

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

„Der Abbau von Remifentanyl im Nabelschnurblut von Frühgeborenen“
("Remifentanyl degradation in umbilical cord blood of preterm infants")

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sabine Ebenfeld
aus Köln

promoviert am 06. November 2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. B. Roth

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. S. Herzig

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med Lars Welzing

Dr. med Carsten Müller

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln (Datum)

(Unterschrift)

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. C. Müller von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagungen

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. B. Roth, der mich vom ersten bis zum letzten Schritt mehr als großartig unterstützt hat, und mir jederzeit geduldig und mit gutem Rat zur Seite stand.

Des Weiteren gilt mein Dank natürlich meinen Betreuern, Dr. Carsten Müller und Dr. Lars Welzing, die mich von der Methodenentwicklung bis zur Ergebnisauswertung, von der Fragestellung bis zum Feinschliff bei jedem Teil dieser Arbeit ebenfalls großartig unterstützt haben.

Danken möchte ich außerdem den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. Müller, Frau Simone Gonschorek und Herrn Ahmad Arbab für ihre gute Hilfe im Laboralltag.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meinen Eltern, die mir dieses Studium und damit auch das Entstehen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben und mich in absolut allen Hochs und Tiefs unterstützt haben und für mich da waren. Und er gilt meiner Schwester Melanie, für das Korrektur lesen, Fragen beantworten, motivieren, aufbauen und dafür, dass sie einfach immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Schmerzwahrnehmung bei Neugeborenen	6
1.2 Analgetische Therapieansätze in der Neonatologie	7
1.3 Erfahrungen mit Remifentanyl in der Neonatologie	7
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	8
1.5 Besondere methodische Aspekte und Ergebnisse	9
1.5.1 Analytik	9
1.5.2 Auswertung	11
1.5.3 Pharmakokinetische Methoden	13
1.5.4 Statistische Methoden	15
2. Publikationsschrift	16
3. Diskussion	25
4. Zusammenfassung	29
5. Literaturverzeichnis	30
6. Lebenslauf	35

1. Einleitung

1.1 Schmerzwahrnehmung bei Neugeborenen

Noch bis in die 1970er Jahre war die Vorstellung weit verbreitet, Neugeborene seien aufgrund des noch unreifen Cortex und der noch unzureichend myelinisierten Nervenfasern nicht in der Lage, Schmerzen wahrzunehmen. Die Meinungen zu diesem Thema haben sich in den letzten 40 Jahren stark gewandelt. Inzwischen ist es unumstritten, dass Neugeborene und selbst sehr unreife Frühgeborene, bei denen das nociceptive System noch nicht voll differenziert ist, Schmerzen wahrnehmen und empfinden [1,7,41]. Dementsprechend kann eine unzureichende Schmerztherapie bei Früh- und Neugeborenen eine Vielzahl negativer akuter und chronischer Auswirkungen haben.

Akut können Schmerzzustände bei diesen Patient/innen beispielsweise zu Veränderungen in der Herzfrequenz, Blutdruckschwankungen oder Sauerstoffsättigungsabfällen führen. Diese sind mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen wie intraventrikulären Blutungen oder einer periventrikulären Leukomalazie assoziiert [6]. Potentiell längerfristige Konsequenzen von wiederholten Schmerzen im Neugeborenenalter umfassen unter anderem die Entwicklung von Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität oder Aufmerksamkeitsdefiziten, zudem können sie eine eventuell dauerhaft gestörte Schmerzwahrnehmung verursachen [5]. Von besonderer Bedeutung sind Erkenntnisse, dass chronische Schmerzzustände bei Frühgeborenen die Hirnentwicklung beeinflussen können. So zeigt eine Studie von Als et al, dass bei Frühgeborenen, bei denen mit Hilfe von Comfort-Scores Schmerzzustände erfasst und vermieden wurden, gegenüber einer Kontrollgruppe sowohl Veränderungen in der neurologischen Entwicklung als auch in der im korrigierten Alter von zwei Wochen durchgeführten Diffusions-Tensor-Magnetresonanztomografie des Gehirns auftraten [4,5]. Neben den ethischen Aspekten der Begründung einer adäquaten Analgesie belegen die aufgeführten Komplikationen frühkindlicher Schmerzerfahrungen somit die große Bedeutung, die eine suffiziente Schmerztherapie bei Frühgeborenen hat.

1.2 Analgetische Therapieansätze in der Neonatologie

Es existieren verschiedene medikamentöse und nicht medikamentöse Methoden, die zur Schmerzbehandlung bei Frühgeborenen verwendet werden. Für häufig

wiederkehrende, schmerzhaft Prozeduren wie kapilläre oder venöse Blutentnahmen eignen sich zum Beispiel nicht pharmakologische Methoden wie nicht-nutritives Saugen ("Schnullern") oder orale Glucose-Gaben [44]. Pharmakologische Therapieansätze für leichte und mittelschwere Schmerzen umfassen die Gabe von nicht-Opioid Analgetika wie Paracetamol oder Ibuprofen [2].

Starke Schmerzreize bedingen auch in der Neonatologie die Gabe von potenten Opioiden [3]. Aufgrund ihrer potentiellen Nebenwirkungen wurde Opiode in dieser besonders vulnerablen Patient/innenengruppe allerdings lange Zeit nur sehr zögerlich eingesetzt. Heutzutage ist ihre Anwendung bei Früh- und Neugeborenen im Rahmen von schmerzhaften Eingriffen oder Operationen klinischer Standard [3]. Die am häufigsten in der Neonatologie verwendeten Opiode sind Fentanyl und Morphin. Die wesentlichen Nebenwirkungen umfassen vor allem eine Atemdepression, arterielle Hypotension, Bradykardien und eine Beeinträchtigung der Darmperistaltik [8, 9, 29]. Durch die teilweise noch unzureichend ausgebildeten Metabolisierungssysteme sind diese Nebenwirkungen bei Früh- und Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen häufig verstärkt und prolongiert [3, 8, 9, 29].

Insgesamt stellen die Opioid-Nebenwirkungen für Frühgeborene einen zusätzlichen Risikofaktor für einige typische Komplikationen der Frühgeburtlichkeit dar. Eine Atemdepression mit der Notwendigkeit einer verlängerten Beatmungszeit erhöht beispielsweise das Risiko für nosokomiale Infektionen, die Entwicklung einer Frühgeborenen-Retinopathie oder die Ausbildung einer bronchopulmonalen Dysplasie [11]. Auch für die längerfristige, psychomotorische Entwicklung scheinen prolongierte Sedierungsphasen durch das Fehlen sensorischer Eindrücke negative Auswirkungen zu haben, weshalb die Verwendung möglichst kurz wirk-samer Opiode wie Remifentanyl bei Früh- und Neugeborenen besonders erstrebenswert ist [3].

1.3 Erfahrungen mit Remifentanyl in der Neonatologie

Remifentanyl ist ein neueres Opioid und wirkt überwiegend als μ -Opioidrezeptor-Agonist der 4-Anilinopiperidin-Klasse. Durch seine spezielle Ester-Verbindung wird es als einziges Opioid-Analgetikum durch unspezifische Serum- und Gewebsesterasen abgebaut. Der Hauptmetabolit von Remifentanyl GR90291, ein

Karbonsäuremetabolit, ist am μ -Rezeptor beinahe nahezu vollständig unwirksam und wird renal ausgeschieden [19,32,52].

Die Wirksamkeit von Remifentanyl ist extrem kurz und dadurch sehr gut steuerbar. In der Literatur sind bei Erwachsenen Eliminations-Halbwertszeiten von 5-10 Min. beschrieben, wobei unter Dauerinfusion keine kumulativen Effekte auftreten [21,28,32]. Dadurch ist es als Analgetikum bei Erwachsenen sowohl bei Narkosen als auch in der Intensivmedizin schon seit einiger Zeit ein beliebtes und gängiges Opioid [43]. Auch bei Kindern wird Remifentanyl inzwischen zunehmend häufiger verwendet [40]. Die größte klinische Erfahrung mit dem Einsatz von Remifentanyl bei Neugeborenen und Kindern stammt aus der intraoperativen Anwendung, bei der sich Remifentanyl als effektiv und sicher gezeigt hat [34,51]. Zum Einsatz als Analgetikum bei längerfristig beatmeten Neu- und Frühgeborenen gibt es bislang nur wenige Daten [33,46].

Pharmakokinetische Daten zu Remifentanyl liegen sowohl für Kinder vom Säuglings- bis Schulkindalter als auch für reife Neugeborene vor, wobei Remifentanyl in diesen Altersklassen grundsätzlich ähnlich schnell metabolisiert wird wie bei Erwachsenen. Bislang gibt es allerdings keine pharmakokinetischen Daten zu Remifentanyl bei Frühgeborenen [38,51].

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Pharmakokinetische Untersuchungen sind bei Frühgeborenen unter anderem aufgrund ihrer geringen Blutvolumina aus ethischen Gründen kaum realisierbar. Da Remifentanyl allerdings unter anderem durch unspezifische Plasmaesterasen metabolisiert wird, lässt sich die Enzymaktivität auch in Nabelschnurblut bestimmen [17,26]. Durch die Verwendung von Nabelschnurblut ist es möglich auch für Frühgeborene Aussagen zur Enzymaktivität zu machen und gleichzeitig schmerzhaftes Blutentnahmen sowie Blutverluste zu vermeiden.

Das Ziel unserer Studie war zu untersuchen, wie ausgeprägt die Aktivität der unspezifischen Esterasen bei Frühgeborenen ist und ob ihre Aktivität eine Abhängigkeit vom Gestationsalter aufweist.

1.5 Besondere methodische Aspekte und Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Abbau von Remifentanyl im Serum aus Nabelschnurblut von Frühgeborenen in vitro getestet. Die Methodik und Ergebnisse dieser Arbeit werden ausführlich in dem Artikel Welzing L, Ebenfeld S, Dlugay V, Wiesen MHJ, Roth B, Mueller C (2011): Remifentanyl Degradation in Umbilical Cord Blood of Preterm Infants. Anesthesiology. 114: 570-7 (siehe Anhang) beschrieben. Einige Aspekte werden an dieser Stelle gesondert erläutert.

