

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA MARĐETKO

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA MARDETKO

**DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ KONTRASTNEGA
SREDSTVA JOHEKSOLA ZA OCENO HITROSTI GLOMERULNE
FILTRACIJE**

DETERMINATION OF CONTRAST MEDIA AGENT IOHEXOL IN
HUMAN PLASMA FOR ESTIMATION OF GLOMERULAR
FILTRATION RATE

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo UL pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Mojci Kerec Kos za mentorstvo pri izdelavi diplomske naloge. Hvala vsem članom Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko za strokovno pomoč in nasvete.

Hvala moji družini za neprecenljivo podporo skozi ves študij.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Nika Mardetko

Ljubljana, 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Tihomir Tomašić, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Ocenjevanje ledvične funkcije	1
1.2	Ledvična funkcija pri bolnikih s srčnim popuščanjem	1
1.3	Kreatinin– endogeni marker za oceno GF.....	2
1.4	Enačbe za oceno GF na osnovi serumskega kreatinina.....	3
1.5	Cistatin C.....	6
1.6	Eksogeni markerji za določanje GF	6
1.7	Joheksol	7
1.7.1	Farmakokinetika joheksola.....	8
1.7.2	Uporaba joheksola	8
1.7.3	Določevanje hitrosti GF na osnovi očistka joheksola	9
1.8	Analizne metode za določevanje joheksola.....	12
1.8.1	HPLC – UV metode.....	13
2	NAMEN DELA	15
3	MATERIALI IN METODE.....	16
3.1	MATERIALI.....	16
3.1.1	Biološki material - plazma.....	16
3.1.2	Standardi.....	16
3.1.3	Reagenti in topila	16
3.1.4	Naprave in pribor	17
3.2	METODE	18
3.2.1	Priprava osnovnih raztopin, topil in pufrov	19
3.2.2	Optimizacija priprave plazemskega vzorca.....	19
3.2.3	Priprava plazemskih vzorcev	20
3.2.4	Optimizacija kromatografije (HPLC).....	21
3.2.5	Validacija metode	22
3.2.6	Analiza realnih vzorcev.....	28
4	REZULTATI.....	30
4.1	Optimizacija priprave plazemskega vzorca	30

4.2	Optimizacija kromatografije	31
4.3	Končna optimizirana metoda.....	33
4.4	Validacija metode.....	35
4.4.1	Linearnost	35
4.4.2	Točnost.....	36
4.4.3	Ponovljivost	37
4.4.4	Območje	38
4.4.5	Meja kvantifikacije	38
4.4.6	Selektivnost	38
4.4.7	Uspešnost ekstrakcije (recovery)	38
4.4.8	Stabilnost	39
4.5	Analiza realnih vzorcev	40
4.5.1	Očistki joheksola.....	40
4.5.2	Ocene GF na osnovi serumskega kreatinina.....	43
4.5.3	Primerjava povprečnih vrednosti ocen GF	44
4.5.4	Korelacija med ocenami ledvične funkcije.....	45
5	RAZPRAVA	49
5.1	Optimizacija priprave plazemskega vzorca	49
5.2	Optimizacija kromatografije	50
5.3	Validacija metode.....	51
5.4	Analiza realnih vzorcev	53
6	SKLEP	59
7	LITERATURA	60

POVZETEK

Joheksol je rentgensko kontrastno sredstvo, ki se uporablja v diagnostiki, vse bolj pa je uveljavljen kot eksogeni marker za določevanje ledvične funkcije. V organizmu se ne metabolizira, ampak se nespremenjen izloča skozi ledvici, izključno z glomerulno filtracijo (GF), zato je njegov plazemski očistek proporcionalen hitrosti GF. Namen diplomske naloge je bil optimizirati in validirati HPLC-UV analizno metodo za določanje plazemskih koncentracij joheksola in na osnovi plazemskih koncentracij izračunati plazemske očistke joheksola ter jih primerjati z ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina (S_{Kr}).

Priprava plazemskih vzorcev za analizo je vključevala obarjanje plazemskih proteinov s 5 % perklorno kislino, vorteksiranje, sonifikacijo vzorcev v ultrazvočni kadički in centrifugiranje. Za analizo na HPLC-UV sistemu smo uporabili reverzno-fazno kolono in mobilno fazo, sestavljeno iz 50 mM fosfatnega pufru s pH 3 in acetonitrila v razmerju 94 : 6 (v/v). Pri valovni dolžini 254 nm smo detektirali oba izomera joheksola, za izračun plazemskih koncentracij joheksola pa smo uporabili površino pod drugim kromatografskim vrhom. Optimizirana analizna metoda je točna, ponovljiva, selektivna in linearna v območju 2,5–500 $\mu\text{g/mL}$. Izkoristek ekstrakcije našega analita je bil 85 %, joheksol pa kaže dobro stabilnost v različnih razmerah, po večkratnem zamrzovanju in odtajanju, na sobni temperaturi in v vzorčevalniku pri 4 °C.

Z optimizirano in validirano analizno metodo smo določili plazemske koncentracije joheksola pri bolnikih s srčnim popuščanjem. Na osnovi enoprostornega modela in z upoštevanjem Bröchner - Mortensenovega popravka smo izračunali očistke joheksola, ki so skladni z očistki joheksola v literaturi. Pokazali smo značilno korelacijo med očistki joheksola in ocenami GF s pomočjo treh najpogosteje uporabljenih enačb na osnovi S_{Kr} ; MDRD enačbe s štirimi spremenljivkami, Cockcroft - Gaultove enačbe in Cockcroft - Gaultove enačbe z vpeljavo mišične mase. Najboljšo korelacijo z očistki joheksola dajejo ocene GF na osnovi MDRD enačbe, povprečna vrednost očistkov joheksola pa je najbližje povprečni vrednosti ocen GF na osnovi C&G enačbe. Nobena od korelacij Cl joheksol - MDRD, Cl joheksol - C&G in Cl joheksol - C&G LBM ne daje značilno boljše povezave od ostalih dveh. Izbira enačbe za oceno GF na osnovi S_{Kr} kot nadomestek določevanja ledvične funkcije z eksogenim markerjem joheksolom torej nima večjega pomena. Uporaba joheksola lahko predstavlja dobro alternativo za določevanje GF s pomočjo eksogenih markerjev v primerih, ko je ocena GF na osnovi S_{Kr} lahko vprašljiva.

ABSTRACT

Iohexol is commonly used as a non-ionic X-ray contrast media agent. Its role as an exogenous marker for the determination of glomerular filtration rate (GFR) is becoming increasingly important. Iohexol is a suitable marker for GFR because it is not metabolised in the body, and it is eliminated only with glomerular filtration without tubular secretion or reabsorption. The aim of our study was to optimise and validate the method for estimation of iohexol in human plasma using HPLC–UV technique. We have also compared iohexol clearances obtained with our method with estimations of GFR, based on the serum creatinine value.

For the analysis, plasma samples were deproteinized by adding 5 % perchloric acid, vortex mixed, sonicated in an ultrasonic water bath, and centrifuged. The determination of iohexol was performed using reversed-phase analytical column, and mobile phase, which was a mixture of 50 mM phosphate buffer pH 3 and acetonitrile 94 : 6 (v/v). Both isomers of iohexol were detected at 254 nm; the calculations of plasma iohexol concentrations were made using the major peak. The method is accurate, reproducible and selective in the range of linearity from 2.5 to 500 $\mu\text{g/mL}$. Extraction recovery of iohexol was 85 %. Iohexol showed a good stability in freeze–thaw, short–term and post–preparative stability test.

Twenty plasma samples from patients with heart failure were analyzed using our optimised and validated method. The values of iohexol clearance were estimated by using the one–compartment model and corrected according to the method of Bröchner–Mortensen. Values of iohexol clearances comply with those reported in the literature and show good correlation with the estimations of GFR determined by three most frequently used creatinine-based formulae: four–variable MDRD formula, Cockcroft–Gault formula and Cocroft–Gault formula with the introduction of lean body mass. We found out that the correlation with iohexol clearances is not significantly different for any of the three formulas used to estimate GFR. The best correlation with iohexol clearance was demonstrated for MDRD formula, but the average value of iohexol clearances is the closest to the average of GFR estimations based on C&G formula. In summary, it is not so important which serum creatinine-based formula we use instead of an exogenous marker for the determination of GFR. Using iohexol for the estimation of GFR can be a good alternative for determining renal function with exogenous markers in cases where the assessment of GFR, based on serum creatinine could be problematic.

SEZNAM OKRAJŠAV

GF – glomerulna filtracija

Cl_{Kr} – endogeni očistek kreatina

MDRD - The modification of Diet in Renal Disease

C&G – Cockroft - Gault

ITM – indeks telesne mase

LBM – idealna telesna masa oz. mišična masa (kg) (lean body mass)

S_{Kr} - serumska koncentracija kreatinina

BSA – telesna površina (m^2) (body surface area)

IDMS – izotopno dilucijska masna spektrometrija

Cl_{joheksol} – očistek joheksola

AUC – površina pod plazemsko krivuljo

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

UV - ultravijolično

LC - MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and drug administration)

QC – kontrolni vzorec (Quality Control)

LLOQ - spodnja limita kvantifikacije (Lower Limit of Quantification)

KV – koeficient variance

ECV – ocena volumna porazdelitve

k_{el} – konstanta hitrosti eliminacije

1 UVOD

1.1 Ocenjevanje ledvične funkcije

Osnovna fiziološka enota ledvičnega tkiva je nefron, ki ga sestavljajo glomerul s pripadajočimi tubuli in žiljem. V glomerulu se odvija glomerulna filtracija (GF), ki se največkrat uporablja za oceno ledvičnega delovanja. Idealna snov za določanje GF se neovirano filtrira v procesu glomerulne filtracije, obenem pa se med prehodom skozi ledvične tubule ne reabsorbira ali secernira (1). GF je trenutno najboljše merilo ledvične funkcije. Spremenjena – zmanjšana je še pred pojavom prvih kliničnih znakov. Predstavlja izločevalno sposobnost ledvic, ki je sorazmerna masi delujočih nefronov. GF merimo v absolutni vrednosti (mL/min oz. mL/s) ali pa relativni vrednosti, preračunani na povprečno telesno površino odraslega človeka, $1,73\text{m}^2$ (2). Ocena GF omogoča spremljanje poteka ledvične bolezni in določanje učinkovitosti zdravljenja ledvičnih bolezni (3), v pomoč je tudi pri določanju primernega odmerka zdravila, ki se pretežno ali izključno izloča skozi ledvici (4). Poznamo različne metode za oceno GF, od katerih ima vsaka svoje prednosti in slabosti. Ocena GF temelji na določitvi očistka neke snovi, ki se v glomerulih prosto filtrira (5). Ledvični očistek pove, kakšen volumen plazme se v enoti časa očisti določene snovi (2).

1.2 Ledvična funkcija pri bolnikih s srčnim popuščanjem

V zadnjih letih so spremembe v delovanju ledvic postale pomemben označevalec tveganja za srčno-žilne bolezni. Zgodnje odkrivanje ledvične disfunkcije je pomembno, saj je lahko to znak oslabiljenega delovanja srca (6). Ledvično popuščanje, ki se kaže z GF manjšo kot $60,0\text{ mL/min}/1,73\text{m}^2$, je relativno pogosto pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (7). Dokazana je značilna povezava med slabšo ledvično funkcijo in srčnim popuščanjem, prav tako obstaja večja možnost za razvoj ledvične disfunkcije pri bolnikih, ki imajo visoko tveganje za razvoj srčnega popuščanja, kot pri tistih, ki tega tveganja nimajo (6). Pri bolnikih s srčnim popuščanjem je lahko ocena ledvične funkcije potencialno močnejši napovednik kliničnih dogodkov kot merjenje iztisnega deleža levega prekata (7). Pojavnost srčno-žilnih bolezni in umrljivosti zaradi le-teh, vključujoč srčno popuščanje, je večja pri bolnikih z ledvično disfunkcijo (6,7).

1.3 Kreatinin – endogeni marker za oceno GF

V rutinski praksi najpogosteje ocenimo GF z določitvijo serumske koncentracije kreatinina in merjenjem endogenega očistka kreatinina (1, 2). Endogeni očistek kreatinina kaže večjo občutljivost za zaznavo ledvične disfunkcije kot serumska koncentracija kreatinina (8). Kreatinin nastaja kot presnovni produkt kreatina in fosfokreatina v mišičnem tkivu (5). Hitrost nastajanja kreatinina je odvisna od mišične mase (dnevno se približno 2 % kreatina pretvori v kreatinin), tako da je količina kreatinina, ki se tvori vsak dan, relativno konstantna (9). Serumska koncentracija kreatinina je poleg mišične mase in dnevnega nihanja odvisna še od starosti, spola, prehranjevalnih navad, prisotnih bolezni in hitrosti izločanja iz telesa (10). Kreatinin se v plazmi ne veže na transportne beljakovine in se v glomerulih prosto filtrira. V proksimalnih tubulih se ne reabsorbira, vendar pa se v manjši meri iz tubulov secernira (5). Za določitev endogenega očistka kreatinina je potrebno zbiranje 24-urnega urina in odvzem krvi za določitev serumske koncentracije kreatinina. Kljub temu da sta to dokaj enostavni opravili, so znana velika odstopanja pri določevanju očistka kreatinina, razlogi so predvsem nenatančno zbiranje urina, merjenje volumna urina in določitev koncentracije kreatinina, ki v različnih laboratorijih poteka po različnih metodah, ki ne dajejo enakih vrednosti (2). Očistek kreatinina je lahko nenatančen oz. višji (za 10–20 %) zaradi izločanja kreatinina skozi ledvične tubule, saj se z zvišanjem koncentracije serumskega kreatinina poveča tudi njegovo izločanje skozi ledvične tubule, to pa vodi do precenjene GF, še posebej pri bolnikih z okrnjeno ledvično funkcijo (5). Nekatera zdravila, kot sta cimetidin in trimetoprim, inhibirajo sekrecijo kreatinina v ledvičnih tubulih, s tem povzročijo zvišano serumsko koncentracijo kreatinina in lažno znižano oceno GF (10).

Endogeni očistek kreatinina (enačba 1) (2):

$$Cl_{Kr} (\text{mL/min}) = (U \times V)/P \quad (1)$$

Cl_{Kr}...očistek kreatinina; U...koncentracija kreatinina v urinu; V...volumen 24-urnega urina, preračunan na minuto (mL/min); P...koncentracija kreatinina v serumu ali plazmi.

Med serumsko koncentracijo kreatinina in hitrostjo glomerulne filtracije obstaja nelinearna obratnosorazmerna povezava. Določitev serumske koncentracije kreatinina je premalo občutljiva metoda za zaznavo majhnega do srednjega zmanjšanja GF (10).

1.4 Enačbe za oceno GF na osnovi serumskega kreatinina

Z regresijsko analizo podatkov lahko vzpostavimo matematično povezavo med koncentracijo serumskega kreatinina in njegovim očistkom oz. GF. Informacija, ki jo tako dobimo, je izračun oziroma ocena GF na osnovi podatkov, značilnih za populacijo, ki je bila zajeta v študijo (2). V klinični praksi se za oceno GF uporabljajo različne enačbe, ki temeljijo na serumskem kreatininu, poleg tega pa lahko vključujejo v izračunu še telesno maso, starost, spol in raso. Najpogosteje uporabljeni formuli sta Cockcroft - Gaultova enačba in enačba iz raziskave The modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (8, 11).

Cockcroft – Gaultova enačba

Cockcroft - Gaultova enačba (C&G enačba) je ena najstarejših in najširše uporabljenih enačb za oceno ledvične funkcije. Enačbo so razvili s pomočjo regresijske analize, upoštevajoč povprečje dveh vrednosti endogenega očistka kreatinina in serumskega kreatinina ter kot spremenljivki vključili še telesno maso in starost. Pri uporabi enačbe za določevanje ocene GF pri ženskah je priporočeno 15 % zmanjšanje dobljene vrednosti (8, 10). Enačba daje manj točno oceno pri starejših in pri ljudeh z večjim indeksom telesne mase (ITM). C&G enačba napoveduje kreatininski očistek oz. GF na osnovi serumske koncentracije kreatinina, starosti in telesne mase (10).

