuční objemy u dospělých 107 – 173 L u levobupivacainu^{177,178}, tedy až 3x vyšší oproti i.v. podání (vs. 56 L).

Podobné výsledky s velkou mírou variability jsou i u dětských pacientů (2,7 L/kg)¹⁷⁹ včetně kojenců starých 3 – 6 měsíců (2,89 – 2,97 L/kg)^{154,157} s výjimkou jedné studie (3,9 L/kg)¹⁵⁹ i pod 3 měsíce (2,89 L/kg)¹⁵⁴. Analýzou bylo pak dokázáno, že na velikost distribučního objemu má spíše vliv váha než věk (spočítána stabilní hodnota V_d celkového levobupivacainu 2,7 L/kg u všech věkových kategorií od 1 měsíce PNA)¹⁸⁰.

Obecně u novorozenců je podobných studií velmi málo. U epidurálního podání byl popsán pouze jeden case report u mírně nedonošeného¹⁴⁴, kde V_d vychází neočekávaně nízký 0,42 L/kg, což lze vysvětlit již proběhlou redistribucí levobupivacainu (steady state) při dlouhém kontinuálním podávání levobupivacainu (a samozřejmě možnou vysokou mírou inter-individuální variability).

Vlastní metabolizace amidových anestetik probíhá v játrech pomocí Cytochromu P450, kdy postupně dochází ke konjugaci lokálního anestetika, které je pak vyloučeno z těla močí či stolicí. U bupivacainu/levobupivacainu je 71 % vyloučeno močí a 26 % stolicí (během i.v. podání)^{172,181}. Levobupivacain je metabolizován pomocí CYP 3A4 a CYP 1A2 především na 3-hydroxy levobupivacain¹⁷². Jaterní extrakce je cca 0,3 – 0,35¹¹⁷, kdy veškerá volná frakce je metabolizována (neprochází racemizací)¹¹⁹ a následně v moči byly nalezeny již jen metabolity^{119,181}. Při delším podávání levobupivacainu se tato jaterní extrakce snižuje, a to spíše kvůli rostoucí vazbě proteinů (zejména AAG) než pro saturaci cytochromu (volná frakce zůstává konstantní)¹¹⁷. Jeho snížená funkce následně může vést ke snížené clearance a vzestupu volné frakce, tedy zvýšenému riziku toxicity. To bylo popsáno u lékových inhibitorů CYP (itakonazol)¹⁸², po jaterních resekcích¹⁸³ či u lidí po transplantaci jater¹⁸⁴. Hlavní obavou u mladších dětí je prokázaná nezralost cytochromu. CYP 3A4 se začíná objevovat od prvního týdne PNA (před tím jeho funkci zastává fetální 3A7, který postupně po narození vymizí) a zhruba okolo 1. měsíce má 30 % hodnoty¹⁸⁵, maturuje až během 3. - 6. měsíce života, CYP 1A2 dozrává až od 1 – 3 let života^{185,186}. Oproti tomu snížená ledvinná clearance přispívá k nárůstu metabolicky neaktivních konjugovaných solí a esterů a nevede tím ke zvýšení toxicity.

U dospělých dobrovolníků po i.v. podání byla clearance spočítána na 465 – 651 (+/- ± 221,5) ml/min^{170,172,187}, u i.v. podávání bupivacainu bylo kalkulováno podobných 4,9 – 8 ml/kg/min (volné frakce cca 100 ml/kg/min, $T_{1/2}$ okolo 1,3 h)^{168,174,176}. Po epidurálním podávání bupivacainu byla naměřena clearance 4,0 – 5,2 ml/kg/min ($T_{1/2}$ 5,1 – 10,6 h)^{188,189}.

U dětí věku 1 – 7 měsíců aplikování levobupivacainu/bupivacainu epidurálně (lumbální či kaudální přístup) vedlo k variabilním hodnotám 1,8 – 7,53 ml/kg/min ($T_{1/2}$ 2,75-7,7 h, volné frakce 36-73 ml/kg/min, dle Vashishta 1 021 ml/min)^{153,156-159}. Důvody takto velkého rozptylu jsou nejspíše výše zmiňované faktory: délka podávání, flip-flop efekt a věková heterogenita. U

děti mladších než 3 měsíce činila u kaudálního podání clearance 3,05 ml/kg/min (volného pak 25 ml/kg/min) vše s vysokou interindividuální variabilitou¹⁵⁴.

V kategorii novorozenců existuje pro epidurální/kaudální podání jen málo studií. V případě dlouhodobého kaudálního podávání levobupivacainu u mírně nedonošeného novorozence vyšla snížená clearance 0,67 ml/kg/min ($T_{1/2}$ 7,3 h)¹⁴². Při aplikaci spinálního levobupivacainu u novorozenců (a u některých dětí s rescue kaudálním blokem) vyšla clearance 4,5 ml/kg/min ($T_{1/2}$ 8,02 h)¹⁶⁰. Velmi názorně ukazuje pokles clearance v závislosti na věku série studií zkoumající farmakokinetiku interkostálně podávaného bupivacainu. Rozdílné skupiny dětí měly odlišné hodnoty clearance – ve věku pod 6 měsíců (15,8 – 17,75 ml/kg/min)^{155,165}, donošení novorozenci (16,93 ml/kg/min)¹⁵⁵ a extrémně nezralí novorozenci (7,9 ml/kg/min)¹⁶². Odchytky výše zmíněných činitelů (v anatomii, fyziologii, metabolismu a exkreci) se nejvíce projevují u nejnižších věkových skupin, kdy právě věk a velikost jsou hlavními faktory ovlivňujícími farmakokinetiku (a potenciální riziko vzniku toxicity) nejen u novorozenců¹⁸⁰, ale i dospělých vyššího věku (nad 70 let)¹⁷¹. Do doby zpracování této disertační práce bylo provedeno málo studií, které by se zabývaly dlouhodobým podáváním bupivacainu/levobupivacainu u nejmladších pacientů. Dle Larssona et al. (1997) se během kontinuálního epidurálního podávání ještě po 48 hodinách zvedaly hladiny celkového bupivacainu¹⁹⁰, proto se delší používání (než 48 hodin) nedoporučuje. I když u kojenců s PNA 3 – 6 měsíců se už ukazuje, že i tento způsob jeho použití lze považovat za bezpečný¹⁵⁶.

1.4.4 Farmakodynamika (zejména nežádoucí účinky)

Působením na napětově řízené iontové kanály nikoli jen v místě podání může docházet k nejen k typickým systémovým AE (LAST), nespécificky k anafylaxi (přímo na LA), ale také k lokálním toxickým účinkům. U malých dětí byly popsány u některých LA příznaky methemoglobinémie¹⁹¹.

V minulosti se systémové toxické účinky LA (LAST) u porodnické epidurální analgezie vyskytovaly v 100 případech z 10 000 do roku 1981¹⁹². Díky redukci koncentrací bupivacainu (dříve byl i 0,75 %), snížení jeho celkových dávek a kontroly jehly (během punkce) pomocí ultrazvuku došlo obecně k poklesu četnosti, ale i k prodloužení nástupu a snížení závažnosti příznaků (dost často se jednalo pouze o prodromální příznaky)¹⁴³.

Současný výskyt LAST během regionální analgezie je nízký, tj. (1,2 – 11) /10 000 u dospělých (během epidurálních i periferních nervových bloků mezi roky 1993 a 2013)¹⁹³. U dětí jsou pak známky LAST mnohem vzácnější 0,76/100 000 případů¹⁹⁴. Z několika registrů vychází výskyt

neurotoxicity 0,44 %, přičemž výskyt křečí a záchvatů osciluje pod 0,01 – 0,05 %¹⁹⁵. Výskyt kardiovaskulárních AE se pohybuje v rozmezí 0,017 – 0,46 %¹⁹⁵. Takto povzbudivá čísla mohou být způsobena jednak uvažovanou relativní „necitlivostí“ novorozenců na LA (viz níže), maskováním známek toxicity analgosedací či tím, že vlivem nezralosti a nespolupráce pacientů se počínající AE obtížně odlišují od diskomfortu a bolesti. Výsledná incidence tedy může být podhodnocená. Zhruba 54 % hlášených případů LAST u pediatrických pacientů jsou kojenci a novorozenci¹⁹⁶.

Lokálním působením LA byla zjištěna jejich přímá neurotoxicita u periferních nervů i míchy^{197,198}, projevující se degenerací neuritů, zástavu růstu až apoptózou¹⁹⁹. Permanentní poškození je ale vzácné.

Je známa i myotoxická, kdy LA zvýšeně uvolňuje Ca²⁺ a zároveň blokuje jeho zpětné vychytávání do sarkoplazmatického retikula, čímž zvyšuje jeho intracelulární koncentraci¹⁰⁸. V místě to pak působí kalcifikující nekrózy²⁰⁰. I přes vzácný výskyt se zdá, že levobupivacain má nejvyšší myotoxický potenciál^{201,202}. Obtíže většinou přetrvávají alespoň 4 měsíce následované dobrou regenerací myocytů²⁰⁰. Diskutovaná je i eventuelní degenerace chondrocytů a chrupavky během intraartikulárního podávání levobupivacainu (i jiných LA)²⁰³⁻²⁰⁵. Nedávnými studiemi se prokázal zánik chondrocytů, úbytek synovie i apoptóza při vyšších koncentracích, dávkách i opakovaném podání bupivacainu a není tak s lidocainem doporučeno podávat je intraartikulárně (mepivacaine a ropivacaine se jeví jako méně toxické, i když jejich používání v této indikaci taktéž diskutabilní)^{206,207}.

In vitro je též prokázané antibakteriální působení bupivacainu²⁰⁸⁻²¹⁰ (a ve slabší míře i levobupivacainu)²¹¹. Klinický dopad však zůstává nadále nejasný²¹².

Jedním z předních znaků LAST je neurotoxicita, která klasicky může začínat změnou chování, kovovou chutí, zmatením, dysartrií, tinnitem, závratěmi, dvojitým viděním, myokloniemi případně excitačním chováním, které může gradovat až do generalizovaných křečí. Následovat může depresivní fáze s bezvědomím a zástavou dýchání. CNS je obecně citlivější na LAST u dospělých než myokard²¹³, a proto se nejčastěji ukazují celkové mírnější příznaky, avšak v závislosti na dávce a místě podání se občas mohou rovnou objevit křeče²¹⁴ i bezvědomí se zástavou dechu. U dětí, především nejnižších věkových skupin, je situace složitější. Většinou před podáním LA (epidurální, spinální nebo perineurální cestou) je nutná hluboká analgosedace či anestezie, čímž mohou být počáteční příznaky neurotoxicity maskovány a první známky mohou být až spatřené projevy kardiotoxicity (oběhová nestabilita, arytmie). Proto nejčastěji zpozorovaná neurotoxicita bývá u katérového kontinuálního podávání při špatně odhadnutém dávkování a kumulaci. U nejnižších věkových skupin je vzhledem k nezralosti CNS a

nespolupráci pacienta jakékoliv hodnocení podstatně ztížené. U novorozeneckých animálních modelů, ale i u dětských novorozenců a kojenců byla pozorována relativní necitlivost CNS k LAST a tím inklinace k prvním projevům kardiotoxicity^{215,216}. Stereospecifita levobupivacainu pak naznačuje nižší vychytávání v CNS a tím vyšší práh pro toxické účinky (jak u animálních modelů, tak u lidských dobrovolníků)^{172,217,218}.

Levobupivacaine (bupivacaine) se váže rychle na Na⁺/K⁺ kanály v srdci a na rozdíl od lidocainu se hůře v diastole uvolňuje („fast in/slow out“)²¹⁹ a to tím rychleji, čím je rychlejší frekvence („rate dependence“)¹¹⁷. Fyziologicky vyšší srdeční frekvence je tak jedním z dalších možných vysvětlení náchylnosti novorozenců ke kardiotoxicitě, bez viditelné neurotoxicity²²⁰. Příznaky obvykle začínají tachyarytmiemi, extrasystolami, potenciální hypertenzí, kdy může následovat generalizovaná deprese myokardu projevující se závažnou hypotenzí, rozšířením QRS komplexů, blokády v převodním systému, ventrikulárním rytmem, bradykardií až asystolií (v závislosti na dávce se může rovnou objevit bradykardie)²²¹. Další příčinou rychlé deprese myokardu je utlumením ATP syntázy²²². To zablokuje energetický metabolismus kardiomyocytů přímo v mitochondriích spolu s transportním systémem mastných kyselin do mitochondrií myokardu (blokáda Carnitine-acylcarnitine translokázy)²²³. Lipofilní chování slouží jako jedna z teorií působení lipidových emulzí jako antidota LA. Ve vysokých dávkách, zejména při extravaskulárním podání, je LA pravděpodobně vychytáváno do lipidových emulzí s poklesem celkové hladiny LA („lipid sink“ theory), ačkoliv při rychlém i.v. podání či v subtoxických dávkách tento účinek pozorován není.^{224,225} Větší efekt byl pozorován u lipofilních LA, nejvíce u bupivacainu²²⁶. Účinnost lipidových emulzí byla již prokázána u nejnižších věkových skupin^{227,228}.

1.4.5 Měření plazmatických hodnot a hranice toxicity

Určení plazmatické hranice toxicity je nadále komplikované a v minulosti byla několikrát měněna, stejně jako doporučené dávkování levobupivacainu (potažmo bupivacainu). Většina těchto zjištění byla provedena u bupivacainu. U dětí jsou logicky z etických i technických důvodů informace v literatuře jen sporadické. Pro účely této práce byla provedena rešerše na téma plazmatické koncentrace levobupivacainu (i bupivacainu) a výskytu LAST u všech věkových kategorií. V rámci tohoto šetření byl prohledán MEDLINE a PubMed s několika druhy zadání s následujícími hesly / klíčovými slovy:

- (plasma concentration bupivacaine toxicity) OR (plasma concentration levobupivacaine toxicity), které obsahovalo 52 článků od 1975 do 2024

- (toxicity threshold bupivacaine) OR (toxicity threshold levobupivacaine), které obsahovalo 30 článků od 1975 do 2024
- plasma concentration levobupivacaine, které obsahovalo 22 článků v letech 1998 až 2024.
- plasma concentration bupivacaine, které obsahovalo 232 článků mezi lety 1973 až 2024
- toxic level levobupivacaine, které obsahovalo 16 článků v časovém rozmezí 1999 až 2024
- toxic level bupivacaine, které obsahovalo 108 článků mezi lety 1976 až 2024

Byly vyhledávány původní práce, case studies / případové studie i review articles / přehledové články. Pokud byl při čtení článku objeven další zdroj, který obsahoval primární kritéria (viz níže), tak byl také zařazen. Takto se zařadily dodatečně další 3 články^{235,258,259}. Byly vyhledávány jen in vivo studie s lidskými dobrovolníky či pacienty (in vitro a animální studie byly vyřazeny). Nebyl nastaven žádný věkový filtr.

Vybírány byly všechny články obsahující známky LAST během podání bupivacainu či levobupivacainu a zároveň byla změřena koncentrace lokálního anestetika (ať už volné či celkové koncentrace). Pokud se v článku používaly další anestetika (ropivacaine, mepivacaine, lidocaine, lignocaine, etidocaine), tak se použily data jen těch subjektů, co dostali bupivacaine či levobupivacaine. Jestliže byla v některých člancích neúplná data, tak byly použity jen ty subjekty, které obsahovaly primární parametry. Byly definovány primární a sekundární parametry.

Primární parametry: plazmatická koncentrace levobupivacainu či bupivacainu a zároveň projevy neurotoxicity či kardiotoxicity

Sekundární parametry: věk, váha, dávka (bolusová či kontinuálně, včetně koncentrace či případné rychlosti infuze), cesta podání, čas do zjištění toxických projevů

Výsledky:

Bylo získáno 463 nálezů (některé články se v rámci zadání hledání opakovaly). Kritéria splnilo 31 článků (3 články týkající se levobupivacainu a 29 článků o bupivacainu, 1 článek se týkal obou). Pro možný rozdíl v plazmatických koncentracích u dětí a dospělých byly údaje vztahující se k dětským pacientům dány do speciální tabulky (Tab. 5). Dále pro velmi pravděpodobný rozdílný nástup a možné koncentrace při výskytu systémových AE, byli dospělí pacienti rozděleni dle AE po intravaskulárním podání v Tab. 3 (včetně IVRA –intravenózní regionální anestezie či Bier bloku) a AE po extravaskulárním podání v Tab. 4 (perineurální, epidurální, paravertebrální či jiné).

Tab. 3 Toxické reakce asociované s měřenou hladinou bupivacainu či levobupivacainu u dospělých během intravenózního podání (včetně Bier bloku) – výsledky rešerše

Pacienti	LA	Dávka a způsob podání	Známky toxicity	Plasmatická koncentrace (ng/ml)	Literatura
N= 10 PNA 21-80 let	BV 0,25 - 0,5% s mepivacaine či lignocaine)	Epi 70-100 mg + adr. 5µg/ml + 4 lidem i.v. 0,53-1,87mg /kg během 5-90 min dokombinace	Opilost, ospalost, Parestézie prstů a jazyka	C _{tot} 1550–2040	Reynolds 1970 ²²⁹
N= 12, PNA 23- 33 let, 74-93kg	BV(ropivacaine, crossover study)	I.v. 10mg/min do vzniku AE, celk. 103mg (70-165)	Neurotoxická, Kardiotoxická, Svalový třes	C _{free} 300 (SD 110, 130–510) C _{tot} 4000 (SD 1400, 1100–6200)	Knudsen 1997 ²³¹
N= 14, PNA 29,5let, 72,3kg	LVB 0,5% a BV 0,5% (crossover)	I.v. 10mg/min do vzniku AE či max. 150mg.	Neurotoxická, kardiotoxická	levobupivacaine C _{tot} 2620 bupivacaine C _{tot} 2250	Bardsley 1998 ²³³
N=5, PNA 23–31 let	BV	i.v. Celk. dávka 1,25mg/kg, během 20 min – 0,11/kg/min	žádné	Navrhnutá hranice neurotoxicity C _{tot} 4000	Jorfeldt 1968 ²³⁵
N= 6 , PNA 26- 37let, 50-86kg	BV	I.v. 10-15min, 30-50mg, při dávce s propranololem 40mg	Tinnitus, brnění, EKG změny – všichni	C _{tot} 800-2700ng , podání s propranololem 1100-2600	Bowdle 1987 ²⁴¹
N=102 u 3 LAST, PNA 19-65let	BV 0,25-0,5%	Bier blok, 150-300 mg bolus	U 3 pacientů se po 20 min uvolnila manžeta – křeče, malátnost, změna chování, paralýza	Peak C _{tot} 7100 a 8300, za 5 min 3200 a 4100, u třetího pacienta nebyly C _{tot}	Magora 1980 ²⁴⁴
N= 5 (další údaje nezmíněny)	BV(crossover s etidocainem, lignocainem	i.v. 10mg/min kont. Až do 125mg či AE	1x setřelá řeč, 1x nystagmus, 1x desorientace, 5x motání hlavy, 5x circumorální necitlivost, 1x svalové záškuby	Peak C _{tot} 2240 (+/- 480) a po 60 min 1480 (+/- 280)	Scott 1975 ²⁴⁶
N=16 PNA 23–35 let,	LVB(crossover s ropivacainem	i.v. 8mg/min do AE, max 120mg	Neurotoxická – neobjevila se u všech, proto obtížně hodnotitelné	Peak C _{tot} 1240 (+/- 700)	Dureau 2016 ²⁴⁷
PNA 28let, 56 kg	BV	i.v. 2mg/min, celk. 270mg	120 min po spuštění pokles srdečního výdeje o 33 %, za dalších 15 min generalizované křeče	C _{tot po} 120 min 1100, C _{tot po} 138 min 1030,	Hasselstrøm 1984 ²⁵³
PNA 71let, 120 kg	BV 0,25 %	Bier Block , 80ml (200mg)	Bradykardie, ztráta vědomí, cyanóza, křeče	10 min po AE C _{tot} 1800, 25 min po AE C _{tot} 900, 40 min po AE C _{tot} 580	Rosenberg 1983 ²⁵⁴
N= 12 PNA 20- 34let, 58-83kg	BV (crossover s ropivacainem)	i.v. 10mg/min do výskytu AE či 150mg	4 min po začátku, max efekt po 10 min neurotoxická	C _{tot} při AE až 30min po konci AE mezi 600-2100 , max 2000-2500	Scott 1989 ²⁵⁹

AE – adverse effects (nežádoucí účinky), adr. – adrenalin, celk.-celkový, Bier blok (IVRA – intravenózní regionální anestezie), C_{tot} – celková plazmatická koncentrace lokálního anestetika, C_{free} – volná plazmatická koncentrace lokálního anestetika, epi. – epidurální, i.v. – intravenózní, Kont. – kontinuální, LA – lokální anestetikum, LVB -levobupivacaine, BV – bupivacaine, N – počet subjektů, PNA – postnatální věk, Peak – maximální naměřená koncentrace lokálního anestetika, SD – standart deviation (směrodatná odchylka)
Zdroj: vlastní zpracování dle databázi MEDLINE, Pubmed a Scopus

Tab. 4 Toxické reakce asociované s měřenou hladinou bupivacainu či levobupivacainu (celková i volná koncentrace) u dospělých během extravaskulárního podání (epidurální, perineurální, paravertebrální a jiné) – výsledky rešerše

Pacienti	LA	Dávka a způsob podání	Známky toxicity	Plasmatická koncentrace (ng/ml)	Literatura
N=11 (rodičky) PNA 17–38 let	BV 0,5 %	Paracervikálně , 20ml (100mg)	Nevolnost, zvonění v uších, pokles tlaku	C _{tot} 1870 (jen u jedné)	Hollmén 1969 ²³⁰
Asymptomatictí N=11 a symptomatictí N= 7	BV	Perineurálně, dávka neznámá	Neurotoxicita	Asymptomatictí – C _{tot} 4820 (SD 880, 3640-6600) ,C _{free} 150(SD 60, 40-250) Symptomatictí C _{tot} 4850 (SD 3380, 1000-10 000), C _{free} 350(SD 110, 200-540)	Denson 1984 ²³²
PNA 41 let, 57 kg,	BV 0,75 %	Epi. 2x bolus, 113mg (nechtěně i.v.) a podruhé taky 113mg	Vždy tonicko – klonické křeče	Po první epizodě C _{tot} 2700-2800, během druhé epizody 5100-5400 a těsně po konci 3500	Moore 1979 ²³⁸
N=20, 7 mělo AE, PNA 46-70 let	BV 0,125-0,5 %	Hrudní Epi, bolus 20-30 mg s adr. 1:200 000, 0,13-0,51mg/kg/min	Malátnost/ospalost/ zmatenost, hypotenze	C _{tot} 950-3760, toxické AE nad 1500 (4 ze 7 pacientů)	Griffiths 1975 ²⁴²
PNA 57let, 70 kg (case report)	BV 0,125-0,5 %	Epi, kont 0,11mg/kg/h po 18hod zvýšeno na 0,43mg/kg/h	18-48 h zhoršování agitace	Po 48 h C _{tot} 4000	Dunne 1991 ²⁴³
N=9 , PNA 52-77 let, 45-77kg	BV 0,125-0,25 %	Epi , Bolus 50-102mg, kont. 15-45mg/h – po dva dny	euphorie 1x,blok 2x, nauzea 3x, hypotenze 2x, sedace 1x, 2x bolest ramene	C _{tot} rozmezí středních hodnot 680-3040 (rozmezí SD 250-1320)	Ross 1980 ²⁴⁵
PNA 77let, 74 kg	LVB 0,75%	i.v. omylem (původně epi),142,5mg (5 min po testu 22,5mg s 15µg adr.)	Excitovanost, zmatenost, setřelá řeč	14 min po události C _{tot} 2700, 120 min po události C _{tot} 1100	Kopacz 1999 ²⁴⁸
PNA 25let	BV 0,5 %	Epi (porod, omylem i.v), test 10mg pak 50mg, za 95 min 40mg	Konvulze, ztráta vědomí	C _{tot} 2300 během akutní epizody	Ryan 1973 ²⁴⁹
PNA 40let,56 kg	BV 0,5 %	Akcidentální i.v. při epi. 75mg	Konvulze, ztráta vědomí	C _{tot} 3000 2-3 min po prvním záchvatu	Yamashiro 1977 ²⁵⁰
PNA 77let, 42 kg (alkoholik, kachexie, voriconazol)	BV 0,1-0,375 %	Interpleurální a paravertebrální opakované bolusy den operace 328mg, 1. pooperační den 404mg, 2.den do výskytu AE 250mg	Zmatenost, Tonicko klonické křeče, aspirační pneumonie – úmrtí	C _{tot} 8000 v den AE	Fagenholz 2012 ²⁵¹
PNA 67let, 66 kg	BV 0,375%	Interskalenický , 25ml (93,75mg)	Tonicko-klonické křeče	C _{tot} 1667 krátce po epizodě	Güngör 2015 ²⁵²
N=4, PNA 40-60 let, 53-79 kg, u N ₂ a N ₄ měřen BV	BV 0,75 %	Epi , bolus , N ₂ 165mg + 110µg adr., N ₄ 188mg + 125µg adr.	Konvulze: U N ₂ po15 min od epi U N ₄ po 1 min od epi	N ₂ 1min po AE C _{tot} 2740, 6min po AE C _{tot} 2310, 16min po AE C _{tot} 2160 ,N ₄ 4min po AE C _{tot} 2030	Moore 1982 ²⁵⁵