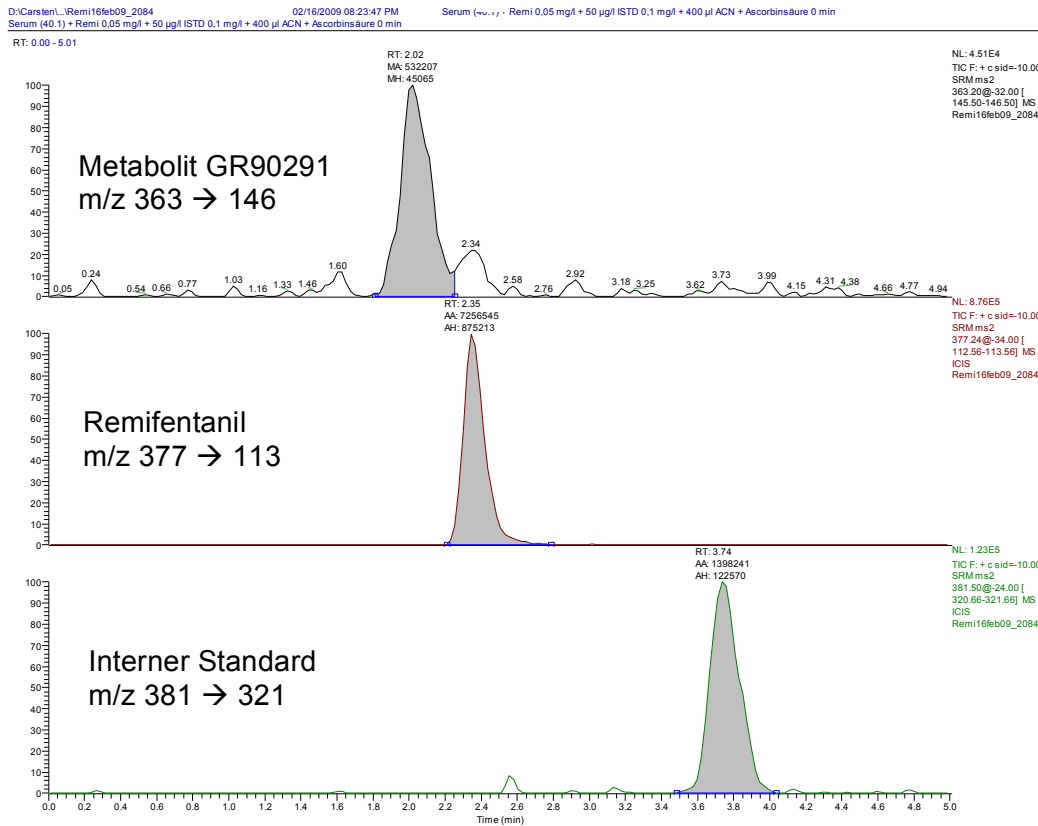
1.5.1 Analytik

Die Bestimmung von Remifentanyl und des dazugehörigen Metaboliten erfolgte mittels massenspektrometrischer instrumenteller Analytik. Die Methode wurde in geringfügig abgeänderter Form auf der Basis vorangegangener Publikationen entwickelt und validiert [12]. Nach Extraktion durch Fällung mit Acetonitril und Zugabe des internen Standards (Propionamid-Ester-Oxalat GR92559A der Firma GlaxoSmithKline) wurden mittels TSQ Quantum Massenspektrometer (Thermo-Fisher, San Jose, CA) Remifentanyl, Metabolit und interner Standard gemessen. Die Übergänge von Ausgangsion zum Produktion lagen für Remifentanyl bei m/z 377 $\rightarrow$ 113, für den Metaboliten bei m/z 363 $\rightarrow$ 146 und für den internen Standard bei m/z 381 $\rightarrow$ 321. Die untere Quantifizierungsgrenze von Remifentanyl und Metabolit lag bei 1,6 μ g/l, die untere Nachweisgrenze bei 0,32 μ g/l und eine Linearität für einen Bereich von 1,6-1000 μ g/l konnte nachgewiesen werden (vgl Publikation S. 572, siehe Anhang).

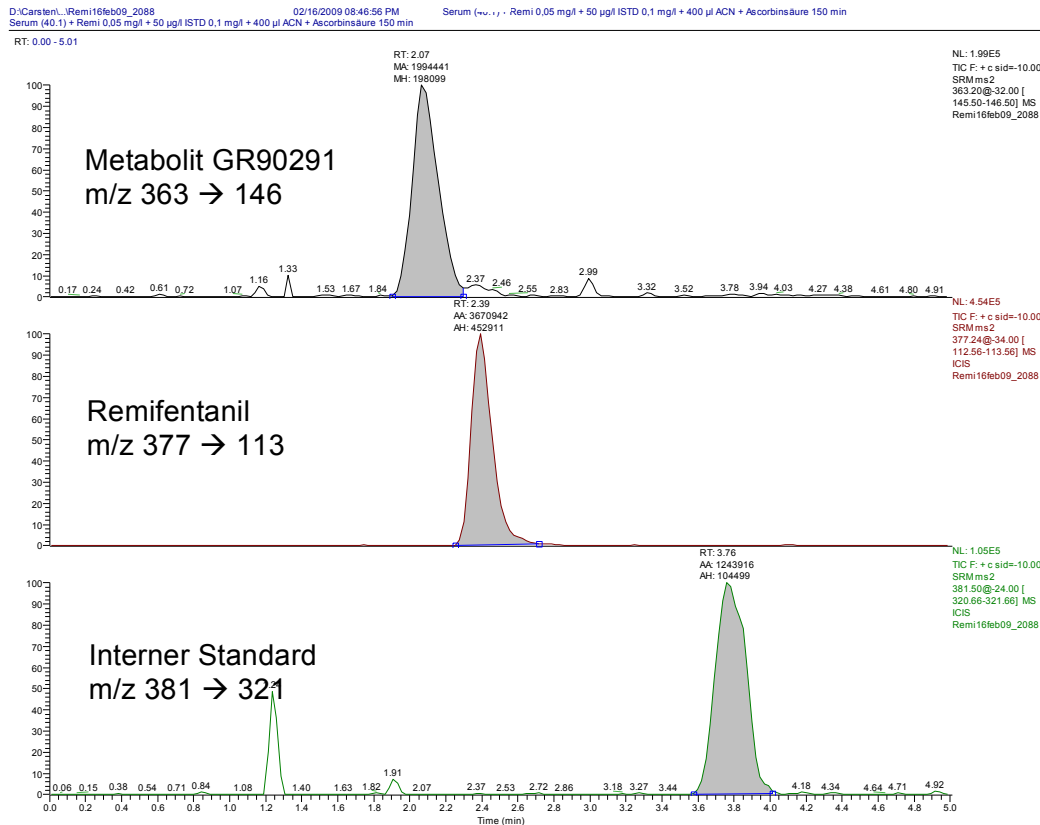
Nach Inkubation des Versuchsansatzes zeigt sich sowohl eine Zunahme des Peaks des Metaboliten als auch eine Abnahme von Remifentanyl über die Zeit als Ausdruck der Enzymaktivität (Grafik 1a und b).

Grafik 1: Beispiel-Chromatogramme

1a) gepooltes Neugeborenenserum mit Remifentanyl 50 µg/l nach 0 min



1b) gepooltes Neugeborenenserum mit Remifentanyl 50 µg/l nach 150min

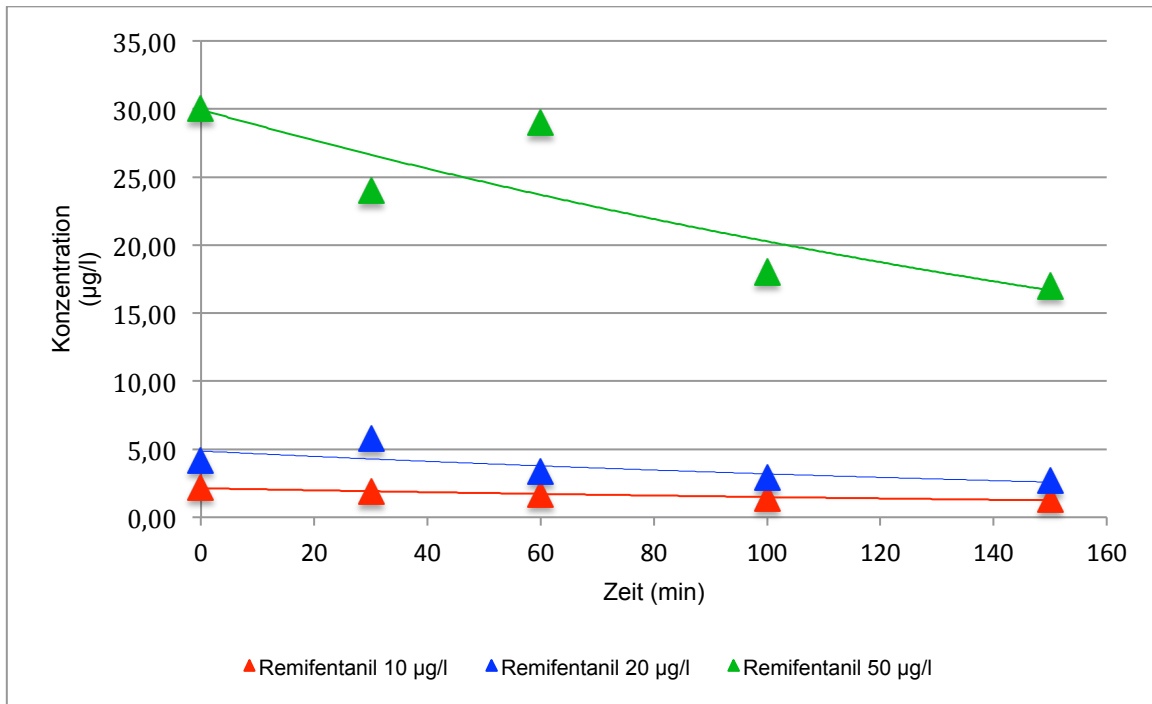


1.5.2 Auswertung

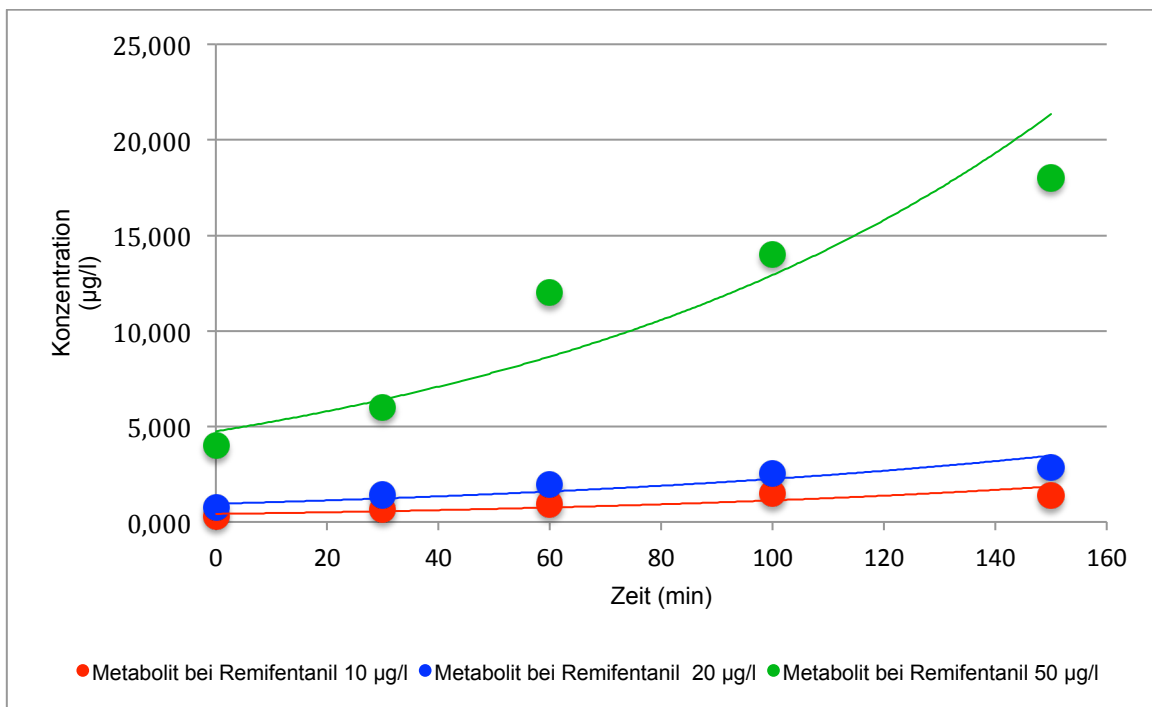
Nach Integration der Peakflächen wurden mittels interner Standardisierung Eichreihen erstellt, die der Konzentrationsberechnung von Remifentanyl und Metabolit dienten. Nach Import dieser Werte wurden dann mit Excel Konzentrations-Zeit Diagramme für Serumproben jedes Früh- und Neugeborenen individuell erstellt. In Grafik 2 ist exemplarisch die Abnahme der Remifentanyl-Konzentration und die Zunahme des Metaboliten als Ausdruck der Enzymaktivität dargestellt. Diese in vitro Analysen bildeten die Grundlage für eine differenzierte Berechnung von pharmakokinetischen Parametern (Halbwertszeit) und für eine modellabhängige Berechnung relevanter Parameter (K_m , v_{max}) auf der Basis einer Michaelis-Menten-Kinetik (vgl. Modell, Publikation S.572, siehe Anhang).