Cockcroft – Gaultova enačba (enačba 2) (12):

$$Cl_{Kr} \text{ (mL/min)} = ((140 - \text{starost}) \times TM) / (0,814 \times S_{Kr}) \times (0,85 \text{ za ženske}) \quad (2)$$

Prilagoditev Cl_{Kr} na povprečno telesno površino (enačba 3) (12):

$$Cl_{Kr} \text{ (mL/min/1,73m}^2\text{)} = Cl_{Kr} \text{ (mL/min)} \times 1,73 \text{ m}^2\text{/BSA} \quad (3)$$

$$BSA = 0,007184 \times TM^{0,425} \times TV^{0,725}$$

Cl_{Kr} ...očistek kreatinina; starost (leta); TM ...telesna masa (kg); TV ...telesna višina (cm);
 S_{Kr} ...serumska koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$); BSA ...telesna površina (m^2).

Cockroft – Gaultova enačba z vpeljavo mišične mase

Pri klasični C&G enačbi v razvoju niso upoštevali vpliva močno povečane telesne mase zaradi maščobnega tkiva na izračun očistka kreatinina. Zaradi tega je v primeru debelosti ali ascitesu priporočljivo v C&G enačbi nadomestiti masno spremenljivko z idealno telesno maso ali mišično maso (LBM) (12).

Cockroft – Gaultova enačba z vpeljavo LBM (enačba 4) (13):

$$Cl_{Kr} \text{ (mL/min)} = ((140 - \text{starost}) \times \text{LBM}) / (0,814 \times S_{Kr}) \times (0,85 \text{ za ženske}) \quad (4)$$

LBM (moški) = 50 kg + (0,9 kg za vsak cm nad 150 cm telesne višine)

LBM (ženske) = 45 kg + (0,9 kg za vsak cm nad 150 cm telesne višine)

Prilagoditev C_{Kr} na povprečno telesno površino (enačba 5) (13):

$$Cl_{Kr} \text{ (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = Cl_{Kr} \text{ (mL/min)} \times 1,73 \text{ m}^2/BSA \quad (5)$$

$$BSA = 0,007184 \times TM^{0,425} \times TV^{0,725}$$

Cl_{Kr} ...očistek kreatinina; starost (leta); TM ...telesna masa (kg); TV ...telesna višina (cm);
 S_{Kr} ...serumska koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$); LBM ...idealna telesna masa (kg);
 BSA ...telesna površina (m^2).

MDRD enačba

MDRD enačba s šestimi spremenljivkami je nastala kot produkt retrospektivne analize vpliva proteinske diete in natančne kontrole krvnega pritiska na napredovanje ledvične bolezni (Modification of diet in renal disease study - MDRD study). S pomočjo multiple regresije in obdelave podatkov so pridobili spremenljivke, ki najbolj napovedo oceno GF. Enačba s šestimi spremenljivkami tako vključuje serumsko koncentracijo sečnine, serumsko koncentracijo albumina, serumsko koncentracijo kreatinina, starost, spol in raso. Za pridobitev vseh teh vrednosti so potrebne preiskave, ki so za rutinsko laboratorijsko

delo predrage, zato so razvili MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami, ki vključuje serumski kreatinin, starost, spol in raso. Preiskovancem, ki so bili vključeni v študijo, bolnikom z diagnozo kroničnega ledvičnega popuščanja so izmerili GF s pomočjo eksogenega markerja za določevanje ledvične funkcije, ^{125}I -iotalamata. Pri primerjavi ocene GF, določene z ^{125}I -iotalamatom, in ocenami GF na osnovi MDRD enačbe s šestimi spremenljivkami in MDRD enačbe s štirimi spremenljivkami se je izkazalo, da z uporabo poenostavljene enačbe s štirimi spremenljivkami izgubimo zelo malo na napovedljivosti. In sicer so pri primerjavi očistka ^{125}I -iotalamata in ocene GF na osnovi enačbe s šestimi spremenljivkami določili determinacijski koeficient korelacije $r^2 = 0,903$, pri primerjavi očistka ^{125}I -iotalamat in ocene GF na osnovi enačbe s štirimi spremenljivkami pa so določili determinacijski koeficient $r^2 = 0,892$ (8). MDRD enačba podaja oceno GF prilagojeno na povprečno telesno površino $1,73\text{m}^2$ (10).

MDRD enačba s šestimi spremenljivkami (enačba 6) (8):

$$\text{GF (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 170 \times (\text{S}_{\text{Kr}} \times 0,011312)^{-0,999} \times (\text{starost})^{-0,176} \times (0,762 \text{ če je bolnik ženska}) \times (1,180 \text{ če je bolnik črne rase}) \times (\text{S}_{\text{sečnina}} \times 2,801)^{-0,170} \times (\text{S}_{\text{albumin}} \times 0,1)^{0,318} \quad (6)$$

GF...glomerulna filtracija; S_{Kr}...serumska koncentracija kreatinina (μmol/L); starost (leta); S_{sečnina}...serumska koncentracija sečnine (mmol/L); S_{albumin}...serumska koncentracija albumina (g/L).

MDRD enačba s štirimi spremenljivkami (enačba 7) (1 in 8):

S_{Kr} določen z metodo, ki daje skladne rezultate z referenčno izotopno dilucijsko masno spektrometrijo (IDMS).

$$\text{GF (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{S}_{\text{Kr}} / 88,4)^{-1,154} \times (\text{starost})^{-0,203} \times (0,742 \text{ če je bolnik ženskega spola}) \times (1,180 \text{ če je bolnik črne rase}) \quad (7)$$

Prilagoditev ocene GF po MDRD enačbi na telesno površino (enačba 8) (13):

$$\text{GF (mL/min)} = \text{GF (mL/min/1,73 m}^2\text{)} \times \text{BSA} / 1,73 \text{ m}^2 \quad (8)$$

GF...glomerulna filtracija; S_{Kr}...serumska koncentracija kreatinina (μmol/L); starost (leta); BSA...telesna površina (m²).

1.5 Cistatin C

Alternativo za določanje GF s pomočjo endogenega markerja predstavlja cistatin C. Cistatin C je protein iz skupine cisteinskih proteaznih inhibitorjev, ki ga proizvajajo vse jedrne celice. Nastajanje cistatina C je v organizmu konstantno (10). Zaradi svoje majhnosti se cistatin C prosto filtrira v glomerulih, v proksimalnih tubulih se ne secernira, ampak na tem mestu steče reabsorbcija ter razgradnja cistatina C. Posledično se ne vrača v kri v svoji prvotni obliki, ampak kot manjši peptidi ali kot aminokislina (5). Te lastnosti proteina omogočajo določanje GF na osnovi merjenja serumske koncentracije cistatina C (1), zaradi razgradnje v proksimalnih tubulih pa ne moremo meriti njegovega očistka (5). Pri nenadnem zmanjšanju GF se serumska koncentracija cistatina C poveča še pred serumsko koncentracijo kreatinina (1). Potrebno pa je upoštevati, da je serumska koncentracija cistatina C zvišana tudi pri terapiji z glukokortikoidi, pri bolezni ščitnice, jetrni bolezni in pri kadilcih, ko ni prisotne ledvične okvare (1,10).

1.6 Eksogeni markerji za določanje GF

Za zanesljivo oceno GF je potrebno določiti očistek eksogenega markerja. Glavne značilnosti ustreznega markerja so, da se prosto filtrira skozi glomerule, se ne reabsorbira in ne secernira v ledvičnih tubulih, v organizmu se ne sme metabolizirati, ni toksičen, je fiziološko inerten in nima škodljivega delovanja na ledvice (11).

Zlati standard za določevanje GF je eksogeni marker inulin, polifruktozna molekula, s povprečno molekulsko maso 5200 Da, ki se skozi ledvice izloča izključno z GF (14). Uporaba inulina v vsakdanji praksi pa je omejena, ker je za določanje očistka inulina potrebna kontinuirana infuzija, ki omogoča vzdrževanje konstantne plazemske koncentracije inulina, preiskava zahteva kateterizacijo sečnega mehurja in pogosto vzorčenje (14, 15, 16). Določevanje GF s pomočjo inulina je tako draga metoda, dodaten problem pa predstavlja še pomanjkanje inulina v farmacevtskih oblikah na trgu (14, 15).

Kot alternativa inulinu se za določevanje GF uporabljajo radioaktivni markerji, in sicer $^{51}\text{Cr-EDTA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$. Kljub temu da so metode za določevanje GF z radioaktivnimi markerji hitre in enostavne, pa postopek oteži izdaja dovoljenj za njihovo uporabo, zapleteno rokovanje in skladiščenje teh substanc ter odstranjevanje radioaktivnih

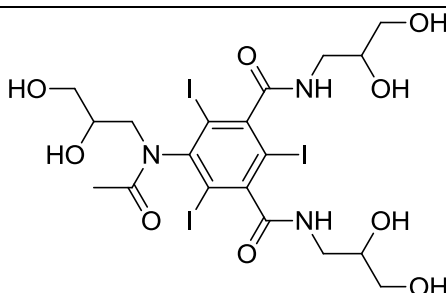
odpadkov. Te metode zaradi izpostavljenosti sevanju niso primerne za vse paciente, izključene so nosečnice (14, 16, 26) in otroci (26).

Eden od vedno bolj uveljavljenih načinov za določevanje ocene GF pa so metode, ki temeljijo na določevanju plazemskih očistkov rentgenskih kontrastnih sredstev, kot sta jotalamat in joheksol, katerih plazemska očistka izkazujeta dobro korelacijo z očistkom inulina in ^{51}Cr -EDTA (16).

1.7 Joheksol

Določevanje plazemske koncentracije joheksola in njegovega očistka je v nekaterih državah vedno bolj uveljavljen postopek za določevanje GF v klinični praksi. Joheksol z lastniškim imenom OmnipaqueTM je jodirano, vodotopno, neionsko kontrastno sredstvo z molekulsko maso 821,14 Da (17).

Preglednica I: Fizikalno kemijske lastnosti joheksola (18)

JOHEKSOL	
kemijsko ime	1- <i>N</i> ,3- <i>N</i> -bis(2,3-dihidroksipropil)-5-[<i>N</i> -(2,3-dihidroksipropil)acetamido]-2,4,6-trijodobenzen-1,3-dikarboksamid
molekulska formula	C ₁₉ H ₂₆ I ₃ N ₃ O ₉
molekulska masa	821,14 Da
strukturna formula	
fizikalne lastnosti	bel do sivkasto bel prah brez vonja
topnost	zelo dobro topen v vodi in metanolu, skoraj netopen ali netopen v etru in kloroformu
temperatura tališča	174 – 180 °C

Farmacevtska oblika joheksola je sterilna, bistra, brezbarvna do blede rumena vodna raztopina za injiciranje (18, 19). Na razpolago so raztopine z različnimi koncentracijami

joda, in sicer 180, 240, 300 in 350 mg I/mL. Raztopina joheksola je glede na ostale raztopine rentgenskih kontrastnih sredstev nizkoosmolarna, osmolarnost raztopin joheksola je med 408 in 844 mOsmol/kg H₂O. Glede na plazmo in cerebrospinalno tekočino (osmolarnost približno 285 in 301 mOsmol/kg H₂O) pa so raztopine joheksola, ki so na razpolago, hiperosmolarne (19, 20). pH raztopine joheksola je med 6,8 in 7,7 in je uravnan s klorovodikovo kislino. Sterilizacija raztopin joheksola poteka z avtoklaviranjem, pripravljene raztopine ne vsebujejo konzervansov (18).

1.7.1 Farmakokinetika joheksola

Joheksol po aplikaciji z intravensko injekcijo takoj doseže maksimalno plazemsko koncentracijo in se nato hitro razporedi v ekstracelularno tekočino (18). Joheksol se ne presnavlja (18, 19) in navadno ne prehaja krvno-možganske bariere (18). Vezava joheksola na plazemske beljakovine je zanemarljiva (manj kot 2 %) (14, 19), izloča se nespremenjen skozi ledvice, izključno z GF (14, 18), zanemarljivo malo (1-2 %) se ga izloča v žolč (18). Pri pacientih z normalnim ledvičnim delovanjem se skoraj ves intravensko injiciran joheksol izloči iz telesa nespremenjen v prvih 24 urah. Največjo koncentracijo v urinu doseže 1 uro po injiciranju (18, 19). Pri bolnikih z normalno ledvično funkcijo je razpolovni čas porazdelitve 22 minut, razpolovni čas eliminacije je 2,1 ure, volumen porazdelitve pa 165-270 mL/kg (18).

Po aplikaciji joheksola v subarahnoidni prostor se ta hitro pomeša s cerebrospinalno tekočino in difundira v spinalne in intrakranialne subarahnoidne prostore (18).

1.7.2 Uporaba joheksola

Joheksol se uporablja kot rentgensko kontrastno sredstvo in za določanje ocene GF (14). Raztopina joheksola je namenjena samo za dioagnostiko (19, 20). Joheksol se kot rentgensko kontrastno sredstvo uporablja pri odraslih in otrocih za angiokardiografijo, arteriografijo, urografijo, flebografijo, računalniško tomografijo, lumbalno, torakalno in cervikalno mielografijo ter računalniško tomografijo bazalnih cistern po subarahnoidni injekciji. Uporablja se tudi za artografijo, endoskopsko retrogradno pankreatografijo,

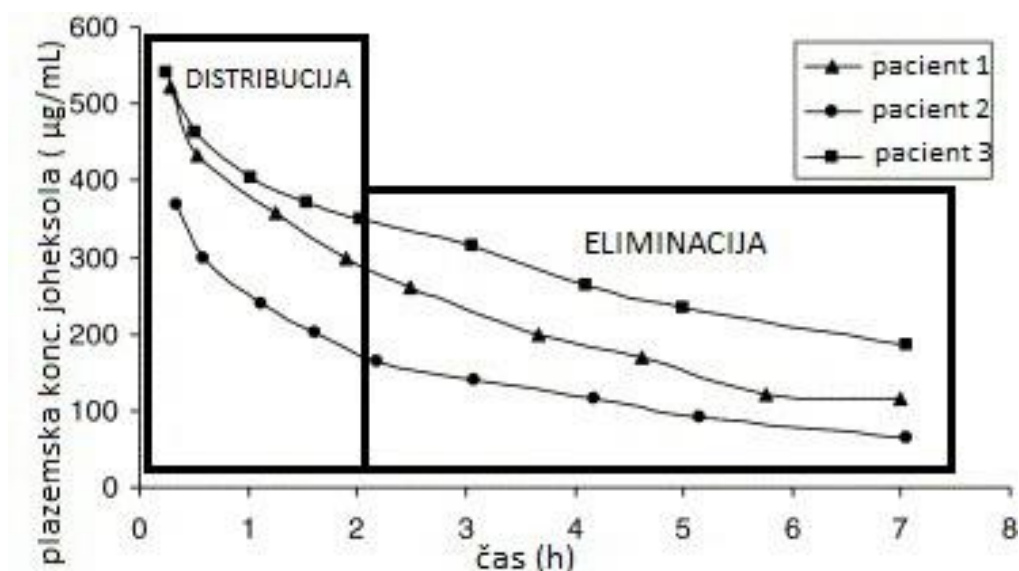
endoskopsko retrogradno holangiopankreatografijo, herniografijo, histerosalpingografijo, sialografijo in preiskave prebavil(19).

Uporaba joheksola kot kontrastnega sredstva temelji na dejstvu, da jod močnejše absorbira rentgenske žarke, ki prehajajo skozi telo, kot ostale strukture v organizmu. Zato pride do razlik med tkivi, ki vsebujejo jod oz. kontrastna sredstva, in tkivi, v katerih kontrastnega sredstva ni (20).