AE – adverse effects (nežádoucí účinky), adr. – adrenalin, celk. celkový, BV -bupivacaine, C_{tot} – celková plasmatická koncentrace lokálního anestetika, , C_{free} – volná plasmatická koncentrace lokálního anestetika, epi. – epidurální ,i.v. – intravenózní, Kont. – kontinuální, LA – lokální anestetikum, LVB – levobupivacaine, N – počet subjektů, PNA – postnatální věk, Peak – maximální naměřená koncentrace lokálního anestetika, SD – standart deviation (směrodatná odchylka)

Zdroj: vlastní zpracování dle databází MEDLINE, Pubmed a Scopus

Tab. 5 Toxické reakce asociované s měřenou hladinou bupivacainu či levobupivacainu (celková i volná koncentrace) u dětí – výsledky rešerše

Pacienti	LA	Dávka a způsob podání	Známky toxicity	Plasmatická koncentrace (ng/ml)	Literatura
PNA 4roky, 17,1kg	BV 0,25 %	Lumbální epi. 0,57mg/kg/min	grand mal po 44hod	C _{tot} 4500	Peutrell 1995 ²³⁴
N ₁ 3,89 kg PNA 1 den, N ₂ 45 kg, PNA 12let, N ₃ 12kg, PNA 4roky	BV 0,25 %	Epi. 0,25% opakované bolusy 0,55-2,5mg/kg pak kont. 1,5-4,0 hod po posledním bolusu kont. 1,67-2,5mg/kg/h s adre. 1:200 000	N ₁ po 10hod bradykardie+ křeče, komorová tachykardie N ₂ po 25hod 2x tonicko-klonické křeče N ₃ po 34 hod tonicko-klonické křeče	N ₁ po první epizodě C _{tot} . 5600, po 12 hod 3600 N ₂ C _{tot} 6600 N ₃ během křečí C _{tot} 10 200	McKloskey 1992 ²³⁶
N ₁ 9,4 kg, PNA 3roky, N ₂ 26 kg, PNA 9 let,	BV 0,25 %	N ₁ Intrapl. bolus 0,66mg/kg s adre. 1:200 000, pak kont 0,25-0,5mg/kg/h N ₂ Epi. Bolus 1,25mg/kg, pak 1,25mg/kg, /hod oboje s adre. 1:200 000	N ₁ po 21 hod bradykardie+ křeče, N ₂ po 54hod – 3x tonicko-klonické křeče	N ₁ C _{tot} 5600, N ₂ C _{tot} 5400 během první epizody	Agarwal 1992 ²³⁷
N=7, PNA 1 den -7 měsíců, 3,4-7,3kg	BV 0,125-0,25 %	Epi bolus 1,5-1,9mg/kg, kont. 0,5-0,83mg/kg/h	N ₁ (PNA2,5měsíce) bradykardie po 7 h N ₂ (PNA 2měsíce) po 19hod křeče N ₃ (PNA 1 den)po 12 hod nervozita/neklid	N ₁ C _{tot} 1200-1700 (po 6 a 12 h) N ₂ C _{tot} 2120 po 12 h (dostal ale navíc bolus lignocainu 3,75mg/kg) N ₃ C _{tot} 2100 po 6 hod	Larsson 1994 ²³⁹
4 s LAST (PNA 3-4 měsíců, 5,9-7,2kg)	BV0,125 -0,25%	Epi, bolus 1,25mg/kg,pak 0,31-0,63mg/kg/min	N ₁₋₄ nervozita neklid	Peak C _{tot} u N ₁₋₄ 460-650, Peak C _{free} u N ₁₋₄ 17,9-21,6, AAG 0,45-0,71g/l	Luz 1998 ²⁴⁰
2 donošení N ₁ PNA 1den, 3890 g, N ₂ ztraceny vzorky	BV 0,25 %	Epi N ₁ - bolus 2,5mg/kg + adr. 5μg/ml, opakované bolusy 1,87mg/kg +adr, pak kont 2,5mg/kg/min s adr 5μg/ml	N ₁ po 10 hod po začátku infuze – ventr. tachykardie, bigeminie, hypotenze	N ₁ během epizody C _{tot} 5600, po 12hod 3700 N ₂ - krevní vzorky ztraceny	Maxwell 1994 ²⁵⁶
N ₁ 13 kg PNA 2 roky, N ₂ 10 kg, PNA 1,5let, N ₃ 12,5kg, PNA 1,6 let N ₄ 10 kg, PNA 1rok	BV 0,125%	Epi vždy s fentanylam 1-2 μg/ml a adr. 1:400 000, N ₁ kont 5ml/hod (0,48mg/kg/hod) (4hod pauza, 2x bolus 5ml směsi) N ₂ směs 5ml/hod (0,62mg/kg/hod) N ₃ směs 6ml/hod (0,6mg/kg/min) N ₄ směs 4-5ml/hod (0,31-0,5mg/kg/min)	N ₁ nervozita, mimovolní třes – 2. den N ₂ 2.den ospalost, netečnost (přisuzováno fentanyl), N ₃ tonicko-klonické křeče 30sekund – přisouzeny teplotě 39,2, N ₄ spasmy močového měchýře – není LAST	N ₁ 3. den C _{tot} 3860 N ₂ C _{tot} - 5500 N ₃ C _{tot} 2100 N ₄ C _{tot} 2340	Wood 1994 ²⁵⁷
BV u N ₅ (1800 g, kojeneček)	BV 0,375%	Kaudální (susp. i.v. podání) 0,5ml (1 mg/kg) + 5μg adrenalinu	Transientní Bradykardie, změny T-vln	3 min po AE N ₅ C _{tot} 2600	Freid 1993 ²⁵⁸

AE – adverse effects (nežádoucí účinky), adr. – adrenalin, celk. BV – bupivacaine, celkový, C_{tot} – celková plasmatická koncentrace lokálního anestetika, C_{free} – volná plasmatická koncentrace lokálního anestetika, epi. – epidurální, i.v. – intravenózní, Kont. – kontinuální, LA – lokální anestetikum, LVB – levobupivacaine, N – počet subjektů, PNA – postnatální věk, Peak – maximální naměřená koncentrace lokálního anestetika, SD – standart deviation (směrodatná odchylka)

Zdroj: vlastní zpracování dle databází MEDLINE, Pubmed a Scopus

Již Jorfeldt et al. (1968)²³⁵ navrhl ustanovit hranici neurotoxicity plazmatické hladiny celkového bupivacainu na 4000 ng/ml, která poměrně dlouho platila. Přesná hranice toxicity jasná nebyla (i když dle jejich zkušeností se do úrovně 2 400 ng/ml neobjevovaly žádné AE). Již v té době někteří autoři (Reynolds²²⁹, Hollmén et al.²³⁰) poukazovali na Jorfeldtova „hrubší“ kritéria pro toxicitu a udávali již vznik „mírných“ příznaků LAST (tinnitus, závrať, parestézie, ospalost) mezi 1 550 – 2 040 ng/ml, ačkoliv to nebylo v tehdejší literatuře příliš reflektováno. Postupem času se ale začaly kumulovat studie a case reporty popisující vznik LAST při nižších koncentracích (než tehdy uznávaný práh toxicity) nejen bupivacainu, ale i levobupivacainu (Tab. 3, Tab. 4 a Tab. 5).

Na studiích s dobrovolníky u i.v. podávání do výskytu AE (infuze zastaveny již při mírných projevech) byl stanoven dodnes uznávaný práh toxicity pro plazmatickou koncentraci celkového bupivacainu 2000–2200 ng/ml^{232,246}. U levobupivacainu pak na základě studie Bardsleyho et al.²³² (1998, taktéž na dobrovolnících u i.v. podávání) byla změřena hranice toxicity 2 620 ng/ml. Ačkoliv je díky svým vlastnostem (ověřeným komparativními studiemi – viz 1.4.3 Farmakokinetika)²⁶⁶ méně toxický a dá se očekávat vyšší práh toxicity, pro nedostatek studií a velkou variabilitu plazmatických koncentrací při výskytu LAST se někdy udává zhruba stejný práh toxicity jako u bupivacainu. Zároveň řada studií hodnotících plazmatické koncentrace těchto LA ukazovala i vyšší koncentrace než 4 000 ng/ml bez klinické odpovědi (ale i nižší než 2 000 ng/ml s výskytem LAST). Velmi dobře to je ilustrováno Densonem et al. (1984)²³², který zkoumal koncentraci celkového bupivacainu (během periferních blokad) u skupiny s přítomnými příznaky LAST (symptomatická se střední koncentrací 4 850 (SD 3 380, 1 000 -10 000) ng/ml) a bez nich (asymptomatická se střední koncentrací 4 820 (SD 880, 3 640-6 600) ng/ml). Nebyl zde rozdíl ve středních hodnotách obou skupin (navíc jsou obě nad 4 000). V symptomatické skupině byl vysoký rozptyl koncentrací, kdy se začaly projevovat AE. V té samé studii byla naměřena zřetelně vyšší koncentrace volného bupivacainu u symptomatické skupiny (350 (SD 110, 200 – 540) ng/ml) než u asymptomatické (150 (SD 60, 40 – 250) ng/ml). Knudsen et al. (1997)²³¹ podobným měřením (300 (SD 110, 130 – 540) ng/ml) potvrzuje mnohem přesnější hranici toxicity bupivacainu (a potažmo levobupivacainu) měřením volné frakce, kdy se za práh toxicity dá považovat koncentrace 130 – 300 ng/ml. V praxi (i během provádění klinických studií) se však volná frakce měří obtížně.

Z výše uvedeného vyplývá, že měření celkového bupivacainu (potažmo levobupivacainu) poměrně často není přesné a s velkou pravděpodobností přehlíží další činitele, které ovlivňují efekt toxických účinků.

Hlavními faktory by mohly být dávka, koncentrace, rychlost podání, forma podání (bolus vs. kontinuální) a místo podání. Při vysoké jednorázové dávce, která je i.v. nebo se rychle absorbuje do cévního řečiště (typicky neúmyslné i.v. podání při epidurálním či periferním nervovém bloku), dochází k prudkému vzestupu plazmatické koncentrace a tím i k rychlému a mnohdy až život ohrožujícímu výskytu LAST (ať už kardiotoxický, či neurotoxický), která ale vlivem redistribuce farmaka zase velmi rychle klesá (AE ale mají tendenci přetrvávat nebo se vracet i po poklesu pod toxické hladiny²⁶⁰). To je velmi dobře ilustrováno na case reportech u akcidentálního povolení manžety během IVRA (i.v. regionální anestezie, Bier blok)^{244,254}. Magora et al. (1980)²⁴⁴ dokázal u dvou pacientů změřit plazmatickou koncentraci bupivacainu během LAST (uvolnění dávky 150 – 300 mg po 20 minutách, tonicko-klonické křeče, paralýza), která byla 7 100 ng/ml a 8 300 ng/ml. Opakované měření (po 5 minutách) ukázalo koncentrace 3 200 ng/ml a 4 100 ng/ml. Rosenberg et al. (1983)²⁵⁴ během LAST u povolené manžety IVRA (80 ml, 200 mg, bradykardie, křeče, bezvědomí) změřil koncentrace 10 minut, 25 minut a 40 minut po výskytu AE, které činily 1 800 ng/ml, 900 ng/ml a 580 ng/ml. To vysvětluje „nízké“ koncentrace bupivacainu i levobupivacainu (na hranici uznávané toxicity²³³ či v bezpečných koncentracích) nabrané krátce po LAST, vzniklé krátce po podání bolusové regionální blokady (kdy patrně došlo k akcidentálnímu intravaskulárnímu podání či velmi rychlé absorpci)^{238,248,249,252,255}. Výsledky tak spíše reflektují míru redistribuce LA, které se již dříve navázalo na senzitivní receptory (v CNS a v srdci), než vlastní hranici toxicity bupivacainu a levobupivacainu.

Při kontinuálním podávání se přidává schopnost vázat volnou frakci LA na proteiny (zejména alfa1 kyselý glykoprotein a albumin), inter-individuální citlivost jedince na účinky LA, metabolizace a eliminace (zejména jaterní extrakce volné frakce). Výskyt a čas vzniku závisí na schopnostech těchto mechanismů kompenzovat přívod LA. Při vysoké rychlosti infuze (závisí i na koncentraci LA a místě podání) nemusí být kompenzační mechanismy dostatečné a může teoreticky dojít k rychlému nárůstu volné frakce a výskytu LAST (typicky i.v. kontinuální podávání u dobrovolníků viz Tab. 3). Rychlý výskyt LAST (v řádu jednotek sekund až desítek minut) bývá spojen s hodnotami plazmatické koncentrace celkového bupivacainu/levobupivacainu na hranici nebo pod určenou mez toxicity^{241,246,247,253,259} (volná frakce nebyla změřena). Tato nepřímá úměra mezi rychlostí a koncentrací celkového bupivacainu byla již popsána Scottem et al. (1985)²⁵⁹. U kontinuálních regionálních blokad (za předpokladu očekávané zpomalené absorpce) se kompenzační mechanismy projevují a umožňují kumulaci celkového LA (kdy volná frakce je předpokládána nízká) bez projevů

LAST. Ta se pak může projevit až v řádu hodin a dní s typicky vysokými koncentracemi celkového bupivacainu/levobupivacainu^{243,251}.

Nejčastější uváděnou příčinou vzniku LAST (neurotoxicity i kardiotoxicity) u dětí je předávkování během kontinuální infuze (epidurální či periferní blokády), které se rozvíjí většinou během až hodin až dní. Koncentrace jsou uváděny od nízkých (včetně volného bupivacainu – AE: nervozita, neklid)²⁴⁰, přes hranici toxicity uváděnou u dospělých (AE: nervozita, neklid, bradykardie)²³⁹ až po vysoké koncentrace (AE: zejména závažné příznaky jako křeče, bradykardie, arytmie)^{234,236,237,256}. Problematické je především objevení časných příznaků LAST pro nespolečnosti, kdy se dá jen velmi obtížně odlišit počínající toxicitu od nedostatečné analgezie, neklidu²⁴⁰ či jiné příčiny. To může zpozdit odhalení počínající reakce až do doby projevů jednoznačných (a většinou závažných) AE. Zároveň i při naměřených vysokých koncentracích jsou sporné příznaky mnohdy přisuzovány jiné příčině (febrilní křeče, ospalost následkem fentanylu)²⁵⁷. S ohledem na tyto skutečnosti se nedaří stanovit hranice toxicity pro děti (i když ji díky rozdílům ve farmakodynamice lze předpokládat – viz 1.4.4 Farmakodynamika (zejména nežádoucí účinky)), a proto je přejímána od dospělých.

Tímto jsou hranice toxicity, jak pro dospělé, tak i pro pediatrické pacienty, nadále velmi neostře. Hodnoty plazmatických koncentrací celkového bupivacainu /levobupivacainu mohou být v závislosti na klinické situaci obtížně interpretovatelné. Měření volné frakce se jeví jako přesnější a citlivější varianta, i když je náročnější na provedení

1.5 Etické a technické problémy vzniku klinických/farmakokinetických studií u novorozenců

Nedostatek klinických studií bezpečnosti a účinnosti farmak v dětském věku je nejčastější příčinou omezení indikací většiny léků v této věkové kategorii.

Daný stav je nahrazován nasazováním léčiv na základě klinického úsudku, zkušeností, zvyklostí či extrapolace závěrů studií u dospělých pacientů. Z tohoto „off-label“ použití může pramenit nesprávné dávkování s následným výskytem různě závažných AE. Od roku 1997 proto vznikla legislativní iniciativa (v USA a později i v Evropě), která si kladla za cíl usnadnit a iniciovat tvorbu / provádění klinických studií²⁶¹. Díky ní se podařilo rozšířit věkové omezení na dětské pacienty (labelling) cca u 500 léků. Z toho činí jen 43 léků na novorozence a kojence (z toho jsou 3 anestetika)^{261,262}. Do dnešní doby 59,5 – 60 % léků používaných na NICU je tak „off-label“. 94 % novorozenců a kojenců dostává při svém pobytu na novorozenecké jednotce intenzivní péče alespoň jeden „off-label“ lék^{263,264}. Překážkou k častějšímu provádění studií je

nízké procento informovaných souhlasů u rodičů a limitovaný odběr krevních vzorků k analýze (velikost i četnost)²⁶⁵. Prosté převedení designu klinických studií dospělých pacientů na novorozené není vždy uplatnitelné a bývá důvodem selhání provedení těchto studií²⁶². Celosvětovou spoluprací se postupně identifikují oblasti, kterými by se tyto neonatální studie měly zabývat (farmakokinetický modeling, speciální biomarkery, sledovaný outcome, adaptivní design studií, kritéria pro spuštění neonatálních studií), aby měly co největší šanci na úspěšné provedení²⁶⁶. Nadále pokračuje snaha o vytvoření minimal-risk study design či metod analýzy, které dále usnadňují provádění těchto studií. Příkladem může být ultralow volume drug essay, farmakokinetické modelace a simulace, dried matrix spot, alternativní odběr vzorků (neinvazivní – sliny, vydechované koncentrace), mikrodávkování či oportunistické farmakokinetické studie²⁶⁵.

2. Cíle a hypotézy práce

Hypotéza:

Kontinuální (kaudální) epidurální analgezie (c-CELA) se u dětí ukazuje jako účinná analgetická metoda, která nejenom účinně zlepšuje komfort pacientů, ale zejména umožňuje snižovat dávky opiátů a tím omezovat jejich nežádoucí účinky a předcházet vzniku tolerance na opiáty. Kvůli přetrvávajícím obavám u novorozenců z možné kumulace lokálních anestetik z důvodu rozdílnosti metabolismu a nezralosti některých orgánových soustav se nedoporučuje ji používat déle než 48 hodin, navzdory časté klinické praxi. V současné době se preferuje isomerický levobupivacain oproti racemickému bupivacainu kvůli nižší toxicitě.

Ta je způsobena volnou frakcí (nevázanou na proteiny) levobupivacainu. Standardně se ale určuje farmakokinetika a toxicita měřením celkového levobupivacainu (dostupnější a levnější metoda). I když se nabízí lineární závislost, tak vztah volného a celkového levobupivacainu není přesně definován. Dále z literatury vyplývá vysoká variabilita toxického prahu celkové koncentrace levobupivacainu oproti jeho volné frakci.

Cíle:

- 2.1 Pozorováním výskytu komplikací a možných nežádoucích účinků levobupivacainu potvrdit či vyloučit bezpečnost kontinuální epidurální analgezie u novorozenců během dlouhodobého používání a v případě známek toxicity ukončit nabírání dalších pacientů.
- 2.2 Zhodnotit, zdali dojde ke vzniku ustáleného stavu či viditelné kumulaci k toxickým hodnotám levobupivacainu měřením přímých plasmatických koncentrací volného i celkového levobupivacainu. A tím laboratorně potvrdit či vyvrátit jeho bezpečnost dlouhodobého používání
- 2.3 Experimentálně určit vzájemný vztah koncentrací volného a celkového levobupivacainu. Dále zhodnotit obě měření za účelem zjištění, která z metod je vhodnější k měření toxicity a kumulace levobupivacainu.

3. Metodika provedení

3.1 Experimentální/pilotní studie

Pro potřeby této práce a pro umožnění všech experimentálních měření byla vytvořena a oficiálně zaregistrována pilotní klinická studie LEVON („Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LEVObupivacaine during continuous caudal epidural analgesia in Newborns“), která poskytla veškerá potřebná data. Jedná se o multicentrickou (JIP Dětské chirurgické kliniky ve Fakultní nemocnici v Motole a Neonatologické oddělení resuscitační a intenzivní péče v Ústavu pro péči o matku a dítě) prospektivní studii, kam byli zařazeni novorozenci s vysokými nároky na analgezii a s klinickou indikací zavedena c-CELA ze strany ošetřujícího lékaře (nejčastěji v rámci peroperační a pooperační péče).

Následně během 144 hodin od zavedení a spuštění c-CELA (nasyčovací dávka 1,25 mg/kg a udržovací epidurální infuze 0,2 – 0,3 mg/kg/hod levobupivacainu dle protokolu) bylo odebráno až 7 krevních vzorků, ze kterých byla stanovena plazmatická koncentrace volného a celkového levobupivacainu. To umožnilo pozorování růstu plazmatických koncentrací do vzniku „steadystate“ (tj. ustálený stav, kdy příkon nového LA a jeho eliminace jsou v rovnováze), pokud nastal, a tím potvrdit či vyloučit kumulaci LA do toxických hladin. Původním záměrem bylo vytvoření dvou skupin (donošených a nedonošených) kvůli různorodosti s cílem 20 – 30 pacientů do každé skupiny.

Účinnost analgezie byla hodnocena pomocí zavedených skórovacích systémů (NIPS a Comfort Neo scale, uvedeny v příloze) a podle poklesů dávek ostatních analgetik (či extra dávek mimo pořadí v případě nízké analgezie).

Pacienti byli po celou dobu používání c-CELA monitorováni a v případě známek toxicity LA či jakýchkoliv jiných komplikací spojených s užíváním c-CELA byla epidurální infuze zastavena a epidurální katétr vytažen. Opakované závažné komplikace, zejména toxicita by byly důvodem k provedení interim analýzy této pilotní studie a k jejímu případnému předčasnému ukončení.

Druhá experimentální část zkoumá vztah plazmatických koncentrací volného a celkového levobupivacainu. Dá se očekávat, že se jedná o vztah přímo úměrný (až lineární). Předpokládá se vysoká vazba levobupivacainu na proteiny a z měřené celkové koncentrace by teoreticky mělo být možné odhadnout volnou část (volné molekuly LA v plazmě jsou odpovědné za možnou toxicitu). Měření celkové koncentrace LA se preferuje v literatuře (nižší cena i větší

jednoduchost analýzy). Zároveň se koncentrace levobupivacainu během toxických příznaků velmi liší a hranice toxicity je tak velmi neostrá (oproti volné frakci). U novorozenců se dají očekávat vysoké interindividuální rozdíly koncentrací, které dále ztěžují interpretaci. Proto byl zjištěn vztah (korelace) celkové i volné koncentrace v časech odběrů vzorků (tedy až 7 plánovaných korelací). Za kontrolní skupinu je považováno měření celkových koncentrací levobupivacainu a nulovou hypotézou je žádný vztah obou veličin (chovají se nezávisle). Výsledkem je určení přesnější metody (či zjištění, že obě metody jsou zástupné) k pozorování nebezpečné kumulace a toxických hladin.

Pacienti byli zařazováni do studie a veškeré odběry a měření byly prováděny dle zásad GCP a v duchu Helsinské deklarace až po schválení etickými komisemi (EK) obou center. Dále byla studie LEVON nahlášena a po připomínkovém řízení schválena Státním ústavem pro kontrolu léčiv (EudraCTnumber: 2020-000595-37) a zaregistrována v mezinárodním registru klinických studií ClinicalTrials.gov (NCT06171295).

Primárním cílem této experimentální práce je potvrzení bezpečnosti dlouhodobé epidurální analgezie dle pevně stanoveného protokolu. Z důvodu vzácnosti výskytu pacientů, etické a technické náročnosti nemohla být do designu studie zařazena kontrolní skupina (bez c-CELA a management bolesti proveden systémovým podáváním morfinu) s následnou randomizací (praxe běžná pro hodnocení účinnosti a superiority léčebné intervence), což je typické pro tuto věkovou skupinu. Zjištěné výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou, která tím tak tvoří jistou kontrolu.