Grafik 2: Konzentrations-Zeit-Verläufe

2a) Abbau von Remifentanyl im gepoolten Neugeborenenserum (n=5) bei verschiedenen Anfangskonzentrationen von Remifentanyl



2b) Zunahme des Metaboliten im gepoolten Neugeborenenserum (n=5) bei verschiedenen Anfangskonzentrationen von Remifentanyl



1.5.3 Pharmakokinetische Methoden

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die pharmakokinetische Software TOPFIT (Thomae Optimized Fitting Programm) verwendet, ein Datenverarbeitungsprogramm zur Ermittlung pharmakokinetischer und –dynamischer Parameter, das geeignet ist, auch in vitro Modelle zu betrachten [23,48,49]. Mit diesem Programm, das ursprünglich zur Einsparung von Tierversuchen entwickelt wurde, können Berechnungen nach verschiedene Methoden durchgeführt werden. Diese umfassen nicht-kompartimentelle Modelle, Standard Kompartimentmodelle, benutzerdefinierte lineare Modelle und 24 vorgegebene nicht-lineare Modelle. Für unsere Berechnungen wurde in Topfit zunächst verwendet, um individuelle Konzentrations-Zeit-Verläufe von Remifentanyl und dem Metaboliten GR90291 im in vitro Ansatz zu betrachten. In diesem Zusammenhang wurden mit Hilfe von Topfit Degradations-Halbwertszeiten berechnet.

Ferner wurden mit Hilfe des Programms Berechnungen zur Michaelis-Menten-Kinetik durchgeführt. Dafür wurde, ausgehend von einer sättigbaren Kinetik, das im Artikel beschriebene nicht lineare Modell MM1IVM verwendet (Publikation Seite 572, siehe Anhang) [23,S 3-101]. Diesem zu Grunde liegt eine Michaelis-Menten-Kinetik charakterisiert durch folgende Differentialgleichung:

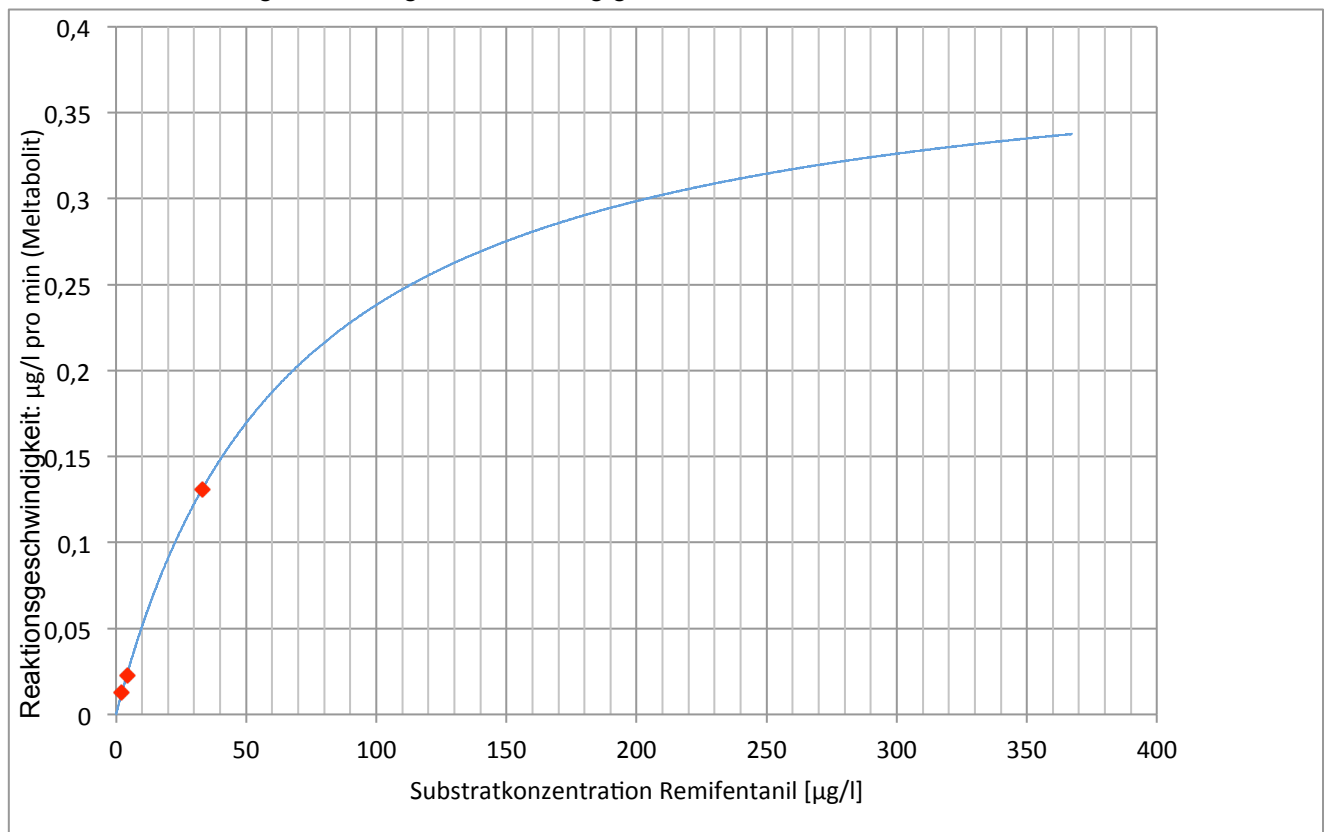
$$\frac{dc_i}{dt} = \pm V_{max} \cdot \frac{c_i}{K_M + c_i} = [AE] = [E_0] \cdot \frac{[A]}{K_m + [A]}$$

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, c_i = Konzentration des Substrats, K_m Konzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist, AE = Enzym-Substrat-Komplex (hier wurde für unsere Versuche eine konstante Konzentration angenommen, also eine Reaktion im steady state) [23].

Für eine solche Kinetik ist wichtig, dass die Substratkonzentration weder sehr weit unterhalb noch oberhalb von K_m liegt. Läge die Konzentrationen deutlich unterhalb K_m würde der Massentransfer einer Kinetik 1.Ordnung unterliegen. Läge er deutlich oberhalb würde die Reaktionsgeschwindigkeit unter Umständen aufgrund von Substrathemmung abnehmen. Dies ist hier nicht der Fall, die Substratkonzentrationen lagen zwischen 10µg/l und 50µg/l, K_m lag im Median nicht höher als 92,5 µg/l, eine Substrathemmung wurde daher ebenfalls nicht angenommen.

Aufgrund der sehr geringen Probenvolumina war es für unsere Versuche leider nicht möglich, jede einzelne Probe mit verschiedenen Substratkonzentrationen zu messen um daraus $V_{\max}$ zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde ein Vorversuch mit gepooltem Neugeborenenserum ($n=5$) durchgeführt. In diesem wurden drei verschiedenen Substratkonzentrationen verwendet (im Versuchsansatz 50 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/l}$, daraus resultieren nach Zugabe von Acetonitril und internem Standard Konzentrationen von 33,1 $\mu\text{g/l}$; 4,2 $\mu\text{g/l}$ und 2,2 $\mu\text{g/l}$) und aus den Ergebnissen durch Extrapolation der ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten näherungsweise die maximale Umsatzrate bestimmt, wobei die Bildung des Metaboliten pro Minute als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeiten verwendet wurde (Grafik 3).

Grafik 3: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration



$V_{\max}$ wurde dann für die Berechnungen der weiteren Versuchsergebnisse auf 0,4 $\mu\text{g/l pro min}$ fixiert. Mit dem Programm TOPFIT kann für jeden Versuchsablauf K_m und $V_{\max}$ individuell bestimmt werden. Hier erfolgte eine Fixation eines Parameters vor der Berechnung, dies ist in TOPFIT optional möglich [23]. Die Fixation von $V_{\max}$ erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da die Variabilität von K_m zwischen den einzelnen Altersgruppen primär als Zielgröße inte-

ressierte. Die so erhaltenen K_m –Werte sind somit nicht als absolute Größen zu betrachten sondern dienen als Vergleichsmaß für die enzymatischen Reifungsprozesse in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

1.5.4 Statistische Methoden

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der Aktivität der unspezifischen Serumesterasen zwischen den Gruppen der Frühgeborenen (P1 = Gestationsalter 24-27 SSW, P2 = Gestationsalter 28-31 SSW und P3 = 31-36 SSW) und den Reifgeborenen (Gruppe T) sowie die Analyse möglicher Unterschiede zwischen diesen. Hierfür wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test verwendet und ein paarweiser Vergleich zwischen den Degradations-Halbwertszeiten, dem Verhältnis von Metabolit und Remifentanyl nach 150min sowie der Michaelis-Menten-Konstante vorgenommen.

Aufgrund des explorativen Charakters der Arbeit wurde auf eine Adjustierung des Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ für multiples Testen verzichtet. Die angegebenen P-Werte sind demnach als explorativ zu werten. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Für die statistische Auswertung wurde SPSS version 16.0 (SPSS 2007, München, Deutschland) verwendet.

2. Publikationsschrift

Remifentanyl Degradation in Umbilical Cord Blood of Preterm Infants

Lars Welzing, M.D.,* Sabine Ebenfeld, M.D.,† Verena Dlugay, M.Sc.,‡ Martin H. J. Wiesen, M.D.,§ Bernhard Roth, M.D., Ph.D.,|| Carsten Mueller, M.D.#

ABSTRACT

Background: No pharmacokinetic data about remifentanyl in preterm infants exist, although remifentanyl is increasingly used in this especially vulnerable subgroup of pediatric patients. Unfortunately, ethical restrictions in the volume of blood that can be withdrawn for kinetic sampling nearly prohibit pharmacokinetic studies in preterm infants.

Methods: Because remifentanyl is rapidly metabolized by nonspecific blood esterases, we collected umbilical cord serum of preterm and term infants to investigate whether the activity of nonspecific blood esterases depends on gestational age. Umbilical cord serum, buffer solution, ascorbic acid, and remifentanyl were mixed in a glass vial placed in a shaking water bath at 37°C. Subsequently, serum samples were subjected to liquid chromatography–mass spectrometry-based analysis of remifentanyl and its metabolite GR90291 after 0, 30, 60, 100, and 150 min.

Results: We analyzed umbilical cord serum samples of 34 preterm infants (24–36 gestational weeks) and six term infants. The degradation rates of remifentanyl to its major metabolite GR90291 were comparable in preterm and term infants. The overall median degradation half-life of remifentanyl was $143 \pm$ (interquartile range) 47 min (minimum, 76 min; maximum, 221 min) without significant differences between very preterm infants (less than 28 gestational weeks)

What We Already Know about This Topic

- Remifentanyl appears to have a short-lasting effect in preterm neonates, but for ethical reasons its pharmacokinetics have not been studied

What This Article Tells Us That Is New

- With the use of umbilical blood to assess nonspecific esterase metabolism of remifentanyl, blood from preterm neonates was found to be similar to term neonates in the rate of remifentanyl metabolism

and term infants. The remifentanyl concentration remained stable in control runs without serum.