Rentgenska kontrastna sredstva, ki se izločajo iz plazme pretežno z glomerulno filtracijo, se lahko uporabljajo kot eksogeni markerji za določevanje ocene GF (16). GF lahko določamo v kombinaciji s klasično rentgensko preiskavo, kjer so odmerki 50 do 100 mL rentgenskega kontrastnega sredstva, razvili pa so številne občutljivejše metode, kot so HPLC-UV metode in rentgenska fluorescence, ki omogočajo določevanje GF na osnovi majhnega enkratnega odmerka (27). Joheksol in jotalamat sta kontrastni sredstvi, ki sta zaradi svojih lastnosti primerna markerja za določevanje GF, poleg tega sta lahko dostopna in varna za uporabo (21). Imata enak kinetični profil, a je joheksol bolj primeren za določevanje glomerulne filtracije, saj je manj alergen. Kot možen vzrok za to navajajo, da joheksol manj vpliva na sproščanje histamina, serotonina in na aktivacijo kaskade komplementa kot jotalamat (16).

1.7.3 Določevanje hitrosti GF na osnovi očistka joheksola

Določevanje ocene GF s pomočjo joheksola temelji na izračunu očistka joheksola iz plazme po aplikaciji enkratnega majhnega odmerka z intravensko injekcijo (11, 16, 22). Plazemski profil joheksola najboljše opišemo z dvoprostornim farmakokinetičnim modelom. Sestavljata ga zgodnja porazdelitvena in pozna eliminativna faza. Iz slike 1 je razvidno, da linearnost v dvoprostornem modelu opazimo približno 2 uri po aplikaciji intravenske injekcije, in sicer v območju eliminativne faze (16).



Slika 1: Plazemski profil joheksola (koncentracija joheksola v odvisnosti od časa) (14)

Izračun očistka joheksola temelji na določevanju površine pod plazemsko krivuljo (AUC), kar pa zahteva veliko plazemskih vzorcev (11, 22), da se pokrije porazdelitvena in eliminativna faza (11).

Izračun plazemskega očistka joheksola na osnovi AUC (enačba 9) (22):

$$Cl_{\text{joheksol}} = \text{odmerek}/\text{AUC} \quad (9)$$

Cl_{joheksol}...plazemski očistek joheksola; AUC...površina pod plazemsko krivuljo.

Veliko študij se osredotoča na določevanje plazemskega očistka joheksola na osnovi manjšega števila vzorcev (1-3 vzorci), saj je zmanjševanje števila plazemskih vzorcev prednost tako za bolnike kot za medicinsko osebje (11). Oceno očistka joheksola iz manjšega števila vzorcev lahko dobimo na osnovi plazemskih vzorcev, pridobljenih med drugo in četrto uro po injiciranju odmerka, torej v eliminativni fazi (22). Očistek joheksola tako izračunamo na osnovi enopostornega modela s pomočjo konstante hitrosti eliminacije (k_{el}) in volumna porazdelitve (V_D) (11). Ena od možnosti za določitev očistka joheksola je tako izračun s pomočjo konstante hitrosti eliminacije (k_{el}), odmerka joheksola in koncentracije joheksola ob času $t = 0$ (C_0), katero izračunamo s pomočjo metode najmanjših kvadratov (22).

Izračun plazemskega očistka joheksola na osnovi k_{el} , odmerka in C_0 (enačba 10) (22):

$$Cl_{\text{joheksol}} = (\text{odmerek} / C_0) \times k_{el} \quad (10)$$

$$V_D = \text{odmerek} / C_0 \quad (\text{enačba 11}) \quad (22) \quad (11)$$

Cl_{joheksol}...plazemski očistek joheksola; odmerek...odmerek joheksola; C₀...koncentracija joheksola ob času t = 0; k_{el}...konstanta hitrosti eliminacije; V_D...volumen porazdelitve.

Volumen porazdelitve joheksola lahko izračunamo na osnovi odmerka in koncentracije joheksola ob času t = 0, kot je prikazano v enačbi 11. Oceno volumna porazdelitve (ECV) joheksola v ekstracelularno tekočino pa lahko določimo tudi s pomočjo nabora osnovnih podatkov o bolniku (11, 23). V študiji korelacije osnovnih podatkov o bolniku in farmakokinetičnih parametrov V_D in k_{el} so ugotovili, da je V_D pozitivno povezan s težo, višino, telesno površino (BSA) in idealno telesno maso (ITM) (11). Literatura navaja dva načina za določitev ECV joheksola; pri prvem načinu ECV določimo na osnovi BSA (23), pri drugem pa na osnovi telesne mase (24).

Očistek joheksola, ki ga dobimo na osnovi enoprostornega modela, ne upošteva zgodnje porazdelitvene faze (22, 25), zato so izračunani očistki joheksola na osnovi enoprostornega modela malce višji od tistih, ki jih dobimo z upoštevanjem celotne površine pod plazemsko krivuljo v dvoprostornem modelu (22). Pri določevanju očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela se zato upošteva Bröchner - Mortensenov popravek (11, 16, 22, 25).

$$Cl_{\text{joheksol BM}} (\text{mL/min}) = 0,990778 \times Cl_{\text{joheksol}} - 0,001218 \times (Cl_{\text{joheksol}})^2 \quad (\text{enačba 12}) \quad (11, 16, 22, 25) \quad (12)$$

Prilagoditev očistka joheksola na povprečno telesno površino (enačba 13):

$$Cl_{\text{joheksol BM}} (\text{mL/min}/1,73 \text{ m}^2) = Cl_{\text{joheksol BM}} (\text{mL/min}) \times 1,73 \text{ m}^2/BSA \quad (13)$$

Cl_{joheksol BM}...očistek joheksola po Bröchner - Mortensenovem popravku; Cl_{joheksol}...očistek joheksola; BSA...telesna površina (m²).

Plazemski očistek joheksola, izračunan s pomočjo dvoprostornega modela, kaže dobro povezavo z ledvičnim očistkom inulina. Če določimo oceno GF na osnovi enoprostornega

modela in upoštevamo Bröchner - Mortensenov popravek, dobimo primerljive očistke joheksola z očitki, določenimi z dvoprostornim modelom, in posledično z očitki inulina (16). Dokazana ni le dobra korelacija plazemskega očistka joheksola z očitkom inulina, ampak tudi z očitkom $^{51}\text{Cr-EDTA}$ in $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ (27).

Pri proučevanju toksičnosti joheksola na glomerule in ledvične tubule v nizkih odmerkih za določevanje ocene GF ni bilo značilnih razlik v vrednostih serumskega kreatinina, razmerja med očitkom kreatinina in očitkom albumina in *N*-acetil-beta-glukozaminidaze pred in po injiciranju joheksola (25). Pri injiciranju joheksola za določevanje GF se ne pojavljajo neželeni učinki, kot so rdečica, srbečica in urtikarija (22, 25), prav tako se zelo redko pojavijo hipotenzija, alergija ali dispeptične težave (27).

1.8 Analizne metode za določevanje joheksola

Za določevanje koncentracije joheksola v bioloških vzorcih so na voljo številne analizne metode, in sicer različne HPLC-UV metode, kolorimetrična metoda, ki vključuje dejodinacijo joheksola z alkalno hidrolizo in temelji na merjenju sproščenega joda z reakcijo s cerijem in arzenom, rentgenska fluorescenca, kapilarna elektroforeza, atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo, uporablja se tudi LC-MS/MS metoda (17). Kapilarna elektroforeza je v primerjavi s HPLC-UV metodami enostavna in daje primerljive rezultate. Analizna metoda, ki temelji na določevanju sproščenega joda z reakcijo s cerijem in arzenom, je dolgotrajna, daje nelinearne odzive in nima ustrezne natančnosti. Rentgenska fluorescenca je glede na ostale analizne metode enostavna za uporabo, vendar zahteva precejšnjo naložbo za opremo, ki je potrebna za izvajanje analize (28). Joheksol lahko določujemo v različnih bioloških vzorcih, in sicer v plazmi, serumu, urinu in blatu (14). Za rutinsko rabo v klinični praksi mora biti metoda za določevanje joheksola enostavna, hitra, stroškovno ugodna in zanesljiva (14, 17).

1.8.1 HPLC-UV metode

Objavljene so številne HPLC-UV metode za določevanje plazemske oz. serumske koncentracije joheksola. (17). Priprava plazemskega vzorca za analizo na HPLC-UV sistemu temelji na obarjanju plazemskih proteinov s 5 % perklorno kislino in centrifugiranju, da dobimo supernatant, ki ga lahko injiciramo v kromatografski sistem (3, 11, 4, 16, 21, 22). Postopek je lahko dopolnjen, in sicer z vorteksiranjem (11, 14) in sonifikacijo v ultrazvočni kadički (14). Komercialno dostopen joheksol sestavljata dva geometrijska izomera, kompleksi endo in ekso oblike. S pomočjo HPLC-UV metode detektiramo oba izomera (17), saj se joheksol iz kromatografske kolone eluira z dvema vrhoma (22). Razmerje med površinama obeh vrhov je konstantno ne glede na spreminjanje pH mobilne faze, zato velja sklep, da vrhova pripadata endo in ekso izomeru joheksola. Iz praktičnega vidika se za določevanje očistka joheksola uporablja površina pod večjim vrhom. Ponavljajoče določitve očistka joheksola na osnovi manjšega vrha dajejo dosledno enake rezultate, kar kaže, da sta oba izomera enako obravnavana v organizmu (22). Maksimum UV absorpcije za joheksol je pri valovni dolžini 244 nm, vendar se zaradi prevelikega šuma na bazni liniji detekcija joheksola izvaja pri valovni dolžini 254 nm (3, 11, 14, 16, 21, 22). Za HPLC-UV analizo bioloških vzorcev so potrebni odmerki 5 mL raztopine joheksola (300 mg joda/ml), da dosežemo ustrezno občutljivost metode, medtem ko so za isto raven občutljivosti pri rentgenski fluorescenci potrebni odmerki okoli 20 mL raztopine joheksola (27). Najpogosteje poteka na HPLC-UV sistemu analiza plazemskih oz. serumskih vzorcev. Za pripravo vzorcev različne metode navajajo volumne plazme oz. seruma od 100 μ L do 1 mL (11, 14, 21, 22). Volumni supernatanta, ki se injicirajo v kromatografski sistem, pa so pri večini objavljenih analiznih metod 20 μ L (3, 11, 16, 22), injicirali pa so tudi 90 μ L (14). Maksimalne plazemske koncentracije joheksola, izmerjene 15 minut po aplikaciji 10 mL raztopine joheksola, se gibljejo od 261 do 674 μ g/mL, odvisno od ledvične funkcije posameznika (14). Štiri ure po aplikaciji 5 mL joheksola pri nobenem od pacientov niso izmerili koncentracije, nižje od 10 μ g/mL (22). V rutinski praksi se plazemske koncentracije joheksola po aplikaciji 5 mL raztopine joheksola navadno gibljejo med 40 in 600 μ g/mL, odvisno od ledvične funkcije bolnika in od preteka časa od aplikacije do vzorčenja plazme (21).

Na HPLC-UV sistemu se izvaja tudi analiza urinskih vzorcev. Ena od analiznih metod navaja zelo enostavno pripravo urinskih vzorcev, ki obsega le redčenje urina z bidestilirano

vodo, temu sledi direktna analiza na HPLC-UV sistemu (21), v drugem primeru pa so urinske vzorce pripravili na enak način kot plazemske, torej z obarjanjem s 5 % perklorno kislino, vorteksiranjem in centrifugiranjem (22). Koncentracije joheksola v urinu po aplikaciji 5 mL raztopine joheksola se gibljejo od 86 do 4144 $\mu\text{g/mL}$ (21). Injiciran odmerek joheksola se preko ledvic izloči v času 12 ur, procent izločenega joheksola skozi ledvice glede na apliciran odmerek je med 94 in 109 % (22).

2 NAMEN DELA

Joheksol je kontrastno sredstvo, ki se lahko uporablja kot eksogeni marker za ocenjevanje ledvične funkcije. V organizmu se ne metabolizira, nespremenjen se izloča skozi ledvici, izključno z GF, zato lahko oceno GF določimo na osnovi njegovega očistka. Intravenska aplikacija joheksola in določevanje njegove plazemske koncentracije je v številnih bolnišnicah v tujini del klinične prakse določevanja ledvične funkcije. Postopek se je izkazal kot natančen, varen, enostaven in stroškovno ugoden. V Sloveniji temelji ocenjevanje ledvične funkcije največkrat na izračunu glomerulne filtracije iz koncentracije serumskega kreatinina.

Namen diplomske naloge je optimizirati in validirati analizno metodo za določanje plazemskih koncentracij joheksola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in UV detekcijo. Plazemske vzorce bomo za analizo pripravili z obarjanjem plazemskih proteinov s 5 % perklorno kislino in centrifugiranjem. Določili bomo pogoje analize, ki bodo zagotavljali enostavno, natančno, točno in hitro metodo.

Z razvito metodo bomo določili plazemske koncentracije joheksola pri bolnikih s srčnim popuščanjem. Koncentracija joheksola bo izmerjena v vzorcu, odvzetem tik pred intravensko aplikacijo joheksola, ter v vzorcih, odvzetih tri in štiri ure po aplikaciji joheksola. Iz izmerjenih koncentracij joheksola bomo izračunali njegov plazemski očistek, ki služi za oceno hitrosti GF, katero bomo primerjali z vrednostmi ocen GF, določenih s pomočjo enačb na osnovi serumskega kreatinina. Ovrednotiti želimo določevanje plazemskih koncentracij joheksola s HPLC-UV metodo kot eno od možnosti za določevanje ledvične funkcije pri bolnikih. Ocenjevanje GF s pomočjo plazemskega očistka eksogenega markerja joheksola bi lahko postalo del klinične prakse za določevanje ledvične funkcije ne le v tujini, ampak tudi v Sloveniji.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki material - plazma

Uporabljali smo humano plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, Ljubljana. Uporabljali smo različne plazme, ki smo jih hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Realne vzorce bolnikov smo dobili iz raziskave z naslovom Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetične parametre bisoprolola in ramiprila ter na oceno ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem, ki se izvaja v bolnišnici Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik.

3.1.2 Standardi

- JOHEKSOL ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{I}_3\text{N}_3\text{O}_9$); $M = 821,138\text{ g/mol}$ (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

3.1.3 Reagenti in topila

- 70 % perklorna kislina, Chromasol V[®] (HClO_4); $M = 100,46\text{ g/mol}$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 85 % ortofosforna kislina (H_3PO_4); $M = 98\text{ g/mol}$ (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Bidestilirana voda – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA), specifična upornost $18,2\text{ M}\Omega\text{cm}$, celokupni organski ogljik (TOC) 5, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- Acetonitril Chromasol V[®] (CH_3CN); $M = 41,05\text{ g/mol}$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)

- 25 % vodna raztopina amonijaka (NH_3); $M = 17,03 \text{ g/mol}$ (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)
- Kalijev hidrogen fosfat pro analysi (KH_2PO_4); $M = 136,08 \text{ g/mol}$ (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Puferski raztopini $\text{pH} = 2$ in $\text{pH} = 3$ (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Puferska raztopina $\text{pH} = 4$ (Panreac Quimica S.A.U., Barcelona, Španija)

3.1.4 Naprave in pribor

- HLADILNIK (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ MDF – U50V (Sanyo Electric Bimedocal, Japonska)
- TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Švica)
- TEHTNICA XP105 (Mettler Toledo, Švica)
- pH METER MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- CENTRIFUGA EPPENDORF 5415 R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- MEŠALNIK LAB DANCER (IKA[®], Staufen, Nemčija)
- MEŠALNIK VIBROMIX 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ULTRAZVOČNA KADIČKA BANDELIN SONOREX DIGITAL 10 P (Schalltec, Mörfelden – Walldorf, Nemčija)
- ELEKTROMAGNETNO MEŠALO ROTAMIX 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- POLAVTOMATSKE PIPETE 2-20 μL , 20-200 μL in 200-1000 μL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- PLASTIČNE EPICE oz. MIKROCENTRIFUGIRKE - PLASTIBRAND[®] (Brand, Nemčija)
- HPLC KOLONE:
 - LUNA C18, $250 \times 4,60 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
 - SYNERGI Hydro C18, $250 \times 4,60 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

- HPLC PREDKOLONA: C18, 4 × 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC SISTEM Agilent technologies 1100 in 1200 series z UV detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)
- STEKLENI INVENTAR: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala, presesalna buča, lij za presesalno bučo
- OSTALI INVENTAR: spatule, nastavki za pipete

3.2 METODE

Pri razvoju in optimizaciji analizne metode smo izhajali iz HPLC-UV in LC-MS/MS metod, objavljenih v različnih člankih (3, 14, 16, 17, 21, 22). Objavljene metode so si podobne, zato smo naredili osnovno shemo za optimizacijo metode, nato pa prilagajali različne parametre, da smo dobili ustrezno metodo.