K vytvoření grafů a korelačním výpočtům byl použit software GraphPad Prism 8.0.1.

3.2 Soubor pacientů

Po schválení EK a SÚKL byli vhodní novorozenci pacienti zařazováni dle kritérií níže (Tab. 6). Z hlediska předpokládané rozdílnosti byly vytvořeny dvě skupiny novorozenců: Skupina donošených (PMA 37. - 45. týden) a nedonošených (PMA 25. týden až 36. týden + 6 dní, minimální váha 500 g).

Poznámka autora: Skupina nedonošených dostala dodatečné povolení k zařazení do studie od SÚKL po prezentaci prvotních dat, kdy se neprokázaly toxické účinky či nebezpečná kumulace.

Tab. 6 Shrnutí zařazujících a vylučujících kritérií do studie, včetně kritéria ukončující observační část ve studii

Zařazující kritéria:	Vylučující kritéria	Ukončující kritéria
písemný souhlas obou zákonných zástupců (rodičů)	nepodepsání písemného souhlasu oběma rodiči (zákonnými zástupci)	přání rodiče (zákonného zástupce)
věk mezi 25-45 týdnů PMA	věk starší než 45 týdnů PMA	zhoršení jaterních funkcí (2x či vyšší nárůst na fyziologickou mez)
váha větší než 500 g	věk mladší než 25 týdnů PMA	zhoršení ledvinných funkcí (2x či vyšší nárůst na fyziologickou mez)
chirurgický stav pod úrovní bránice vyžadující vysoké dávky analgezie	váha pod 500 g	neřešitelné komplikace spojené se zaváděním či péčí o katétr (selhání zavedení, malfunkce, obtékání, vytažení)
jakýkoli stav bez nutnosti operace (pod úrovní bránice)	vrozené malformace páteřního kanálu (spina bifida occulta, memingocoele, meningomyelocele)	infekce způsobená c-CELA (zarudnutí, otok v místě vpichu, meningitis, celulitida, absces)
hemodynamicky stabilní (není podezření, že c-CELA by hrozila hemodynamickou nestabilitou)	onemocnění či malformace významně snižující jaterní funkce (2x a více zvýšené jaterní enzymy)	známky neuro – či kardiotoxicity asociované s používáním c-CELA
	onemocnění či malformace významně snižující ledvinné funkce (2x a více zvýšená urea či kreatinine)	stav, který již nevyžaduje vysoké dávky analgezie (určuje ošetřující lékař)
	infekce v místě vpichu či systémová (Sepse)	nově se objevivší či zhoršená anémie, která by vyžadovala transfuzi (Hb pod 90 g/l)
	stav, který nevyžaduje vysoké dávky analgezie	časté krevní odběry, či nové krvácení, které by ve spojení s náběry pro účely studie překročily doporučené maximum odběrů ²⁶⁷
	syndrom z odnětí (po používání opiátů)	
	vysoké riziko krvácení během zavádění katétru (antikoagulancia, koagulopatie)	
	významná anémie, která by při odebrání vzorků vedla k potřebě podání transfuze (Hb pod 90 g/l)	
	hemodynamická nestabilita (např.: šok, významné arytmie)	
	časté krevní odběry, které by ve spojení s náběry pro účely studie překročily doporučené maximum odběrů ²⁶⁷	
	meningismus	

Zdroj: vlastní zpracování

3.3 Zavedení epidurálního katétru a vedení kaudální kontinuální epidurální analgezie (c-CELA)

Po splnění zařazovacích kritérií (včetně písemného souhlasu obou rodičů) a bez známek vylučovacích kritérií byl zaveden epidurální katétr, a to, buď po úvodu do anestezie (konkrétní farmaka dle zvyklostí anesteziologa) před plánovanou operací, nebo na oddělení v analgosedaci (dle zvyklostí oddělení).

Z kaudálního přístupu skrz membránu sacrococcygea do epidurálního prostoru byl zaveden armovaný katétr G20 (ArrowInt. USA) pomocí kanyly G18, případně silikonový Premicath (Vigon, UK) u dětí pod 2 kg pomocí kanyly G22 či G24. Následně byl podán bolus levobupivacainu 0,25% (Chirocaine, Abbvie či Levobupivacaine Kabi, Fresenius Kabi) v dávce 0,5 ml/kg (1,25 ml/kg) a spuštěna kontinuální epidurální infuze levobupivacainu 0,2 mg/kg/hod (která mohla být postupně snižována dle zvyklostí oddělení) spolu se sufentanilem 0,02 µg/kg/hod (Sufentanil Torrex 5 microgram/ ml, 5x2 ml, Piramal Critical Care V.S Rouboslaan, Netherland) ve standardizované směsi. Ta obsahovala 20 ml levobupivacainu 0,5 % + 10 µg sufentanilu (2 ml) a 20 ml FR 1/1 (s koncentrací levobupivacainu 0,238 % a sufentanil 0,238 µg/ml). Další analgetika a sedativa byla podávána dle zvyklostí oddělení na podkladě skórovacích systémů bolesti (detaily viz 3.6 Metody hodnocení farmakodynamických účinků (účinnosti, pozorování komplikací, včetně známek toxicity).

3.4 Doba pozorování, sběr dat a odběr a skladování krevních vzorků

Po úspěšném zavedení epidurálního katétru a spuštění c-CELA byly zaznamenány tlak, srdeční frekvence, vstupní neurologické vyšetření (orientační, v rozsahu provedeném dle ošetřujícího lékaře) a demografické údaje (PMA, PNA, váha, indikace k c-CELA, přidružená onemocnění). Po celou dobu byli pacienti monitorováni (EKG, tlak a neurologické vyšetření – detaily viz 3.6 Metody hodnocení farmakodynamických účinků (účinnosti, pozorování komplikací, včetně známek toxicity)). V pozorovacím intervalu 144 hodin byl naplánován odběr po 0,5 hod, 1 hod, 6 hod, 12 hod, 36 hod, 72 hod a 144 hod po spuštění c-CELA. V případě ukončení c-CELA dříve byl odebrán vzorek při vytažení. Jakékoliv (akcidentální) časové odchýlení od odběrového schématu se zaznamenalo, ale nebylo důvodem k vyřazení pacienta ze souboru. Z povahy onemocnění pacientů byl vždy přítomen cévní vstup (kanyla, arteriální katétr). Každý odběr do mikrozkuřavky typu Eppendorf měl objem 200 – 500 µl. Vzorky byly uskladněny v ledničce o teplotě 4 °C a během několika dní transportovány do laboratoře (Ústav soudního

lékařství a toxikologie, Oddělení toxikologie ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze), kde byla centrifugací separována plazma a vzorek uskladněn (zamražen) k pozdější analýze.

Po nashromáždění signifikantního počtu vzorků byla provedena analýza (detailní popis analýzy viz 3.5 Úprava biochemické analýzy za účelem minimalizování velikosti odebíraného vzorku). Dle GCP a mezinárodních doporučení WHO k bezpečnému odběru krevních vzorků²⁶⁷ bylo vytvořeno schéma odběru krevních vzorků za účelem minimalizovat množství potřebné krve k analýze vzorků. Ideální velikost jednoho krevního vzorku je 500 μ l, ale 200 – 300 μ l je stále dostatečné množství k analýze (s únosným rizikem selhání preanalytické či analytické fáze). Snížená velikost vzorku (viz Tab. 7 níže) byla odebírána u pacientů s velmi nízkou porodní hmotností (VLBW, pod 1 500 g) a s extrémně nízkou porodní hmotností (ELBW, pod 1 000 g). Takto navržené schéma by mělo být bezpečné i pro pacienty s nejnižší možnou hmotností (500 g) a umožňuje zařazení pacientů do studie. V případě významné anémie (viz Tab. 7) či většího odběru krevních vzorků pro krevní testy (kdy by ve spojení s krevními vzorky pro potřeby studie bylo překročeno maximální bezpečné množství krve k odběru), byl pacient vyřazen ze studie. Pokud již byl do studie zařazen, byl další plánovaný odběr vzorků okamžitě ukončen (již odebrané vzorky byly analyzovány).

Tab. 7 Navržené schéma bezpečného odběru krevních vzorků dle GCP a doporučení WHO²⁶⁷

Tělesná hmotnost (g)	Odhadované celkové množství krve(TBV) (ml)	Maximální povolený objem (ml) při jednom krevním vzorku(2.5% TBV)	Maximální povolený krevní objem (ml) (pro vědecké i klinické účely) během 30 dní (5% TBV)	Maximální plánovaný objem krve(ml) k odběru pro potřeby studie(během 144 hod)	Minimální Hemoglobin (g/l) potřebný ke klinickým odběrům
500	52	1,3	2,6	1,4-2,1	90
700	74	1,85	3,7	1,4-2,1	90
1000	105	2,63	5,25	1,4-2,1	90
1500	150	3,75	7,5	1,4-2,1	90
2000	170	4,25	8,5	1,4-3,5	90
2500	213	5,33	10,65	1,4-3,5	90
3000	255	6,37	12,75	1,4-3,5	90
3500	308	7,7	15,4	1,4-3,5	90

GCP – good clinical practice, TBV – celkový objem krve pacienta

Zdroj: vlastní zpracování

3.5 Úprava biochemické analýzy za účelem minimalizování velikosti odebíraného vzorku

Ke stanovení celkového a volného levobupivacainu bylo použito tekutinové chromatografie (LC) s tandemovou spektrometrickou detekcí (pozitivní ESI mód (LC-ESI(+)-MS/MS), interní standard (IS) mepivacaine). Metoda byla vyvinuta dle platných doporučení SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology)²⁶⁸, tak aby se dal minimalizovat každý krevní odběr na 0,2 – 0,5 ml a zároveň splnila všechny nutné podmínky k měření všech analytů.

Během standardizace vzorku pro vázaný levobupivacaine se 10 μ l patientského séra spojilo s 10 μ l roztokem interního standardu (10 μ l, $c = 125 \text{ ng ml}^{-1}$ in methanol) a poté precipitovalo přidáním 300 μ l acetonitrilu. Směsí bylo jemně třeseno 60 s a následně byla centrifugována (1 min, 15 500 otáček/min). Výsledný supernatant (160 μ l) byl přepipetován do 1,5 ml zkumavky a analyzován. Kalibrace byla provedena v pásmu 0 – 1 000 ng/ml.

V případě stanovování volného levobupivacainu se 160 μ l patientského séra přepipetovalo do centrifugálního filtru (Amicon Ultra 0.5ml, Merck Millipore Ltd., Cork, Ireland) a zcentrifugovalo (v 15 500 otáčkách/min na 10 minut), poté 30 μ l centrifugovaného séra bylo pipetováno do 1,5 ml eppendorfky / mikrozkušavky typu Eppendorf, smícháno s 20 μ l interního standardu (10 μ l, $c = 2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ v methanolu) a precipitováno přidáním 100 μ l acetonitrilu. Směs byla třesena 60 s a centrifugována další minutu (15 500 otáček/min). 100 μ l vzniklého supernatantu bylo vloženo do 1,5 ml zkumavky a analyzováno.

Metoda byla vyvinuta za pomoci Nexera X2 Shimadzu HPLC (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan) spolu s AB Sciex QTRAP 5500 (MA, USA). Mobilní fáze A se skládala z 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí a mobilní fáze B obsahovala acetonitril. Vlastní analýza byla provedena na Zorbax Eclipse XDB-C18 column (1,8 μ m, 50 x 4,6 mm).

Iniciální LC podmínky měly průtok 0,5 ml min^{-1} a složení mobilní fáze 50: 50 (A: B). Tyto podmínky trvaly 120 s, aby se analyty naložily do kolony. Ve 120. sekundě bylo během 78 s složení mobilní fáze navýšeno na 100 % (B) po dobu 30 s a následně navraceno do původních LC podmínek.

Kvantifikace byla provedena za použití MRM módu (multiple reaction monitoring) k monitoraci tranzice protonovaného prekurzoru \rightarrow produktový iont (m/z pro levobupivacaine 288.6 \rightarrow 140.0, pro mepivacaine 246.6 \rightarrow 98.2).

3.6 Metody hodnocení farmakodynamických účinků (účinnosti, pozorování komplikací, včetně známek toxicity)

Hodnocení bolesti probíhalo v pevných intervalech (á 4 hod) dle zvyklostí oddělení. ComfortNeo pain scale či NIPS (u extubovaných pacientů) byly hodnoceny spolu s expertním odhadem ošetřující (0-3 žádná bolest, 4-7 mírná bolest, 8-10 silná bolest) sestry. Hodnoty a jejich změny byly pravidelně zaznamenávány. Při známkách bolesti, kdy alespoň jedna hodnotící škála bolesti indikuje bolest (sesterský odhad 4 a více bodů, ComfortNeo pain scale více než 14, NIPS více než 4) byl považován management bolesti za nedostatečný a analgezie byla navýšena či podána mimo pořadí dle zvyklostí pracoviště a dle úvahy ošetřujícího lékaře (vše bylo zaznamenáno). V případě významného poklesu v hodnocení škál bolesti (ComfortNeo pain scale pod 9, NIPS a expertní odhad pod 4) bylo možno adekvátně snížit dávkování analgetik (především opioidů) dle uvážení lékaře.

Po celou dobu používání c-CELA (i po skončení observační fáze) byly sledovány komplikace spojené s jejím používáním a pečováním o katétr. Nejčastěji se může jednat o dislokaci, malfunkci, znečištění, infekci v místě. Pokud se vyskytly, tak byly obtíže zaznamenány. V případě předčasného ukončení používání c-CELA byl zaznamenán jeho důvod. U vzácných závažných komplikací typu epidurální absces či hematoma (ztráta hybnosti, bolestivost v místě, horečky) bylo používání c-CELA okamžitě přerušeno a katétr byl vytažen. Další diagnostika (MRI, chirurgický výkon, ATB) byla realizována dle ošetřujícího lékaře.

Každý pacient byl po celou dobu používání c-CELA kontinuálně monitorován, v časových intervalech byla zaznamenávána pravidelná kontrola celkového stavu, EKG, měření tlaku, neurologické hodnocení (vstupní, výstupní a dle uvážení ošetřujícího lékaře) dle zvyklostí pracoviště, vše bylo zaznamenáno. Jakékoliv časné klinické známky LAST, tedy neurotoxicity (konvulze, iritabilita, mimovolní pohyby, křeče, ztuhlost) a kardiotoxicity (arytmie: bradykardie, ventrikulární i supraventrikulární tachyarytmie, významný pokles tlaku) vedl k okamžitému ukončení c-CELA a vytažení epidurálního katétru (vše bylo zaznamenáno). Další symptomatická léčba byla vedena dle ošetřujícího lékaře.

Pokud se vyskytla významná oběhová nestabilita či jiného ohrožení vitálních funkcí, bylo dle ošetřujícího lékaře indikováno podání Intralipidu 20 % (bolus 1,5 ml/kg a 15 ml/kg/hod kontinuálně dle doporučení ČSARIM²⁶⁹). V této věkové skupině není mnoho literatury popisující podávání Intralipidu (v podstatě case reporty^{227,228}). Vzhledem k závažnosti problému lze po zvážení přínosu a rizika považovat jeho podání za ospravedlnitelné²⁷⁰.

Po ukončení observační fáze (ať už předčasně či očekávaně) byl proveden follow-up po 30 dnech.

3.7 Statistické metody

3.7.1 Základní popis a grafy

Získaná data (koncentrace volného i celkového levobupivacainu) byla zobrazena v grafech s časovou osou, a byl k nim vytvořen medián. Měření mimo schéma byla přiřazena k nejbližšímu plánovanému měření v rámci výpočtu mediánu i následné korelace (viz níže). Výsledky budou srovnány s literaturou (viz Tab. 3, Tab. 4 a Tab. 5).

3.7.2 Srovnání výsledků měření biomarkerů toxicity (plazmatických koncentrací volného a celkového levobupivacainu)

Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 8.0.1. Dle názoru autora této práce je současná představa o vztahu celkového a volného levobupivacainu jako o přímo lineárním vztahu. Nulová hypotéza v tomto případě zní, že plazmatické koncentrace volného a celkového levobupivacainu jsou na sobě nezávislé veličiny. Tento vztah byl testován v čase každého plánovaného odběru (odběry získané mimo plánovaný odběr byly přiřazeny k nejbližšímu plánovanému odběru), tedy 7 korelací (odběrů po 30 min, 1 hod, 6 hod, 12 hod, 36 hod, 72 hod a 144 hod po spuštění c-CELA). V rámci testování linearitu vztahu je preferován Pearsonův korelační koeficient s vytvořením příslušných korelačních grafů. Jsou-li na korelačních grafech znázorněny odlehle hodnoty, více skupin výsledků či naznačený nelineární vztah, je od Pearsonovy korelace upuštěno a je nahrazena korelací dle Spearmana.

Korelační koeficient obou metod se pohybuje mezi -1 až 1, kdy rozmezí 0-0.19 označuje žádnou či velmi slabou závislost, 0.2-0.39 slabou závislost, 0.4-0.59 střední závislost, 0.6-0.79 silnou závislost, 0.8-0.99 velmi silnou závislost a hodnota 1.0 je dokonalá přímá závislost²⁷¹. Záporná rozmezí odpovídají ekvivalentně nepřímé závislosti (u Pearsonova korelačního koeficientu se jedná o lineární závislost). V každém případě bude vytvořen i interval spolehlivosti 95 % a p-hodnota (p-val), která pomůže zamítnout či nezamítnout nulovou hypotézu (při hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$).

4. Výsledky

4.1 Základní data a měření plazmatických koncentrací

Zařazení prvního pacienta (po schválení všech EK a SÚKL) proběhlo dne 4.2.2021 a poslední sběr dat u posledního zařazeného subjektu proběhl 17.7.2022. Celkem bylo k zařazení 24 pacientů. 9 subjektů muselo být vyřazeno (3 subjekty dostaly z rozhodnutí lékaře jiné lokální anestetikum, u 2 pacientů byla zrušena indikace k zavedení c-CELA a u čtyř subjektů selhalo provedení laboratorní metody). 15 subjektů bylo dále analyzováno. 14 jedinců bylo ve skupině donošených novorozenců a počáteční data byla již publikována²⁷². 1 pacient byl ve skupině nedonošených (data byla publikována v roce 2024)¹⁴⁴. Pro nízký počet nedonošených subjektů byla dále analyzována jen skupina donošených.

Demografická data subjektů a jejich laboratorní hodnoty jsou vidět v tabulce níže (Tab. 8). C-CELA byla označena ošetřujícím personálem jako účinná. Pooperačně buď nebyly nasazeny analgetika, či byl vidět denní pokles v počtu dávek. U pacientů 2 a 11 byly zaznamenány vyšší dávky opioidů a midazolamu během prvních 24 hodin (u pacienta 2 tento stav pokračoval i následující den). U pacientů 8 a 9 byly objeveny četné extra dávky sedativ (midazolam, chloralhydrát) mimo plán během prvních 24 hodin po operaci (se zvýšenými hodnotami Comfort Neo Pain Score), dávky analgetik mimo pořadí zaznamenány nebyly. Délka používání c-CELA měla medián 74,5 hodin (rozmezí 13–191 hodin).

Nejčastějším důvodem ukončení používání a vytažení katétru bylo snížení nároků na analgezií. U pacientů 11 a 12 byl katétr vytažen předčasně kvůli prosakování. U pacienta 6 došlo k úniku stolice do krytí epidurálního katétru, který byl vyčištěn a nebylo třeba předčasného vytažení.

Během epidurálního používání nebyly zaznamenány žádné klinické známky toxicity. U pacienta 1 byla zjištěna v rámci follow-upu (s odstupem několika měsíců po vytažení epidurálního katétru) mírná chabá paraparéza. Během používání bylo neurologické vyšetření v normě. Tato událost nebyla asociována s používáním epidurálního katétru. Nadále probíhá šetření. U pacienta 6 byl během následného follow-upu popsán konvergentní strabismus, centrální hypotonický syndrom, plagiocefalie, paréza n. VI, kognitivní deficit a opoždění psychomotorického vývoje. Nic z toho nebylo asociováno s používáním c-CELA.

V důsledku lidské chyby u některých pacientů byly některé odběry (a následná analýza) provedeny mimo odběrové schéma. U pacienta 2 byly všechny vzorky odebrány o 30 minut později oproti plánu. U pacienta 3 byla krev odebrána po 24 hodinách (místo po 12 hodinách), u pacienta 6 byl proveden odběr po 3. hodině (místo po 30 minutách) od spuštění c-CELA. Pokud byl katétr vytažen dříve, než byl naplánován odběr, byl uskutečněn krevní odběr mimo

pořadí při vytažení katétru (u pacientů 10 a 12 po 55. a 63. hodině od spuštění c-CELA). U některých pacientů došlo k selhání stanovení (nedostatek materiálu či selhání laboratorní metody) celkového levobupivacainu (pacient 2, odběr po 144 hodinách) i volného levobupivacainu (pacienti 7 a 8, oba odběr po 30 minutách). Pokud laboratorně vyšlo měření negativní či pod limit měření (LOQ), bylo označeno jako nula (kalibrace a schopnost měření byla od 1 ng/ml).

Mediány volného levobupivacainu (Graf 1) byly 5,4 (0–91,3), 5,5 (0–50,5), 8,2 (0–66,4), 6,4 (0–42,8), 4,3 (0–38,9), 3,4 (0–14,0) a 0,0 (vždy naměřena 0) ng/ml dle schématu (0.5 hod, 1 hod, 6 hod, 12 hod, 36 hod, 72 hod a 144 hod) po spuštění c-CELA. Maximální naměřená hodnota byla 91,3 ng/ml (u pacienta 3, 30 minut po spuštění c-CELA).

Mediány celkového levobupivacainu (Graf 2) byly 405 (123–2230), 548,5 (140–1930), 837,5 (175–1770), 906,5 (303–2730), 828 (389–3360), 811 (325–3950) a 357,5 (348–367) ng/ml ve stejném odběrovém schématu (0.5 hod, 1 hod, 6 hod, 12 hod, 36 hod, 72 hod a 144 hod) po spuštění c-CELA. Maximální naměřená hodnota byla 3950 ng/ml (u pacienta 12, 63 hodin po spuštění c-CELA – přiřazeno do mediánu po 72. hodině).