Conclusions: Our study demonstrates that very preterm infants exhibit a high nonspecific esterase activity in umbilical cord blood that is comparable with that of term infants. These results support clinical experiences that remifentanyl is rapidly metabolized by preterm infants without prolonged side effects.

IN term neonates as well as in preterm infants, intense pain should be treated with potent opioids. The most frequently used opioids in pediatric anesthesia and neonatal intensive care medicine are morphine and fentanyl.^{1,2} However, neonatologists fear the exceptionally prolonged side effects of these substances in preterm infants. Side effects such as constipation or respiratory depression with the need for prolonged mechanical ventilation may have a major effect on morbidity in this especially vulnerable subgroup of pediatric patients.³

Remifentanyl is structurally unique among currently available opioids because of its ester linkage, which makes it susceptible to hydrolysis by nonspecific esterases in blood and tissues. The major metabolite of remifentanyl, GR90291, is almost inactive compared with remifentanyl and is eliminated primarily by the kidneys.^{4–6} Because of its unique pharmacokinetic property (a short recovery profile), remifentanyl could be the ideal opioid for preterm infants.^{7,8} Four studies investigating the pharmacokinetics of remifentanyl in children have been published.^{9–12} They demonstrate that pharmacokinetic data in children are comparable with those in adults. However, until now no pharmacokinetic data have existed about remifentanyl in preterm infants.¹³

Ethical restrictions in the volume of blood that can be withdrawn for kinetic sampling nearly prohibit pharmacoki-

* Research Resident, || Professor and Head of Department, Children's Hospital, Department of Neonatology and Pediatric Intensive Care, † Research Associate, § Clinical Pharmacology Resident, # Consultant Pharmacologist and Head of Division, Institute of Pharmacology, Division of Therapeutic Drug Monitoring, ‡ Research Associate, Institute of Medical Statistics, Informatics and Epidemiology, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany.

Received from the Children's Hospital, Department of Neonatology and Pediatric Intensive Care and the Institute of Pharmacology, Department of Therapeutic Drug Monitoring, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany. Submitted for publication May 23, 2010. Accepted for publication October 14, 2010. Supported by institutional and departmental sources. Remifentanyl-metabolite GR90291 and internal standard (propionamide ester oxalate, GR92559A) were provided by GlaxoSmithKline (Durham, United Kingdom).

Address correspondence to Dr. Welzing: University of Cologne, Children's Hospital, Department of Neonatology and Pediatric Intensive Care, Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany. lars.welzing@uk-koeln.de. Information on purchasing reprints may be found at www.anesthesiology.org or on the masthead page at the beginning of this issue. ANESTHESIOLOGY's articles are made freely accessible to all readers, for personal use only, 6 months from the cover date of the issue.

Copyright © 2011, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. Anesthesiology 2011; 114: 570–7

netic studies in preterm infants. However, in contrast to other opioids, the metabolism of remifentanyl is almost independent of liver and renal function.^{14,15} Because remifentanyl is rapidly metabolized by nonspecific blood esterases, umbilical cord blood is suitable for *in vitro* investigations.^{8,16} Using this exceptionally huge amount of fetal blood, we wanted to investigate whether the activity of nonspecific blood esterases depends on gestational age. Our aim was to find out whether very premature infants exhibit a blood esterase activity comparable with that of mature infants.

Materials and Methods

Patients

The study was approved by the Ethical Review Board of the Medical Faculty of the University of Cologne (Cologne, Germany). Informed consent was given by the parents or legal guardians of the children.

Because we wanted to investigate whether the activity of nonspecific blood esterases depends on gestational age, we collected umbilical cord blood of all available preterm infants with 24–36 weeks of gestation, who were born between August 2007 and August 2008 in the Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Cologne, Germany. For the statistical analysis, we subdivided the preterm infants into three groups: 24–27 gestational weeks (group P1), 28–31 gestational weeks (group P2), and 32–36 gestational weeks (group P3). In addition, we collected umbilical cord blood from six term infants (group T).

Blood Sampling. One minute after umbilical cord clamping, we carefully aspirated 1–5 ml fetal blood from the placental part of the umbilical vein. Blood samples were transferred into an S-monovette, total volume 10 ml (Sarstedt AD & Co., Nümbrecht, Germany) and centrifuged immediately at room temperature and 3,000 g for 10 min (Minifuge GL; Hereaus-Christ, Osterode, Germany). Subsequently, the supernatant was transferred as a serum sample into microvials and directly frozen at –80°C for later *in vitro* investigation.

In Vitro Enzyme Kinetics

Chemicals and Reagents. The following chemicals were used for the analytical procedure. Acetonitrile was purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). Formic acid, sodium chloride, potassium chloride, disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, and ascorbic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were of analytical or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. Deionized water, further purified with a Milli-Q water-purifying system (Millipore Corporation, Bedford, MA) was used. HPLC eluent A was water with 0.1% formic acid. Acetonitrile was used as HPLC eluent B. Remifentanyl hydrochloride, methyl 1-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-(phenyl-propanoylamino) piperidine-4-carboxylate; remifentanyl metabolite GR90291, and in-

ternal standard (propionamide ester oxalate, GR92559A) were purchased from GlaxoSmithKline (Durham, United Kingdom).

Experimental. A sample volume of 0.5 ml umbilical cord blood serum was mixed with 0.5 ml phosphate-buffered saline (phosphate buffer, pH 7.4; 300 mM) and 10 µl ascorbic acid (12.5%, percentage by mass) in a 10-ml glass vial placed in a shaking water bath at $v = 37^{\circ}\text{C}$ (shaking water bath 20; Medingen, Dresden, Germany) for 5 min. An aliquot of 52.5 µl precooled ($v = 5^{\circ}\text{C}$) remifentanyl stock solution containing 1 mg/l remifentanyl was added to yield a remifentanyl concentration of 50 µg/l in the experimental approach. Remifentanyl and its metabolite GR90291 were measured by a modification of the HPLC electrospray ionization-tandem mass spectrometry method of Bossù *et al.*¹⁷ Serum samples were subjected to liquid chromatography–mass spectrometry-based analysis of remifentanyl and GR90291 concentrations before (blank) and 0, 30, 60, 100, and 150 min after drug application, respectively. A control run was performed for each sequence containing buffer solution instead of 0.5 ml umbilical cord blood serum.

Assay of Remifentanyl. For liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis, the samples were transferred into plastic microvials on ice, and protein precipitation was achieved by mixing 100 µl serum with 200 µl acetonitrile; 50 µl internal standard solution (0.1% formic solution with a concentration of 100 µg/l of internal standard) was added. Subsequently, the vials were vortexed (Bender and Hobein, Zurich, Switzerland) for 30 s and centrifuged for 10 min at 15,800g and 4°C (Eppendorf centrifuge 5402; Hamburg, Germany). The supernatant was transferred into disposable glass microvials (volume 100 µl) and 10-µl samples were injected into the HPLC–tandem mass spectrometry system.

Chromatographic Conditions and Mass Spectrometry Detector Settings. Separation of sample aliquots was achieved using a BetaBasic C4 column (100 × 3.0 mm, 5 µm) with its corresponding precolumn (10 × 3.0 mm; Thermo Fisher, Dreieich, Germany). The system was equilibrated until stability of total ion current for a minimum of 1.5 h, and sensitivity was checked by analyzing an aqueous standard solution of remifentanyl, metabolite, and internal standard.

The column and tray temperatures were maintained at $v = 45^{\circ}\text{C}$ and $v = 10^{\circ}\text{C}$, respectively. The flow rate was 350 µl/min, resulting in a column pressure of 280–420 kPa. The total duration of chromatography of each sample run was 6 min. Retention times of both analytes (remifentanyl and metabolite) and the internal standard were 2.04 min and 2.56 min, respectively.

Detection was carried out with a TSQ Quantum mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA), equipped with an electrospray ionization source working in positive ion and reaction monitoring mode. Instrument parameters were as

follows: electrospray ionization source collision-induced dissociation, 10.0 V; spray voltage, 3.8 kV; nitrogen used as sheath and auxiliary gas, 45 and 10 units (arbitrary units); heated capillary temperature was set to $v = 380^\circ\text{C}$. The argon collision gas pressure was set to 1.5 mTorr.

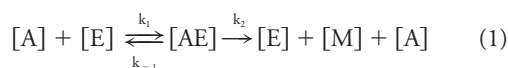
The collision energy was set to 27 eV for remifentanyl, 30 eV for GR90291, and 28 eV for internal standard, respectively. The following transitions of $[M-H]^+$ precursor ions to product ions were selected: for remifentanyl, $m/z\ 377 \rightarrow 113$; for GR90291, $m/z\ 363 \rightarrow 146$; and for the internal standard, $m/z\ 381 \rightarrow 321$.

The lower limit of quantification of remifentanyl and its metabolite was $1.6\ \mu\text{g/l}$, the limit of detection was $0.32\ \mu\text{g/l}$. Linearity was demonstrated over a range of $1.6\text{--}1,000\ \mu\text{g/l}$. The intraday variability of the relative SD was 13.9% at $1.6\ \mu\text{g/l}$ and 6.9% at $1,000\ \mu\text{g/l}$.

Description of the Model. Data were processed by a standard calculation program (LCQuan rev. Version 1.3; ThermoFinnigan, San Jose, CA). Corresponding data sets were imported into the pharmacokinetic program TOPFIT,¹⁸ and Michaelis–Menten kinetics of each group were analyzed by a nonlinear compartment model based on the most appropriate model MM1IVM. The model is an integral part of TOPFIT, which is characterized by a code of as many as six characters containing the following information: MM, type of nonlinearity (Michaelis–Menten kinetics); 1, number of disposition compartments *in vitro*; IV, type of input (intravenous); M, present in the model if a metabolite is measured in addition to its parent compound. Metabolite data sets are accepted for the central compartment and parent compound data sets for the central compartment and one elimination compartment; the letter M would be absent, if only the parent compound were measured.

The model was used to fit the individual remifentanyl and metabolite serum concentration-time profiles with a bolus dosage of $0.15\ \mu\text{g/kg}$ remifentanyl. The following parameters were investigated: half-life, Michaelis–Menten constant K_m , and elimination constant k_e .

Michaelis–Menten Equation for Biotransformation. The biotransformation of remifentanyl is catalyzed by non-specific esterases *via* hydrolysis in blood and tissues and can be represented schematically by the following closed system,



with A = drug; E = metabolizing enzyme; [AE] = complex of drug and metabolizing enzyme; k_1 = rate constant for interaction of drug and enzyme to build a complex [AE]; k_{-1} = rate constant for dissociation of [AE] to drug and enzyme $[A] + [E]$; [M] = metabolite; k_2 = rate constant for dissociation of the substrate [A] and accumulation of the metabolite [M].

The differential equation describing the above model is as follows,

$$\frac{d[AE]}{dt} = k_1 \cdot [A] \cdot [E] - k_{-1} \cdot [AE] - k_2 \cdot [AE] \quad (2)$$

The objective of the analysis is to represent the above model in terms of a Michaelis–Menten expression with the following form,

$$[AE] = [E_0] \cdot \frac{[A]}{K_m + [A]} = V_{\max} \cdot \frac{c_i}{K_m + c_i} \quad (3)$$

where

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

with $V_{\max}$ = maximum transfer rate; c_i = concentration (or amount) of drug in compartment i.