Osnovna shema:

Priprava plazemskega vzorca:

- 100 µL plazemskega vzorca dodamo od 100 do 400 µL 5 % perklorne kisline
- vorteksiranje (0,5 do 3 minute)
- sonifikacija na ultrazvočni kadički (ni navedena pri vseh objavljenih metodah)
- centrifugiranje (10 min pri 10000 g in temperaturi 4 °C)
- prenos 100 do 150 µL supernatanta v inserte, inserte vstavimo v viala za HPLC

Kromatografski pogoji:

- HPLC-UV sistem
- reverzno-fazna kromatografska kolona (C18, velikost delcev 4-5 µm, dolžina kolone 250 mm, notranji premer 4,6 mm)
- temperatura kolone: 40 °C
- pretok mobilne faze: 1,0–1,5 mL/min
- mobilna faza: voda/acetonitril 95 : 5 (v/v); pH 2 - 3, dosežen z ortofosforno kislino
- UV detektor, valovna dolžina detekcije: 254 nm

3.2.1 Priprava osnovnih raztopin, topil in pufrov

Osnovno raztopino naše učinkovine joheksola v koncentraciji 10 mg/mL smo pripravili v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. Učinkovino smo najprej natehtali v mikrocentrifugirko (mase natehte so bile od 9,97 do 10,13 mg), nato pa glede na točno zatehto dodali toliko bidestilirane vode, da smo dobili točno koncentracijo osnovne raztopine, 10 mg/mL. Le-to smo hranili v hladilniku pri 4 °C največ en mesec.

50 mM fosfatni pufer s pH 3 za mobilno fazo: Na tehtič smo zatehtali 6,804 g KH_2PO_4 in ga kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko ter bučko z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. S pomočjo predhodno umerjenega pH metra smo s 85 % ortofosforno kislino pripravljeno raztopino KH_2PO_4 titrirali do pH 3, jo nato filtrirali s pomočjo presesalne buče in razplinili v ultrazvočni kadički. Pripravljen pufer smo uporabljali za mobilno fazo pri HPLC, pripravljali smo ga pred vsako analizo, tako da je bil pufer vedno sveže pripravljen.

2,5 % raztopina amonijaka: V digestoriju smo v 1,5 mL mikrocentrifugirko odpipetirali 100 μL 25 % vodne raztopine amonijaka in dodali 900 μL bidestilirane vode. Pripravljeno raztopino smo približno 20 sekund vorteksirali. 2,5 % raztopino amonijaka smo pripravljali sproti, pri vsaki pripravi vzorcev.

3.2.2 Optimizacija priprave plazemskega vzorca

Izbira postopka za pripravo plazemskih vzorcev

Odločili smo se, da preizkusimo dve možnosti za pripravo plazemskega vzorca.

- Pri prvem postopku priprave plazemskega vzorca smo 100 μL plazemskega vzorca dodali 300 μL 5 % perklorne kisline, sledilo je vorteksiranje 30 sekund in centrifugiranje 10 min pri 10000 g in 4 °C. **(p1)**
- Pri drugem postopku smo 100 μL plazemskega vzorca prav tako dodali 300 μL 5 % perklorne kisline, sledilo pa je vorteksiranje 3 minute, 5 minut sonifikacije v ultrazvočni kadički in centrifugiranje 10 min pri 10000 g in 4 °C. **(p2)**

100 μL supernatanta smo nato pri obeh postopkih odpipetirali v inserte, te pa vstavili v vialo za HPLC. Po analizi na HPLC smo primerjali površine pod drugim vrhom joheksola. Večja površina pod vrhom pomeni večji izkoristek ekstrakcije.

Spreminjanje pH supernatanta

pH supernatanta, namenjenega za analizo na HPLC sistemu, je bil med 0 in 1. Tako nizek pH injiciranega supernatanta je lahko problematičen za HPLC sistem, saj se lahko poškoduje injektor pa tudi kolona, zato smo iskali primerno rešitev za dvig pH-ja supernatanta.

- Poskusili smo z 200 mM fosfatnim pufrom (KH_2PO_4) s $\text{pH} = 7,4$. 50 μL supernatanta smo dodali 50 μL pufru. (**supernatant 1**)
- Kot drugo možnost smo preizkusili nevtralizacijo z dodatkom 6 mM NaOH, dodajali smo od 10 do 20 μL 6 mM NaOH v 100 μL supernatanta. (**supernatant 2**)
- Preizkusili smo dodajanje 2,5 % raztopine amonijaka. Dodajali smo od 20 do 80 μL 2,5 % amonijaka v 100 μL supernatanta. (**supernatant 3**)

Ker smo z dodatkom pufru k supernatantu dodatno razredčili vzorec, smo zmanjšali volumen 5 % perklorne kisline, ki smo jo v postopku p1 in p2 dodajali plazemskemu vzorcu. Za obarjanje plazemskih proteinov smo tako plazemskemu vzorcu namesto 300 μL dodali 200 μL 5 % perklorne kisline. V postopek za pripravo plazemskega vzorca pa smo dodali redčenje supernatanta z ustreznim pufrom, da smo zagotovili višji pH vzorca za analizo na HPLC. Z zmanjšanjem volumna 5 % perklorne kisline in dodatkom pufru v supernatant smo ohranili osnovno načrtano redčenje.

3.2.3 Priprava plazemskih vzorcev

Priprava plazemskih vzorcev za razvoj metode: V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 225 μL slepe plazme in 25 μL osnovne raztopine standarda, razredčene na ustrezno koncentracijo. Vzorec smo vorteksirali 15 sekund in nato v nove mikrocentrifugirke odpipetirali 100 μL pripravljenega vzorca ustrezne koncentracije in dodali 200 μL 5 % perklorne kisline. Sledilo je 3-minutno vorteksiranje in 5-minutna sonifikacija v

ultrazvočni kadički. Mikrocentrifugirke smo nato zložili v centrifugo in centrifugirali 10 minut pri 10000 g in temperaturi 4 °C. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL supernatanta in mu dodali 70 µL 2,5 % amonijaka ter nastalo raztopino vorteksirali 30 sekund. 150 µL raztopine smo nato odpipetirali v inserte in te vstavili v vialo za HPLC.

Priprava realnih plazemskih vzorcev: 100 µL bolnikove plazme smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in dodali 200 µL 5 % perklorne kisline. Sledilo je 3-minutno vorteksiranje in 5-minutna sonifikacija v ultrazvočni kadički. Mikrocentrifugirke smo nato zložili v centrifugo in centrifugirali 10 minut pri 10000 g in temperaturi 4 °C. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL supernatanta in mu dodali 70 µL 2,5 % amonijaka ter nastalo raztopino vorteksirali 30 sekund. 150 µL raztopine smo nato odpipetirali v inserte in te vstavili v vialo za HPLC.

3.2.4 Optimizacija kromatografije (HPLC)

Izbira kolone

Preizkusili smo dve različni kolini, obe reverzno fazni.

- Luna, C18 250 × 4,60 mm, 5 µm (Phenomenex, ZDA)
- Synergi Hydro, C18 250 × 4,60 mm, 4 µm (Phenomenex, ZDA)

Preučevali smo vpliv posamezne HPLC kolone na čas (dolžino) analize in na ločbo (resolucijo) vrhov preiskovanega analita in komponent iz plazme.

Izbira optimalne mobilne faze

Kot vodni del mobilne faze smo preizkusili:

- voda pH 3, pH uravnan s 85 % ortofosforno kislino (**VD 1**)
- 50 mM fosfatni pufer s pH 3, pH uravnan s 85 % ortofosforno kislino (**VD 2**)
- 50 mM fosfatni pufer s pH 4, pH uravnan s 85 % ortofosforno kislino (**VD 3**)
- 50 mM fosfatni pufer s pH 5, pH uravnan s 85 % ortofosforno kislino (**VD 4**)

Organski del mobilne faze je vedno predstavljal acetonitril.

Spreminjali smo odstotek organske faze v mobilni fazi, in sicer smo preizkusili kombinacije VD 1 in acetonitril v razmerju 95 : 5, 94 : 6, 93 : 7 (v/v) ter kombinacije VD 2 in acetonitril, VD 3 in acetonitril ter VD 4 in acetonitril v razmerju 94 : 6 (v/v).

Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

Preizkusili smo različne pretoke mobilne faze v območju od 1,0 do 1,5 mL/min.

Izbira temperature kolone

Preizkusili smo temperaturo kolone 40 °C.

Pri optimizaciji HPLC-UV analize metode (izbira kolone, mobilne faze, pretoka mobilne faze, temperature kolone) smo proučevali predvsem dva kriterija, in sicer čas oz. dolžino analize in resolucijo oz. ločbo kromatografskih vrhov preiskovanega analita in interferenčnih vrhov iz plazme.

3.2.5 Validacija metode

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da metoda z veliko gotovostjo zagotavlja rezultate, ki točno odražajo lastnosti preiskovanega analita. Validacija bioanalitske metode vključuje postopke, s katerimi dokažemo, da je določena metoda za kvantitativno merjenje določenega analita v biološkem mediju (krvi, urinu, plazmi, serumu), zanesljiva in ponovljiva. Metodo smo validirali po FDA smernicah o validaciji bioanaliznih metod za industrijo (29).

Vrednotili smo naslednje validacijske parametre: linearnost, točnost, natančnost (ponovljivost), uspešnost ekstrakcije (recovery), selektivnost in stabilnost.

Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti

Iz osnovne standardne raztopine joheksola s koncentracijo 10 mg/mL smo z redčenjem pripravili standardne raztopine. Pripravili smo 8 standardnih raztopin in slepi vzorec za umeritveno krivuljo ter tri standardne raztopine za kontrolo kakovosti (kontrolne vzorce oz. QC). Preglednica II prikazuje pripravo standardnih raztopin iz osnovne standardne raztopine, preglednica III pa pripravo kontrolnih vzorcev.

Preglednica II: Priprava standardnih raztopin joheksola (redčitve osnovne standardne raztopine s koncentracijo 10 µg/mL) za umeritveno krivuljo

volumen osnovne standardne raztopine µL	volumen vode µL	koncentracija joheksola µg/mL
0	50	0
2,5	997,5	25
5	995	50
10	990	100
25	975	250
25	475	500
20	180	1000
25	75	2500
50	50	5000

Preglednica III: Priprava kontrolnih vzorcev (QC)

QC	volumen osnovne standardne raztopine µL	volumen vode µL	Koncentracija joheksola µg/mL
nizek (QCl)	5	1245	40
srednji (QCm)	20	480	400
visok (QCh)	200	300	4000

Priprava standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 225 µL slepe plazme in 25 µL ustrezne standardne raztopine s koncentracijami, navedenimi v preglednici II in III. Vzorec smo vorteksirali 15 sekund in ga 100 µL odpipetirali v novo mikrocentrifugirko ter mu dodali 200 µL 5 % perklorne kisline. Sledilo je 3-minutno vorteksiranje, 5-minutna sonifikacija v ultrazvočni kadički in centrifugiranje (10 min, 10000g in 4 °C). V novo mikrocentrifugirko smo

odpipetirali 100 μL supernatanta in mu dodali 70 μL 2,5 % amonijaka ter nastalo raztopino vorteksirali 30 sekund. 150 μL raztopine smo nato odpipetirali v inserte in te vstavili v vialo za HPLC.

Na takšen način smo pripravili slepi in osem standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo ter pet paralel pri vsaki koncentraciji kontrolnih vzorcev (skupaj 15 kontrolnih vzorcev). Pripravljene vzorce smo nato analizirali s HPLC.

Preglednica IV: Koncentracija joheksola v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico

standardni plazemski vzorec	koncentracija joheksola $\mu\text{g/mL}$	standardni plazemski vzorec	koncentracija joheksola $\mu\text{g/mL}$
1	0	6	50
2	2,5	7	100
3	5	8	250
4	10	9	500
5	25		

Preglednica V: Koncentracije joheksola v kontrolnih vzorcih

kontrolni vzorec (QC)	koncentracija joheksola $\mu\text{g/mL}$
QCl	4
QCm	40
QCh	400

Validacija je potekala 3 zaporedne dni, zato smo standardne raztopine in plazemske vzorce za validacijo pripravili na enak način vsak dan posebej.

Linearnost

Linearnost je sposobnost analitskega postopka, da znotraj danega območja daje rezultate, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami proporcionalni koncentraciji analita v vzorcu. Linearnost določamo skozi celotno območje analiznega postopka, in sicer s statistično obdelavo odzivov standardnih vzorcev z metodo linearne regresije. Z metodo linearne regresije dobimo umeritveno premico z enačbo $y = kx + n$, pri čemer je y odziv (površina kromatografskega vrha analita), x je koncentracija analita v vzorcu, k je naklon premice in n je odsek na ordinati. Umeritvena premica predstavlja

statistični model celotne metode in opisuje odnos med koncentracijo analita in odzivom. Korelacijo med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom ovrednotimo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (r) oz. z deteminacijskim koeficientom (r^2).

Za določanje linearnosti se priporoča uporaba šest do osem standardnih vzorcev, ki pokrivajo pričakovani obseg odzivov vzorcev, ter slepi vzorec. Najmanj 75 % standardnih vzorcev, med temi obvezno standardni vzorec pri spodnji limiti kvantifikacije (LLOQ) in standard z najvišjo koncentracijo analita, morajo po izračunu koncentracije iz umeritvene premice odstopati manj kot 15 % od njihove nominalne koncentracije oz. manj kot 20 % pri LLOQ. Metoda ustreza smernicam za linearnost po FDA v danem območju, če dobljeni rezultati ustrezajo postavljenim kriterijem (29).

Točnost

Točnost metode pove, kakšno je ujemanje dobljenih vrednosti s pravo (referenčno) vrednostjo analita v vzorcu. Točnost določimo z analizo kontrolnih vzorcev (QC) z znano koncentracijo analita, in sicer analiziramo vsaj tri različne koncentracije kontrolnih vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, in pri vsaki koncentraciji naredimo pet ponovitev. Za vsak kontrolni vzorec iz odziva izračunamo s pomočjo umeritvene premice njegovo koncentracijo. Povprečne vrednosti koncentracij petih ponovitev pri posamezni koncentraciji kontrolnih vzorcev, izračunanih iz umeritvene premice, ne smejo odstopati za več kot 15 % od prave (referenčne) vrednosti, pri LLOQ pa ne za več kot 20 % (29).

Ponovljivost

Ponovljivost je natančnost znotraj postopka. Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Običajno jo izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variance (KV). Ponovljivost določamo z analizo kontrolnih vzorcev, in sicer vsaj tri različne koncentracije in pri vsaki pet ponovitev. Pri nobeni od koncentracij kontrolnih vzorcev KV petih ponovitev ne sme presegati 15 %, pri LLOQ pa KV ne sme presegati 20 %. Ponavadi določamo znotrajdnevno in meddnevno (vsaj 3 dni) ponovljivost (29).

Območje

Območje je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane linearnost, točnost in natančnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti (29). Območje je odvisno od namena metode.

Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije (LLOQ) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo. Po FDA smernicah je to najnižja točka (standard) na umeritveni premici, ki ustreza naslednjim zahtevam:

- Odziv standarda pri LLOQ je petkrat višji od odziva pri analizi slepega vzorca.
- Odziv standarda pri LLOQ mora ustrezati že prej omenjenim zahtevam za točnost in natančnost (točnost med 80 in 120 % in KV < 20%) (29).

Selektivnost

Selektivnost je zmožnost analitske metode, da nedvoumno določi iskani analit v vzorcu ob prisotnosti ostalih komponent, za katere domnevamo, da so lahko prisotne v vzorcu (komponente biološkega materiala, metaboliti, razgradni produkti, zdravila, ki se sočasno jemljejo, in drugi ksenobiotiki). Kromatografski vrh, ki pripada analitu, ne sme vsebovati drugih komponent. Za določevanje selektivnosti analiziramo najmanj šest slepih vzorcev, pridobljenih iz različnih virov. Pri retencijskem času našega analita ne sme biti prisotnih interferenčnih vrhov (29).

Uspešnost ekstrakcije (recovery)

Uspešnost ekstrakcije analita smo dobili tako, da smo določili razmerje med odzivom ekstrahiranega plazemskega vzorca in neekstrahiranega plazemskega vzorca pri treh različnih koncentracijah analita (koncentracije, ki ustrezajo QCl, QCm in QCh) (29). Ekstrahiran plazemski vzorec smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.2.5 v odstavku Priprava standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti.

Neekstrahiran vzorec pa smo pripravili tako, da smo 100 μL plazme dodali 200 μL 5 % perklorne kisline, sledilo je vorteksiranje, sonifikacija vzorcev v ultrazvočni kadički in centrifugiranje. 100 μL supernatanta smo nato dodali 70 μL 2,5 % amonijaka, kateremu smo predhodno dodali ustrezno količino našega analita, da smo dobili neekstrahirane vzorce s koncentracijami, ki ustrezajo QCh, QCm in QCl. Odziv analita v neekstrahiranem vzorcu je predstavljal 100 %. Izvedli smo tri ponovitve, saj nas je poleg izkoristka ekstrakcije zanimala tudi ponovljivost.

Stabilnost

- Stabilnost po zamrzovanju in odtajanju

Za določevanje stabilnosti po zamrzovanju in odtajanju smo plazmi dodali določen volumen ustrezne standardne raztopine, da smo dobili koncentracije, ki ustrezajo QCl in QCh. Pripravili smo tri paralelke pri vsaki koncentraciji. Izvedli smo tri cikle zamrzovanja in odtajanja, vzorce smo odtajali na sobni temperaturi, zamrznjeni pa so bili vsaj 24 ur. Vzorce smo analizirali v času $t = 0$ in po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja.

- Kratkoročna stabilnost

Za določevanje kratkoročne stabilnosti smo plazmi dodali določen volumen ustrezne standardne raztopine, da smo dobili koncentracije, ki ustrezajo QCl in QCh. Pripravili smo tri paralelke pri vsaki koncentraciji. Pripravljene alikvotne vzorce smo pustili 4 ure na sobni temperaturi, nato pa izvedli pripravo plazemskih vzorcev in analizo na HPLC. Odzive smo primerjali z odzivi vzorcev, pripravljenih takoj po dodatku standardne raztopine v plazmo (v času $t = 0$). Določitev časa za kratkoročno stabilnost temelji na maksimalnem času, ko so vzorci na sobni temperaturi pri izvajanju analizne metode.

- Postpreparativna stabilnost

Določili smo stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku. Pripravili smo standardne plazemske vzorce v koncentracijah, ki ustrezajo QCl, QCm in QCh in jih v treh paralelkah analizirali ob času $t = 0$ in $t = 6$ ur. Ves ta čas so bili vzorci v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C.

3.2.6 Analiza realnih vzorcev

Validirano metodo smo uporabili za analizo realnih vzorcev. Vzorce smo pridobili od bolnikov s srčnim popuščanjem, ki so jim z intravensko injekcijo injicirali 5 mL zdravila Omnipaque 300, kar ustreza 1500 mg joda oz. 3235,5 mg joheksola. Po aplikaciji zdravila so bolnika opazovali še 15 minut. Vzorci krvi so bili odvzeti tik pred aplikacijo joheksola in približno 3 in 4 ure po aplikaciji zdravila. Za analizo plazemskih vzorcev na HPLC-UV sistemu smo porabili 100 μ L plazme.

Na podlagi plazemskih koncentracij joheksola smo izračunali njegov plazemski očistek, tako da smo določili konstanto hitrosti eliminacije in ocenili volumen porazdelitve joheksola. ECV lahko določimo na osnovi BSA (23).

$$\mathbf{EVC}_1 \text{ (mL)} = \mathbf{9985} \times \mathbf{BSA} \text{ (m}^2\text{)} - \mathbf{3431} \text{ (enačba 14) (23)} \quad (14)$$

$$\mathbf{BSA} = 0,024265 \times \mathbf{W}^{0,5378} \times \mathbf{H}^{0,3964}$$

ECV...ocena volumna porazdelitve (mL); BSA...telesna površina (m²); W...telesna masa (kg); H...telesna višina (cm).

Druga možnost pa je, da volumen porazdelitve joheksola ocenimo na osnovi telesne mase, in sicer ločeno za moške in ženske (24).

$$\mathbf{EVC}_2 \text{ (moški) (mL)} = \mathbf{(166} \times \mathbf{TM)} + \mathbf{2490} \text{ (enačba 15) (24)} \quad (15)$$

$$\mathbf{EVC}_2 \text{ (ženske) (mL)} = \mathbf{(95} \times \mathbf{TM)} + \mathbf{6170} \text{ (enačba 16) (24)} \quad (16)$$

ECV...ocena volumna porazdelitve; TM...telesna masa (kg).

Očistek joheksola smo določili na osnovi enačbe:

$$\mathbf{Cl}_{\text{joheksol}} \text{ (mL/min)} = \mathbf{ECV} \text{ (mL)} \times \mathbf{k_{el}} \text{ (min}^{-1}\text{)} \text{ (enačba 17)} \quad (17)$$

Cl_{joheksol} (mL/min)...očistek joheksola; ECV...ocena volumna porazdelitve; k_{el}...konstanta hitrosti eliminacije.

Upoštevali smo Bröchner - Mortensenov popravek za določevanje očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela (enačba 12) (11, 16, 22, 25), izračunane očistke joheksola smo prilagodili na povprečno telesno površino odraslega človeka (enačba 13).

Ocena GF na osnovi serumskega kreatinina

Na voljo so nam bili osnovni podatki o bolnikih s srčnim popuščanjem, in sicer starost, spol, višina, telesna masa in vrednost serumskega kreatinina (S_{Kr}). S pomočjo enačb za določevanje GF na osnovi serumskega kreatinina smo ocenili hitrost glomerulne filtracije pri bolnikih. Izbrali smo tri najpogosteje uporabljene enačbe, in sicer Cockcroft - Gaultovo enačbo za določitev očistka kreatinina (enačba 2), Cockcroft - Gaultovo enačbo z vpeljavo mišične mase za določitev očistka kreatinina (enačba 4) in MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami za določitev ocene GF (enačba 7). Oceno GF smo podali glede na povprečno telesno površino odraslega človeka.

Vrednotenje rezultatov

Rezultate smo obdelali s programom Microsoft Office Excel 2007. Očistke joheksola smo primerjali z ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina. Določili smo korelacijo med našo metodo za ocenjevanje GF na osnovi očistka joheksola in metodami, ki temeljijo na določanju GF na osnovi serumskega kreatinina, in sicer smo določili Pearsonov korelacijski koeficient (r) in determinacijski koeficient (r^2). S pomočjo statističnih testov smo primerjali korelacije med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina in srednje vrednosti ocen GF. Za primerjavo smo uporabili vrednosti, ki so bile prilagojene na telesno površino: $Cl_{joheksol}$ (enačba 13) MDRD (enačba 7), C&G (enačba 3), C&G LBM (enačba 5). Statistični testi, s katerimi smo analizirali podatke, so: t-test značilnosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov, Fisherjev z-test za primerjavo Pearsonovih korelacijskih koeficientov in Studentov t-test odvisnih vzorcev za primerjavo povprečij ocen glomerulne filtracije.

4 REZULTATI

4.1 Optimizacija priprave plazemskega vzorca

Izbira postopka za pripravo plazemskih vzorcev

Pri izbiri postopka za pripravo plazemskih vzorcev za analizo na HPLC smo primerjali površine pod kromatografskim vrhom joheksola plazemskih vzorcev, pripravljenih po postopku p1 in p2, postopka sta opisana v poglavju 3.2.2. Za vsak postopek smo pripravili dve paralelki vzorcev. Glavna razlika med postopkoma je, da traja vorteksiranje plazemskega vzorca po postopku p2 3 minute in ne le 30 sekund kot pri postopku p1, poleg tega pa postopek p2 vsebuje še 5-minutno sonifikacijo vzorcev v ultrazvočni kadički. Pri postopku p2 smo dobili malo večje površine pod kromatografskim vrhom joheksola oz. večji izkoristek ekstrakcije, zato smo se odločili za pripravo nadaljnjih vzorcev po postopku p2.

Preglednica VI: Primerjava površin pod kromatografskim vrhom joheksola po pripravi vzorcev po postopku p1 in p2

ponovitev	koncentracija joheksola v plazemskem vzorcju	postopek 1 (p1)	postopek 2 (p2)	razmerje površin (p1/p2)
	($\mu\text{g/mL}$)	površina pod vrhom joheksola	površina pod vrhom joheksola	(%)
1	1	8,8	15,2	57,9
	2	15,7	24,1	65,2
	10	88,4	101	87,5
	50	448,3	567,1	79,1
	250	3480,3	3492,7	99,6
	750	10248,8	10904,2	94,0
2	1	/	8,5	/
	2	17,1	21,4	79,9
	10	87,6	96,3	91,0
	50	446,0	451,4	98,8
	250	3569,8	3539,3	100,9
	750	10424,5	10779,5	96,7

Spreminjanje pH supernatanta

Pri preizkušanju možnosti za dvig pH-ja supernatanta smo preverjali pH supernatanta s pomočjo pH-lističev. pH supernatanta smo poskušali dvigniti na tri načine, ki so opisani v poglavju 3.2.2. Pri prvi od preizkušenih možnosti (supernatant 1) ni prišlo do spremembe pH-ja, zato smo to možnost ovrgli. Druga možnost na osnovi nevtralizacije kisline (supernatant 2) se ni izkazala za ugodno, saj smo zasledili velike preskoke pH, ali smo še vedno ostali pri pH 1 ali pa se je zgodil preskok do pH 14. V primeru postopka z 2,5 % amonijakom (supernatant 3) nam je uspelo doseči pH 7-8 v celotnem območju plazemskih koncentracij joheksola. 100 μ L supernatanta smo pri pripravi vzorcev dodajali 70 μ L 2,5 % amonijaka, da smo zagotovili ustrezen pH za analizo na HPLC sistemu.

4.2 Optimizacija kromatografije

Izbira kolone

Izbrali smo kolono Synergi Hydro C18 250 \times 4,60 mm 4 μ m (Phenomenex, ZDA), saj smo z njo dosegli najboljšo ločbo (resolucijo) kromatografskih vrhov in kratek čas analize.

Izbira optimalne mobilne faze

Pri izbiri optimalne mobilne faze smo preizkusili različne kombinacije, ki so navedene v poglavju 3.2.4. Pri uporabi mobilne faze, sestavljene iz kombinacije VD 1 in acetonitril v razmerjih 95 : 5, 94 : 6, 93 : 7 (v/v), so se pojavljale interferenice iz plazme v območju kromatografskih vrhov joheksola. S kombinacijami VD 2 in acetonitril, VD 3 in acetonitril ter VD 4 in acetonitril v razmerju 94 : 6 (v/v) smo dosegli boljšo ločbo (resolucijo) vrhov našega analita in interferenc iz plazme; kot najustreznejša se je izkazala kombinacija VD 2 in acetonitril. Na čas analize sprememba vodnega dela mobilne faze ni imela večjega vpliva, v vseh primerih je bil čas analize ustrezno kratek.

Optimalna mobilna faza:

- 94 % vodnega dela: 50 mM fosfatni pufer s pH 3 (VD 2)

- 6 % organskega dela: acetonitril

Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

Izbrali smo pretok 1,2 mL/min, saj smo z njim dosegli najboljšo ločbo kromatografskih vrhov našega analita in relativno kratek čas analize.

Izbira optimalne temperature kolone

Uporabili smo temperaturo kolone 40 °C, ki je navedena v objavljenih analiznih metodah (16, 21) in se je tudi pri naši analizi metodi izkazala za ustrezno.

Izbira kromatografskega vrha joheksola za izračun plazemskih koncentracij

Joheksol se iz kromatografske kolone eluira z dvema kromatografskima vrhoma, za izračun plazemskih koncentracij iz odzivov (površin pod kromatografskim vrhom) smo upoštevali površino pod drugim vrhom joheksola. Literatura navaja, da se razmerje med prvim in drugim kromatografskim vrhom ohranja in je zato smiselno za izračun koncentracij iz odzivov uporabiti površino pod večjim, drugim vrhom joheksola (22). Iz preglednice VII je razvidno, da se tudi pri naši analizi metodi razmerje med vrhoma ohranja. Razmerje smo določali pri štirih paralelkah plazemskih vzorcev s štirimi različnimi koncentracijami joheksola.

Preglednica VII: Razmerje med površino pod prvim in drugim kromatografskim vrhom joheksola

koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	1. ponovitev		razmerje (%) (površina1/ površina2)	2. ponovitev		razmerje (%) (površina1/ površina2)
	površina 1	površina 2		površina 1	površina 2	
10	25,4	156,1	16,27	25,4	152,2	16,69
50	161,4	921,1	17,52	174,1	947,3	18,38
100	297,8	1654,8	18,00	325,7	1779,8	18,30
500	820,4	4639,8	17,68	819,1	4603,6	17,79
povprečje			17,37			17,79
SD			0,76			0,78
KV (%)			4,36			4,38
koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	3. ponovitev		razmerje (%) (površina1/ površina2)	4. ponovitev		razmerje (%) (površina1/ površina2)
	površina 1	površina 2		površina 1	površina 2	
10	/	/	/	35,8	176	20,34
50	156,3	848,1	18,43	159,4	860,2	18,53
100	249,1	1620,4	18,15	290,0	1567,5	18,50
500	968,4	5450,0	17,77	953,0	5309,2	17,95
povprečje			18,12			18,83
SD			0,33			1,04
KV (%)			1,83			5,53

- koeficient variacije med štirimi paralelkami: KV = 3.42 %.