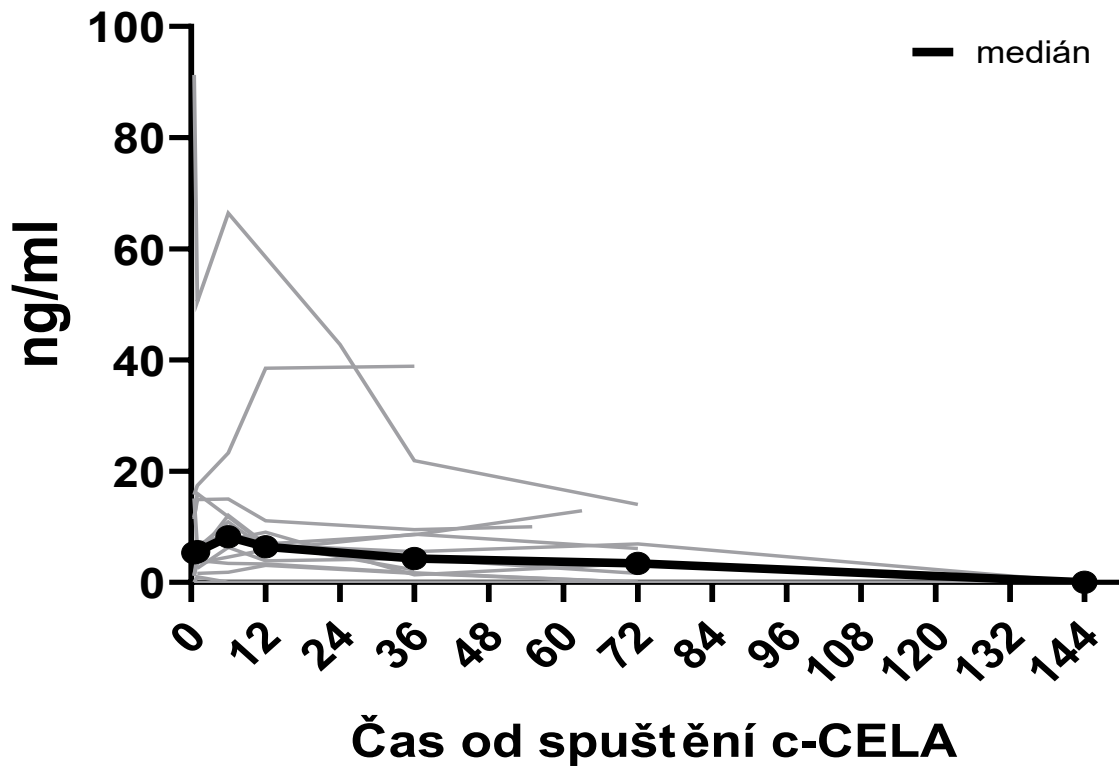
Tab. 8 Demografické a laboratorní údaje pacientů

Pacient	Pohlaví	PMA (týden + den)	PNA (týden + den)	Váha (g)	Diagnóza + komorbidity	ALT (ukat/l)	AST (ukat/l)	Kreatinin (umol/l)	Alb (g/l)	Délka c-CELA (h)
01	m	42+1	5	3500	CDH	0.49	0.89	37	28.3	191
02	m	40+2	7	3300	CDH	0.42	0.56	21	39	163
03	ž	38+1	3	3200	CDH + RDS	0.15	0.55	31	28.8	86
04	ž	39+0	7	2550	CDH + PPHN	0.39	0.43	16	26.7	146
05	ž	39+6	2	2700	extrofie močového měchýře	0.31	1.15	44	42	63
06	m	42+0	7	3400	Hirsprungova choroba + peripartální asfyxie	0.19	0.46	32	28.8	81
07	m	39+1	7	3185	anální atrezie	0.25	0.63	11	30.9	72
08	m	40+5	12	3365	Hirsprungova choroba	0.16	0.52	46	36.4	84
09	m	43+0	14	4010	abdominální neuroblastom	0.76	1.26	27	33	70
10	m	37+0	7	2980	Hirsprungova choroba	Pod 0.15	0.58	34	36.7	55
11	m	37+1	11	2980	Hirsprungova choroba + Downův syndrom	0.24	0.58	26	35.5	13
12	m	39+0	7	2948	retroperitoneální maligní neoplázie, FOA, bikavální aortální chlopeň, GER	0.5	0.89	44	33.8	63
13	ž	40+0	7	2700	Hirsprungova choroba, laryngomalácie hyperbilirubinémie	Pod 0.15	0.59	52	34.2	77
14	m	41+1	1	3620	AAR s píštělí, peripartální asfyxie, anémie	0.33	2.93	88	29.9	45

AAR – anorektální atrezie, c-CELA – kaudální kontinuální epidurální dlouhodobá analgezie, FOA – foramen ovale apertum, GER – gastroesofageální reflux, PMA – postmenstruační věk, PNA – postnatální věk, CDH – vrozená brániční hernie, PPHN – persistent pulmonary hypertension, RDS – respiratory distress syndrome

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPad

volný levobupivacaine

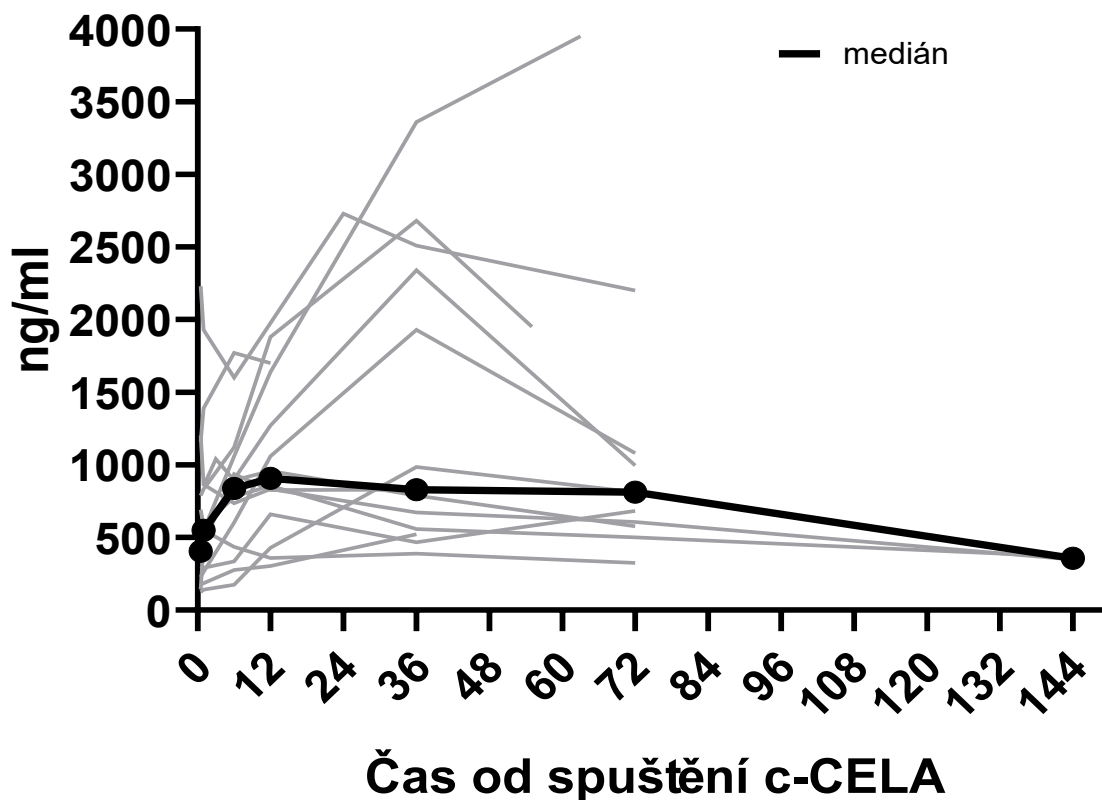


Graf 1 Plazmatická koncentrace volného levobupivacainu během observační fáze

Vytvořeno pomocí programu Graphpad, kde jsou znázorněny graficky plazmatické koncentrace volného levobupivacainu v čase odběru vzorků u 14 pacientů. Vzorky odebrány mimo plánované pořadí byly přesně znázorněny, ale pro zpřesnění měření mediánu byly přiřazeny k nejbližšímu plánovanému odběru (plná černá čára s body).

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPad

Celkový Levobupivacaine



Graf 2 Plazmatická koncentrace celkového levobupivacainu během observační fáze

Vytvořeno pomocí programu Graphpad, kde jsou znázorněny graficky plazmatické koncentrace celkového levobupivacainu v čase odběru vzorků u 14 pacientů. Vzorky odebrány mimo plánované pořadí byly přesně znázorněny, ale pro zpřesnění měření mediánu byly přiřazeny k nejbližšímu plánovanému odběru (plná černá čára s body).

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPad

4.2 Korelace mezi plazmatickou koncentrací celkového a volného levobupivacainu

Volný i celkový levobupivacaine byly spárovány po dvojicích do sloupců podle plánovaných odběrů (viz Tab. 9). Pokud se nepodařilo stanovit koncentraci po odběru, bylo to označeno „x“ a příslušný pár hodnot byl vyřazen z měření (pacienti 2, 7, 8). U pacienta 6 byl jeden odběr po 3 hodinách od spuštění c-CELA (místo po 30 minutách), a proto byl vyřazen z měření. Vzorky odebrané mimo plánovaný odběr byly přiřazeny k nejbližšímu plánovanému odběru, pokud tam nebylo provedeno plánované měření (výsledky označené zeleně).

Bylo provedeno celkem šest korelací, přičemž každá korelace byla provedena z 11–14 párů dat (v důsledku selhání stanovení, chybného odběru či časného vytažení katétru). U 7. odběru nebylo kvůli nedostatku měření možné udělat validní výsledek.

Po provedení Pearsonovy korelace s vytvořením příslušných grafů (Graf 3) byly identifikovány velmi odlehlé hodnoty (pacient 3 a 5, označeny červeně v Grafu 3 a možno vidět v Tab. 9) u měření po 30 minutách (1 hodnota), po 1 hodině (1 hodnota), po 6 hodinách (1 hodnota), po 12 hodinách (2 hodnoty) a po 36 hodinách od spuštění c-CELA (1 hodnota). U měření po 72 hodinách dle grafu nejsou zřetelně odlehlé hodnoty, a proto byla provedena Pearsonova i Spearmanova korelace.

Spearmanův korelační koeficient (Tab. 10) byl u měření po 30 minutách 0,37 (CI -0,32–0,80, p-val 0,26), po 1 hodině 0,29 (CI -0,30–0,72, p-val 0,31), po 6 hodinách 0,42 (CI -0,16–0,79, p-val 0,13), po 12 hodinách 0,29 (CI -0,30–0,72, p-val 0,32), po 36 hodinách 0,57 (CI +0,01–0,86, p-val 0,045) a po 72 hodinách 0,80 (CI +0,37–0,95, p-val 0,005). Pearsonův korelační koeficient, provedený jen u odběru po 72 hodinách (z výše uvedených důvodů), byl 0,82 (CI +0,43–0,95, p-val 0,002).

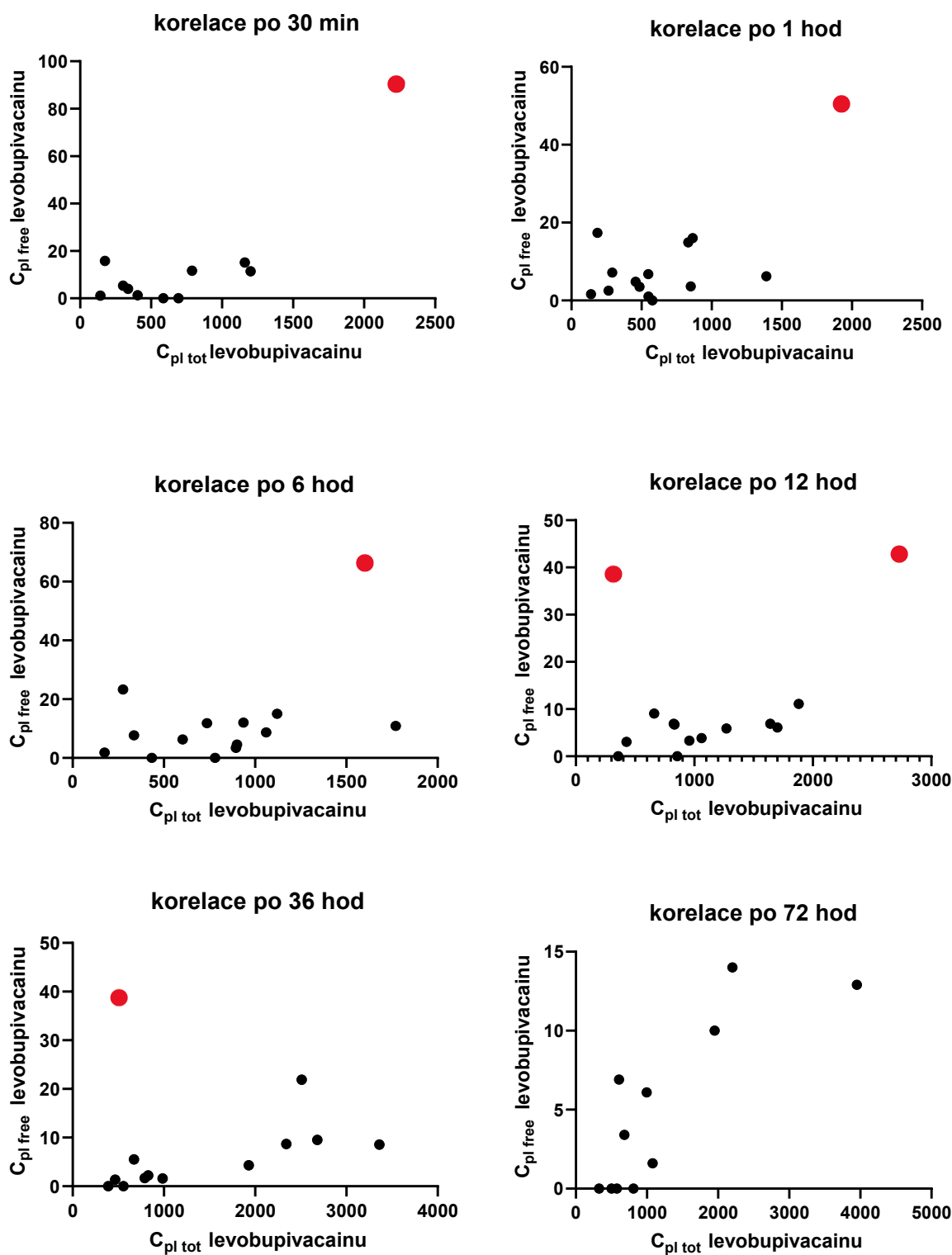
Tab. 9 Tabulka ke korelacím volného a vázaného levobupivacainu časově k plánovaným odběrům

	1. odběr 30 min		2. odběr 1 hod		3. odběr 6 hod		4. odběr 12 hod		5. odběr 36 hod		6. odběr 72 hod		7. odběr 144 hod	
	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB	celkový LVB	volný LVB
Pac. 1	692	0	577	0	780	0	856	0	557	0	501	0	367	0
Pac. 2	586	0	549	1	434	0	358	0	389	0	325	0	x	0
Pac. 3	2230	91,3	1930	50,5	1600	66,4	2730	42,8	2510	21,9	2200	14		
Pac. 4	1200	11,4	865	16	736	11,8	833	6,73	672	5,51	606	6,9	348	0
Pac. 5	175	15,8	185	17,4	276	23,3	303	38,5	521	38,9				
Pac. 6			851	3,62	895	3,4	957	3,3	789	1,7	577	0		
Pac. 7	123	x	140	1,63	175	1,84	428	3,06	986	1,6	811	0		
Pac. 8	227	x	264	2,53	603	6,33	1060	3,87	1930	4,32	1080	1,6		
Pac. 9	405	1,32	485	3,55	900	4,58	1270	5,88	2340	8,68	995	6,1		
Pac. 10	788	11,7	832	14,9	1120	15	1880	11,1	2680	9,5	1950	10		
Pac. 11	1160	15,1	1390	6,2	1770	10,9	1700	6,1						
Pac. 12	338	3,97	548	6,76	1060	8,72	1640	6,9	3360	8,55	3950	12,9		
Pac. 13	303	5,35	291	7,15	336	7,7	660	9,05	466	1,37	682	3,4		
Pac. 14	142	1,16	458	4,82	936	12,05	826	6,9	828	2,24				

Zeleně vyznačeny hodnoty, které byly odebrány mimo plánované pořadí a přiřazeny do nejbližšího sloupce odběru (detaily v textu).

LVB – levobupivacaine

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPa



Grafy 3 Korelační grafy volného a celkového levobupivacainu v časech plánovaných odběrů po spuštění c-CELA

$C_{pl\ free}$ levobupivacainu – plazmatická koncentrace volného levobupivacainu v ng/ml, $C_{pl\ tot}$ levobupivacainu – plazmatická koncentrace celkového levobupivacainu v ng/ml

Červeně jsou označeny odlehle hodnoty

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPad

Tab. 10 Tabulka korelací plazmatických volného a vázaného levobupivacainu časově k plánovaným odběrům dle Spearmana (modrá část tabulky) a dle Pearsona (zelená část tabulky)

Korelace volného a vázaného levobupivacainu	po 30 minutách	po 1 hodině	po 6 hodinách	po 12 hodinách	po 36 hodinách	po 72 hodinách	po 72 hodinách
Spearman r							Pearson r
r	0,369	0,2923	0,4224	0,2863	0,5695	0,8002	0,82
95% confidence interval	-0,3151 to 0,8008	-0,2980 to 0,7209	-0,1565 to 0,7853	-0,3039 to 0,7178	0,008611 to 0,8578	0,3677 to 0,9481	0,4332 to 0,9517
P value							
P (two-tailed)	0,2626	0,31	0,1331	0,3183	0,0453	0,005	0,002
P value summary	ns	ns	ns	ns	*	**	**
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Significant? (alpha = 0.05)	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes
Number of XY Pairs	11	14	14	14	13	11	11

r – korelační koeficient, ns – nesignifikantní (výsledek), * - signifikantní (výsledek), ** - velmi signifikantní (výsledek)

Zdroj: vlastní zpracování v GraphPad

5. Diskuze

Podstatným snížením objemu krevních vzorků (zde kapalinová chromatografie s tandemovou spektrometrickou detekcí) je jednou z efektivních a bezpečných metod u novorozenců (kde u dítěte s porodní váhou 2 500 g je odhadováno 250 ml krve v oběhu)²⁶⁵, jak poskytnout dostatek validních dat pro ověření bezpečnosti LA v této rizikové populaci. Tento fakt je také dobrý argument k získání informovaného souhlasu rodičů (další častý důvod k selhání klinických studií v této věkové kategorii)²⁶⁵. Nevýhodou ale je, že oproti větším krevním vzorkům není dostatek materiálu na možné opakované měření při případné chybě měření. Takto selhala jednotlivá měření u pacientů 2, 7 a 8. Zároveň pro nedostatek materiálu, chyby v měření, konfliktní data a neúplnost byli vyřazeni další 4 pacienti. Alternativní možností je odběr malého množství vzorků „sparse sampling“ a jejich následná analýza pomocí populační farmakokinetiky a modelingu. Ta umožňuje nejen výpočet farmakokinetických parametrů (a určení, zda se léčivo kumuluje) s ohledem na kovariáty (nezávislé proměnné, které ovlivňují výsledky – u novorozenců typicky PMA, PNA, váha), ale i při dané dávce (mnohdy jednorázové) predikovat další chování v organismu²⁷³. Tato metoda je však velmi komplikovaná a vyžaduje těsnou spolupráci farmakologa/statistika a klinika. Dalším podstatným problémem je, zejména u novorozenců, populační soubor dat (umožňující modeling a predikce), který často sestává ze zdravých dospělých dobrovolníků¹⁰³. Zmiňované rozdíly v metabolismu, orgánových funkcích a tím i PK mohou vést k chybnému odhadu farmakokinetických vlastností a další predikci¹⁰³. Uvedený přístup se ukazuje být současným trendem a již se objevují první studie levobupivacainu u kojenců během kontinuálního epidurálního podávání¹⁵⁶ a jednorázového spinálního podávání u novorozenců (i jedné studie s kaudálním či spinálním „rescue“ blokem v případě podezření na neúčinnost)^{160,161}. U poslední zmíněné studie byl pak převzat populační model z 1 studie (23 novorozenců a kojenců, PNA 3-14 týdnů, 2 – 5,5kg)^{160,180}.

Proto tato provedená experimentální studie (klinická studie LEVON) s přímým měřením koncentrací má svůj přínos k detekci kumulace a měření farmakokinetických vlastností, ale i pro poskytnutí dalších dat k modelování u podobných studií.

Farmakokinetická populační analýza a modelování by již přesahovaly zamýšlený rozměr této práce, a proto nejsou uvedeny. Z této studie již ale byla publikována farmakokinetická populační analýza metodou SAEM algoritmu (Stochastic Approximation Expectation Maximization, Monolix Suite software version 2021R1 (Lixoft SAS, Antony, France)) u nedonošeného novorozence¹⁴⁴. U skupiny donošených momentálně v době přípravy disertační práce probíhala analýza s přípravou na publikaci.

5.1 Ověření klinické účinnosti a bezpečnosti

Na úspěšnou analgezií (účinnost) poukazuje nenasazení opiátů, denní snižování dávek analgosedace (především morfinu) a v některých případech i snižování rychlosti c-CELA. Zvyšování dávek, či jejich podání mimo pořadí naopak značí neúčinnost (Pacient 2 prvních 48 hodin morfin a midazolam kontinuálně a pacient 11 prvních 24 hodin 1 extra dávka opioidů, jež nebyla standardně ordinována), která může být způsobena špatným dávkováním, malpozicí či zalomením katétru, ale i snahou personálu o prohloubení analgosedace z jiných důvodů, intervencí, či bolestí v oblastech, kde c-CELA již nepůsobí (zhruba od bránice vzhůru). To samé platí i u četného podávání sedace bez analgetik (midazolam a chloral hydrát u 2 pacientů). Metodou volby je proto prospektivní randomizovaná studie, která by tuto techniku velmi dobře porovnála se systémovým podáváním opiátů (kontrolní skupina) co do efektivity a výskytu komplikací. To je vzhledem ke vzácnosti pacientů, technickým a etickým problémům jen velmi obtížně proveditelné, a představuje to tak limitaci výzkumu nejen pro tuto disertační práci.

Během používání c-CELA se u pacientů objevily 3 nezávažné komplikace (u 3 pacientů) související se zavedením a ošetřováním epidurálního katétru. 2x prosakování epidurální směsi okolo vpichu (epidurální katétr předčasně vytažen) a 1x znečištění okolí stolicí (bez nutnosti vytažení).

Příznaky neurotoxicity či kardiotoxicity zaznamenány nebyly. To odpovídá i literatuře (PRAN databáze), kde se uvádí, že nejčastější komplikace jsou spojené se zaváděním a používáním epidurálního katétru⁸³ (až 4 % – vytažení, posunutí, zalomení). Častou obtíží bývá kolonizace katétru 10–12 %²⁷⁴, ale známky infekce bývají mnohem vzácnější, cca 57:10 000 u kaudálních katétrů. Obávaný absces s nutností chirurgické intervence je pak 0,76 případů na 10 000⁸³. Přejídné projevy LAST jsou s četností 0,76:10 000 (v PRAN databázi v časovém období 2007–2015 zejména u mladších věkových kategorií – 5 ze 7 případů byli kojenci, žádný novorozenec). Riziko přejídného neurologického postižení bylo stanoveno na 2,4:10 000 blokad. Dle PRAN bylo pak jediné hlášení epidurálního hematomu u paravertebrálního bloku (bez závažných následků), u epidurálního používání u novorozenců pak nebylo hlášeno žádné⁸³. U dvou pacientů byly s odstupem od používání c-CELA identifikovány neurologické komplikace. U jednoho byly již přítomny před zavedením c-CELA, a tak nejsou asociovány s jejím používáním. U dalšího byla objevena chabá paraparéza s odstupem, kdy epidurální katétr i absces byly vyloučeny. Navzdory probíhajícímu šetření, tato komplikace není asociována s

používáním c-CELA, které se tak jeví v této věkové kategorii jako bezpečné s nízkým výskytem komplikací.

5.2 Hodnocení farmakokinetiky plazmatických koncentrací celkového a volného levobupivacainu

Dle vypočítaných mediánů byl vzestup plazmatických koncentrací volného levobupivacainu do 6. hodiny a pak následoval jejich pokles. Volná frakce dosahuje rovnováhy velmi brzy, ačkoli celková koncentrace může nadále růst (viz níže). To vše bývá připisováno vysoké hepatální extrakci^{117,119} a pravděpodobně rostoucí koncentraci AAG (jako proteinu akutní fáze)^{129-133,135}. Ačkoli je zde vyšší variabilita koncentrací, všechna měření volného levobupivacainu byla zřetelně pod uváděnou hranicí toxicity (130–300 ng/ml)^{231,232}. U pacienta 3 byla naměřena nejvyšší hodnota 91 ng/ml po 30 minutách po spuštění c-CELA následovaná poklesem hodnot na 51, 66, 43, 22 a 14 ng/ml (po 1., 6., 24., 36. a 72. hodině od zahájení epidurální infuze). Při bližším zkoumání nebyly objeveny zjevné příčiny. Bolusová dávka c-CELA byla 1,15mg/kg a udržovací dávka následně 0,22 mg/kg/h. Z komorbidit měl pacient respiratory distress syndrome. První zjištěný albumin byl sice nízký, ale byl změřený více než tři týdny po zavedení c-CELA (28,8 g/L).

To vše poukazuje na to, že zde ke kumulaci volné frakce nedochází a hladiny jsou po celou dobu bezpečné. Plazmatické koncentrace AAG, specifického proteinu s vysokou afinitou k volné frakci, kdy jeho produkce kooperativně výrazně roste, pro nízkou velikost vzorku nebyly stanoveny a jsou tak limitací této studie.