In nonlinear kinetics, the rate of drug transfer is not directly proportional to drug concentrations. Most commonly, nonlinear kinetics occur as a consequence of saturable (capacity-limited) transfer processes.¹⁹ As a starting point for the current study, $V_{\max}$ was experimentally determined with independent substrate concentrations of remifentanyl (50.0, 20.0, and $10.0\ \mu\text{g/l}$). $V_{\max}$ represents the total capacity of the saturable process and was calculated and fixed at $0.40\ \mu\text{g} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ for all individual calculations; K_m is equal to the value of c_i for half-maximal transfer rate and represents the affinity of the transfer system.

Statistical Analysis

The aim of this study was to analyze potential differences among the three subgroups of preterm infants (groups P1, P2, P3) and term infants (group T) concerning the activity of nonspecific blood esterases. For this purpose, we used the nonparametric Mann–Whitney test and performed pairwise comparisons for the degradation half-life of remifentanyl, the ratio of the metabolite GR90291 and remifentanyl after 150 min, and the Michaelis–Menten constant.

Because of the explorative character of this study, we did not adjust the significance level $\alpha = 0.05$ to account for multiple testing. Therefore, all *P* values are of an explorative nature and *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant. All reported *P* values are two-sided, and continuous variables are presented as median $\pm$ interquartile range with minimum and maximum, respectively, in brackets. SPSS version 16.0 (SPSS 2007, Munich, Germany) was used for the statistical analysis.

Results

We analyzed umbilical cord blood samples of 34 preterm infants and six term newborns. Nine preterm infants had a

Table 1. Kinetic Results for Every Patient

Patient	Gestational Week	C _{remi-150} (nmol/l)	C _{metab-150} nmol/l	Ratio M/R	t _{1/2} (min)	K _m (μg/l)
1	24	57.3	85.5	1.49	190.0	107.0
2	25	42.8	64.0	1.50	124.7	84.3
3	25	70.2	94.0	1.34	182.9	101.0
4	26	50.8	78.8	1.55	118.3	65.2
5	26	48.9	67.7	1.38	124.0	73.0
6	26	61.4	95.4	1.55	139.7	83.7
7	27	51.3	89.5	1.74	134.4	71.7
8	27	57.7	86.6	1.50	178.4	107.0
9	27	62.8	82.4	1.31	220.7	126.0
10	28	55.6	83.6	1.50	153.9	96.0
11	28	52.6	90.6	1.72	146.5	119.0
12	29	40.0	95.6	2.39	123.2	104.0
13	29	35.9	83.9	2.34	145.6	84.6
14	30	31.3	74.9	2.39	143.3	97.8
15	30	28.4	67.2	2.37	123.6	82.2
16	30	29.1	68.1	2.34	137.7	88.3
17	31	26.8	78.4	2.93	97.8	67.8
18	31	32.8	68.1	2.08	134.6	89.5
19	31	29.0	58.7	2.02	146.2	105.0
20	32	41.0	108.1	2.64	113.9	68.0
21	32	39.3	99.0	2.52	110.5	72.8
22	32	45.8	110.3	2.41	155.4	84.1
23	33	58.3	127.4	2.19	143.0	85.2
24	33	47.6	103.6	2.18	101.4	74.5
25	33	31.9	120.0	3.76	76.4	51.7
26	34	50.8	103.2	2.03	193.2	183.0
27	34	38.7	83.2	2.15	107.0	70.5
28	34	50.0	70.5	1.41	168.7	119.0
29	35	34.6	63.7	1.84	102.3	74.0
30	35	40.1	88.0	2.19	166.0	121.0
31	35	35.3	32.8	0.93	145.1	84.0
32	36	42.5	82.3	1.93	151.1	123.0
33	36	35.4	78.0	2.20	120.9	99.5
34	36	31.5	68.5	2.17	128.1	109.0
35	37	39.4	82.2	2.09	119.8	71.3
36	38	49.4	67.8	1.37	207.5	121.0
37	38	45.9	66.6	1.45	158.2	95.5
38	40	45.6	60.8	1.33	182.7	109.0
39	40	45.1	71.2	1.58	193.3	110.0
40	41	50.0	64.6	1.29	206.0	116.0
Median		44.0	82.3	1.98	143.1	92.5
IQR		±15.5	±25.3	±0.81	±46.6	±34.9
Range		26.8–70.2	32.8–127.4	0.93–3.76	76.4–220.7	51.7–183.0

C_{metab-150} = concentration of metabolite GR90291 after 150 min; C_{remi-150} = concentration of remifentanyl after 150 min; IQR = interquartile range ratio; K_m = Michaelis-Menten constant; M/R = ratio of metabolite GR90291 and remifentanyl after 150 min; t_{1/2} = elimination half-life.

gestational age of 24–27 weeks (group P1), 10 a gestational age of 28–31 weeks (group P2), and 15 a gestational age of 32–36 weeks (group P3). The kinetic results for each patient are displayed in table 1.

The degradation rates of remifentanyl to its major metabolite GR90291 are demonstrated in figure 1. In all age groups we found a continuous degradation of remifentanyl with a concomitant increase of its metabolite GR90291. However, the remifentanyl concentration remained stable in control runs without serum.

The overall median degradation half-life of remifentanyl was 143 ± (interquartile range) 47 min (minimum, 76 min;

maximum, 221 min). The remifentanyl half-life in the preterm subgroups was 140 ± 62 min (118 min; 221 min) in group P1, 141 ± 23 min (98 min; 154 min) in group P2, and 128 ± 48 min (76 min; 193 min) in group P3. These differences were of no statistical significance, although there was a tendency for a longer half-life in the most immature preterm infants of group P1 compared with more mature preterm infants in group P3 (P1 *vs.* P2, *P* = 0.414; P1 *vs.* P3, *P* = 0.128; P2 *vs.* P3, *P* = 0.739). In term infants, remifentanyl half-life was 188 ± 58 min (120 min; 208 min), which was significantly longer than that of groups P2 (*P* = 0.023) and P3 (*P* = 0.011). However, half-life in term infants revealed

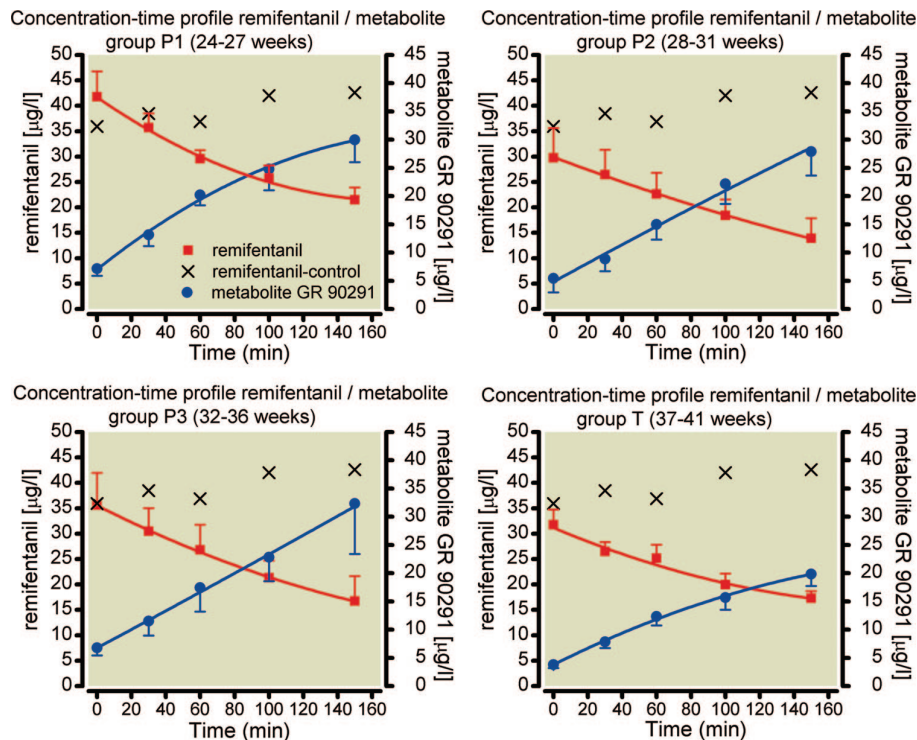


Fig. 1. Time-concentration curves of remifentanyl and its metabolite GR90291 for *in vitro* metabolism in umbilical cord serum. Data are presented as mean concentration with SD. Over time there was a continuous decrease of remifentanyl and an analog continuous increase of GR90291 in all age groups. In the control runs without serum remifentanyl, concentrations remained stable.

no statistical difference compared with the very premature infants of group P1 ($P = 0.289$) (table 2, fig. 2).

The overall median ratio of the metabolite GR90291 and remifentanyl after 150 min was 1.98 ± 0.81 (minimum, 0.93; maximum, 3.76). This ratio reflects the fraction of remifentanyl metabolized to its major metabolite by unspecific esterases, and it increased in preterm infants with gestational age. The most immature infants of group P1 had a significantly lower ratio than did the more mature preterm

infants of groups P2 and P3 ($P < 0.001$ and $P = 0.002$, respectively). However, term infants had a significantly lower ratio compared than did the more mature preterm infants of groups P2 and P3 ($P = 0.007$ and $P = 0.010$, respectively), but there was no significant difference between the ratios of term infants and those of the most immature preterm infants of group P1 ($P = 0.637$) (table 2, fig. 3).

Table 2. Statistical Comparisons between Groups P1, P2, P3, and T

Group Comparison	P Value		
	$t_{1/2}$ (min)	Ratio M/R	K_m ($\mu\text{g/l}$)
P1 vs. P2	0.414	0.001	0.744
P1 vs. P3	0.128	0.002	0.929
P1 vs. T	0.289	0.637	0.194
P2 vs. P3	0.739	0.698	0.677
P2 vs. T	0.023	0.007	0.159
P3 vs. T	0.013	0.010	0.350

K_m = Michaelis-Menten constant; ratio M/R = ratio of metabolite GR90291 and remifentanyl after 150 min; $t_{1/2}$ = elimination half-life.

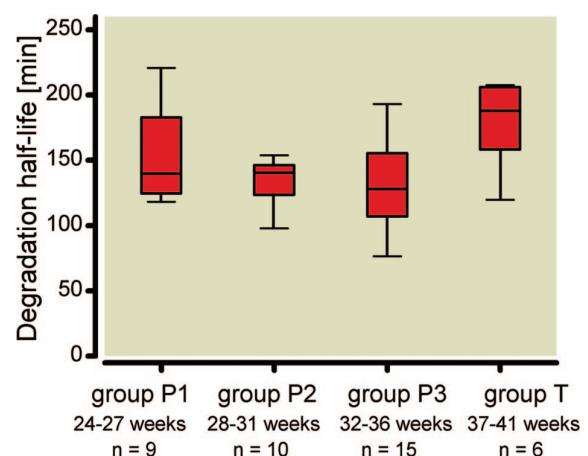


Fig. 2. *In vitro* half-life of remifentanyl according to gestational age. Box plots represent median, IQR, minimum and maximum. IQR = interquartile range.