4.3 Končna optimizirana metoda

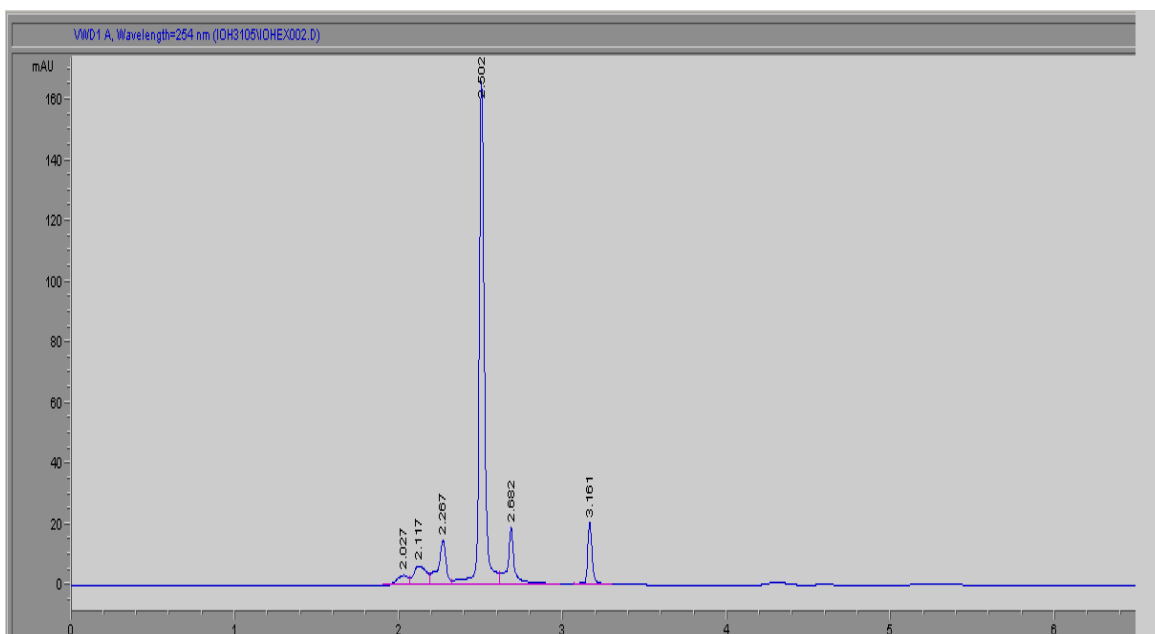
Priprava plazemskega vzorca:

- 100 μL bolnikove plazme dodamo 200 μL 5 % perklorne kisline
- vorteksiranje (3 minute)
- sonifikacija v ultrazvočni kadički (5 minut)
- centrifugiranje (10 minut, 10000g in 4 °C)
- odpipetiramo 100 μL supernatanta in mu dodamo 70 μL 2,5 % amonijaka (nastalo raztopino 30 sekund vorteksiramo)
- 100 μL odpipetiramo v inserte za HPLC
- inserte vstavimo v vialo za HPLC

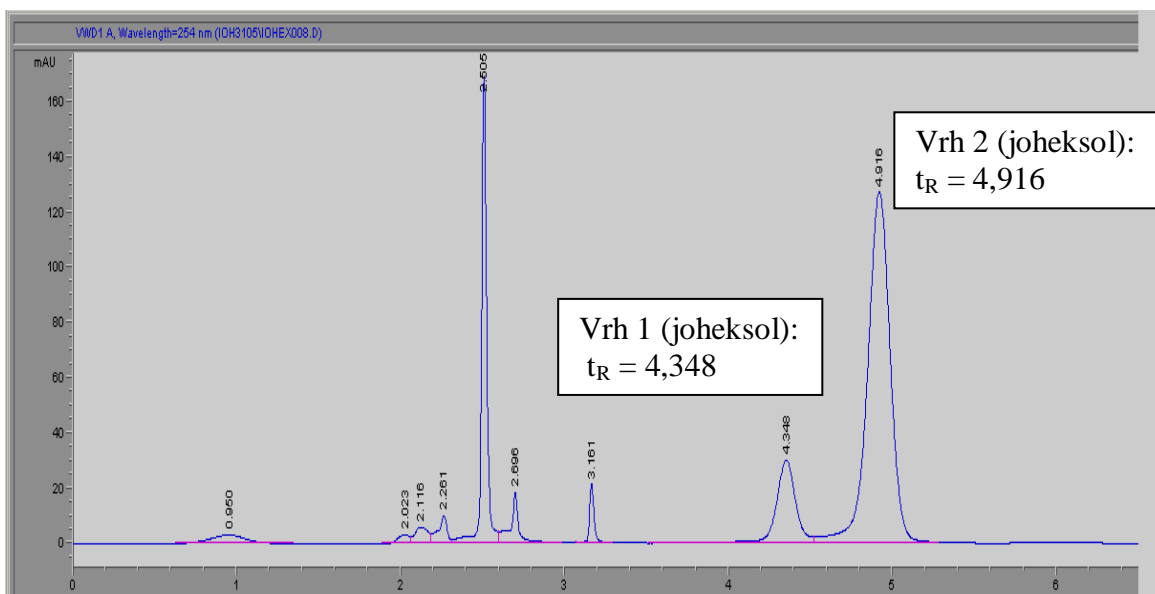
Analiza na HPLC:

- kolona: Synergi Hydro C18, 250 \times 4,60 mm, 4 μm (Phenomenex, ZDA)

- mobilna faza: 94 % vodnega dela: 50 mM fosfatni pufer s pH 3
6 % organskega dela: acetonitril
- pretok mobilne faze: 1,2 mL/min
- temperatura kolone: 40 °C
- valovna dolžina detekcije: 254 nm
- volumen injiciranja 50 µL
- čas analize: 7 minut



Slika 2: Kromatogram slepega vzorca



Slika 3: Kromatogram standardnega plazemskega vzorca s koncentracijo 100 µg/mL

Slika 2 prikazuje kromatogram slepega vzorca, na sliki 3 pa je kromatogram standardnega plazemskega vzorca s koncentracijo 100 µg/mL.

4.4 Validacija metode

Validacijo smo izvajali tri zaporedne dni, po postopkih, ki so opisani v poglavju 3.2.5. Pri obdelavi podatkov smo upoštevali površine pod drugim kromatografskim vrhom joheksola.

4.4.1 Linearost

V preglednici VIII so podani odzivi (površine pod drugim kromatografskim vrhom) standardnih plazemskih vzorcev, na osnovi katerih smo vsak dan validacije določili enačbo umeritvene krivulje.

Preglednica VIII: Odzivi joheksola v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno krivuljo

koncentracija joheksola (µg/mL)	odziv (površina pod drugim vrhom)		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	0	0	0
2,5	25,2	31,7	29,7
5	56,0	60,5	58,7
10	111,5	123,1	116,2
25	266,7	297,5	298,2
50	563,8	529,4	604,7
100	1179,7	1200,2	1193,8
250	2809,1	2806,0	/
500	5762,7	5784,2	5884,9

Na podlagi odzivov v preglednici VIII smo določili enačbe umeritvene krivulje. V preglednici IX so podane enačbe umeritvenih krivulj in determinacijski koeficienti (r^2).

Preglednica IX: Enačbe umeritvenih krivulj in determinacijski koeficienti (r^2) po dnevih

dan validacije	enačba umeritvene krivulje	determinacijski koeficient (r^2)
1.dan	$y = 11,497x - 7,6$	0,9998
2.dan	$y = 11,517 - 2,781$	0,9996
3.dan	$y = 11,765 + 5,569$	1

V preglednici X so podane točnosti koncentracij joheksola, ki smo jih izračunali na osnovi enačb umeritvene krivulje, glede na nominalne (prave) koncentracije v standardih.

Preglednica X: Točnost koncentracij joheksola, izračunanih iz umeritvene premice

koncentracija joheksola ($\mu\text{g/mL}$)	točnost (%)		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	/	/	/
2,5	114,1	119,8	82,1
5	110,6	109,9	90,3
10	103,6	109,3	94,0
25	95,4	104,3	99,5
50	99,4	92,4	101,9
100	103,3	104,5	101,0
250	98,0	97,6	/
500	100,4	100,5	99,9

Nobeden od rezultatov ne odstopa več, kot je dovoljeno po FDA smernicah.

4.4.2 Točnost

Točnost metode smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5 Validacija metode. Preglednica XI prikazuje odzive (površine pod drugim vrhom) joheksola v QC vzorcih in točnost metode za določanje plazemske koncentracije joheksola.

Preglednica XI: Odzivi joheksola v QC vzorcih in točnost metode

	odziv (površina pod drugim vrhom)								
	QCl (4 $\mu\text{g/mL}$)			QCm (40 $\mu\text{g/mL}$)			QCh (400 $\mu\text{g/mL}$)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	45,8	47,4	46,5	485,6	466,8	476,8	4959,3	4513,1	4339,8
2.	43,6	43,1	47,7	482,7	442,4	482,7	5017,7	4471,8	4150,5
3.	43,6	44,7	44,7	485,2	436	470	5001,2	4818,8	4340,5
4.	46,4	47,8	46,5	485,1	477,6	422,1	5216,6	4719,5	3977,6
5.	43,6	46,1	44,6	484,2	477,4	465,9	4923,2	4580,1	4449,9
povprečje	44,6	45,8	46	484,5	460,0	463,5	5023,6	4620,7	4251,7
točnost (%)	113,5	105,5	85,9	107,0	100,5	97,3	109,4	100,4	90,2

Vsi rezultati za točnost metode so znotraj okvirov, ki jih določajo smernice po FDA.

4.4.3 Ponovljivost

Ponovljivost metode smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5 Validacija metode.

Znotrajdnevna ponovljivost

Preglednica XII prikazuje rezultate znotrajdnevne ponovljivosti.

Preglednica XII: Znotrajdnevna ponovljivost metode

koeficient variance (KV) (%)								
QCl (4µg/mL)			QCm (40µg/mL)			QCh (400 µg/mL)		
1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
3,11	4,25	2,88	0,24	4,27	5,18	2,27	3,14	4,40

Znotrajdnevna ponovljivost metode ustreza smernicam po FDA za vse tri dni.

Meddnevna ponovljivost

Preglednica XIII prikazuje rezultate meddnevne ponovljivosti.

Preglednica XIII: Meddnevna ponovljivost metode

	QCl (4 µg/mL)		QCm (40 µg/mL)		QCh (400 µg/mL)	
	povprečni odziv	povprečna izračunana koncentracija	povprečni odziv	povprečna izračunana koncentracija	povprečni odziv	povprečna izračunana koncentracija
1. dan	44,60	4,54	484,56	42,81	5023,60	437,61
2. dan	45,82	4,22	460,04	40,19	4620,66	401,44
3. dan	46,00	3,44	463,50	38,92	4251,66	360,91
KV (%)	1,67	13,97	2,83	4,88	8,34	9,59

Meddnevna ponovljivost metode ustreza smernicam po FDA.

4.4.4 Območje

Območje smo določili na osnovi območja linearnosti. Območje metode za določevanje našega analita joheksola je od 2,5 µg/mL do 500 µg/mL.

4.4.5 Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije za naš analit joheksol je najnižja točka umeritvene krivulje, v našem primeru 2,5 µg/mL.

4.4.6 Selektivnost

Z analizo šestih slepih plazemskih vzorcev smo dokazali, da pri retencijskem času joheksola ni interferenčnih vrhov. Pri enem od šestih slepih plazemskih vzorcev je bil prisoten majhen interferenčni vrh v območju retencijskega časa joheksola, vendar je bila površina pod interferenčnim vrhom približno sedemkrat manjša od površine pod vrhom spodnje limite kvantifikacije (LLOQ), po FDA smernicah pa je določeno, da mora biti površina interferenčnega vrha vsaj petkrat manjša od površine pod vrhom LLOQ. Pri ostalih petih slepih plazemskih vzorcih interferenčnih vrhov v območju retencijskega časa joheksola ni bilo.

4.4.7 Uspešnost ekstrakcije (recovery)

Uspešnost ekstrakcije (recovery) smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5 Validacija metode.

Preglednica XIV: Uspešnost ekstrakcije (recovery)

vzorec	EKSTRAHIRAN VZOREC		NEEKSTRAHIRAN VZOREC		izkoristek (%)	povpr. izkoristek (%)	KV izkoristkov (%)
	povprečen odziv (treh paralelk)	KV (%)	povprečen odziv (treh paralelk)	KV (%)			
QCl 4 µg/mL	45,8	1,39	52,9	1,89	86,52	85,04	2,88
QCm 40 µg/mL	463,1	0,86	536,1	0,32	86,38		
QCh 400µg/mL	4405,0	1,66	5357,9	1,43	82,21		

Iz rezultatov v preglednici XIV je razvidno, da je izkoristek ekstrakcije približno 85 % in da smo dobili dobro ponovljiv izkoristek pri vseh koncentracijah. Dosegli smo tudi ustrezno ponovljivost po FDA smernicah, dokazano z ustreznim KV, tako za ekstrahirane kot tudi za neekstrahirane vzorce.

4.4.8 Stabilnost

Stabilnost po zamrzovanju in odtajanju

Plazemske vzorce za določevanje stabilnosti po zamrzovanju in odtajanju smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5 Validacija metode. Preglednica XV prikazuje rezultate določevanja stabilnosti po zamrzovanju in odtajanju, in sicer relativno spremembo odziva joheksola v odvisnosti od časa.

Preglednica XV: Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtajanju

koncentracija	POVPREČEN ODZIV pred cikli zamrzovanja in odtajanja	POVPREČEN ODZIV po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja	sprememba odziva (%)
QCl 4 µg/mL	45,8	45,5	0,51
QCh 400 µg/mL	4405,0	4314,9	2,04

Kratkoročna stabilnost

Vzorci za določevanje kratkoročne stabilnosti smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5 Validacija metode. Preglednica XVI prikazuje rezultate kratkoročne stabilnosti, in sicer relativno spremembo odziva joheksola v odvisnosti od časa.

Preglednica XVI: Kratkoročna stabilnost plazemskih vzorcev

koncentracija	POVPREČEN ODZIV t = 0 h	POVPREČEN ODZIV t = 4 h	sprememba odziva (%)
QCl 4 µg/mL	45,8	45,9	0,29
QCh 400 µg/mL	4405,0	4550,7	3,31

Postpreparativna stabilnost

Postpreparativno stabilnost smo določali po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5 Validacija metode. Preglednica XVII prikazuje rezultate postpreparativne stabilnosti, in sicer relativno spremembo odziva joheksola v odvisnosti od časa.

Preglednica XVII: Postpreparativna stabilnost.

koncentracija	POVPREČEN ODZIV t = 0 h	POVPREČEN ODZIV t = 6 h	sprememba odziva (%)
QCl 4 µg/mL	45,8	46,0	0,44
QCm 40 µg/mL	463,2	459,2	0,86
QCh 400 µg/mL	4405,0	4400,3	0,11

4.5 Analiza realnih vzorcev

4.5.1 Očistki joheksola

Preglednica XVIII prikazuje rezultate meritev realnih vzorcev, in sicer odzive (površine pod drugim vrhom joheksola) in izračunane plazemske koncentracije joheksola v plazmi po treh in štirih urah po aplikaciji odmerka.

Preglednica XVIII: Rezultati analize realnih vzorcev, odzivi in izračunane plazemske koncentracije joheksola

vzorec	odziv t = 3h	koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) t = 3h	odziv t = 4h	koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) t = 4h
1	1066,5	92,1	772,3	66,5
2	983,8	89,7	644,0	58,6
3	748,1	68,1	600,1	54,6
4	823,1	75,0	654,1	59,5
5	1603,0	138,6	1219,8	105,3
6	1053,7	96,0	877,9	80,0
7	1045,5	90,2	865,2	74,6
8	1248,3	107,8	1075,7	92,9
9	1455,7	132,8	1219,3	111,2
10	971,8	83,6	713,1	61,2
11	1794,5	154,7	1434,7	123,6
12	1129,6	97,2	/	/
13	1176,1	101,2	961,2	82,7
14	1220,4	105,1	1051,9	90,5
15	890,2	76,5	632,2	54,2
16	1051,9	90,5	877,8	75,4
17	1327,7	114,4	1033,6	88,9
18	699,3	60,2	531,6	45,7
19	916,2	79,0	782,0	67,4
20	/	/	830,3	71,3

Preglednica XIX prikazuje izračunane ocene volumna porazdelitve ECV_1 in ECV_2 . ECV_1 smo izračunali s pomočjo enačbe 14, ECV_2 pa na osnovi enačbe 15 za moške in enačbe 16 za ženske. Izračunane ECV po obeh postopkih se bistveno ne razlikujejo. Za izračun očistka joheksola smo upoštevali ECV_1 .