Interpretace plazmatických koncentrací celkového levobupivacainu je o poznání složitější. Ve srovnání s počátečními daty studie LEVON²⁷², kde bylo dosaženo „steady state“ (rovnováhy mezi příkonem a eliminací LA) mezi 36. a 72. hodinou, se po zařazení dalších pacientů maximální medián celkového levobupivacainu objevuje už ve 12. hodině a následně mírně klesá ve 36. a 72. hodině (významný pokles i ve 144. hodině, ale jen u dvou měření), tedy mezi 12. a 36. hodinou by docházelo ke vzniku rovnováhy. Mediány obecně byly zřetelně pod uvažovanou hladinou toxicity. Tyto výsledky je nicméně potřeba brát v úvahu s velkou opatrností. U 5 pacientů (ze 14) je pozorován rostoucí trend až do 36. hodiny a až v 72. hodině při dalším měření je vidět pokles. Tři pacienti z tohoto pohledu nemohou být hodnoceni (katétr vytažen před 72. hodinou či nebyl udělán odběr po 36. hodině). U pacienta 13 se od 12. hodiny pohybovaly koncentrace 660, 466 a 682 ng/ml (po 12. hodině, 36. hodině a 72. hodině po spuštění c-CELA). Spíše tedy ustálený stav celkového levobupivacainu vzniká mezi 12. a 72.

hodinou. Z toho je patrná velká interindividuální variabilita při poměrně malém vzorku pacientů.

U pacienta 12 byly naměřeny koncentrace v rostoucím trendu s hodnotami 3360 ng/ml a 3950 ng/ml po 36. a 63 hodinách od začátku epidurální infuze (volný levobupivacaine byl ve stejných časech 8,6 ng/ml a 12 ng/ml). V porovnání s volnou frakcí, která byla po celou dobu stabilně nízká, je zde patrný rostoucí trend celkových koncentrací, které překračují uznávanou hranici toxicity 2620 ng/ml (Bardsley et al., 1998)²³³ celkové koncentrace (a blíží se dříve uvažované konvulzivní hranici 4000 ng/ml). Ačkoli závěr, že dochází ke vzniku steady state mezi 12. (respektive 36.) a 72. hodinou nelze vyloučit, jednalo se o pacienta po excizi extraadrenální retroperitoneální neoplazie, PMA 39+0, váha 2948 g, kdy samotná operace mohla teoreticky ovlivnit krevní průtok játry nebo ledvinami a tím ovlivnit farmakokinetiku. Teoretická hormonální aktivita nádoru, která by mohla mít vliv, nebyla zmíněna. Celková doba používání c-CELA byla 63 hodin a katétr byl vytažen pro prosakování z místa vpichu. Další komplikace včetně toxických příznaků nebyly hlášeny. Ve follow-upu s odstupem bylo dítě označeno za prospívající, bez komplikací. V laboratoři den před spuštěním c-CELA a následně den po ukončení byly albumin 33,8 g/l a 28,8 g/l, hemoglobin 203 g/l a 160 g/l, AST 0,5 μ kat/l a 0,45 μ kat/l, ALT 0,89 μ kat/l a 1,04 μ kat/l, kreatinin 44 μ mol/l a 49 μ mol/l. Asociace jeho současných onemocnění (bikavální aortální chlopeň, gastroezofageální reflux, *foramen ovale apertum*) s případnou kumulací LA není známa. Bližším zkoumáním byla indentifikována mírná deviace dávkování od protokolu studie. Iničiální bolus levobupivacainu byl 1,32 mg/kg a rychlost c-CELA byla 0,247 mg/kg/hod (na 27 hod), která byla postupně snížena na 0,206 mg/kg/hod (na 9 hod), 0,165 mg/kg/hod (na 12 hod), 0,124 mg/kg/hod (na 12 hod) a 0,08 mg/kg/hod. Ačkoli zpočátku bylo dávkování vyšší, v 36. hodině bylo vše sníženo podle protokolu a pak dále snižováno. To by spíše podporovalo vyšší hladiny na začátku používání než pozdní kumulaci. Další faktory již nebyly zjištěny.

Další dva pacienti překročili výše zmíněnou hranici toxicity 2620 ng/ml bez známek kumulace a bez jakýchkoli příznaků LAST. V případě uznávání toxické hranice celkové koncentrace bupivacainu, 2250 ng/ml (taktéž Bardsley et al., 1998)²³³, byl překročen práh u dalšího pacienta. Celkově tedy 3-4 pacienti (ze 14) překročili teoreticky uvažovanou bezpečnou mez celkové koncentrace levobupivacainu (bupivacainu) bez jakýchkoli projevů toxicity. Vysvětlení se nabízejí různá. I v případě efektivní c-CELA je někdy používána aditivní analgesedace (midazolam, opioidy, chloralhydrát), která mohla potlačovat viditelné příznaky LAST. Zároveň nespolečné pacienta velmi ztěžuje hodnocení příznaků toxicity, které tak mohou být přisouzeny jiným projevům diskomfortu včetně bolesti. To platí i obráceně.

Komplikovanost hodnocení ilustruje Luz et al. (1998)²⁴⁰, jenž hlásí známky mírné neurotoxicity u 4 kojenců (PNA 3,1–4,3 měsíců, 5,9–7,2 kg) během kontinuálního epidurálního podávání bupivacainu (bolus 1,25 mg/kg, rychlost infuze zpočátku 0,63 mg/kg/hod, po 8 hod sníženo na 0,31 mg/kg/hod) při velmi nízkých koncentracích celkového plazmatického bupivacainu 460–620 ng/ml i volného bupivacainu 17,9–21,6 ng/ml. Známky LAST byly popsány jako nervozita, neklid, třes (jittery). Zajímavé je, že ve stejné skupině dva novorozenci (PNA 6 dní, 2,8–3,3 kg) měli mnohem vyšší koncentrace celkového (1400–1470 ng/ml) i volného bupivacainu (68–72,5 ng/ml) bez známek LAST. Autor vysvětluje tento stav možnou analgosedací novorozenců. Analgosedace kojenců s LAST či možnost přisouzení jiné příčiny detailněji komentována nebyla. V analyzované literatuře další podobné případy při takto nízkých koncentracích nebyly nalezeny. Extrapolací z animálních studií je naznačena vyšší hranice neurotoxicity lokálních anestetik u novorozenců (menší afinita receptorů v CNS či vliv AAG)^{215,275}. U kardiotoxicity se uvažuje opačný efekt, kdy by neonatální myokard měl být ve větším riziku²⁷⁶. V praxi to u lidí nebylo ověřeno.

Z dostupné rešerše v úvodní části (viz 1.4.5 Měření plazmatických hodnot a hranice toxicity, Tab. 3, Tab. 4 a Tab. 5) jsou hlášeny případy toxicity u dospělých při celkových koncentracích bupivacainu či levobupivacainu 800–10 000 ng/ml, u dětí pak 1200–6600 ng/ml (koncentrace při toxicitě naměřené Luzem²⁴⁰ nebyly brány v úvahu kvůli spornosti). Tato zjištění naznačují, že hranice toxicity celkového levobupivacainu/bupivacainu se nedá jednoduše hodnotit. Pravděpodobně limity toxicity dost možná ani nejde určit (i když je rozumné ji stanovovat a snažit se ji držet co nejnižší). Velikost dávky, rychlost podání (bolusu i kontinuálního), doba měření koncentrace i místo podání (epidurální, intravenózní, perineurální) jsou zevní ovlivnitelné faktory, které by se měly nutně zohlednit. Významnými vnitřními faktory pak jsou věk, velikost pacienta, hepatální a renální léze, metabolická a srdeční onemocnění, sarkopenie či hypoproteinémie¹⁴³. Všechny mají vliv nejenom na farmakokinetiku (a případnou kumulaci), ale i na velikost hranice toxicity celkového levobupivacainu/bupivacainu. Celková koncentrace se tak jeví jako méně vhodný způsob laboratorní monitorace možné toxicity ve srovnání s volnou frakcí.

5.3 Hodnocení vztahu celkového a volného levobupivacainu v plazmě

Vysoká p-hodnota (dle Spearmanovy korelace) u porovnání odběrů ve 30. minutě, 1. hodině, 6. hodině a 12. hodině nezavrhne nulovou hypotézu (plazmatický celkový a volný levobupivacain jsou nezávislé veličiny), i když korelační koeficienty ukazují slabou až střední

pozitivní závislost. Vztah volného a celkového levobupivacainu je pak prokazatelně pozitivní ve 36. hodině (p-hodnota 0,045, Spearmanův korelační koeficient 0,57) a v 72. hodině je dokonce prokázána pozitivní lineární závislost (Spearmanův korelační koeficient 0,80 s p-hodnotou 0,005, Pearsonův korelační koeficient 0,82 s p-hodnotou 0,002). I když se plně nedá říci, že všechny korelace obou koncentrací do 12. hodiny od začátku c-CELA jsou na sobě úplně nezávislá (poměrně nízký počet měření), tak ve srovnání s následnými měřeními je tato vazba sporná či velmi slabá. To může vypovídat o „kompenzačních“ mechanismech, které se mohou uplatňovat během začátku epidurálního podávání (vazba na proteiny, redistribuce, sycení tukové tkáně, eliminace ledvinami či jaterní extrakce a metabolismus). A po jejich relativním „vyčerpání“ se pak objevuje pozitivní korelace, která s časem dále sílí až do přímé lineární závislosti (kinetika nultého řádu léčiva). Tato myšlenka by vysvětlovala i možné odlehle hodnoty, kdy i krátce po spuštění c-CELA při vysokých dávkách či snížených kompenzačních mechanismech mohou být vysoké hodnoty celkového i volného levobupivacainu s pozitivní závislostí. Pro nízký výskyt těchto odlehlých hodnot, ale nejde ani vyloučit možnost, že se jedná jen o náhodu (eventuálně chybu laboratorní metody).

Jedna z popisovaných příčin nižší toxicity levobupivacainu je vyšší vazba na proteiny 97 % (95 % u racemického bupivacainu)¹¹⁹ u dospělých. Naproti tomu Frawley (2016)¹⁶¹ popisuje již variabilní vazbu na proteiny 91,4–96 % (s mediánem 93,5 %) u novorozenců a kojenců (PMA 36–55 týdnů). To by mohlo být příčinou sporné korelace volné a celkové koncentrace.

Plazmatické koncentrace celkového levobupivacainu (i bupivacainu) jsou dle literatury častěji preferovanou možností, ve srovnání s volnou koncentrací, jak popisovat farmakokinetiku s možnou kumulací, a to pro jednodušší a levnější provedení. Nicméně vysoká variabilita celkového levobupivacainu (místy v hodnotách, při kterých byly hlášeny příznaky LAST) a sporný vztah (slabý či nezávislý) s jeho volnou frakcí (nejméně prvních 12 hodin) činí z měření koncentrací celkového levobupivacainu metodu nepřesnou, minimálně v časné fázi užívání c-CELA. Měření volné koncentrace je tak vhodnější metodou hodnocení toxicity z tohoto pohledu. Hranice toxicity u novorozenců během epidurálního podávání nebyla určena (jen převzata ze starších studií bupivacainu)^{231,232}. Čas, odkdy se dá měření celkového levobupivacainu doporučit, je nejasný (střední pozitivní korelace se objevuje mezi 12.–36. hodinou a velmi silná korelace mezi 36.–72. hodinou používání c-CELA) a vyžaduje další navazující

6. Závěr

Kontinuální epidurální analgezie (z kaudálního přístupu) dle literatury i klinické praxe ukazuje, že má nadále velkou důležitost v pooperačním managementu novorozenců. Hlavním tématem této disertační práce byla její bezpečnost během dlouhodobého podávání. Na základě provedených observací, měření a statistik lze dle cílů této práce konstatovat:

1. Z klinického pohledu se c-CELA během dlouhodobého podávání jeví jako účinná a bezpečná metoda. Během podávání nebyly pozorovány žádné známky toxicity. Komplikace spojené s užíváním byly spojeny se zaváděním katétru a ošetřováním a byly nezávažné. Dlouhodobé neurologické obtíže nebyly asociovány s c-CELA, byly vrozené či spojené s těžkým stavem pacienta.
2. Laboratorně nebyla detekována kumulace. Plazmatický volný levobupivacaine po celou dobu osciloval v bezpečných hladinách a od 6. hodiny lze uvažovat o rovnovážném stavu (mediány koncentrací v poklesu). Medián plazmatických koncentrací celkového levobupivacainu naznačuje dosažení ustáleného stavu mezi 12. a 36. hodinou. Zároveň bylo měření velmi intervvariabilní, co se týče nastolení rovnovážného stavu, a velká část pacientů dosáhla poklesu koncentrací (a nastolení rovnovážného stavu) až mezi 36. a 72. hodinou. U jednoho pacienta pravděpodobně nebyla rovnováha nastolena ani po 63. hodině (při velmi nízkých koncentracích volné frakce). Variabilní byly i celkové hodnoty koncentrací, kdy u 3 pacientů byla překročena potenciálně toxická hranice celkového levobupivacainu (bez známek toxicity, při nízkých koncentracích volného levobupivacainu). Dle literatury je pak výskyt příznaků toxických účinků zaznamenán při koncentracích jak významně vyšších, tak i významně nižších, než je uvažovaná hranice toxicity celkového levobupivacainu. Interpretace výsledků koncentrací celkového levobupivacainu je tedy komplikovaná a nejednoznačná.
3. Hodnoty celkového levobupivacainu pravděpodobně nekorespondují s hodnotami volného levobupivacainu (nebo jen málo), minimálně v prvních 12 hodinách. Jejich měření se v této době nedá odhadovat volná frakce a potenciální riziko toxicity. Ve 36. hodině mezi nimi byla zjištěna střední pozitivní závislost a ve 72. hodině pak přímá lineární závislost. Ačkoli v této době lze odhadnout již trend a korelaci volné frakce, velká variabilita vazby levobupivacainu na plazmatické proteiny činí odhad případné hranice toxicity celkového levobupivacainu nepřesným. Tyto závěry vysvětlují široké rozmezí koncentrací zjištěných během toxické reakce. Měření plazmatické volného

levobupivacainu je mnohem vhodnější metodou k detekci toxicity a kumulace díky mnohem přesněji definované hranici toxicity a jednoduchosti interpretace.

7. Shrnutí

Úvod: Management bolesti novorozenců je i přes velký rozvoj v minulých letech nadále velmi komplikovaný, nejen pro obtížné hodnocení, ale zejména pro změněnou farmakokinetiku a farmakodynamiku. Kvůli obtížnému technickému i etickému provedení studií zaměřených na bezpečnost je na toto téma málo studií, a proto je u novorozenců většina léků podávána „off-label“. Kaudální kontinuální dlouhodobá epidurální analgezie (c-CELA) účinně tlumí bolest. Zároveň dokáže snižovat dávky opioidů a tím redukovat jejich nežádoucí účinky (útlum dechu, zhoršená peristaltika, sedace, pruritus, syndrom závislosti, syndrom z odnětí). Nadále přetrvávají obavy z kumulace a toxicity během dlouhodobého podávání. Epidurální analgezie u novorozenců není doporučena déle než dva dny.

Toxické příznaky způsobuje volné léčivo (nevázané na plazmatické proteiny), které se váže typicky na receptory sodno-draselných pump v srdci a CNS. Toxicita a kumulace lokálního anestetika (levobupivacainu) se určuje buď měřením celkové, nebo volné plazmatické koncentrace. Preferovanou metodou je měření celkové koncentrace levobupivacainu z důvodu jednodušší a levnější proveditelnosti. Zároveň se však hranice toxicity jeví jako velmi nejasná (oproti volné koncentraci), kdy bylo hlášeno více případů s vyšší celkovou koncentrací, než je uvažovaná toxická hranice, ale i případů s výrazně nižší koncentrací, než je uvažovaná hranice. Vztah mezi oběma koncentracemi není přesně definován. Úpravou laboratorní metody (a výrazným snížením objemu krevních vzorků) se podařilo dle schématu bezpečně změřit plazmatickou celkovou a volnou koncentraci levobupivacainu během dlouhodobého podávání.

Cíl: Určit, zda je dlouhodobé epidurální podávání u novorozenců bezpečné. Měření plazmatické volné a celkové koncentrace se zjistí, zda se léčivo kumuluje, či zda nastává vytvoření rovnováhy (steady state). V případě zpozorování toxických příznaků bude podávání přerušeno, případně zastavena celá studie. Zjištění vztahu mezi volným a celkovým levobupivacainem a určení vhodnější metody k měření kumulace a toxicity.

Materiál a metoda: Speciálně vytvořená klinická studie LEVON pro tyto účely poskytla veškerá data k 14 donošeným novorozencům. Po zavedení epidurálního armovaného katétru G20 (ArrowInt. USA, pomocí kanyly G18) z kaudálního přístupu byl iniciálně podán bolus levobupivacainu 0,25 % (1,25 mg/kg) a zahájena kontinuální epidurální infuze levobupivacainu 0,2 mg/kg/hod se sufentanilem 0,02 µg/kg/hod. Kvalita analgezie byla hodnocena pomocí porovnání denních dávek analgezie, skórovacích systémů NIPS, Comfort Neo pain scale a subjektivního odhadu ošetřovatelského personálu; s odstupem minimálně jednoho měsíce pak byl proveden follow-up. Krevní vzorky (0,2–0,5 ml) byly získány po 0,5 hod, 1 hod, 6 hod, 12

hod, 36 hod, 72 hod a 144 hod. Koncentrace volného a celkového levobupivacainu byla stanovena pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou spektrometrickou detekcí. K určení vztahu byl vypočítán korelační koeficient mezi celkovou a volnou koncentrací v každém plánovaném čase odběru (7 korelací, interval spolehlivosti 95 % při hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$).

Výsledky: Mediány celkového levobupivacainu byly 405 (123–2230), 548,5 (140–1930), 837,5 (175–1770), 906,5 (303–2730), 828 (389–3360), 811 (325–3950) a 357,5 (348–367) ng/ml v odběrovém schématu (0,5, 1, 6, 12, 36, 72 a 144 hodin po spuštění c-CELA).

Mediány volného levobupivacainu pak byly 5,4 (0–91,3), 5,5 (0–50,5), 8,2 (0–66,4), 6,4 (0–42,8), 4,3 (0–38,9), 3,4 (0–14,0) a 0,0 ng/ml dle stejného odběrového schématu. Koncentrace volného levobupivacainu byly po celou dobu nízké bez známek kumulace. Plazmatický celkový levobupivacaine se u pacientů přestal kumulovat mezi 12. a 72. hodinou po spuštění c-CELA. U tří pacientů přesáhly koncentrace celkového levobupivacainu uvažovanou bezpečnou hranici. U jednoho z nich pak koncentrace stoupaly po celou dobu užívání (63 hodin). Po celou dobu podávání c-CELA nebyly ani u jednoho pacienta pozorovány známky toxicity levobupivacainu. Komplikace byly nezávažné (spojené se zavedením a péčí o epidurální katétr).

Volný a celkový levobupivacaine spolu prvních 12 hodin sporně korelovaly (nezávisle nebo jen slabě pozitivně závisle). Pozitivně úměrný vztah byl zjištěn ve 36. hodině a přímo lineárně závislý ve 72. hodině (velmi silná závislost) od spuštění c-CELA (nebylo dostatek měření k určení vztahu ve 144. hodině).

Závěr: Dlouhodobé epidurální podávání levobupivacainu se jeví jako bezpečná a účinná technika analgezie u donošených novorozenců. Koncentrace celkového levobupivacainu byly velmi variabilní. Hranice toxicity celkového levobupivacainu (oproti volnému), i když je uvažovaná, se ve shodě s literaturou v praxi jeví jako velmi neostrá. Zpočátku podávání c-CELA volný a celkový levobupivacaine spolu korespondují jen sporně. Volný levobupivacaine se nedá odhadnout z celkového. Pozitivní závislost se objevuje mezi 12. a 36. hodinou a silná pozitivní závislost mezi 36. a 72. hodinou od spuštění c-CELA. Měření volného levobupivacainu je spolehlivější metodou, která lépe odráží rizika kumulace levobupivacainu.

8. Summary

Introduction: Despite recent advances, neonatal pain management is still challenging due to difficult pain assessment and differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clinical trials are limited due to technical and ethical restrictions, so most drugs administered in neonates are off-label. Continuous caudal epidural long-term analgesia (c-CELA) effectively provides pain relief. It also reduces opioid doses, thereby mitigating possible adverse effects (apnoea, worsened peristalsis, sedation, pruritus, withdrawal syndrome, addiction). Long-term epidural use is not recommended for longer than two days due to concerns about possible accumulation and delayed toxicity.

Toxic signs appear when the free drug (unbound to plasma proteins) binds to Na⁺/K⁺ pumps in the myocardium and central nervous system. Determination of plasma free and total levobupivacaine (a local anaesthetic) can detect accumulation with possible toxicity. Total levobupivacaine is the preferred measurement due to lower costs and a simpler procedure. However, the toxic threshold of total levobupivacaine is unclear (in comparison to free levobupivacaine). There are cases in the literature where toxic signs occurred at concentrations well above or well below this threshold. The relationship between free and total concentrations is not well described. Adjustments to the laboratory method (with substantial blood volume reduction) have enabled the safe measurement of both free and total levobupivacaine according to the schedule during long-term c-CELA.

Aims: To determine whether long-term epidural use is safe in neonates. Assessment of plasma free and total levobupivacaine will confirm or refute possible accumulation. If toxic signs are observed, c-CELA will be discontinued, and an interim analysis could potentially stop the trial (in case of accumulation). Additionally, to assess the relationship between free and total levobupivacaine concentrations and determine which method is more appropriate for detecting accumulation and toxicity.

Materials and Methods: Data from 14 full-term neonates were extracted from the clinical trial LEVON. After the insertion of an epidural catheter (G20, Arrow International, USA) using a G18 cannula from a caudal approach, a bolus of levobupivacaine 0,5% (1,25 mg/kg) was administered, followed by a continuous infusion of 0,2 mg/kg/hour with sufentanil 0,02 µg/kg/hour. The efficacy of analgesia assessment was based on total daily doses reduction of other analgesics, the personal opinions of medical staff, and pain scores (NIPS, Comfort Neo). Follow-up was conducted at least one month after c-CELA use. Blood samples (0,2-0,5 ml) were obtained at 0,5; 1; 6; 12; 36; 72; and 144 hours after the start of c-CELA. Plasma free and

total levobupivacaine concentrations were determined using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. The relationship between free and total levobupivacaine was analysed using a correlation coefficient at each scheduled blood draw (7 correlations, 95% confidence interval with a significance level of $\alpha = 0,05$).

Results: The medians of total levobupivacaine were 405 (123-2230); 548,5 (140-1930); 837,5 (175-1770); 906,5 (303-2730); 828 (389-3360); 811 (325-3950); and 357,5 (348-367) ng/ml according to the schedule (0,5; 1; 6; 12; 36; 72; and 144 hours after the start of c-CELA). The medians of free levobupivacaine were 5,4 (0-91,3); 5,5 (0-50,5); 8,2 (0-66,4); 6,4 (0-42,8); 4,3 (0-38,9); 3,4 (0-14,0); and 0,0 ng/ml according to the same schedule. Plasma concentrations of free levobupivacaine remained well below the toxic threshold without signs of accumulation. Plasma total levobupivacaine stopped increasing and reached a steady state between 12 and 72 hours after c-CELA started. In three cases, total levobupivacaine concentrations exceeded the presumed toxicity threshold. In one case, concentrations increased throughout the entire duration of epidural use (63 hours). No clinical signs of toxicity were detected during c-CELA. Complications were minor (related to the insertion and care of the epidural catheter).

The relationship between free and total levobupivacaine was questionable (independent or weakly positive) during the first 12 hours of epidural use. A moderate positive correlation was observed at 36 hours, and a very strong positive correlation (direct linear relationship) was observed at 72 hours after the start of c-CELA (there were not enough measurements to determine the relationship at 144 hours).

Conclusion: Long-term epidural administration of levobupivacaine is an effective and safe method in neonatal pain management. Concentrations of total levobupivacaine were highly variable. The toxicity threshold for total levobupivacaine (in comparison with free levobupivacaine) is clinically vague, despite a presumed threshold, as noted in the literature. At the beginning of c-CELA, total and free levobupivacaine corresponded poorly (if at all). Therefore, free levobupivacaine cannot be reliably estimated from total concentration. A positive correlation appears between 12 and 36 hours after the start of c-CELA, with a strong positive correlation between 36 and 72 hours. Measuring free concentrations of levobupivacaine is the more accurate method, better reflecting the risks of levobupivacaine accumulation and toxicity.