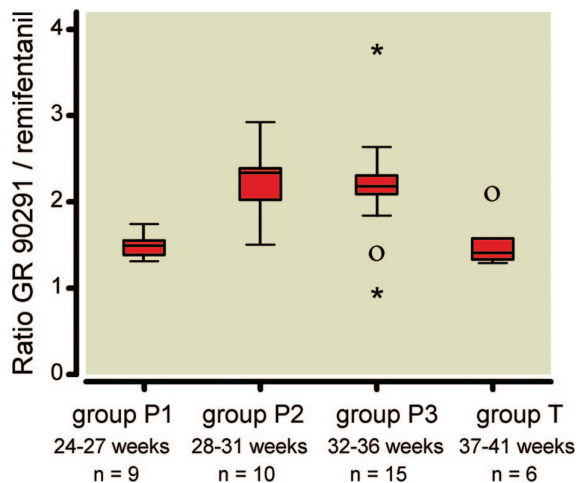


Fig. 3. Ratio of the metabolite GR90291 concentration and remifentanyl concentration after 150 min according to gestational age. Box plots represent median, IQR, minimum, and maximum. Values more than 3 IQR from the box are labeled as extreme and denoted by an asterisk (*). Values more than 1.5 IQR but less than 3 IQR from the end of the box are labeled as outliers (o). IQR = interquartile range.

The overall median Michaelis–Menten constant (K_m) was $92.5 \pm 34.9 \mu\text{g/l}$ (minimum, $51.7 \mu\text{g/l}$; maximum, $183.0 \mu\text{g/l}$). Most important, K_m was at comparable orders of magnitude in all subgroups: $84.3 \pm 34.7 \mu\text{g/l}$ in group P1; $92.8 \pm 20.3 \mu\text{g/l}$ in group P2; $84.1 \pm 46.2 \mu\text{g/l}$ in group P3; and $109.5 \pm 27.8 \mu\text{g/l}$ in group T (fig. 4). The pairwise comparisons between the groups revealed no statistical significance, and the exact P values are given in table 2.

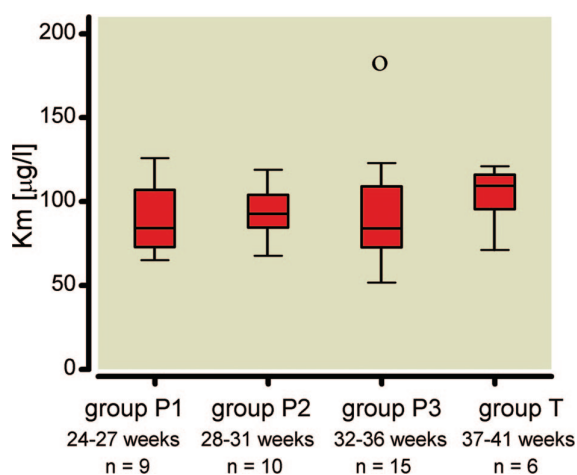


Fig. 4. Michaelis–Menten constant (K_m) according to gestational age. Box plots represent median, IQR, minimum, and maximum. Values more than 1.5 IQR but less than 3 IQR from the end of the box are labeled as outliers (o). IQR = interquartile range.

Discussion

Remifentanyl is a structurally unique opioid with a short elimination half-life of approximately 5–10 min.⁸ Some pharmacokinetic investigations in older children and term infants have been done, but no pharmacokinetic data exist for remifentanyl in preterm infants.¹³ To extend the pharmacokinetic knowledge about remifentanyl in children, we analyzed the degradation of remifentanyl in umbilical cord serum of preterm and term infants. Our aim was to investigate whether the activity of nonspecific blood esterases depends on gestational age.

In all gestational age groups we found a degradation of remifentanyl and an inverse increase of its main metabolite GR90291 over time. In the most immature infants (less than 28 gestational weeks), the activity of nonspecific blood esterases was comparable with the activity in term infants. Spontaneous degradation of remifentanyl was excluded by a control run, which revealed stable remifentanyl concentrations when no serum was added to the assay.

We can only speculate concerning the increased GR90291/remifentanyl ratio and the shorter half-life of remifentanyl in more mature preterm infants compared with term infants. These findings may be caused by the small number of samples, with 6–15 patients per subgroup. However, these results can also reflect an increased fetal activity of nonspecific esterases compared with term infants. It is a known phenomenon that some enzymes are more active prenatally and decrease or even disappear after birth. Rarely, enzyme activity decreases throughout the last trimester of pregnancy.^{20,21} The somewhat longer half-life of remifentanyl in extreme preterm infants (less than 28 gestational weeks) compared with that in more mature preterm infants might be explained by these most immature infants having not yet reached their maximum enzyme activity.^{22,23}

We found an *in vitro* degradation half-life of 143 min for remifentanyl in umbilical cord serum of preterm and term infants. In whole blood of adults, the *in vitro* half-life of remifentanyl is 37–66 min.²⁴ The longer remifentanyl half-life in our preterm and term infants might be explained by a more mature enzyme system in adults. However, we had to analyze the activity of nonspecific esterases in serum, instead of whole blood, because we had to collect and store our samples at -80°C for later *in vitro* investigation. Therefore, another possible explanation could be an increased esterase activity in human whole blood compared with human serum caused by additional esterase activity in erythrocytes.²⁵ This hypothesis is supported by pharmacokinetic *in vivo* studies revealing comparable results in term infants and adults. Neonates and children younger than 2 yr exhibit a larger volume of distribution and a larger clearance than do older children or adults. The terminal elimination half-life of remifentanyl in all age classes is only ~ 5 min.^{7,9–11}

However, the most important finding of our study is that preterm infants of all viable gestational ages reveal a significant activity of nonspecific plasma esterases metabolizing

remifentanyl to its major metabolite GR90291. Even in extremely preterm infants we found a considerable activity of nonspecific esterases. Therefore, it seems possible that the exceptional pharmacokinetic profile of remifentanyl is valid in very preterm infants.

Our *in vitro* results are limited by *in vivo* remifentanyl being metabolized not only by nonspecific blood esterases, but also by nonspecific tissue esterases. For example, in dogs, approximately 11–16% of the total metabolism of remifentanyl was found in muscle and intestine.¹⁶ Therefore, our data cannot be simply transferred to the *in vivo* situation. However, clinical studies with remifentanyl in preterm infants support our results because they report a short recovery profile, comparable with that seen in adults.^{26,27}

We want to stress the explorative character of this study and that the reported *P* values in table 2 are not corrected for multiplicity. Because we conducted six pairwise comparisons, the global significance level of 0.05 could, for example, be corrected by using a local significance level of $0.05/6 \approx 0.008$ (Bonferroni adjustment) for each pairwise comparison. In this case, *P* values less than 0.008 would be considered statistically significant.

Nevertheless, our findings are important not only for anesthesia and analgesia of preterm infants, but also for the use of remifentanyl in obstetric anesthesia. Remifentanyl is known to cross the placenta with resultant respiratory depression in the neonate.²⁸ Our data confirm the clinical experience that the respiratory depression of the neonate resolves within a few minutes and suggest that the exceptional advantages of remifentanyl might also be valid in very immature infants (less than 28 gestational weeks).^{29,30}

In summary, our study demonstrates that very preterm infants have a high nonspecific esterase activity in umbilical cord blood that is comparable with that of term infants. These results support clinical experiences indicating that remifentanyl is rapidly metabolized by preterm infants without prolonged side effects.

References

- Bellù R, de Waal K, Zanini R: Opioids for neonates receiving mechanical ventilation: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 2010; 95:F241–51
- Allegaert K, Veyckemans F, Tibboel D: Clinical practice: Analgesia in neonates. *Eur J Pediatr* 2009; 168:765–70
- Bokodi G, Treszl A, Kovács L, Tulassay T, Vászrhelyi B: Dysplasia: A review. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42:952–61
- Egan TD: Remifentanyl pharmacokinetics and pharmacodynamics: A preliminary appraisal. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29:80–94
- Patel SS, Spencer CM: Remifentanyl. *Drugs* 1996; 52:417–27
- Wilhelm W, Wrobel M, Kreuer S, Larsen R: Remifentanyl: An update. *Anaesthesist* 2003; 52:473–94
- Egan TD, Lemmens HJ, Fiset P, Hermann DJ, Muir KT, Stanski DR, Shafer SL: The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers. *ANESTHESIOLOGY* 1993; 79:881–92
- Glass PS, Hardman D, Kamiyama Y, Quill TJ, Marton G, Donn KH, Grosse CM, Hermann D: Preliminary pharmacokinetics and pharmacodynamics of an ultra-short-acting opioid: Remifentanyl (GI87084B). *Anesth Analg* 1993; 77:1031–40
- Davis PJ, Wilson AS, Siewers RD, Pigula FA, Landsman IS: The effects of cardiopulmonary bypass on remifentanyl kinetics in children undergoing atrial septal defect repair. *Anesth Analg* 1999; 89:904–8
- Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT: Pharmacokinetics of remifentanyl in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. *Anesth Analg* 2001; 93:1393–401
- Rigby-Jones AE, Priston MJ, Sneyd JR, McCabe AP, Davis GI, Tooley MA, Thorne GC, Wolf AR: Remifentanyl-midazolam sedation for paediatric patients receiving mechanical ventilation after cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2007; 99:252–61
- Sam WJ, Hammer GB, Drover DR: Population pharmacokinetics of remifentanyl in infants and children undergoing cardiac surgery. *BMC Anesthesiol* 2009; 9:5
- Welzing L, Roth B: Experience with remifentanyl in neonates and infants. *Drugs* 2006; 66:1339–50
- Dershwitz M, Hoke JF, Rosow CE, Michalowski P, Connors PM, Muir KT, Dienstag JL: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in volunteer subjects with severe liver disease. *ANESTHESIOLOGY* 1996; 84:812–20
- Hoke JF, Shlugman D, Dershwitz M, Michalowski P, Malthouse-Dufore S, Connors PM, Martel D, Rosow CE, Muir KT, Rubin N, Glass PS: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in persons with renal failure compared with healthy volunteers. *ANESTHESIOLOGY* 1997; 87:533–41
- Chism JP, Rickert DE: The pharmacokinetics and extra-hepatic clearance of remifentanyl, a short acting opioid agonist, in male beagle dogs during constant rate infusions. *Drug Metab Dispos* 1996; 24:34–40
- Bossù E, Montinaro A, Lecce R, Farina A, Suppa E, Draisci G, Gostoli G: LC-MS Determination of remifentanyl in maternal and neonatal plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 42:367–71
- Heinzel G, Woloszczak R, Thomann P: Topfit version 2.0: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1993, pp 94–101
- Jusko WJ: Pharmacokinetics of capacity-limited systems. *J Clin Pharmacol* 1989; 29:488–93
- 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; 307:573–82
- Strange RC, Davis BA, Faulder CG, Cotton W, Bain AD, Hopkinson DA, Hume R: The human glutathione S-transferases: Developmental aspects of the GST1, GST2, and GST3 loci. *Biochem Genet* 1985; 23:1011–28
- Blake MJ, Castro L, Leeder JS, Kearns GL: Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005; 10:123–38
- Mylynen P, Immonen E, Kumm M, Vähäkangas K: Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and fetal tissues. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5:1483–99
- Feldman PL, James MK, Brackeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, Lutz MW, Johnson MR, Leighton HJ: Design, synthesis, and pharmacological evaluation of ultrashort- to long-acting opioid analgetics. *J Med Chem* 1991; 34:2202–8
- Uotila L: Glutathione thiol esterases of human erythrocytes: Fractionation by gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta* 1979; 580:277–88

26. Sammartino M, Bocci MG, Ferro G, Mercurio G, Papacci P, Conti G, Lepore D, Molle F: Efficacy and safety of continuous intravenous infusion of remifentanyl in preterm infants undergoing laser therapy in retinopathy of prematurity: Clinical experience. *Paediatr Anaesth* 2003; 13:596–602
27. Welzing L, Kribs A, Huenseler C, Eifinger F, Mehler K, Roth B: Remifentanyl for INSURE in preterm infants: A pilot study for evaluation of efficacy and safety aspects. *Acta Paediatr* 2009; 98:1416–20
28. Ngan Kee WD, Khaw KS, Ma KC, Wong AS, Lee BB, Ng FF: Maternal and neonatal effects of remifentanyl at induction of general anesthesia for cesarean delivery: A randomized, double-blind, controlled trial. *ANESTHESIOLOGY* 2006; 104:14–20
29. Draisci G, Valente A, Suppa E, Frassanito L, Pinto R, Meo F, De Sole P, Bossù E, Zanfini BA: Remifentanyl for cesarean section under general anesthesia: Effects on maternal stress hormone secretion and neonatal well-being: A randomized trial. *Int J Obstet Anesth* 2008; 17:130–6
30. Hinova A, Fernando R: Systemic remifentanyl for labor analgesia. *Anesth Analg* 2009; 109:1925–9

3. Diskussion

Aufgrund seiner besonderen Esterverbindung unterscheidet sich Remifentanyl deutlich von anderen Opioiden. Bei Erwachsenen weist es eine sehr kurze Halbwertszeit von 5-10 Min. auf, bei einem geringen Verteilungsvolumen von 390 ml/kg, einer schnellen Clearance von 30-40 ml/kg/min und einem raschen Wirkungsbeginn von ungefähr 1 Min. [21,28,32,52].