Preglednica XIX: Ocene volumna porazdelitve

vzorec	ECV_1 (mL)	ECV_2 (mL)	razmerje ECV_1/ECV_2 (%)
1	13385	12155	110,1
2	9510	10065	94,5
3	17880	17264	103,6
4	16943	16749	101,2
5	12174	11566	105,3
6	13542	12450	108,8
7	15927	14055	113,3
8	17980	18094	99,4
9	12183	11585	105,2
10	19028	19256	98,8
11	13326	12345	107,9
12	13429	12298	109,2
13	16070	15438	104,1
14	14127	13280	106,4
15	16382	15770	103,9
16	20263	17190	117,9
17	16335	15853	103,0
18	16025	15438	103,8
19	18694	18592	100,5
20	14187	12915	109,8

Očistke joheksola smo izračunali iz konstante hitrosti eliminacije (k_{el}) in ocene volumna porazdelitve ECV_1 na osnovi enačbe 17. V preglednici XX so prikazane izračunane k_{el} , ECV_1 in očistki joheksola, podani na standardno telesno površino odraslega človeka. Pri izračunu očistkov joheksola smo upoštevali Bröchner - Mortensenov popravek za določanje očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela (enačba 12).

Preglednica XX: Konstante hitrosti eliminacije, ocene volumna porazdelitve in plazemski očistki joheksola

vzorec	k_{el}	ECV ₁ (mL)	Cl joheksol (mL/min/1,73m ²)
1	0,256	13385	54,89
2	0,425	9510	81,27
3	0,260	17880	57,15
4	0,330	16943	71,42
5	0,218	12174	46,77
6	0,163	13542	34,88
7	0,181	15927	42,26
8	0,170	17980	39,71
9	0,193	12183	41,82
10	0,278	19028	62,42
11	0,187	13326	41,80
12	0,254 *	13429	55,09
13	0,186	16070	41,61
14	0,176	14127	38,20
15	0,302	16382	65,01
16	0,167	20263	40,79
17	0,188	16335	42,30
18	0,213	16025	47,21
19	0,158	18694	36,84
20	0,296 *	14187	64,95
povprečje	/	15370	50,32
stand. odklon			+/- 13,00

* k_{el} izračunana na osnovi podatka o koncentraciji joheksola po treh oz. štirih urah po aplikaciji joheksola in izračunani koncentraciji pri času 0h na osnovi odmerka in ocenjenega volumna porazdelitve ($C_0 = \text{odmerek} / \text{ECV}_1$; C_0 (13) = 240,93 $\mu\text{g/mL}$ in C_0 (22) = 228,07 $\mu\text{g/mL}$).

4.5.2 Ocene GF na osnovi serumskega kreatinina

V preglednici XXI so podane ocene GF na osnovi serumskega kreatinina, vrednosti smo dobili s pomočjo treh enačb, in sicer MDRD enačbe s štirimi spremenljivkami (enačba 7), Cockroft - Gaultove enačbe (enačba 2, enačba 3) in Cockroft - Gaultove enačbe z vpeljavo mišične mase (enačba 4, enačba 5).

Preglednica XXI: Vrednosti ocene GF na osnovi serumskega kreatinina (MDRD, C&G, C&G LBM), podane na standardno telesno površino odraslega človeka

vzorec	MDRD (mL/min/1,73m²)	C&G (mL/min/1,73m²)	C&G LBM (mL/min/1,73m²)
1	69,84	58,91	50,49
2	103,62	61,44	64,74
3	54,72	40,90	42,61
4	74,60	56,55	53,01
5	55,51	52,40	43,59
6	71,56	39,85	56,65
8	58,03	58,74	36,31
9	47,22	42,17	36,37
10	43,95	41,93	34,43
11	60,27	49,21	41,56
12	47,18	46,21	33,27
13	45,18	38,64	30,19
14	43,46	36,56	39,48
15	46,24	34,35	42,84
16	71,34	49,81	53,11
17	38,46	52,72	27,00
19	41,00	38,46	39,49
20	61,11	43,91	46,83
21	43,81	39,58	36,10
22	64,70	67,04	45,04
povprečje	57,09	47,47	42,65
stand. odklon	+/- 15,79	+/- 9,36	+/- 9,42

MDRD...MDRD enačba s štirimi spremenljivkami za oceno glomerulne filtracije; C&G...Cockroft - Gaultova enačba za določevanje očistka kreatinina; C&G LBM... Cockroft - Gaultova enačba z vpeljavo mišične mase za določevanje očistka kreatinina.

4.5.3 Primerjava povprečnih vrednosti ocen GF

Izračunali smo povprečno vrednost očistkov joheksola in ocen GF na osnovi serumskega kreatinina. Povprečne vrednosti ocen GF s pomočjo enačb so podane v preglednici XXI, povprečna vrednost očistkov joheksola pa je navedena v preglednici XX. Najvišjo povprečno vrednost ocene GF dobimo z enačbo MDRD, in sicer 57,09 mL/min/m², najnižjo povprečno vrednost ocene GF pa s pomočjo enačbe C&G LBM, in sicer 42,45 mL/min/m², s C&G enačbo za oceno GF pa smo dobili povprečno vrednost 47,47 mL/min/m², ki je najbližje povprečni vrednosti očitkov joheksola 50,32 mL/min/m². S

Studentovim t-testom odvisnih vzorcev smo dokazovali značilnost razlik med povprečno vrednostjo očistkov joheksola in povprečno vrednostjo ocen GF na osnovi serumskega kreatinina. Preizkušali smo hipotezo H_0 : razlika med srednjo vrednostjo očistkov joheksola in srednjo vrednostjo ocen GF na osnovi serumskega kreatinina je enaka nič ($H_0: \mu_d = 0$), pri stopnji tveganja $\alpha < 0,05$. Rezultati statističnega testa so prikazani v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Primerjava povprečnih vrednosti ocen GF, statistični podatki

	n - 1	p	prilagojena p	SZ/SN
Cl joheksol – MDRD	19	0,008775	0,017551	SZ
Cl joheksol - C&G	19	0,227231	0,227231	SN
Cl joheksol - C&G LBM	19	0,004439	0,013317	SZ

n – 1...stopinje prostosti; p...p-vrednost ($\alpha = 0,05$, dvostranski test); prilagojena p...p-vrednost z upoštevanim Bonferroni – Holmsvim popravkom ($\alpha = 0,05$, dvostranski test); Cl joheksol...očistek joheksola; MDRD...ocena glomerulne filtracije po MDRD enačbi; C&G...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi; C&G LBM...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi z vpeljavo mišične mase; SZ...statistično značilna razlika; SN...ni statistično značilne razlike.

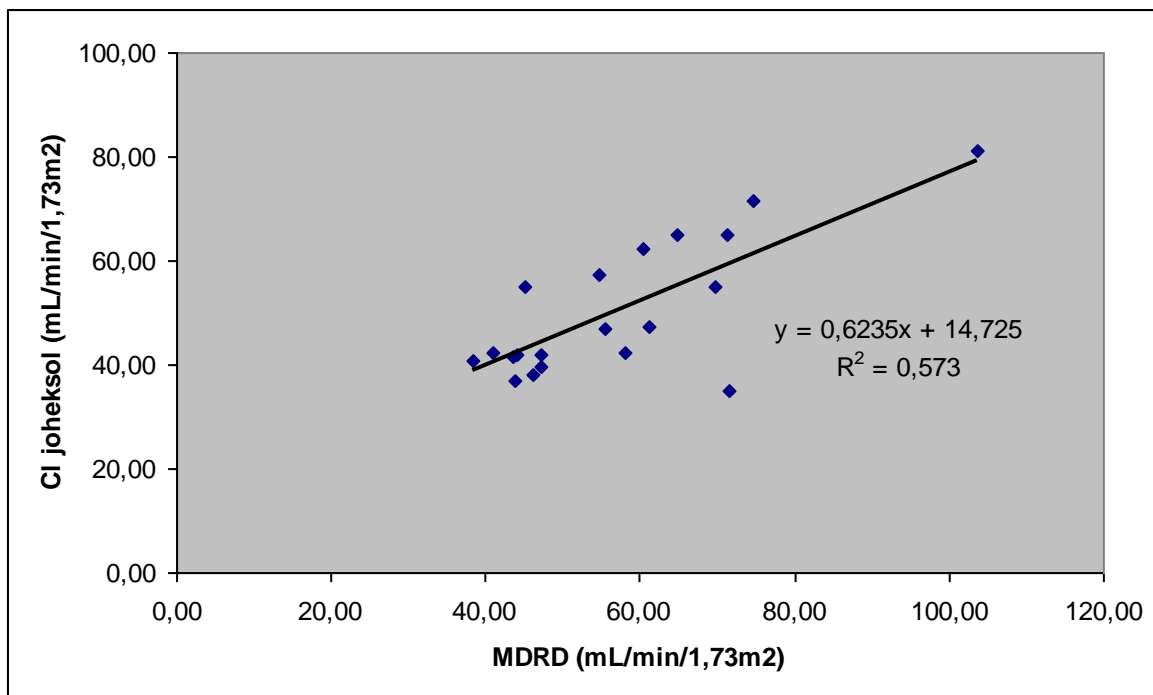
4.5.4 Korelacija med ocenami ledvične funkcije

Korelacijo (odnos) med vrednostmi očistka joheksola in ocenami glomerulne filtracije, izračunanimi s pomočjo enačb MDRD, C&G in C&G LBM, smo določili tako, da smo pri vseh enačbah izračunali Pearsonov korelacijski koeficient (r) in determinacijski koeficient (r^2).

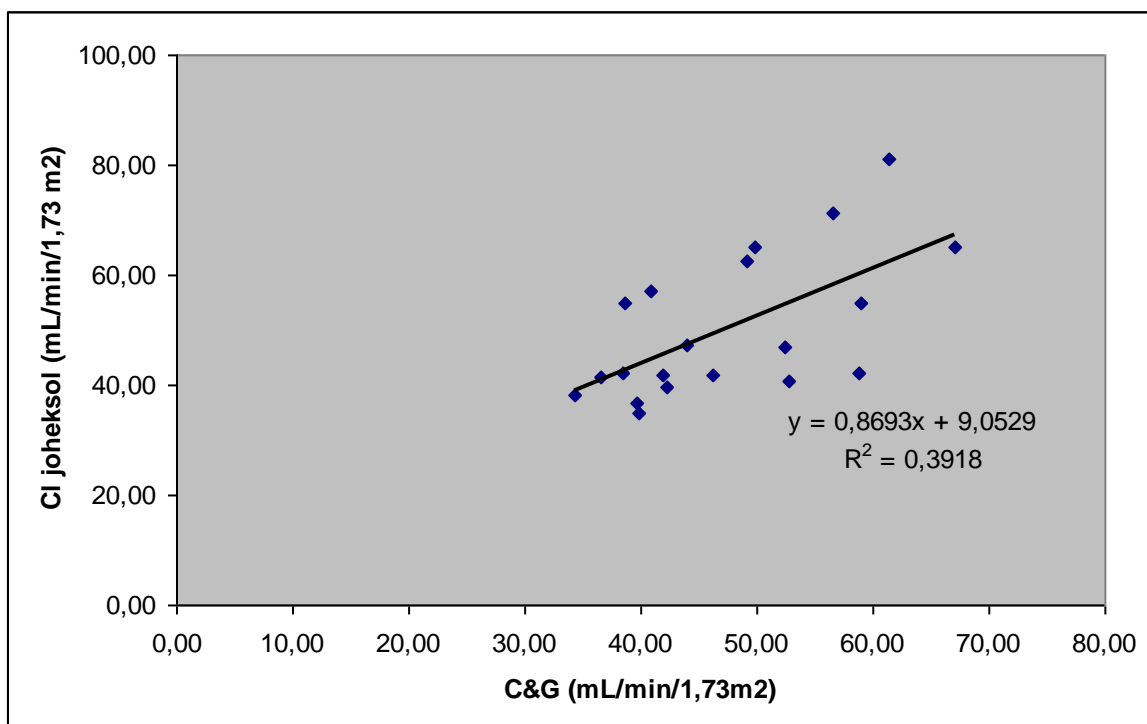
Preglednica XXIII: Pearsonovi korelacijski koeficienti (r) in determinacijski koeficienti (r^2)

	Cl joheksol (mL/min/m²)	
	r	r²
MDRD (mL/min/m²)	0,7570	0,5730
C&G (mL/min/m²)	0,6259	0,3918
C&G LBM (mL/min/m²)	0,5917	0,3501

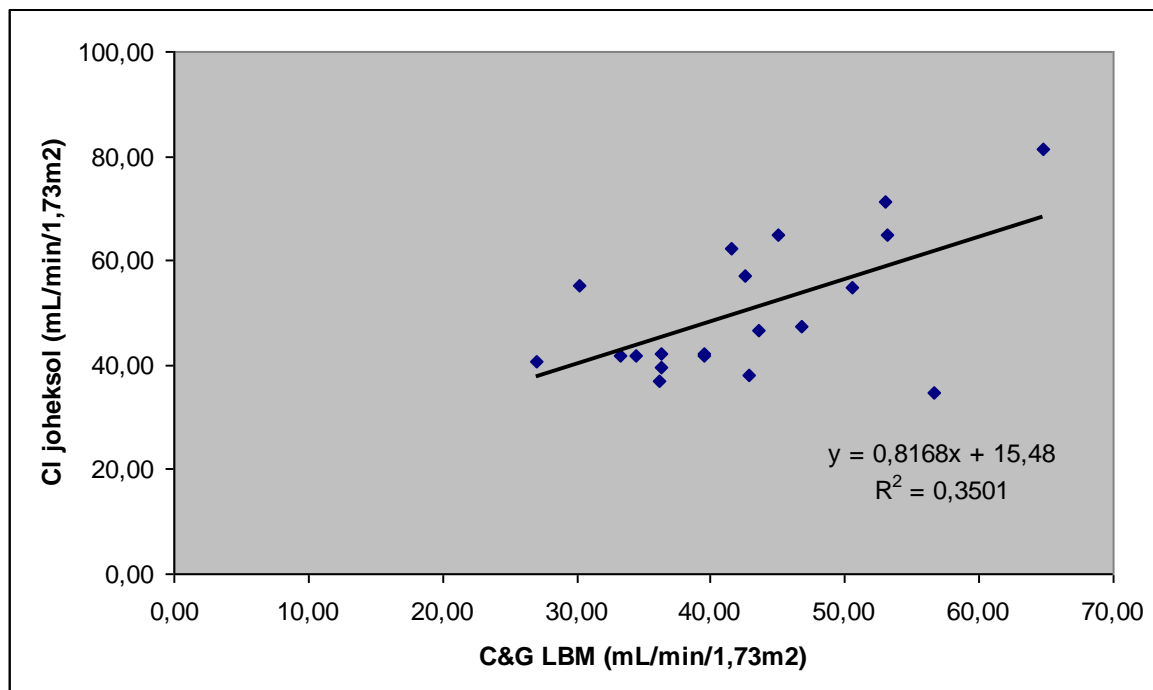
Korelacijo (odnos) smo ponazorili tudi grafično, in sicer s pomočjo razsevnih grafikonov, ki prikazujejo moč linearne povezave med očitstki joheksola in ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina.



Slika 4: Korelacija med očitstki joheksola in ocenami GF na osnovi MDRD enačbe



Slika 5: Korelacija med očitstki joheksola in ocenami GF na osnovi Cockroft - Gaultove enačbe



Slika 6: Korelacija med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi Cockcroft - Gaultove enačbe z vpeljavo mišične mase

T-test značilnosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov

V skupini naših bolnikov ($n = 20$) smo preizkušali hipotezo $H_0: \rho = 0$, ki predpostavlja, da je izračunani r le posledica naključnega vzorca, v katerem korelacija ne obstaja pri stopnji tveganja $\alpha = 0,01$. Z veljavnostjo alternativne hipoteze $H_a: \rho \neq 0$ smo ugotovili statistično pomembno povezavo med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina.