9. **Literatura**

- 1) Hall RW, Anand KJ. Pain management in newborns. *ClinPerinatol*. 2014 Dec;41(4):895-924. doi: 10.1016/j.clp.2014.08.010. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25459780; PMCID: PMC4254489.
- 2) Rodkey EN, Pillai Riddell R. The infancy of infant pain research: the experimental origins of infant pain denial. *J Pain*. 2013 Apr;14(4):338-50. doi: 10.1016/j.jpain.2012.12.017. PMID: 23548489.
- 3) Pernick, MS, *A calculus of suffering: Pain, professionalism, and anesthesia in nineteenth-century America*. Columbia University Press, New York, NY1985
- 4) Watson JB, Psychology as the behaviorist view sit. *PsycholRev*. 1913; 20: 158-177
- 5) BlantonMG, The behavior of the human infant in the first 30 days of life, *PsycholRev*. 1917; 24: 456-483
- 6) McGraw M. Neural maturation as exemplified in the changing reactions of infant to pin prick. *Child Development*. 1941; 12:31–42.
- 7) Peiper A, Untersuchungen über die reaktionszeit auf schmerzreiz. *Monatsschr Kinderheilkd*. 1926; 32: 136-143
- 8) Peiper A, Die hirntätigkeit des neugeborenen, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*. 1926; 29: 290-314
- 9) Peiper A, *Cerebral Function in Infancy and Childhood*, Consultants Bureau, New York, NY1961/1963, (strana 33)
- 10) Anand KJS, Brown MJ, Causon RC, Christofides ND, Bloom SR, Aynsley-Green A. Can the human neonate mount a nendocrine and metabolic response to surgery? *Journal of Pediatric Surgery*. 1985;20:41–8.
- 11) Anand KJ, Hansen DD, Hickey PR. Hormonal-metabolic stress responses in neonates undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology*. 1990;73:661–70.
- 12) Anand KJ, Sippell WG, Aynsley-Green A. Randomised trial of fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response. *Lancet*. 1987; 1:243–8.
- 13) Anand KJ, Hickey PR. Halothane-morphine compared with high-dose sufentanil for anesthesia and postoperative analgesia in neonatal cardiac surgery. *New England Journal of Medicine*. 1992;326:1–9.
- 14) Anand KJ, Sippell WG, Schofield NM, Aynsley-Green A. Does halothane anaesthesia decrease the metabolic and endocrine stress responses of newborn infants undergoing operation? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:668–72.

- 15) Quinn MW, Wild J, Dean HG, Hartley R, Rushforth JA, Puntis JW, Levene MI. Randomised double-blind controlled trial of effect of morphine on catecholamine concentrations in ventilated pre-term babies. *Lancet*. 1993 Aug 7;342(8867):324-7. doi: 10.1016/0140-6736(93)91472-x. PMID: 8101584.
- 16) Simons SH, van Dijk M, van Lingen RA, Roofthoof D, Boomsma F, van den Anker JN, Tibboel D. Randomised controlled trial evaluating effects of morphine on plasma adrenaline/noradrenaline concentrations in newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005 Jan;90(1):F36-40. doi: 10.1136/adc.2003.046425. PMID: 15613571; PMCID: PMC1721820.
- 17) Barker DP, Rutter N. Stress, severity of illness, and outcome in ventilated preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1996 Nov;75(3):F187-90. doi: 10.1136/fn.75.3.f187. PMID: 8976685; PMCID: PMC1061198.
- 18) Quinn MW, de Boer RC, Ansari N, et al. Stress response and mode of ventilation in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78:F195–8.
- 19) Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, et al. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *S dence*. 2000;289:628- 631.
- 20) Anand KJ, Coskun V, Thirivikraman KV, et al. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *PhysiolBehav*. 1999;66: 627-637.
- 21) Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1659-62. doi: 10.1126/science.277.5332.1659. PMID: 9287218.
- 22) Grunau RE, Whitfield MF, Petrie-Thomas J et al. Neonatal pain, parenting stress and interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants. *Pain*. 2009 May; 143(1-2): 138–146.
- 23) Taddio A, Katz J. The effects of early pain experience in neonates on pain responses in infancy and childhood. *PaediatrDrugs*. 2005; 7:245–57.
- 24) Evans DJ, MacGregor RJ, Dean HG, Levene MI. Neonatal catecholamine levels and neurodevelopmental outcome: a cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2001 Jan;84(1):F49-52. doi: 10.1136/fn.84.1.f49. PMID: 11124926; PMCID: PMC1721202.
- 25) Guedj R, Danan C, Daoud P, et al. Neonatal pain management is not the same during days and nights in Intensive Care Units: Analysis from the EPIPAIN Study. *British Medical Journal Open*. 2014 in press.
- 26) Lawrence J, Alcock D, McGrath P, Kay J, MacMurray SB, Dulberg C. The development of a tool to assess neonatal pain. *Neonatal Netw*. 1993;12:59–66.

- 27) Stevens B, Johnston C, Petryshen P, Taddio A. Premature Infant Pain Profile: development and initial validation. *Clinical Journal of Pain*. 1996;12:13–22.
- 28) Meesters NJ, Dilles T, van Rosmalen J, van den Bosch GE, Simons SHP, van Dijk M. COMFORTneo scale: a reliable and valid instrument to measure prolonged pain in neonates? *J Perinatol*. 2023 May;43(5):595-600. doi: 10.1038/s41372-023-01628-1. Epub 2023 Feb 6. PMID: 36746985.
- 29) Hummel P, Lawlor-Klean P, Weiss MG. Validity and reliability of the N-PASS assessment tool with acute pain. *J Perinatol*. 2010 Jul;30(7):474-8. doi: 10.1038/jp.2009.185. Epub 2009 Nov 19. PMID: 19924132.
- 30) Sharek PJ, Powers R, Koehn A, Anand KJ. Evaluation and development of potentially better practices to improve pain management of neonates. *Pediatrics*. 2006 Nov;118 Suppl 2:S78-86. doi: 10.1542/peds.2006-0913D. PMID: 17079627.
- 31) Holsti L, Grunau RE, Shany E. Assessing pain in preterm infants in the neonatal intensive care unit: moving to a 'brain-oriented' approach. *Pain Manag*. 2011 Mar 1;1(2):171-179. doi: 10.2217/pmt.10.19. PMID: 21874145; PMCID: PMC3161414.
- 32) Walas W, Latka-Grot J, Szczapa T, Maroszyńska I, Rutkowska M, Bartkowska-Śniatkowska A, Piotrowski A. Usefulness of two types of pain monitors in newborns treated in NICU, in the opinion of experts: Results of the survey. *J Mother Child*. 2022 Apr 1;25(2):72-76. doi: 10.34763/jmotherandchild.20212502.d-21-00018. PMID: 34842396; PMCID: PMC8976587.
- 33) Karlsson V, Heinemann AB, Sjors G, Nykvist KH, Agren J. Early skin-to-skin care in extremely preterm infants: thermal balance and care environment. *Journal of Pediatrics*. 2012;161:422–6.
- 34) Mitchell AJ, Yates C, Williams K, Hall RW. Effects of daily kangaroo care on cardiorespiratory parameters in preterm infants. *J Neonatal Perinatal Med*. 2013;6(3):243-9. doi: 10.3233/NPM-1370513. PMID: 24246597; PMCID: PMC4148008.
- 35) Liaw JJ, Zeng WP, Yang L, Yuh YS, Yin T, Yang MH. Nonnutritive sucking and oral sucrose relieve neonatal pain during intramuscular injection of hepatitis vaccine. *J Pain Symptom Manage*. 2011 Dec;42(6):918-30. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2011.02.016. Epub 2011 May 26. PMID: 21620644.
- 36) Bueno M, Yamada J, Harrison D, Khan S, Ohlsson A, Adams-Webber T, Beyene J, Stevens B. A systematic review and meta-analyses of nonsucrose sweet solutions for pain relief in neonates. *Pain Res Manag*. 2013 May-Jun;18(3):153-61. doi: 10.1155/2013/956549. PMID: 23748256; PMCID: PMC3673933.

- 37) Stevens B, Yamada J, Ohlsson A, Haliburton S, Shorkey A. Sucrose for analgesia in newborn infants undergoing painful procedures. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Jul 16;7(7):CD001069. doi: 10.1002/14651858.CD001069.pub5. PMID: 27420164; PMCID: PMC6457867.
- 38) Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Preterm infant massage therapy research: a review. *Infant Behav Dev.* 2010 Apr;33(2):115-24. doi: 10.1016/j.infbeh.2009.12.004. PMID: 20137814; PMCID: PMC2844909.
- 39) Procianoy RS, Mendes EW, Silveira RC. Massage therapy improves neurodevelopment outcome at two years corrected age for very low birth weight infants. *Early Hum Dev.* 2010 Jan;86(1):7-11. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2009.12.001. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20022717.
- 40) Nevin DG, Shung J. Intravenous paracetamol overdose in a preterm infant during anesthesia. *Paediatr Anaesth.* 2010 Jan;20(1):105-7. doi: 10.1111/j.1460-9592.2009.03210.x. PMID: 20078803.
- 41) Mosca F, Bray M, Lattanzio M, Fumagalli M, Tosetto C. Comparative evaluation of the effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral perfusion and oxygenation in preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr.* 1997 Oct;131(4):549-54. doi: 10.1016/s0022-3476(97)70060-x. PMID: 9386657.
- 42) Van Overmeire B, Smets K, Lecoutere D, Van de Broek H, Weyler J, Degroote K, Langhendries JP. A comparison of ibuprofen and indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *N Engl J Med.* 2000 Sep 7;343(10):674-81. doi: 10.1056/NEJM200009073431001. PMID: 10974130.
- 43) Allegaert K, Vanhole C, de Hoon J, Guignard JP, Tibboel D, Devlieger H, Van Overmeire B. Nonselective cyclo-oxygenase inhibitors and glomerular filtration rate in preterm neonates. *Pediatr Nephrol.* 2005 Nov;20(11):1557-61. doi: 10.1007/s00467-005-1998-2. Epub 2005 Aug 16. PMID: 16133061.
- 44) Hall RW. Anesthesia and analgesia in the NICU. *Clin Perinatol.* 2012 Mar;39(1):239-54. doi: 10.1016/j.clp.2011.12.013. PMID: 22341549; PMCID: PMC3612887.
- 45) Morton NS. , Errera A., APA national audit of pediatric opioid infusions, *Ped Anesth;* 20:119–125.
- 46) Levene M. Morphine sedation in ventilated newborns: who are we treating? *Pediatrics.* 2005 Aug;116(2):492-3. doi: 10.1542/peds.2005-0441. PMID: 16061608.
- 47) Simons SH, van Dijk M, van Lingen RA, et al. Routine morphine infusion in preterm newborns who received ventilatory support: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290(18):2419–2427.

- 48) Hall RW, Kronsberg SS, Barton BA, et al. Morphine, hypotension, and adverse outcomes in preterm neonates: who's to blame? *Pediatrics*. 2005;115(5):1351–1359.
- 49) Menon G, Boyle EM, Bergqvist LL, McIntosh N, Barton BA, Anand KJ. Morphine analgesia and gastrointestinal morbidity in preterm infants: secondary results from the NEOPAIN trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008;93:F362–7.
- 50) Anand KJS., Willson DF., Berger J. et al., Tolerance and Withdrawal From Prolonged Opioid Use in Critically ill Children, *Pediatrics* 200;125 (6):1208-1225
- 51) Arnold JH, Truog RD, Orav EJ et al. Tolerance and dependence in neonates sedated with fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. *Anesthesiology* 1990;73(6):1136-1140.
- 52) Katz R, Kelly HW, Hsi A. Prospective study on the occurrence of withdrawal in critically ill children who receive fentanyl by continuous infusion. *Crit Care Med* 1994;22(5):763–767.
- 53) de Graaf J, van Lingen RA, Valkenburg AJ, Weisglas-Kuperus N, Jebbink LG, Wijnberg-Williams B, Anand KJS, Tibboel D, van Dijk M. Does neonatal morphine use affect neuropsychological outcomes at 8 to 9 years of age? *Pain*. 2013 Mar;154(3):449-458. doi: 10.1016/j.pain.2012.12.006. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23352760.
- 54) Garcia OC, Reichberg S, Brion LP, Schulman M. Topical anesthesia for line insertion in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 1997 Nov-Dec;17(6):477-80. PMID: 9447537.
- 55) Lander J, Brady-Fryer B, Metcalfe JB, Nazarali S, Muttitt S. Comparison of ring block, dorsal penile nerve block, and topical anesthesia for neonatal circumcision: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1997 Dec 24-31;278(24):2157-62. PMID: 9417009.
- 56) Brisman M, Ljung BM, Otterbom I, Larsson LE, Andréasson SE. Methaemoglobin formation after the use of EMLA cream in term neonates. *Acta Paediatr*. 1998 Nov;87(11):1191-4. doi: 10.1080/080352598750031202. PMID: 9846923.
- 57) Taddio A, Ohlsson A, Einarson TR, Stevens B, Koren G. A systematic review of lidocaine-prilocaine cream (EMLA) in the treatment of acute pain in neonates. *Pediatrics*. 1998 Feb;101(2):E1. doi: 10.1542/peds.101.2.e1. PMID: 9445511.
- 58) Taddio A, Lee CM, Parvez B, Koren G, Shah V. Contact dermatitis and bradycardia in a preterm infant given tetracaine 4% gel. *Ther Drug Monit*. 2006 Jun;28(3):291-4. doi: 10.1097/01.ftd.0000195615.92591.9c. PMID: 16778708.
- 59) Willschke H, Bosenberg A, Marhofer P, Willschke J, Schwindt J, Weintraud M, Kapral S, Kettner S. Epidural catheter placement in neonates: sonoanatomy and feasibility of

ultrasonographic guidance in term and preterm neonates. *Reg Anesth Pain Med.* 2007 Jan-Feb;32(1):34-40. doi: 10.1016/j.rapm.2006.10.008. PMID: 17196490.

60) Heydinger G, Tobias J, Veneziano G. Fundamentals and innovations in regional anaesthesia for infants and children. *Anaesthesia.* 2021 Jan;76 Suppl 1:74-88. doi: 10.1111/anae.15283. PMID: 33426659.

61) Chen CK, Teo SC, Phui VE, Saman MA. Analgesic efficacy of transversus abdominis plane block in neonates and early infants for colostomy and reversal of colostomy. *Agri.* 2015;27(4):210-4. doi: 10.5505/agri.2015.66487. PMID: 26860495.

62) Hoffmann C, Snow A, Chedid C, Abi Shadid C, Miyasaka EA. Quadratus Lumborum Block as a Cornerstone for Neonatal Intestinal Surgery Enhanced Recovery (ERAS): A Case Series. *Local Reg Anesth.* 2023 Oct 10;16:165-171. doi: 10.2147/LRA.S403567. PMID: 37841495; PMCID: PMC10576531.

63) Swenson Schalkwyk A, Flaherty J, Hess D, Horvath B. Erector spinae catheter for post-thoracotomy pain control in a premature neonate. *BMJ Case Rep.* 2020 Sep 7;13(9):e234480. doi: 10.1136/bcr-2020-234480. PMID: 32900720; PMCID: PMC7478038.

64) Gado AA, Abdalwahab A, Ali H, Alsadek WM, Ismail AA. Serratus Anterior Plane Block in Pediatric Patients Undergoing Thoracic Surgeries: A Randomized Controlled Trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2022 Aug;36(8 Pt A):2271-2277. doi: 10.1053/j.jvca.2021.09.014. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34607760.

65) Lönnqvist PA. Fascial plane blocks in children-Scientifically supported or not? *Paediatr Anaesth.* 2024 Jan;34(1):13-18. doi: 10.1111/pan.14752. Epub 2023 Aug 31. PMID: 37650686.

66) Lucente M, Ragonesi G, Sanguigni M, Sbaraglia F, Vergari A, Lamacchia R, Del Prete D, Rossi M. Erector spinae plane block in children: a narrative review. *Korean J Anesthesiol.* 2022 Dec;75(6):473-486. doi: 10.4097/kja.22279. Epub 2022 Jul 5. PMID: 35790215; PMCID: PMC9726462.

67) Bosenberg A, Flick RP. Regional anesthesia in neonates and infants. *Clin Perinatol.* 2013 Sep;40(3):525-38. doi: 10.1016/j.clp.2013.05.011. Epub 2013 Jul 12. PMID: 23972755.

68) Oberlander TF, Berde CB, Lam KH, Rappaport LA, Saul JP. Infants tolerate spinal anesthesia with minimal overall autonomic changes: analysis of heart rate variability in former premature infants undergoing hernia repair. *Anesth Analg.* 1995 Jan;80(1):20-7. doi: 10.1097/00000539-199501000-00005. PMID: 7802281.

69) Istaphanous GK, Loepke AW. General anesthetics and the developing brain. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009 Jun;22(3):368-73. doi: 10.1097/aco.0b013e3283294c9e. PMID: 19434780.

- 70) Rizzi S, Carter LB, Ori C, Jevtovic-Todorovic V. Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathol.* 2008 Apr;18(2):198-210. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00116.x. Epub 2008 Jan 29. PMID: 18241241; PMCID: PMC3886120.
- 71) Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science.* 1999 Jan 1;283(5398):70-4. doi: 10.1126/science.283.5398.70. PMID: 9872743.
- 72) Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2005 Sep;146(2):189-97. doi: 10.1038/sj.bjp.0706301. PMID: 15997239; PMCID: PMC1576258.
- 73) Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ. Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):540-9. doi: 10.1093/toxsci/kfj180. Epub 2006 Mar 31. PMID: 16581949.
- 74) Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration; 2017. Apr 27, FDA Drug Safety Communication: FDA approves label changes for use of general anesthetic and sedation drugs in young children [Internet] [cited 2018 Apr 22]. Available from <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm554634.htm>.
- 75) Davidson AJ, Disma N, de Graaff JC, Withington DE, Dorris L, Bell G, Stargatt R, Bellinger DC, Schuster T, Arnup SJ, Hardy P, Hunt RW, Takagi MJ, Giribaldi G, Hartmann PL, Salvo I, Morton NS, von Ungern Sternberg BS, Locatelli BG, Wilton N, Lynn A, Thomas JJ, Polaner D, Bagshaw O, Szmuk P, Absalom AR, Frawley G, Berde C, Ormond GD, Marmor J, McCann ME; GAS consortium. Neurodevelopmental outcome at 2 years of age after general anaesthesia and awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2016 Jan 16;387(10015):239-50. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00608-X. Epub 2015 Nov 4. Erratum in: *Lancet.* 2016 Jan 16;387(10015):228. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00054-4. PMID: 26507180; PMCID: PMC5023520.
- 76) McCann ME, de Graaff JC, Dorris L, Disma N, Withington D, Bell G, Grobler A, Stargatt R, Hunt RW, Sheppard SJ, Marmor J, Giribaldi G, Bellinger DC, Hartmann PL, Hardy P, Frawley G, Izzo F, von Ungern Sternberg BS, Lynn A, Wilton N, Mueller M, Polaner DM, Absalom AR, Szmuk P, Morton N, Berde C, Soriano S, Davidson AJ; GAS Consortium. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international, multicentre, randomised, controlled equivalence

trial. *Lancet*. 2019 Feb 16;393(10172):664-677. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32485-1. Epub 2019 Feb 14. Erratum in: *Lancet*. 2019 Aug 24;394(10199):638. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31958-0. PMID: 30782342; PMCID: PMC6500739.

77) Bösenberg, A.T., Hadley, G.P. & Wiersma, R. Oesophageal atresia: caudo-thoracic epidural anaesthesia reduces the need for post-operative ventilatory support. *Pediatr Surg Int* 7, 289–291 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF00183983>

78) Nagappa S, Kalappa S, Vijayakumar HN, Nethra HN. Comparison of the effectiveness of intravenous fentanyl versus caudal epidural in neonates undergoing tracheoesophageal fistula surgeries. *Saudi J Anaesth*. 2022 Apr-Jun;16(2):182-187. doi: 10.4103/sja.sja_847_21. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35431742; PMCID: PMC9009581.

79) Shenkman Z, Hoppenstein D, Erez I, Dolfen T, Freud E. Continuous lumbar/thoracic epidural analgesia in low-weight paediatric surgical patients: practical aspects and pitfalls. *Pediatr Surg Int*. 2009 Jul;25(7):623-34. doi: 10.1007/s00383-009-2386-y. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19499233.

80) Hoehn T, Jetzek-Zader M, Blohm M, Mayatepek E. Early peristalsis following epidural analgesia during abdominal surgery in an extremely low birth weight infant. *Paediatr Anaesth*. 2007 Feb;17(2):176-9. doi: 10.1111/j.1460-9592.2006.02038.x. PMID: 17238891.

81) Gerber AC, Weiss M. Awake spinal or caudal anaesthesia in preterms for herniotomies: what is the evidence based benefit compared with general anaesthesia? *Curr Opin Anaesthesiol*. 2003 Jun;16(3):315-20. doi: 10.1097/00001503-200306000-00012. PMID: 17021477.

82) Udassin R, Eimerl D, Schiffman J, Haskel Y. Epidural anesthesia accelerates the recovery of postischemic bowel motility in the rat. *Anesthesiology*. 1994 Apr;80(4):832-6. doi: 10.1097/00000542-199404000-00016. PMID: 8024138.

83) agarwal

84) Breschan C, Krumpholz R, Jost R, Likar R. Intraspinial haematoma following lumbar epidural anaesthesia in a neonate. *Paediatr Anaesth*. 2001 Jan;11(1):105-8. doi: 10.1046/j.1460-9592.2001.00593.x. PMID: 11123741.

85) Meyer MJ, Krane EJ, Goldschneider KR, Klein NJ. Case report: neurological complications associated with epidural analgesia in children: a report of 4 cases of ambiguous etiologies. *Anesth Analg*. 2012 Dec;115(6):1365-70. doi: 10.1213/ANE.0b013e31826918b6. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23144440.

86) Bösenberg AT, Jöhr M, Wolf AR. Pro con debate: the use of regional vs systemic analgesia for neonatal surgery. *Paediatr Anaesth*. 2011 Dec;21(12):1247-58. doi: 10.1111/j.1460-9592.2011.03638.x. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21722227.

- 87) Moriarty A. Pediatric epidural analgesia (PEA). *Paediatr Anaesth*. 2012 Jan;22(1):51-5. doi: 10.1111/j.1460-9592.2011.03731.x. PMID: 22128779.
- 88) Ivani G, Suresh S, Ecoffey C, Bosenberg A, Lonnqvist PA, Krane E, Veyckemans F, Polaner DM, Van de Velde M, Neal JM. The European Society of Regional Anaesthesia and Pain Therapy and the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine Joint Committee Practice Advisory on Controversial Topics in Pediatric Regional Anesthesia. *Reg Anesth Pain Med*. 2015 Sep-Oct;40(5):526-32. doi: 10.1097/AAP.0000000000000280. PMID: 26192549.
- 89) Campbell MF. Caudal anesthesia in children. *J Urol*. 1933;30:245–50.
- 90) RUSTON FG. Epidural anaesthesia in pediatric surgery. *Anesth Analg*. 1957 May-Jun;36(3):76-82. PMID: 13425043.
- 91) RUSTON FG. Epidural anaesthesia in pediatric surgery. *Anesth Analg*. 1957 May-Jun;36(3):76-82. PMID: 13425043.
- 92) RUSTON FG. EPIDURAL ANAESTHESIA IN PAEDIATRIC SURGERY: PRESENT STATUS IN THE HAMILTON GENERAL HOSPITAL. *Can Anaesth Soc J*. 1964 Jan;11:12-34. doi: 10.1007/BF03002129. PMID: 14099688.
- 93) Ecoffey C, Dubousset AM, Samii K. Lumbar and thoracic epidural anesthesia for urologic and upper abdominal surgery in infants and children. *Anesthesiology*. 1986 Jul;65(1):87-90. doi: 10.1097/00000542-198607000-00017. PMID: 3729065.
- 94) Murat I, Delleur MM, Esteve C, Egu JF, Raynaud P, Saint-Maurice C. Continuous extradural anaesthesia in children. Clinical and haemodynamic implications. *Br J Anaesth*. 1987 Nov;59(11):1441-50. doi: 10.1093/bja/59.11.1441. PMID: 3689618.
- 95) Bösenberg AT, Bland BA, Schulte-Steinberg O, Downing JW. Thoracic epidural anesthesia via caudal route in infants. *Anesthesiology*. 1988 Aug;69(2):265-9. doi: 10.1097/00000542-198808000-00020. PMID: 3407976.
- 96) Chawathe MS, Jones RM, Gildersleve CD, Harrison SK, Morris SJ, Eickmann C. Detection of epidural catheters with ultrasound in children. *Paediatr Anaesth*. 2003 Oct;13(8):681-4. doi: 10.1046/j.1460-9592.2003.01151.x. PMID: 14535905.
- 97) Jöhr M. Regional anaesthesia in neonates, infants and children: an educational review. *Eur J Anaesthesiol*. 2015 May;32(5):289-97. doi: 10.1097/EJA.0000000000000239. PMID: 25693139.
- 98) Kil HK. Caudal and epidural blocks in infants and small children: historical perspective and ultrasound-guided approaches. *Korean J Anesthesiol*. 2018 Dec;71(6):430-439. doi: 10.4097/kja.d.18.00109. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30086609; PMCID: PMC6283718.