Es gibt einzelne pharmakokinetische Untersuchungen zu Remifentanyl bei Kindern im Neugeborenen- bis Schulkindalter. Diese zeigen im Bezug auf die Clearance und das Verteilungsvolumen von Remifentanyl altersabhängige Unterschiede. Die Clearance ist bei Kindern höher als bei Erwachsenen, so liegt sie bei älteren Kindern im Alter von zwei bis 18 Jahren um 46-76 ml/kg/min, bei Kindern <2 Jahren sogar bei 92 ml/kg/min. Auch das Verteilungsvolumen ist bei Kindern größer als bei Erwachsenen, es lag bei Kindern insgesamt im Durchschnitt bei 223-308 ml/kg, in einer Studie bei Kindern <2 Monaten bei 452 ml/kg. [14,15,35-37,52]. Die Eliminations-Halbwertszeit war bei Kindern mit 5-10 Min. vergleichbar mit der Eliminations-Halbwertszeit Erwachsener. Insgesamt weist Remifentanyl bei Kindern unterschiedlicher Altersgruppen also eine ähnliche Pharmakokinetik wie bei Erwachsenen auf, wobei es bislang jedoch keine pharmakokinetischen Untersuchungen zu Remifentanyl bei Frühgeborenen gab.

Wir analysierten in vitro den Abbau von Remifentanyl im Serum aus Nabelschnurblut von 34 Frühgeborenen und sechs reifen Neugeborenen. Dafür wurde über einen Zeitraum von 150 Min. in regelmäßigen Abständen die Konzentrationen von Remifentanyl und seinem Hauptmetaboliten GR90291 gemessen und daraus Degradations-Halbwertszeiten berechnet.

Die Ergebnisse wurden separat für Blutproben aus vier unterschiedlichen Altersgruppen analysiert: Gruppe P1 (Frühgeborene 24-27 Schwangerschaftswochen), Gruppe P2 (Frühgeborene 28-31 Schwangerschaftswochen), Gruppe P3 (Frühgeborene 32-36 Schwangerschaftswochen) und Gruppe T (reife Neugeborene mit 37-41 Schwangerschaftswochen) als Vergleichsgruppe. Wir konnten in allen Altersgruppen im zeitlichen Verlauf einen nicht linearen, zunehmenden Abbau von Remifentanyl und eine gleichzeitige Zunahme der Konzentration des Metaboliten GR90291 feststellen. Einen Spontanzerfall von Remifentanyl konnten wir mit Hilfe eines Kontroll-Versuchsansatzes, dem kein Serum zugefügt wurde, aus-

schließen. In diesem Ansatz blieben die Konzentrationen von Remifentanil über den Beobachtungszeitraum stets stabil.

Bei den sehr unreifen Frühgeborenen der Gruppe P1 war die Esterase-Aktivität vergleichbar mit der Aktivität in der Gruppe der reifen Neugeborenen der Gruppe T. Die Halbwertszeiten lagen in der Gruppe P1 bei 140 ± 62 Min. und in der Gruppe T bei 188 ± 58 Min. ($p=0,289$). Die etwas reiferen Frühgeborenen der Gruppen P2 und P3 weisen mit 141 ± 23 Min. und 128 ± 48 Min. sogar signifikant kürzere Halbwertszeiten als reife Neugeborene auf ($p=0,023$ bzw $p=0,011$). Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Zum einen mag dies an den kleinen Patient/innenanzahlen von 6 und 15 Kindern pro Gruppe liegen. Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass reifere Frühgeborene tatsächlich eine relativ höhere Enzymaktivität aufweisen als zum Termin geborene Kinder. Es ist in der Literatur beschrieben, dass die Aktivität einiger Enzyme wie die einiger Glutathion S-Transferasen und einiger hepatischer CYP3A Enzyme der im Laufe der Schwangerschaft ansteigt und am Ende der Schwangerschaft bis zur Geburt wieder abfällt [45,47]. Die etwas geringere Enzymaktivität in der Gruppe P1 ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass in diesen frühen Schwangerschaftswochen durch die Unreife des Organismus noch nicht die volle Enzymaktivität vorliegt [10,30].

Die von uns gemessenen Degradations-Halbwertszeiten im Serum von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen lagen im Mittel bei 143 Min. Vergleichbare in vitro Untersuchungen im Vollblut von Erwachsenen ergaben Halbwertszeiten von 37-91 Min. [16,20,42]. Diese Differenz lässt sich möglicherweise durch das noch unreife Enzymsystem bei Früh- und Neugeborenen erklären. Dagegen spricht allerdings, dass Remifentanil in vivo eine vergleichbare Halbwertszeit bei Neugeborenen und Erwachsenen aufweist [14,35-38]. Ein anderer Erklärungsansatz betrifft den Versuchsaufbau. Da wir die Proben bis zur Verarbeitung bei -80°C lagern mussten, waren wir auf die Verwendung von Serum angewiesen. Die Vergleichs-Halbwertszeiten von Erwachsenen stammen allerdings aus Versuchen mit Vollblut. Vorversuche im Rahmen unserer Studie haben gezeigt, dass selbst in gewaschenen Erythrozyten ein Abbau von Remifentanil stattfindet, also anscheinend auch Erythrozyten eine Esterase-Aktivität aufweisen. In zwei Studien wurden zuvor ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Halbwertszeiten von Remifentanil in gewaschenen Erythrozyten, Vollblut und Plasma festgestellt

[16,42]. Es ist also denkbar, dass durch Vorliegen von Esterasen in Erythrozyten in Vollblut summativ mehr Esterase-Aktivität vorliegt als in Serum [50].

Insgesamt erlauben die Ergebnisse unserer in vitro Studie nur limitierte Rückschlüsse auf die Bedingungen in vivo. Die für den Metabolismus von Remifentanyl verantwortlichen, unspezifischen Esterasen kommen in vivo nicht ausschließlich im Plasma vor, sondern auch in Erythrozyten und in verschiedenen Geweben. So wiesen Chism et al beispielsweise bei Hunden nach, dass etwa 11-16% der Esteraseaktivität im Muskelgewebe und Gastrointestinaltrakt vorliegt [13]. Unsere Ergebnisse lassen sich also nicht direkt auf die in vivo Situation übertragen, sie sprechen jedoch dafür, dass die günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften von Remifentanyl auch bei sehr unreifen Frühgeborenen gültig sein könnten.

Eine weitere Limitation der Arbeit im Hinblick auf die enzymkinetische Betrachtung ist durch die geringen Probenvolumina bedingt, durch die es nicht möglich war jede Probe mit verschiedenen Substratkonzentrationen zu messen um so für jede Altersgruppe $V_{\max}$ und K_m experimentell zu bestimmen. Durch die näherungsweise Bestimmung von $V_{\max}$ in einem Vorversuch mit einem Serumpool reifer Neugeborener ($n=5$) konnte K_m ermittelt werden. Durch die Fixierung von $V_{\max}$ lies sich entsprechend unserer Fragestellung die Variabilität von K_m in Abhängigkeit vom Gestationsalter näherungsweise ermitteln. Diese Werte sind nicht als absolut zu betrachten, ein Vergleich zwischen den verschiedenen Altersgruppen ist jedoch möglich.

Damit die Enzymaktivität wie hier angenommen einer Michaelis-Menten-Kinetik entspricht, darf die Substratkonzentration im in vitro Ansatz nicht sehr deutlich ober- oder unterhalb der Michaelis-Menten Konstante liegen. Dies war annähernd gegeben. K_m lag im Median nicht höher als 92,5 $\mu\text{g/l}$, die Substratkonzentration lag bei 50 $\mu\text{g/l}$. Läge die Konzentration deutlich unterhalb K_m würde eine Reaktion 1.Ordnung vorliegen, dies wurde hier, ebenso wie eine Substrathemmung, nicht angenommen.

Die Stabilität des Enzyms in dem gewählten Ansatz über den Versuchszeitraum von 150 min ist nicht nachgewiesen worden, sondern lediglich eine Annahme. Diese Annahme stützt jedoch sich darauf, dass in ähnlichen Studien in der Literatur in vitro Untersuchungen zu Remifentanyl sogar über deutlich längere Zeiträu-

me durchgeführt und valide Ergebnisse erreicht wurden [16,42]. Andere Serumesterasen, wie die Cholinesterase, sind über Monate stabil [22,27], auch wenn sich dies nicht zwingend so auf die hier aktiven Esterasen übertragen lässt, so scheint eine Stabilität dieser Esterasen doch sehr wahrscheinlich. Für die Stabilität des Enzyms spricht zudem der hier gesehene nicht lineare, über die Zeit zunehmende Abbau von Remifentanil. Bei einer Abnahme der Konzentration des Enzyms über den Versuchszeitraum wäre eine Abnahme der Abbaugeschwindigkeit und damit eine Abflachung der Konzentrations-Zeit-Kurve zu erwarten. Zudem wäre ein möglicher Effekt äußerer Einflüsse auf die Enzymaktivität in allen Altersgruppen gleichermaßen zu erwarten und somit die Aussagekraft im Vergleich der Altersgruppen nicht vermindert.

Unterstützt werden diese Aussagen von ersten klinischen Erfahrungen und Untersuchungen zur peripartalen Anwendung von Remifentanil [39]. Als plazentagängiges Medikament zeigt sich bei Verwendung von Remifentanil zur Analgesie der Mutter unter der Geburt beim Neugeborenen häufig eine Atemdepression [24,31]. Diese dauert aber aufgrund der schnellen Metabolisierung beim Neugeborenen nur wenige Minuten an [18,25].

4. Zusammenfassung

Bis heute existieren keine pharmakokinetischen Daten zu Remifentanyl bei Frühgeborenen, obwohl Remifentanyl in dieser besonders vulnerablen Patientengruppe inzwischen zunehmend eingesetzt wird. Aufgrund der hohen Anzahl benötigter Blutproben für pharmakokinetische Studien, ist es aus ethischen Gründen nahezu unmöglich diese bei Frühgeborenen durchzuführen.