- 99) Šípek, J.; Mixa, V., Současný pohled na kaudální epidurální blokády u dětí a jejich komplikace. *Anest. intenziv. Med.* 2016, 27 (2), 78-86.
- 100) Lees D, Frawley G, Taghavi K, Mirjalili SA. A review of the surface and internal anatomy of the caudal canal in children. *Paediatr Anaesth.* 2014 Aug;24(8):799-805. doi: 10.1111/pan.12392. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24666890.
- 101) Lundblad M, Forestier J, Marhofer D, Eksborg S, Winberg P, Lönnqvist PA. Reduction of cerebral mean blood flow velocity and oxygenation after high-volume (1.5 ml kg⁻¹) caudal block in infants. *Br J Anaesth.* 2014 Oct;113(4):688-94. doi: 10.1093/bja/aeu161. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24972788.
- 102) Conroy S, McIntyre J. The use of unlicensed and off-label medicines in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2005 Apr;10(2):115-22. doi: 10.1016/j.siny.2004.11.003. Epub 2005 Jan 25. PMID: 15701577.
- 103) O'Hara K, Wright IM, Schneider JJ, Jones AL, Martin JH. Pharmacokinetics in neonatal prescribing: evidence base, paradigms and the future. *Br J Clin Pharmacol.* 2015 Dec;80(6):1281-8. doi: 10.1111/bcp.12741. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26256466; PMCID: PMC4693494.
- 104) Tayman C, Rayyan M, Allegaert K. Neonatal pharmacology: extensive interindividual variability despite limited size. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2011;16(3):170–184. doi: 10.5863/1551-6776-16.3.170.
- 105) Smits A, Annaert P, Allegaert K. Drug disposition and clinical practice in neonates: cross talk between developmental physiology and pharmacology. *Int J Pharm.* 2013;452(1–2):8–13. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.035.
- 106) Notarianni LJ. Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin Pharmacokinet.* 1990 Jan;18(1):20-36. doi: 10.2165/00003088-199018010-00002. PMID: 2178848.
- 107) Booker PD, Taylor C, Saba G. Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery. *Br J Anaesth.* 1996 Mar;76(3):365-8. doi: 10.1093/bja/76.3.365. PMID: 8785135.
- 108) Johnson PJ. Neonatal pharmacology--pharmacokinetics. *Neonatal Netw.* 2011 Jan-Feb 1;30(1):54-61. doi: 10.1891/0730-0832.30.1.54. PMID: 21317099.
- 109) Ruggiero A, Ariano A, Triarico S, Capozza MA, Ferrara P, Attinà G. Neonatal pharmacology and clinical implications. *Drugs Context.* 2019 Oct 14;8:212608. doi: 10.7573/dic.212608. PMID: 31692800; PMCID: PMC6821278.

- 110) Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Nov;307(2):573-82. doi: 10.1124/jpet.103.054841. Epub 2003 Sep 15. PMID: 12975492.
- 111) Bouwmeester NJ, Anderson BJ, Tibboel D, Holford NH. Developmental pharmacokinetics of morphine and its metabolites in neonates, infants and young children. *Br J Anaesth.* 2004;92(2):208–217. doi: 10.1093/bja/ae042.
- 112) Bhat R, Abu-Harb M, Chari G, Gulati A. Morphine metabolism in acutely ill preterm newborn infants. *J Pediatr.* 1992 May;120(5):795-9. doi: 10.1016/s0022-3476(05)80251-3. PMID: 1578319.
- 113) Hartley R, Quinn M, Green M, Levene MI. Morphine glucuronidation in premature neonates. *Br J Clin Pharmacol.* 1993 Mar;35(3):314-7. PMID: 8471411; PMCID: PMC1381583.
- 114) Barrett DA, Barker DP, Rutter N, Pawula M, Shaw PN. Morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide pharmacokinetics in newborn infants receiving diamorphine infusions. *Br J Clin Pharmacol.* 1996 Jun;41(6):531-7. doi: 10.1046/j.1365-2125.1996.03539.x. PMID: 8799518; PMCID: PMC2042627.
- 115) Ligi I, Boubred F, Grandvuillemin I, Simeoni U. The neonatal kidney: implications for drug metabolism and elimination. *Curr Drug Metab.* 2013 Feb;14(2):174-7. PMID: 22935066.
- 116) Allegaert K, Mian P, van den Anker JN. Developmental Pharmacokinetics in Neonates: Maturational Changes and Beyond. *Curr Pharm Des.* 2017;23(38):5769-5778. doi: 10.2174/1381612823666170926121124. PMID: 28950819.
- 117) Mazoit JX, Dalens BJ. Pharmacokinetics of local anaesthetics in infants and children. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(1):17-32. doi: 10.2165/00003088-200443010-00002. PMID: 14715049.
- 118) Ekenstam BAF, Egner B & Petterson GN. N-alkyl pyrrolidine and N-alkyl piperidine carboxylic acid amines. *Acta ChemScand* 1957; 11: 1183–1190.
- 119) Heppolette CAA, Brunnen D, Bampoe S, Odor PM. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Levobupivacaine. *Clin Pharmacokinet.* 2020 Jun;59(6):715-745. doi: 10.1007/s40262-020-00868-0. PMID: 32034727.
- 120) Aps C, Reynolds F. An intradermal study of topical anesthetic and vascular effects of the isomers of bupivacaine. *Br J clin Pharmac* 1978; 6: 63-68.

- 121) Bardsley H, Gristwood R, Watson N, Nimmo W. The local anaesthetic activity of levobupivacaine does not differ from racemic bupivacaine (Marcain): first clinical evidence. *Expert OpinInvestigDrugs*. 1997;6(12):1883–5.
- 122) Aps C, Reynolds F. The effect of concentration on vasoactivity of bupivacaine and lignocaine. *Br J Anaesth*. 1976; 48: 1171-1174
- 123) Guinard JP, Carpenter RL, Morell RC. Effect of local anesthetic concentration on capillary blood flow in human skin. *RegAnesth*. 1992; 17: 317-321
- 124) Cederholm I, Evers H, Löfström JB Skin blood flow after intradermal injection of ropivacaine in various concentrations with and without epinephrine evaluated by laser Doppler flowmetry. *RegAnesth*. 1992; 17: 322-328
- 125) Newton DJ, Burke D, Khan F, et al. Skin blood flow changes in response to intradermal injection of bupivacaine and levobupivacaine, assessed by laser Doppler imaging. *RegAnesthPain Med*. 2000; 25: 626-631
- 126) Newton DJ, McLeod GA, Khan F, Belch JJ. Vasoactive characteristics of bupivacaine and levobupivacaine with and without adjuvant epinephrine in peripheral human skin. *Br J Anaesth*. 2005 May;94(5):662-7. doi: 10.1093/bja/aei095. Epub 2005 Feb 18. PMID: 15722384.
- 127) Burm AG, van der Meer AD, van Kleef JW, Zeijlmans PW, Groen K. Pharmacokinetics of the enantiomers of bupivacaine following intravenous administration of the racemate. *Br J Clin Pharmacol*. 1994 Aug;38(2):125-9. doi: 10.1111/j.1365-2125.1994.tb04335.x. PMID: 7981012; PMCID: PMC1364857.
- 128) Oda Y. Pharmacokinetics and systemic toxicity of local anesthetics in children. *J Anesth*. 2016 Aug;30(4):547-50. doi: 10.1007/s00540-016-2201-6. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27312980.
- 129) Bienvenu J, Sann L, Bienvenu F, Lahet C, Divry P, Cotte J, Bethenod M. Laser nephelometry of orosomucoid in serum of newborns: reference levels and relation to bacterial infections. *ClinicalChemistry* 1981; 27: 721–726.
- 130) Edwards DJ, Lalka D, CerraFl, Slaughter RL. Alpha1-acid glycoprotein concentration and protein binding in trauma. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1982; 31: 62–67.
- 131) Macfie AG, Magides AD, Reilly CS. Disposition of alfentanil in burns patients. *British Journal of Anaesthesia* 1992; 69: 447–450.
- 132) Chio LF, Oon CJ. Changes in serum alpha1 antitrypsin, alpha1-acid glycoprotein and beta2 glycoprotein I in patients with malignant hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1979; 43: 596–604.

- 133) Philip AGS, Hewitt JR. 1 – Acid glycoprotein in the neonate with and without infection. *Biology of the Neonate* 1983; 43: 118–124.
- 134) Anell-Olofsson M, Ahmadi S, Lönnqvist PA, Eksborg S, von Horn H, Bartocci M. Plasma concentrations of alpha-1-acid glycoprotein in preterm and term newborns: influence of mode of delivery and implications for plasma protein binding of local anaesthetics. *Br J Anaesth.* 2018 Aug;121(2):427-431. doi: 10.1016/j.bja.2018.01.034. Epub 2018 Mar 21. PMID: 30032881.
- 135) Booker PD, Taylor C, Saba G. Perioperative changes in alpha1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery. *Br J Anaesth.* 1996 Mar;76(3):365-8. doi: 10.1093/bja/76.3.365. PMID: 8785135.
- 136) Lönnqvist PA, Herngren L. Effects of pronounced haemodilution on the plasma protein binding of lidocaine. *Perfusion.* 1995;10(1):17-20. doi: 10.1177/026765919501000104. PMID: 7795308.
- 137) Jean-François Meunier, Etienne Goujard, Anne-Marie Dubousset, Kamran Samii, Jean Xavier Mazoit; Pharmacokinetics of Bupivacaine after Continuous Epidural Infusion in Infants with and without biliary atresia. *Anesthesiology* 2001; 95:87–95 doi: <https://doi.org/10.1097/00000542-200107000-00018>
- 138) Coyle DE, Denson DD, Thompson GA, Myers JA, Arthur GR, Bridenbaugh PO. The influence of lactic acid on the serum protein binding of bupivacaine: species differences. *Anesthesiology.* 1984;61:127–33.
- 139) Denson D, Coyle D, Thompson G, Myers J. Alpha1-acidglycoprotein and albumin in human serum bupivacaine binding. *ClinPharmacolTher.* 1984 Mar;35(3):409-15. doi: 10.1038/clpt.1984.51. PMID: 6697648.
- 140) Becker DE, Reed KL. Essentials of local anesthetic pharmacology. *AnesthProg.* 2006;53:98–108.
- 141) Berde CB, Strichartz GR. Local anesthetics. In: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL, editors. *Miller's Anesthesia*, 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. pp. 932–4.
- 142) Celotto AC, Restini CB, Capellini VK, Bendhack LM, Evora PR. Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol.* 2011;656:88–93.
- 143) Macfarlane AJR, Gitman M, Bornstein KJ, El-Boghdadly K, Weinberg G. Updates in our understanding of local anaesthetic systemic toxicity: a narrative review. *Anaesthesia.* 2021 Jan;76 Suppl 1:27-39. doi: 10.1111/anae.15282. PMID: 33426662.

- 144) Sipek J, Pokorna P, Sima M, Styblova J, Mixa V. Disposition of levobupivacaine during intraoperative continuous caudal epidural analgesia in a preterm neonate. *BiomedPap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub.* 2024 Mar;168(1):81-84. doi: 10.5507/bp.2023.047. Epub 2023 Nov 22. PMID: 37997373.
- 145) Costello TG, Cormack JR, Mather LE, LaFerlita B, Murphy MA, Harris K. Plasma levobupivacaine concentrations following scalp block in patients undergoing awake craniotomy. *Br J Anaesth.* 2005;94(6):848–51.
- 146) Ishida T, Sakamoto A, Tanaka H, Ide S, Ishida K, Tanaka S, et al. Transversus abdominis plane block with 0.25% levobupivacaine: a prospective, randomized, double-blinded clinical study. *J Anesth.* 2015;29(4):557–61.
- 147) Lacassie HJ, Rolle A, Cortinez LI, Solari S, Corvetto MA, Altermatt FR. Pharmacokinetics of levobupivacaine with epinephrine in transversus abdominis plane block for postoperative analgesia after Caesarean section. *Br J Anaesth.* 2018;121(2):469–75.
- 148) Corvetto MA, Echevarria GC, De La Fuente N, Mosqueira L, Solari S, Altermatt FR. Comparison of plasma concentrations of levobupivacaine with and without epinephrine for transversus abdominis plane block. *RegAnesthPain Med.* 2012;37(6):633–7.
- 149) Odor PM, Cavalier AG, Reynolds ND, Ang KS, Parrington SJ, Xu H, Johnston A, Sage FJ. Safety and Pharmacokinetics of Levobupivacaine Following Fascia Iliaca Compartment Block in Elderly Patients. *DrugsAging.* 2019 Jun;36(6):541-548. doi: 10.1007/s40266-019-00652-1. PMID: 30924096.
- 150) Pintaric TS, Kozelj G, Stanovnik L, Casati A, Hocevar M, Jankovic VN. Pharmacokinetics of levobupivacaine 0.5% after superficial or combined (deep and superficial) cervical plexus block in patients undergoing minimally invasive parathyroidectomy. *J ClinAnesth.* 2008;20(5):333–7
- 151) Crews JC, Weller RS, Moss J, James RL. Levobupivacaine for axillary brachial plexus block: a pharmacokinetic and clinical comparison in patients with normal renal function or renal disease. *AnesthAnalg.* 2002;95(1):219–23.
- 152) Chalkiadis GA, Eyres RL, Cranswick N, Taylor RH, Austin S. Pharmacokinetics of levobupivacaine 0.25% following caudal administration in children under 2 years of age. *Br J Anaesth.* 2004;92(2):218–22. <https://doi.org/10.1093/bja/aeh051>.
- 153) Jean-François Meunier, Etienne Goujard, Anne-Marie Dubousset, Kamran Samii, Jean Xavier Mazoit; Pharmacokinetics of Bupivacaine after Continuous Epidural Infusion in Infants with and without biliary atresia. *Anesthesiology* 2001; 95:87–95 doi: <https://doi.org/10.1097/00000542-200107000-00018>

- 154) Chalkiadis GA, Anderson BJ, Tay M, Bjorksten A, Kelly JJ. Pharmacokinetics of levobupivacaine after caudal epidural administration in infants less than 3 months of age. *Br J Anaesth.* 2005 Oct;95(4):524-9. doi: 10.1093/bja/aei218. Epub 2005 Aug 12. PMID: 16100236.
- 155) Simon R. W. Bricker, Richard J. Telford, Peter D. Booker; Pharmacokinetics of Bupivacaine Following Intraoperative Intercostal Nerve Block in Neonates and in Infants Aged Less than 6 Months. *Anesthesiology* 1989; 70:942–947 doi: <https://doi.org/10.1097/00000542-198906000-00010>
- 156) Vashisht R, Bendon AA, Okonkwo I, Patel D, Fullwood C, Ogungbenro K, Aarons L, Darwich AS. A study of the dosage and duration for levobupivacaine infusion by the caudal-epidural route in infants aged 3-6 months. *PaediatrAnaesth.* 2019 Feb;29(2):161-168. doi: 10.1111/pan.13548. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30447167.
- 157) Calder A, Bell GT, Andersson M, Thomson AH, Watson DG, Morton NS. Pharmacokinetic profiles of epidural bupivacaine and ropivacaine following single-shot and continuous epidural use in young infants. *PaediatrAnaesth.* 2012 May;22(5):430-7. doi: 10.1111/j.1460-9592.2011.03771.x. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22211825.
- 158) Hansen TG, Morton NS, Cullen PM, Watson DG. Plasma concentrations and pharmacokinetics of bupivacaine with and without adrenaline following caudal anaesthesia in infants. *Acta anaesthesiologica Scandinavica.* 2001;45(1):42-47. doi:10.1034/j.1399-6576.2001.450107.x
- 159) Mazoit JX, Denson DD, Samii K. Pharmacokinetics of bupivacaine following caudal anesthesia in infants. *Anesthesiology.* 1988 Mar;68(3):387-91. doi: 10.1097/00000542-198803000-00011. PMID: 3344993.
- 160) Frawley G, Cortinez LI, Anderson BJ. Prediction of levobupivacaine concentrations in neonates and infants following neuraxial rescue blocks. *PaediatrAnaesth.* 2021 Jun;31(6):655-664. doi: 10.1111/pan.14170. Epub 2021 Apr 18. PMID: 33683791.
- 161) Frawley G, Hallett B, Velkov T, Bjorksten A. Pharmacokinetics of levobupivacaine following infant spinal anesthesia. *PaediatrAnaesth.* 2016 Jun;26(6):575-81. doi: 10.1111/pan.12899. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27061607.
- 162) Weston PJ, Bouchier D. The pharmacokinetics of bupivacaine following interpleural nerve block in infants of very low birth weight. *PaediatrAnaesth.* 1995;5(4):219-22. doi: 10.1111/j.1460-9592.1995.tb00286.x. PMID: 7489450.
- 163) Cortínez LI, Fuentes R, Solari S, Ostermann P, Vega M, Muñoz HR. Pharmacokinetics of levobupivacaine (2.5 mg/kg) after caudal administration in children younger than 3 years.

AnesthAnalg. 2008 Oct;107(4):1182-4. doi: 10.1213/ane.0b013e318181bb4d. PMID: 18806025.

164) Chalkiadis GA, Eyres RL, Cranswick N, Taylor RH, Austin S. Pharmacokinetics of levobupivacaine 0.25% following caudal administration in children under 2 years of age. *Br J Anaesth*. 2004 Feb;92(2):218-22. doi: 10.1093/bja/ae051. PMID: 14722171.

165) Rothstein, Peter MD; Arthur, G. Richard PhD; Feldman, Hal S. BSc; Kopf, Gary S. MD; Covino, Benjamin G. PhD, MD. Bupivacaine for Intercostal Nerve Blocks in Children: Blood Concentrations and Pharmacokinetics. *Anesthesia & Analgesia* 65(6):p 625-632, June 1986.

166) Sinha C, Kumar A, Sharma S, Singh AK, Majumdar S, Kumar A, Sahay N, Kumar B, Bhadani UK. Ultrasound assessment of cranial spread during caudal blockade in children: Effect of different volumes of local anesthetic. *Saudi J Anaesth*. 2017 Oct-Dec;11(4):449-453. doi: 10.4103/sja.SJA_284_17. PMID: 29033727; PMCID: PMC5637423.

167) Triffterer L, Machata AM, Latzke D, Willschke H, Rebhandl W, Kimberger O, Marhofer P. Ultrasound assessment of cranial spread during caudal blockade in children: effect of the speed of injection of local anaesthetics. *Br J Anaesth*. 2012 Apr;108(4):670-4. doi: 10.1093/bja/aer502. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22315328.

168) Burm AG, Van Kleef JW, Vermeulen NP, Olthof G, Breimer DD, Spierdijk J. Pharmacokinetics of lidocaine and bupivacaine following subarachnoid administration in surgical patients: simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes. *Anesthesiology*. 1988 Oct;69(4):584-92. doi: 10.1097/00000542-198810000-00020. PMID: 3177919.

169) Yáñez JA, Remsberg CM, Sayre CL, Forrest ML, Davies NM. Flip-flop pharmacokinetics--delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. *TherDeliv*. 2011 May;2(5):643-72. doi: 10.4155/tde.11.19. PMID: 21837267; PMCID: PMC3152312.

170) Simon MJ, Veering BT, Stienstra R, van Kleef JW, Williams SG, McGuire GM, Burm AG. The systemic absorption and disposition of levobupivacaine 0.5% after epidural administration in surgical patients: a stable-isotope study. *Eur J Anaesthesiol*. 2004 Jun;21(6):460-70. doi: 10.1017/s0265021504006088. PMID: 15248626.

171) Simon MJ, Veering BT, Stienstra R, van Kleef JW, Burm AG. Effect of age on the clinical profile and systemic absorption and disposition of levobupivacaine after epidural administration. *Br J Anaesth*. 2004 Oct;93(4):512-20. doi: 10.1093/bja/ae0241. Epub 2004 Aug 20. PMID: 15321929.

- 172) Gristwood RW, Greaves JL. Levobupivacaine: a new safer long acting local anaesthetic agent. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999 Jun;8(6):861-76. doi: 10.1517/13543784.8.6.861. PMID: 15992136.
- 173) Tucker GT. Pharmacokinetics of local anaesthetics. *Br J Anaesth*. 1986 Jul;58(7):717-31. doi: 10.1093/bja/58.7.717. PMID: 3524638.
- 174) Burm AG, Vermeulen NP, van Kleef JW, de Boer AG, Spierdijk J, Breimer DD. Pharmacokinetics of lignocaine and bupivacaine in surgical patients following epidural administration. Simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes. *ClinPharmacokinet*. 1987 Sep;13(3):191-203. doi: 10.2165/00003088-198713030-00004. PMID: 3665324.
- 175) Burm AG, de Boer AG, van Kleef JW, Vermeulen NP, de Leede LG, Spierdijk J, Breimer DD. Pharmacokinetics of lidocaine and bupivacaine and stable isotope labelled analogues: a study in healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos*. 1988 Jan-Feb;9(1):85-95. doi: 10.1002/bod.2510090109. PMID: 3342287.
- 176) Veering BT, Burm AG, Vletter AA, van den Heuvel RP, Onkenhout W, Spierdijk J. The effect of age on the systemic absorption, disposition and pharmacodynamics of bupivacaine after epidural administration. *ClinPharmacokinet*. 1992 Jan;22(1):75-84. doi: 10.2165/00003088-199222010-00007. PMID: 1559309.
- 177) Denson DD, Raj PP, Saldahna F, Finnsson RA, Ritschel WA, Joyce TH 3rd, Turner JL. Continuous perineural infusion of bupivacaine for prolonged analgesia: pharmacokinetic considerations. *Int J ClinPharmacolTherToxicol*. 1983 Dec;21(12):591-7. PMID: 6668096.
- 178) Perkins FM. Pharmacokinetics of bupivacaine following prolonged administration [abstract]. *Anesthesiology* 1989; 71: 3A
- 179) Ecoffey C, Desparmet J, Maury M, Berdeaux A, Giudicelli JF, Saint-Maurice C. Bupivacaine in children: pharmacokinetics following caudal anesthesia. *Anesthesiology*. 1985 Oct;63(4):447-8. doi: 10.1097/00000542-198510000-00017. PMID: 4037406.
- 180) Chalkiadis GA, Anderson BJ. Age and size are the major covariates for prediction of levobupivacaine clearance in children. *PaediatrAnaesth*. 2006 Mar;16(3):275-82. doi: 10.1111/j.1460-9592.2005.01778.x. PMID: 16490091.
- 181) Foster RH, Markham A. Levobupivacaine: a review of its pharmacology and use as a local anaesthetic. *Drugs*. 2000 Mar;59(3):551-79. doi: 10.2165/00003495-200059030-00013. PMID: 10776835.
- 182) Palkama VJ, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of bupivacaine enantiomers in healthy volunteers. *Br J Anaesth*. 1999;83(4):659-61.

- 183) Lauprecht AE, Wenger FA, El Fadil O, Walz MK, Groeben H. Levobupivacaine plasma concentrations following major liver resection. *J Anesth*. 2011;25(3):369–75.
- 184) Mather LE, McCall P, McNicol PL. Bupivacaine enantiomer pharmacokinetics after intercostal neural blockade in liver transplantation patients. *Anesth Analg*. 1995;80(2):328–35.
- 185) Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Feb;300(2):355-60. doi: 10.1124/jpet.300.2.355. PMID: 11805191.
- 186) Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci*. 1997;61(26):2567-74. doi: 10.1016/s0024-3205(97)01011-4. PMID: 9416779.
- 187) Purdue Pharma L.P. Chirocaine (levobupivacaine injection) prescribing information. Norwalk: Purdue Pharma L.P.; 1999.
- 188) Morrison LM, Emanuelsson BM, McClure JH, Pollok AJ, McKeown DW, Brockway M, Jozwiak H, Wildsmith JA. Efficacy and kinetics of extradural ropivacaine: comparison with bupivacaine. *Br J Anaesth*. 1994 Feb;72(2):164-9. doi: 10.1093/bja/72.2.164. PMID: 8110567.
- 189) Emanuelsson BM, Zaric D, Nydahl PA, Axelsson KH. Pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine during 21 hours of continuous epidural infusion in healthy male volunteers. *Anesth Analg*. 1995 Dec;81(6):1163-8. doi: 10.1097/00000539-199512000-00008. PMID: 7486098.
- 190) Larsson BA, Lönnqvist PA, Olsson GL. Plasma concentrations of bupivacaine in neonates after continuous epidural infusion. *Anesth Analg*. 1997 Mar;84(3):501-5. doi: 10.1097/00000539-199703000-00006. PMID: 9052290.
- 191) Guay, Joanne MD, FRCPC. Methemoglobinemia Related to Local Anesthetics: A Summary of 242 Episodes. *Anesthesia & Analgesia* 108(3):p 837-845, March 2009. | DOI: 10.1213/ane.0b013e318187c4b1
- 192) Kenepf NB, Gutsche BB. Inadvertent intravascular injections during lumbar epidural anesthesia. *Anesthesiology*. 1981 Feb;54(2):172-3. PMID: 7469096.
- 193) Linsey E. Christie, John Picard, Guy L. Weinberg, Local anaesthetic systemic toxicity, *BJA Education*, Volume 15, Issue 3, June 2015, Pages 136–142, <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mku027>
- 194) Walker B.J., Long J.B., Sathyamoorthy M., Birstler J., Wolf C., Bosenberg A.T., Flack S.H., Krane E.J., Sethna N.F., Suresh S., et al. Complications in Pediatric Regional Anesthesia. *Anesthesiology*. 2018;129:721–732. doi: 10.1097/ALN.0000000000002372.

- 195) Gunter JB. Benefit and risks of local anesthetics in infants and children. *Paediatr Drugs*. 2002;4(10):649-72. doi: 10.2165/00128072-200204100-00003. PMID: 12269841.
- 196) Singaravelu Ramesh A., Boretsky K. Local Anesthetic Systemic Toxicity in Children: A Review of Recent Case Reports and Current Literature. *Reg. Anesth. Pain Med*. 2021;46:909–914. doi: 10.1136/rapm-2021-102529.
- 197) Zink, Wolfgang; Graf, Bernhard M. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Current Opinion in Anaesthesiology* 21(5):p 645-650, October 2008. | DOI: 10.1097/ACO.0b013e32830c214c
- 198) Cox B, Durieux ME, Marcus MA. Toxicity of local anaesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2003; 17:111–136.
- 199) Radwan IA, Saito S, Goto F. The neurotoxicity of local anesthetics on growing neurons: a comparative study of lidocaine, bupivacaine, mepivacaine, and ropivacaine. *Anesth Analg* 2002; 94:319–324.
- 200) Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2004; 29:333–340.
- 201) Zink W, Graf BM, Sinner B, *et al*. Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca²⁺ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity. *Anesthesiology* 2002; 97:710–716.
- 202) Zink W, Missler G, Sinner B, *et al*. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2005; 102:793–798.
- 203) Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, *et al*. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy* 2006; 22:693–699.
- 204) Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, *et al*. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy* 2006; 22:813–819.
- 205) Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med* 2007; 35:1621–1627.
- 206) Kreuz PC, Steinwachs M, Angele P. Single-dose local anesthetics exhibit a type-, dose-, and time-dependent chondrotoxic effect on chondrocytes and cartilage: a systematic review of the current literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2018 Mar;26(3):819-830. doi: 10.1007/s00167-017-4470-5. Epub 2017 Mar 13. PMID: 28289821.
- 207) Breu A, Rosenmeier K, Kujat R, Angele P, Zink W. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. *Anesth Analg*. 2013

Aug;117(2):514-22. doi: 10.1213/ANE.0b013e31829481ed. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23749443.

208) Hodson M, Gajraj R, Scott NB. A comparison of the antibacterial activity of levobupivacaine vs. bupivacaine: an in vitro study with bacteria implicated in epidural infection. *Anaesthesia*. 1999;54(7):699–702.

209) Jappinen A, Turpeinen M, Kokki H, Rasi A, Ojanen T, Pelkonen O, et al. Stability of sufentanil and levobupivacaine solutions and a mixture in a 0.9% sodium chloride infusion stored in polypropylene syringes. *Eur J Pharm Sci*. 2003;19(1):31–6.

210) Helin-Tanninen M, Lehtonen M, Naaranlahti T, Venalainen T, Pentikainen J, Laatikainen A, et al. Stability of an epidural analgesic admixture of levobupivacaine, fentanyl and epinephrine. *J Clin Pharm Ther*. 2013;38(2):104–8.

211) Pere P, Lindgren L, Vaara M. Poor antibacterial effect of ropivacaine: comparison with bupivacaine. *Anesthesiology*. 1999;91(3):884–6.

212) Guillier M, Boselli E, Bouvet L, Freney J, Renaud FN, Chassard D, et al. Levobupivacaine hydrochloride and sufentanil have no antimicrobial effect at 25 degrees C in vitro. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24(7):634–9.

213) Kopacz DJ, Allen HW. Accidental intravenous levobupivacaine. *Anesth Analg*. 1999;89(4):1027–9.

214) Gitman M, Barrington MJ. Local anesthetic systemic toxicity: a review of recent case reports and registries. *Reg Anesth Pain Med*. 2018;43(2):124–30.

215) Kohane DS, Sankar WN, Shubina M, Hu D, Rifai N, Berde CB. Sciatic nerve blockade in infant, adolescent, and adult rats: a comparison of ropivacaine with bupivacaine. *Anesthesiology*. 1998 Nov;89(5):1199-208; discussion 10A. doi: 10.1097/00000542-199811000-00021. PMID: 9822009.

216) Satas S, Johannessen SI, Hoem NO, Haaland K, Sørensen DR, Thoresen M. Lidocaine pharmacokinetics and toxicity in newborn pigs. *Anesth Analg*. 1997 Aug;85(2):306-12. doi: 10.1097/00000539-199708000-00012. PMID: 9249105.

217) Denson DD, Behbehani MM, Gregg RV. Enantiomer-specific effects of an intravenously administered arrhythmogenic dose of bupivacaine on neurons of the nucleus tractus solitarius and the cardiovascular system in the anesthetized rat. *Reg Anesth*. 1992 Nov-Dec;17(6):311-6. PMID: 1286051.

218) Huang YF, Pryor ME, Mather LE, Veering BT. Cardiovascular and central nervous system effects of intravenous levobupivacaine and bupivacaine in sheep. *Anesth Analg*. 1998 Apr;86(4):797-804. doi: 10.1097/00000539-199804000-00023. PMID: 9539605.

- 219) Clarkson CW, Hondeghem LM. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology*. 1985;62(4):396–405.
- 220) Maxwell LG, Martin LD, Yaster M. Bupivacaine-induced cardiac toxicity in neonates: successful treatment with intravenous phenytoin. *Anesthesiology*. 1994 Mar;80(3):682-6. doi: 10.1097/00000542-199403000-00028. PMID: 8141465.
- 221) Heath ML. Deaths after intravenous regional anaesthesia. *Br Med J*. 1982;285(6346):913–4.
- 222) Nouette-Gaulain K, Jose C, Capdevila X, Rossignol R. From analgesia to myopathy: when local anesthetics impair the mitochondrion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(1):14–9.
- 223) Weinberg GL, Palmer JW, VadeBoncouer TR, Zuechner MB, Edelman G, Hoppel CL. Bupivacaine inhibits acylcarnitine exchange in cardiac mitochondria. *Anesthesiology*. 2000;92(2):523–8.
- 224) Litonius E, Tarkkila P, Neuvonen PJ, Rosenberg PH. Effect of intravenous lipid emulsion on bupivacaine plasma concentration in humans. *Anaesthesia*. 2012 Jun;67(6):600-5. doi: 10.1111/j.1365-2044.2012.07056.x. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22352703.
- 225) Dureau P, Charbit B, Nicolas N, Benhamou D, Mazoit JX. Effect of Intralipid® on the Dose of Ropivacaine or Levobupivacaine Tolerated by Volunteers: A Clinical and Pharmacokinetic Study. *Anesthesiology*. 2016 Sep;125(3):474-83. doi: 10.1097/ALN.0000000000001230. PMID: 27404223.
- 226) Clark LA, Beyer J, Graudins A. An in vitro analysis of the effects of intravenous lipid emulsion on free and total local anaesthetic concentrations in human blood and plasma. *Crit Care Res Pract*. 2014;2014:236520. doi: 10.1155/2014/236520. Epub 2014 Nov 5. PMID: 25538850; PMCID: PMC4236888.
- 227) Jermolajevaite J, Razlevici I, Gurskis V, Grinkeviciute DE, Lukosiene L, Macas A. Local Anesthetic Systemic Toxicity Following Inadvertent Intravenous Levobupivacaine Infusion in Infants: A Case Report. *Medicina (Kaunas)*. 2023 May 19;59(5):981. doi: 10.3390/medicina59050981. PMID: 37241213; PMCID: PMC10221613.
- 228) Crowe AM, Mislovič B. Local anesthetic toxicity following erector spinae plane block in a neonate: A case report. *Paediatr Anaesth*. 2022 Mar;32(3):479-481. doi: 10.1111/pan.14355. Epub 2021 Dec 10. PMID: 34865271.
- 229) Reynolds F. A comparison of the potential toxicity of bupivacaine, lignocaine and mepivacaine during epidural blockade for surgery. *Br J Anaesth*. 1971 Jun;43(6):567-72. doi: 10.1093/bja/43.6.567. PMID: 5089935.

- 230) Hollmén A, Korhonen M, Ojala A. Bupivacaine in paracervical block--plasma levels and changes in maternal and foetal acid-base balance. *Br J Anaesth*. 1969 Jul;41(7):603-8. doi: 10.1093/bja/41.7.603. PMID: 5798839.
- 231) Knudsen K, Beckman Suurküla M, Blomberg S, Sjövall J, Edvardsson N. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. Infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br J Anaesth* 1997; 78 (5): 507–514.
- 232) Donald D. Denson, Jane A. Myers, Craig T. Hartrick, Charles P. Pither, Dennis E. Coyle, P. Prithvi Raj; The relationship between free bupivacaine concentration and central nervous system toxicity. *Anesthesiology* 1984;61:A211
doi: <https://doi.org/10.1097/00000542-198409001-00211>
- 233) Bardsley H, Gristwood R, Baker H, Watson N, Nimmo W. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46 (3): 245–249.
- 234) Peutrell JM, Hughes DG. A grand mal convulsion in a child in association with a continuous epidural infusion of bupivacaine. *Anaesthesia* 1995; 50 (6): 563–564.
- 235) Jorfeldt L, Löfström B, Pernow B, Persson B, Wahren J, Widman B. The effect of local anaesthetics on the central circulation and respiration in man and dog. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1968;12(4):153-69. doi: 10.1111/j.1399-6576.1968.tb00420.x. PMID: 4896937.
- 236) McCloskey JJ, Haun SE, Deshpande JK. Bupivacaine toxicity secondary to continuous caudal epidural infusion in children. *Anesthesia Analgesia* 1992; 75: 287–290.
- 237) Agarwal R, Gutlove DP, Lockhart CH. Seizures occurring in pediatric patients receiving continuous infusion of bupivacaine. *Anesth Analg*. 1992 Aug;75(2):284-6. doi: 10.1213/00000539-199208000-00023. PMID: 1632544.
- 238) Moore DC, Balfour RI, Fitzgibbons D. Convulsive arterial plasma levels of bupivacaine and the response to diazepam therapy. *Anesthesiology*. 1979 May;50(5):454-6. doi: 10.1097/00000542-197905000-00013. PMID: 453563.
- 239) LARSSON, B.A., OLSSON, G.L. and LÖNNQVIST, P.A. (1994), Plasma concentrations of bupivacaine in young infants after continuous epidural infusion. *Pediatric Anesthesia*, 4: 159-162. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.1994.tb00152.x>
- 240) Luz G, Wieser C, Innerhofer P, Frischhut B, Ulmer H, Benzer A. Free and total bupivacaine plasma concentrations after continuous epidural anaesthesia in infants and children. *Paediatr Anaesth*. 1998;8(6):473-8. doi: 10.1046/j.1460-9592.1998.00285.x. PMID: 9836211.

- 241) Bowdle TA, Freund PR, Slattery JT. Propranolol reduces bupivacaine clearance. *Anesthesiology*. 1987 Jan;66(1):36-8. doi: 10.1097/00000542-198701000-00007. PMID: 3800032.
- 242) Griffiths DP, Diamond AW, Cameron JD. Postoperative extradural analgesia following thoracic surgery: a feasibility study. *Br J Anaesth*. 1975 Jan;47(1):48-55. doi: 10.1093/bja/47.1.48. PMID: 1148075.
- 243) Dunne NM, Kox WJ. Neurological complications following the use of continuous extradural analgesia with bupivacaine. *Br J Anaesth*. 1991 May;66(5):617-9. doi: 10.1093/bja/66.5.617. PMID: 2031825.
- 244) Magora F, Stern L, Zylber-Katz E, Olshwang D, Donchin Y, Magora A. Prolonged effect of bupivacaine hydrochloride after cuff release in i.v. regional anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1980 Nov;52(11):1131-6. doi: 10.1093/bja/52.11.1131. PMID: 7426218.
- 245) Ross RA, Clarke JE, Armitage EN. Postoperative pain prevention by continuous epidural infusion. A study of the clinical effects and the plasma concentrations obtained. *Anaesthesia*. 1980 Jul 7;35(7):663-8. doi: 10.1111/j.1365-2044.1980.tb03881.x. PMID: 7435935.
- 246) Scott DB. Evaluation of the toxicity of local anaesthetic agents in man. *Br J Anaesth*. 1975 Jan;47(1):56-61. doi: 10.1093/bja/47.1.56. PMID: 1096908.
- 247) Dureau P, Charbit B, Nicolas N, Benhamou D, Mazoit JX. Effect of Intralipid® on the Dose of Ropivacaine or Levobupivacaine Tolerated by Volunteers: A Clinical and Pharmacokinetic Study. *Anesthesiology*. 2016 Sep;125(3):474-83. doi: 10.1097/ALN.0000000000001230. PMID: 27404223.
- 248) Kopacz DJ, Allen HW. Accidental intravenous levobupivacaine. *Anesth Analg*. 1999 Oct;89(4):1027-9. doi: 10.1097/00000539-199910000-00038. PMID: 10512284.
- 249) Ryan DW. Accidental intravenous injection of bupivacaine: a complication of obstetrical epidural anaesthesia. Case report. *Br J Anaesth*. 1973 Aug;45(8):907-8. doi: 10.1093/bja/45.8.907. PMID: 4753689.
- 250) Yamashiro H. Bupivacaine-induced seizure after accidental intravenous injection, a complication of epidural anesthesia. *Anesthesiology* 1977; 47: 472-473
- 251) Fagenholz PJ, Bowler GM, Carnochan FM, Walker WS. Systemic local anaesthetic toxicity from continuous thoracic paravertebral block. *Br J Anaesth*. 2012 Aug;109(2):260-2. doi: 10.1093/bja/aes126. Epub 2012 May 11. PMID: 22581806.

- 252) Güngör İ, Akbaş B, Kaya K, Çelebi H, Tamer U. Sudden developing convulsion during interscalene block: Does propofol anesthesia diminish plasma bupivacaine level? *Agri*. 2015;27(1):54-7. doi: 10.5505/agri.2015.82160. PMID: 25867875.
- 253) Hasselstrøm LJ, Mogensen T. Toxic reaction of bupivacaine at low plasma concentration. *Anesthesiology*. 1984 Jul;61(1):99-100. PMID: 6742492.
- 254) Rosenberg PH, Kalso EA, Tuominen MK, Lindén HB. Acute bupivacaine toxicity as a result of venous leakage under the tourniquet cuff during a Bier block. *Anesthesiology*. 1983 Jan;58(1):95-8. doi: 10.1097/00000542-198301000-00014. PMID: 6848022.
- 255) Moore DC, Thompson GE, Crawford RD. Long-acting local anesthetic drugs and convulsions with hypoxia and acidosis. *Anesthesiology*. 1982 Mar;56(3):230-2. doi: 10.1097/00000542-198203000-00020. PMID: 7059040.
- 256) Maxwell LG, Martin LD, Yaster M. Bupivacaine-induced cardiac toxicity in neonates: successful treatment with intravenous phenytoin. *Anesthesiology*. 1994 Mar;80(3):682-6. doi: 10.1097/00000542-199403000-00028. PMID: 8141465.
- 257) Wood CE, Goresky GV, Klassen KA, Kuwahara B, Neil SG. Complications of continuous epidural infusions for postoperative analgesia in children. *Can J Anaesth*. 1994 Jul;41(7):613-20. doi: 10.1007/BF03010002. PMID: 8087910.
- 258) Freid EB, Bailey AG, Valley RD. Electrocardiographic and hemodynamic changes associated with unintentional intravascular injection of bupivacaine with epinephrine in infants. *Anesthesiology*. 1993 Aug;79(2):394-8. doi: 10.1097/00000542-199308000-00029. PMID: 8342851.
- 259) Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GM, Bloomfield P, Lundh R. Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. *Anesth Analg*. 1989 Nov;69(5):563-9. PMID: 2679230.
- 260) Di Gregorio G, Neal JM, Rosenquist RW, Weinberg GL. Clinical presentation of local anesthetic systemic toxicity: a review of published cases, 1979 to 2009. *Reg Anesth Pain Med*. 2010 Mar-Apr;35(2):181-7. doi: 10.1097/aap.0b013e3181d2310b. PMID: 20301824.
- 261) Nasr VG, Davis JM. Anesthetic use in newborn infants: the urgent need for rigorous evaluation. *Pediatr Res*. 2015 Jul;78(1):2-6. doi: 10.1038/pr.2015.58. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25790274; PMCID: PMC4471569.
- 262) Coppini R, Simons SHP, Mugelli A, Allegaert K. Clinical research in neonates and infants: Challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 Jun;108:80-87. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.025. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27142783.

- 263) Stark A, Smith PB, Hornik CP, Zimmerman KO, Hornik CD, Pradeep S, Clark RH, Benjamin DK Jr, Laughon M, Greenberg RG. Medication Use in the Neonatal Intensive Care Unit and Changes from 2010 to 2018. *J Pediatr.* 2022 Jan;240:66-71.e4. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.08.075. Epub 2021 Sep 2. PMID: 34481808; PMCID: PMC9394450.
- 264) Riou S, Plaisant F, Maucort Boulch D, Kassai B, Claris O, Nguyen KA. Unlicensed and off-label drug use: a prospective study in French NICU. *Acta Paediatr.* 2015 May;104(5):e228-31. doi: 10.1111/apa.12924. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25669964.
- 265) Autmizguine J, Benjamin DK Jr, Smith PB, Sampson M, Ovetchkine P, Cohen-Wolkowicz M, Watt KM. Pharmacokinetic studies in infants using minimal-risk study designs. *Curr Clin Pharmacol.* 2014;9(4):350-8. doi: 10.2174/1574884709666140520153308. PMID: 24844642; PMCID: PMC4703884.
- 266) Davis JM, Turner MA. Global Collaboration to Develop New and Existing Drugs for Neonates. *JAMA Pediatr.* 2015 Oct;169(10):887-8. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.1640. PMID: 26258395.
- 267) Howie SR. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ.* 2011;89(1):46-53. doi:10.2471/BLT.10.080010
- 268) Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 2013. 37(7), 452-74.
- 269) Recommended guidelines, statements and procedures of ČSARIM in 2012 webpage: <https://www.csarim.cz/dokumenty/doporucene-postupy-a-stanoviska>
- 270) Dontukurthy S, Tobias JD. Update on Local Anesthetic Toxicity, Prevention and Treatment During Regional Anesthesia in Infants and Children. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2021;26(5):445-454. doi:10.5863/1551-6776-26.5.445
- 271) Universita Masarykova, Katedra aplikované matiky, Statistika, materiály dostupné online na stránce: <https://mathstat.econ.muni.cz/materialy/statistika>
- 272) Sipek J, Pokorna P, Sima M, Berka I, Hlozek T, Styblova J, Mixa V, Nedomova B. Plasma concentrations of levobupivacaine in neonates during caudal epidural analgesia maintained over 48 hours. *Bratisl Lek Listy.* 2023;124(2):116-120. doi: 10.4149/BLL_2023_018. PMID: 36598299.
- 273) Hlaváč J., Šíma M., Slanař O., Populační přístup ve farmakokinetické analýze, *Klin Farmakol Farm* 2023;37(3):102-107, <https://doi.org/10.36290/far.2023.018>
- 274) Hui-Bih Yuan, Zhiyi Zuo, Kwok-Woon Yu, Wan-May Lin, Hui-Chen Lee, Kwok-Han Chan; Bacterial Colonization of Epidural Catheters Used for Short-term Postoperative

Analgesia: Microbiological Examination and Risk Factor Analysis. *Anesthesiology* 2008; 108:130–137 doi: <https://doi.org/10.1097/01.anes.0000296066.79547.f3>

275) Satas S, Johannessen SI, Hoem NO, Haaland K, Sørensen DR, Thoresen M. Lidocaine pharmacokinetics and toxicity in newborn pigs. *Anesth Analg.* 1997 Aug;85(2):306-12. doi: 10.1097/00000539-199708000-00012. PMID: 9249105.

276) Simon L, Kariya N, Edouard A, Benhamou D, Mazoit JX. Effect of bupivacaine on the isolated rabbit heart: developmental aspect on ventricular conduction and contractility. *Anesthesiology.* 2004 Oct;101(4):937-44. doi: 10.1097/00000542-200410000-00019. PMID: 15448527.

10. Seznam publikací

Sipek J, Pokorna P, Sima M, Styblova J, Mixa V. Disposition of levobupivacaine during intraoperative continuous caudal epidural analgesia in a preterm neonate. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2023 Nov 22. doi: 10.5507/bp.2023.047. Epub ahead of print. PMID: 37997373. **(IF 0,7)**

Sipek J, Pokorna P, Sima M, Berka I, Hlozek T, Styblova J, Mixa V, Nedomova B. Plasma concentrations of levobupivacaine in neonates during caudal epidural analgesia maintained over 48 hours. Bratisl Lek Listy. 2023;124(2):116-120. doi: 10.4149/BLL_2023_018. PMID: 36598299. **(IF 1,5)**

Sipek J., Mixa V. Současný pohled na kaudální epidurální blokády u dětí a jejich komplikace. Anest. Intenziv. Med. 2016, 27, pps 7886 **(přehledový článek bez IF)**

MIXA, Vladimír, Ivan BERKA a Jan ŠÍPEK. Techniky epidurální analgezie u dětí nejtětlejšího věku. Postgraduální medicína. 2018, 20(5), 447-452. ISSN 1212-4184. Dostupné také z: <http://zdravi.euro.cz/archiv/postgradualni-medicina/> **(bez IF)**

Klocperk A, Bloomfield M, Parackova Z, Zentsova I, Vrabцова P, Balko J, Meseznikov G, Casas Mendez LF, Grandcourtova A, Sipek J, Tulach M, Zamecnik J, Vymazal T, Sediva A. Complex Immunometabolic Profiling Reveals the Activation of Cellular Immunity and Biliary Lesions in Patients with Severe COVID-19. J Clin Med. 2020 Sep 17;9(9):3000. doi: 10.3390/jcm9093000. PMID: 32957548; PMCID: PMC7565504. (IF 3,9)

Tomáš Vymazal a kolektiv autorů (Jan Šípek je jedním z kolektivu autorů) Naléhavé situace na operačním sále aneb Co dělat když. Nakladatel: Karolinum, Datum vydání 1.1.2018, počet stran 196 ISBN: 978-80-246-3901-7

11. Přílohy