Remifentanyl wird zu einem großen Teil von unspezifischen Plasmasterasen metabolisiert, was eine Messung der Enzymaktivität im Nabelschnurblut möglich macht. Wir haben die Metabolisierung von Remifentanyl zu seinem Metaboliten GR90291 im Nabelschnurblut von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen gemessen und untersucht, ob die Enzymaktivität vom Gestationsalter abhängig ist. Wir analysierten Serum aus Nabelschnurblut von 34 Frühgeborenen (24-36 Schwangerschaftswochen) und von sechs reifen Neugeborenen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Metabolisierungsraten von Remifentanyl zu seinem Hauptmetaboliten GR90291 zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen. Im Mittel ergab sich eine Eliminations-Halbwertszeit von 143 +/- 47 Min., (Minimum 76 Min., Maximum 221 Min.). In Kontrollversuchen ohne Serum blieb die Remifentanyl-Konzentration stabil.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie bereits bei sehr unreifen Frühgeborenen eine Aktivität unspezifischer Serumesterasen nachweisen, welche vergleichbar mit der Aktivität bei reifen Neugeborenen ist. Diese Ergebnisse, zusammen mit dem derzeitigen Stand der klinischen Erfahrungen, sprechen dafür, dass Remifentanyl von Frühgeborenen ähnlich schnell metabolisiert wird wie von reifen Neugeborenen und auch keine prolongierten Nebenwirkungen beim Einsatz von Remifentanyl in dieser Patient/innengruppe zu erwarten sind.

5. Literatur

1. **Abu-Saad HH, Bours GJ, Stevens B, Hamers, JP (1998):** Assessment of pain in the neonate. *Semin Perinatol.* 22: 402-16
2. **Allegaert K, de Hoon J, Van Overmeire B, Devlieger H (2005):** Clinical pharmacology of non opioid analgesics in neonates. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 67: 289-315
3. **Allegaert K, Veyckemans F, Tibboel D (2009):** Clinical practice: Analgesia in neonates. *Eur J Pediatr.* 168: 765-70
4. **Als H, Duffy FH, McAnulty GB, Rivkin MJ, Vajapeyam S, Mulkern RV, Warfield SK, Huppi PS, Butler SC, Conneman N, Fischer C, Eichenwald EC (2004):** Early experience alters brain function and structure. *Pediatrics.* 113: 846-57
5. **Anand KJ, Scalzo FM (2000):** Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate.* 77: 69-82
6. **Anand KJ (1998):** Clinical importance of pain and stress in preterm neonates. *Biol Neonate.* 73: 1-9
7. **Anand KJ, Stevens BJ, McGrath PJ (2007):** Pain in neonates and infants, 3rd ed. Canada: Elsevier Science
8. **Anand KJ, Hall RW, Desai N, Shephard B, Bergqvist LL, Young TE, Boyle EM, Carbajal R, Bhutani VK, Moore MB, Kronsberg SS, Barton BA (2004):** Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates: primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial. 263: 1673-82
9. **Bellù R, de Waal K, Zanini R (2010):** Opioids for neonates receiving mechanical ventilation: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 95: F241-51
10. **Blake MJ, Castro L, Leeder JS, Kearns GL (2005):** Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med.* 10: 123-38
11. **Bokodi G, Treszl A, Kovacs L, Tulassay T, Vasarhelyi B (2007):** Dysplasia: a review. *Pediatr Pulmonol.* 42: 952-61

12. **Bossu E, Montinaro A, Lecce R, Farina A, Suppa E, Draisci G, Gostoli G (2006):** LC-MS Determination of remifentanyl in maternal and neonatal plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 42(3): 367-71
13. **Chism JP, Rickert DE (1996):** The pharmacokinetics and extra-hepatic clearance of remifentanyl, a short acting opioid agonist, in male beagle dogs during constant rate infusions. *Drug Metab Dispos.* 24: 34-40
14. **Davis PJ, Wilson AS, Siewers RD, Pigula FA, Landsman IS (1999):** The effects of cardiopulmonary bypass on remifentanyl kinetics in children undergoing atrial septal defect repair. *Anesth Analg.* 89: 904-8
15. **Davis PJ, Cladis FP (2005):** The Use of Ultra-Short-Acting Opioids in Paediatric Anaesthesia The Role of Remifentanyl. *Clin Pharmacokinet.* 44: 787-796
16. **Davis PJ, Stiller RL, Wilson AS, McGowan FX, Egan TD, Muir KT (2002):** In Vitro Remifentanyl Metabolism: The Effects of Whole Blood Constituents and Plasma Butyrylcholinesterase. *Anesth Analg.* 95: 1305-7
17. **Dershwitz M, Hoke JF, Rosow CE, Michalowski P, Connors PM, Muir KT, Dienstag JL (1996):** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in volunteer subjects with severe liver disease. *Anesthesiology.* 84: 812-20
18. **Draisci G, Valente A, Suppa E, Frassanito L, Pinto R, Meo F, De Sole P, Bossu E, Zanfini BA (2008):** Remifentanyl for cesarean section under general anesthesia: Effects on maternal stress hormone secretion and neonatal well-being: A randomized trial. *Int J Obstet Anesth.* 17: 130-6
19. **Egan TD, Lemmens HJ, Fiset P, Hermann DJ, Muir KT, Stanski DR, Shafer SL (1993):** The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology.* 79: 881-92
20. **Feldman PL, James MK, Brackeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, Lutz MW, Johnson MR, Leighton HJ (1991):** Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Ultrashort- to Long-Acting Opioid Analgetics. *J Med Chem.* 34: 2202-8

21. **Glass PS, Hardman D, Kamiyama Y, Quill TJ, Marton G, Donn KH, Grosse CM, Hermann D (1993):** Preliminary pharmacokinetics and pharmacodynamics of an ultra-short-acting opioid: Remifentanyl (GI87084B). *Anesth Analg.* 77: 1031-40
22. **Heins M, Heil W, Withold W (1995):** Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 33: 231-38
23. **Heinzel G, Woloszczak R, Thomann P (1993):** Topfit version 2.0: pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
24. **Hill D (2008):** The use of remifentanyl in obstetrics. *Anesthesiol Clin.* 26: 169-82, viii
25. **Hinova A, Fernando R (2009):** Systemic remifentanyl for labor analgesia. *Anesth Analg.* 109: 1925-9
26. **Hoke JF, Shlugman D, Dershwitz M, Michalowski P, Malthouse-Dufore S, Connors PM, Martel D, Rosow CE, Muir KT, Rubin N, Glass PS (1997):** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in persons with renal failure compared with healthy volunteers. *Anesthesiology.* 87: 533-41
27. **Huizenga JR, van der Belt K, Gips CH (1985):** The effect of storage at different temperatures on cholinesterase activity in human serum. *J Clin Chem Clin Biochem.* 23(5): 283-5.
28. **Kapila A, Glass PS, Jacobs JR, Muir KT, Hermann DJ, Shiraishi M, Howell S, Smith RL (1995):** Measured context-sensitive half-times of remifentanyl and alfentanil. *Anesthesiology.* 83: 968-75
29. **Menon G, Boyle EM, Bergqvist LL, McIntosh N, Barton BA, Anand KJ (2008):** Morphine analgesia and gastrointestinal morbidity in preterm infants: secondary results from the NEOPAIN trial. 93: 362-7
30. **Myllynen P, Immonen E, Kumm M, Vahakangas K (2009):** Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and fetal tissues. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 5: 1483-99

31. **Ngan Kee WD, Khaw KS, Ma KC, Wong AS, Lee BB, Ng FF (2006):** Maternal and neonatal effects of remifentanyl at induction of general anesthesia for cesarean delivery: A randomized, double-blind, controlled trial. *Anesthesiology*. 104: 14-20
32. **Patel SS, Spencer CM (1996):** Remifentanyl. *Drugs*. 52: 417-27
33. **Penido MG, Rossella G, Sammartino M, Pereira e Silva Y (2010):** Remifentanyl in neonatal intensive care and anaesthesia practice. *Acta Paediatr*. 99: 1454-63
34. **Pereira e Silva Y, Gomez RS, Marcatto JdO, Maximo TA, Barbosa RF, Simones e Silva AC (2007):** Morphine versus remifentanyl for intubating preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 92: F293–F294
35. **Rigby-Jones AE, Priston MJ, Sneyd JR, McCabe AP, Davis GI, Tooley MA, Thorne GC, Wolf AR (2007):** Remifentanyl-midazolam sedation for paediatric patients receiving mechanical ventilation after cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 99: 252-61
36. **Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT (2001):** Pharmacokinetics of remifentanyl in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. *Anesth Analg*. 93: 1393-401
37. **Sam WJ, Hammer GB, Drover DR (2009):** Population pharmacokinetics of remifentanyl in infants and children undergoing cardiac surgery. *BMC Anesthesiology*. 9: 5
38. **Sammartino M, Bocci MG, Ferro G, Mercurio G, Papacci P, Conti G, Lepore D, Molle F (2003):** Efficacy and safety of continuous intravenous infusion of remifentanyl in preterm infants undergoing laser therapy in retinopathy of prematurity: Clinical experience. *Paediatr Anaesth*. 13: 596-602
39. **Sammartino M, Garra R, Sbaraglia F, De Riso M, Continolo N, Papacci P (2011):** Experience of remifentanyl in extremely low-birth-weight babies undergoing laparotomy. *Pediatr Neonatol*. 52: 176-9
40. **Sammartino M, Garra R, Sbaraglia F, De Riso M, Continolo N (2010):** Remifentanyl in Children. *Paediatr Anaesth*. 20: 246-55

41. **Schuster A, Lenard HG (1990):** Pain in newborns and prematures: current practice and knowledge. *Brain Dev.* 12: 459-65
42. **Selinger K, Nation R, Smith A (1995):** Enzymatic and chemical hydrolysis of remifentanyl. *Anesthesiol.* 83: A385
43. **Servin FS (2003):** Remifentanyl: an update. *Curr Opin Anaesthesiol.* 16: 367-72
44. **Stevens B, Yamada J, Ohlsson A (2010):** Sucrose for analgesia in newborn infants undergoing painful procedures. *Cochrane Database Syst Rev.* CD001069
45. **Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ (2003):** Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 307: 573-82
46. **Stoppa F, Perrotta D, Tomasello C, Cecchetti C, Marano M, Pasotti E, Barbieri MA, Conti G, Pirozzi N (2004):** Low dose remifentanyl infusion for analgesia and sedation in ventilated newborns. *Minerva Anesthesiol.* 70: 753-61
47. **Strange RC, Davis BA, Faulder CG, Cotton W, Bain AD, Hopkinson DA, Hume R (1985):** The human glutathione S-transferases: Developmental aspects of the GST1, GST2, and GST3 loci. *Biochem Genet.* 23: 1011-28
48. **Tanswell T, Heinzl G, Weisenberger H, Roth W (1995):** Pharmacokinetic-pharmacodynamic and metabolite modeling with TopFit. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 33: 550-54
49. **Tanswell T, Koup J (1993):** TopFit: a PC-based pharmacokinetic/ pharmacodynamic data analysis program. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 31: 514-20
50. **Uotila L (1979):** Glutathione thiol esterases of human red blood cells: Fractionation by gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta.* 580: 277-88
51. **Welzing L, Roth B (2006):** Experience with remifentanyl in neonates and infants. *Drugs* 66: 1339-50
52. **Wilhelm W, Wrobel M, Kreuer S, Larsen R (2003):** Remifentanyl: An update. *Anaesthesist* 52: 473-94

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.