Preglednica XXIV: Korelacija med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina (MDRD, C&G in C&G LBM)

	Cl joheksol (mL/min/m ²)				SZ/SN
	n	r	p	prilagojena p	
MDRD (mL/min/m²)	20	0,75699	0,000112	0,000335	SZ
C&G (mL/min/m²)		0,62596	0,003154	0,006308	SZ
C&G LBM (mL/min/m²)		0,59169	0,005994	0,005994	SZ

n...število vzorcev; r...Pearsonov korelacijski koeficinet; p...p-vrednost ($\alpha = 0,01$, dvostranski test); prilagojena p...p-vrednost z upoštevanim Bonferroni - Holmsovim

popravkom ($\alpha = 0,01$, dvostranski test); Cl joheksol...očistek joheksola, MDRD...ocena glomerulne filtracije po MDRD enačbi; C&G...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi; C&G LBM...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi z vpeljavo mišične mase; SZ...statistično značilna povezava; SN...ni statistično značilne povezave.

Fischerjev z-test za primerjavo Pearsonovih korelacijskih koeficientov

S pomočjo Fischerjevega testa za primerjavo Pearsonovih korelacijskih koeficientov smo ugotavljali razlike med posameznimi korelacijskimi koeficienti. Preizkušali smo hipotezo $H_0: \rho_1 = \rho_2 = \dots = \rho_n$. Nismo dokazali statistično značilnih razlik v moči povezave med katerokoli kombinacijo parov: MDRD-Cl joheksol, C&G-Cl joheksol, C&G LBM-Cl joheksol. Rezultati statističnega testa so prikazani v preglednici XXV in preglednici XXVI.

Preglednica XXV: Fisherjeva transformacija korelacijskih koeficientov $r \rightarrow z$

	n	r	z
Cl joheksol -MDRD	20	0,757	0,989
Cl joheksol - C&G	20	0,626	0,735
Cl joheksol - C&G LBM	20	0,592	0,680

n...število vzorcev; r...Pearsonov korelacijski koeficient; z...Fischerjeva transformacija r-vrednosti.

Preglednica XXVI: p-vrednosti primerjave korelacij med posameznimi pari

	p	prilagojena p	SZ/SN
Cl joheksol - MDRD in Cl joheksol - C&G	0,4592	1,0146	SN
Cl joheksol - MDRD in Cl joheksol - C&G LBM	0,3682	1,0146	SN
Cl joheksol - C&G in Cl joheksol - C&G LBM	0,8728	1,0146	SN

p...p-vrednost ($\alpha = 0,05$, dvostranski test); prilagojena p...p-vrednost z upoštevanim Bonferroni - Holmsvim popravkom ($\alpha = 0,05$, dvostranski test); Cl joheksol...očistek joheksola; MDRD...ocena glomerulne filtracije po MDRD enačbi; C&G...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi; C&G LBM...ocena glomerulne filtracije po Cockroft - Gaultovi enačbi z vpeljavo mišične mase; SZ...statistično značilna razlika; SN...ni statistično značilne razlike.

5 RAZPRAVA

Določevanje hitrosti glomerulne filtracije je vsesplošno sprejeti način za oceno hitrosti napredovanja in vpliva zdravljenja na napredujočo ledvično bolezen (3). Ponavadi se hitrost glomerulne filtracije določa na osnovi serumskega kreatinina, kot eksogeni marker za določevanje GF pa je najbolj uveljavljen inulin. Uporaba očistka joheksola za določevanje ledvične funkcije je ponekod v tujini že sprejeta metoda (14). V okviru diplomskega dela smo zato na osnovi do sedaj objavljenih metod za določevanje plazemske koncentracije joheksola optimizirali in validirali HPLC-UV metodo. Pridobili smo enostavno, dokaj hitro in zanesljivo metodo, s katero smo analizirali plazemske vzorce bolnikov s srčnim popuščanjem, dobljene plazemske koncentracije joheksola pa smo uporabili za izračun plazemskega očistka joheksola. Na osnovi očiščkov joheksola smo ocenili hitrost glomerulne filtracije pri bolnikih. Ocene GF na osnovi očiščkov joheksola smo primerjali z metodami za določevanje GF, ki temeljijo na serumskem kreatininu.

5.1 Optimizacija priprave plazemskega vzorca

Večina objavljenih metod za določevanje plazemske oz. serumske koncentracije joheksola navaja pri pripravi plazemskega vzorca le obarjanje plazemskih proteinov s 5 % perklorno kislino in centrifugiranje (10 min, 10000g, 4 °C) (3, 16, 21, 22). Nekatere metode vključujejo pri pripravi vzorca dodatno še vorteksiranje (11, 14) in sonifikacijo v ultrazvočni kadički (14), zato je bilo smiselno, da smo preverili, če ti dodatni koraki pri pripravi plazemskega vzorca pripomorejo k večjemu izkoristku ekstrakcije analita. Vzorce z enakimi koncentracijami joheksola smo tako pripravili po postopku p1, ki vključuje obarjanje, kratko vorteksiranje in centrifugiranje, in po daljšem postopku p2, ki se od postopka p1 razlikuje v tem, da vključuje daljše vorteksiranje in še sonifikacijo vzorcev v ultrazvočni kadički. Zaradi večjega izkoristka ekstrakcije, ki je prikazan v preglednici VI, smo se odločili za pripravo vzorcev po postopku p2, vendar se zavedamo, da dodatni koraki pri pripravi vzorca podaljšajo čas izvajanja metode. V objavljenih metodah (3, 11, 14, 16, 21, 22) so k plazemskim vzorcem dodajali različne volumne 5 % perklorne kisline za obarjanje plazemskih proteinov, in sicer od 100 do 800 μL 5 % perklorne kisline na 100 μL plazme. Odločili smo se za obarjanje plazemskih proteinov z 200 μL 5 % perklorne

kislina v 100 μ L plazme, saj smo s tem volumnom 5 % perklorne kisline zagotovili učinkovito obarjanje plazemskih proteinov, hkrati pa vzorca nismo preveč redčili.

Z dodajanjem 5 % perklorne kisline plazemskemu vzorcu dobimo pri pripravi plazemskega vzorca supernatant s pH 0–1, injiciranje supernatanta s tako nizkim pH pa lahko predstavlja nevarnost za poškodbe injektorja in kolone na kromatografskem sistemu. Iz tega razloga smo preizkusili tri možnosti (supernatant 1, 2 in 3) za dvig pH supernatanta. Kot najbolj primerna se je izkazala možnost supernatant 3, ko smo 100 μ L supernatanta dodali 70 μ L 2,5 % amonijaka in s tem dosegli pH supernatanta med 7 in 8 v celotnem območju plazemskih koncentracij joheksola. Pufranje supernatanta predstavlja dodatno redčenje vzorca in dodaten korak znotraj priprave plazemskih vzorcev, vendar smo le na ta način zagotovili odgovorno in primerno ravnanje z opremo, ki nam je bila na voljo.

5.2 Optimizacija kromatografije

Z izbiro kolone nismo imeli večjih težav, preizkusili smo dve reverzno-fazni koloni, izbrali pa smo kolono Synergi Hydro C18, 250 \times 4,60 mm, 4 μ m (Phenomenex, ZDA), saj smo z njo dosegli boljšo ločbo našega analita in komponent iz plazme. Več dela smo imeli z izbiro ustrezne mobilne faze. Kot najbolj optimalna mobilna faza se je izkazala kombinacija 50 mM fosfatnega puфра s pH 3 (VD 2) in acetonitrila v razmerju 94 : 6 (v/v). Kombinacija vode s pH 3 (VD 1) in acetonitrila v razmerju 95 : 5 (v/v) se v našem primeru ni izkazala za ugodno, kljub temu da številne objavljene metode kot izbrano mobilno fazo navajajo prav to kombinacijo v razmerju 95 : 5 (22) in 96 : 4 (v/v) (3,16). Delež acetonitrila v mobilni fazi vpliva na retencijski čas joheksola, večji kot je delež acetonitrila, krajši je retencijski čas joheksola, in posledično čas analize. Izkazalo se je, da delež acetonitrila v mobilni fazi več kot 6 % ni ustrezen, saj se vrh joheksola prestavi tako, da se pojavljajo številne interference v območju kromatografskih vrhov joheksola. Pri izbranem pretoku 1,2 mL/min, s katerim smo zagotovili primerno kratek čas analize za uporabo metode v rutinski praksi, je bila ustrezna tudi ločba (resolucija) kromatografskih vrhov. Maksimalna UV absorpcija joheksola je pri 244 nm, vendar se je izkazalo, da je zaradi manjšega števila šumov na bazni liniji za UV detekcijo bolj primerna valovna dolžina 254 nm (14); tudi mi smo joheksol detektirali pri valovni dolžini 254 nm. Pri tej valovni dolžini smo detektirali kromatografska vrhova obeh izomerov joheksola, za

določanje enačbe umeritvene krivulje in izračun plazemskih koncentracij joheksola pa smo uporabili površino pod drugim vrhom joheksola, saj smo dokazali, da se razmerje med obema vrhoma joheksola, kot je razvidno iz preglednice VII, ohranja. Uporaba drugega kromatografskega vrha, z daljšim retencijskim časom in večjo površino pod kromatografskim vrhom joheksola, je smiselna iz praktičnega vidika, saj omogoča lažje integriranje vrhov in ločevanje analita od ostalih komponent v vzorcu. Tudi do sedaj objavljene HPLC-UV metode za določevanje plazemskih koncentracij joheksola, iz katerih smo izhajali pri optimizaciji naše metode, navajajo ohranitev razmerja med površino pod prvim in drugim kromatografskim vrhom joheksola in uporabo drugega kromatografskega vrha joheksola za izračun plazemskih koncentracij (3, 11, 14, 16, 21, 22).

Analiza enega vzorca z našo HPLC-UV metodo traja sedem minut, to pomeni, da lahko v eni uri analiziramo osem vzorcev. Na sliki 3 vidimo, da je retencijski čas (t_R) prvega izomera joheksola približno 4,3 minute, t_R drugega izomera, ki daje večji oz. drugi kromatografski vrh, pa približno 5 minut. Prav tako lahko iz slike 2 in slike 3 vidimo, da v območju kromatografskih vrhov joheksola ni prisotnih interferenc iz plazme.

5.3 Validacija metode

Linearnost in območje

Metoda je linearna v območju 2,5–500 $\mu\text{g/mL}$. Determinacijski koeficient (r^2) je bil 0,996 in več. Metode, iz katerih smo izhajali pri razvoju naše metode, navajajo linearnost v območju od 10–750 $\mu\text{g/mL}$ (14), 3,25–650 $\mu\text{g/mL}$ (3), 1,5–700 $\mu\text{g/mL}$ (16). Naše območje linearnosti ima zgornjo mejo nižjo od zgoraj navedenih metod, razlog za to je, da smo z našo metodo analizirali vzorce, odvzete tri in štiri ure po aplikaciji joheksola, v tem času pa so plazemske koncentracije joheksola 20–400 $\mu\text{g/mL}$ (14, 16, 22), z nekaterimi do sedaj objavljenimi metodami pa so določali plazemske koncentracije joheksola tudi takoj po aplikaciji joheksola oz. prej kot tri ure po aplikaciji joheksola, ko so plazemske koncentracije joheksola lahko višje od 500 $\mu\text{g/mL}$ (3, 16, 22). Spodnja meja našega linearnega območja sovпада z do sedaj objavljenimi metodami.

Točnost

Točnost metode za naš analit joheksol je ustrezna. Vse tri dni validacije, pri vseh koncentracijah kontrolnih vzorcev, je odstopanje od prave (referenčne) vrednosti manjše od 15 %.

Ponovljivost

Tako znotrajdnevna kot tudi meddnevna ponovljivost ustreza FDA smernicam za naš analit.

Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije za joheksol je v našem primeru spodnja meja linearnega območja, in sicer 2,5 µg/mL. Nekatere do sedaj objavljene metode navajajo višjo mejo kvantifikacije, in sicer 10 µg/mL (14) in 3,25 µg/mL (3), podali pa so tudi nižjo mejo kvantifikacije, to je 1,5 µg/mL (16). Glede na to, da se naša meja kvantifikacije nahaja med do sedaj določenimi mejami in da ena izmed študij navaja najnižjo plazemsko koncentracijo joheksola 33 µg/mL sedem ur po aplikaciji 5 ml raztopine joheksola Omnipaque 300 (14), enak odmerek so dobili tudi naši bolniki, smatramo našo mejo kvantifikacije za ustrezno.

Selektivnost

Selektivnost smo določali s pomočjo šestih slepih plazem, pridobljenih od različnih posameznikov. Le pri eni izmed plazem smo opazili interferenčni vrh v območju drugega vrha joheksola, površina interferenčnega vrha pa je bila približno sedemkrat manjša od površine pod vrhom LLOQ, po FDA smernicah pa je določeno, da mora biti površina interferenčnega vrha vsaj petkrat manjša od površine pod vrhom LLOQ.

Uspešnost ekstrakcije

Ekstrakcija učinkovine temelji na zelo enostavnem postopku z obarjanjem proteinov s 5 % perklorno kislino, supernatant za analizo na HPLC-UV sistemu pa pridobimo z vorteksiranjem, sonifikacijo in centrifugiranjem. Uspešnost ekstrakcije je v našem primeru 85 %. Ta procent je nižji od tistih, ki jih navajajo v ostalih objavljenih metodah, kjer so dosegli uspešnost ekstrakcije 95 % (14), 90–106 % (22). Določali smo ponovljivost izkoristkov ekstrakcije pri treh koncentracijah kontrolnih vzorcev, dobili smo nizek KV 2,88 %, kar kaže na to, da ne glede na koncentracijo joheksola v vzorcu vedno izgubimo

približno enak delež analita. Vzrok za slabši izkoristek ekstrakcije, kot ga navaja literatura, je lahko pufranje našega supernatanta, saj smo s tem uvedli dodatno pipetiranje vzorca, kar predstavlja dodaten korak znotraj priprave plazemskih vzorcev in večjo možnost za izgubljanje našega analita.

Stabilnost

Določali smo stabilnost plazemskih vzorcev z joheksolom po večkratnem zamrzovanju in odtajanju, kratkoročno stabilnost in postpreparativno stabilnost. Dokazali smo dobro stabilnost joheksola v vseh treh primerih. Po zamrzovanju in odtajanju plazme z dodano določeno koncentracijo joheksola je prišlo do majhne spremembe (0,51 in 2,04 %) v odzivih oz. površinah pod vrhom joheksola pred in po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja. Tudi pri določanju kratkoročne stabilnosti plazemskih vzorcev z joheksolom je prišlo do minimalne spremembe v odzivu oz. površini pod vrhom joheksola (0,29 in 3,31 %). To je dokaz, da so plazemski vzorci na sobni temperaturi stabilni vsaj štiri ure, kolikor je v fazi optimizacije metode največ trajala priprava vseh plazemskih vzorcev, in pri tem ne pride do večjega izgubljanja joheksola v plazemskem vzorcu. Določali smo še postpreparativno stabilnost, in sicer smo plazemske vzorce z joheksolom pustili 6 ur v vzorčevalniku pri 4 °C, v tem primeru je bila maksimalna sprememba v odzivu oz. površini pod vrhom joheksola 0,86 %. Vse analize na HPLC-UV sistemu so potekle znotraj časa, določenega za preverjanje postpreparativne stabilnosti, torej v največ šestih urah. Iz rezultatov določevanja stabilnosti joheksola, ki so natančneje prikazani v preglednicah XV, XVI in XVII, lahko sklepamo, da ni nujno, da plazemski vzorec analiziramo takoj, ko ga pridobimo, vzorec je lahko vsaj štiri ure na sobni temperaturi. S stabilnostjo plazemskih vzorcev po večkratnem zamrzovanju in odtajanju smo pokazali, da lahko isti plazemski vzorec analiziramo večkrat, med analizami pa ga spravimo v zamrzovalniku.

5.4 Analiza realnih vzorcev

Iz opisa naše analizne metode lahko razberemo, da je merjenje plazemske koncentracije joheksola s pomočjo HPLC-UV sistema dokaj enostavno. Za ocenjevanje hitrosti glomerulne filtracije na osnovi očistka joheksola je za preiskavo potrebna intravenska injekcija z nizkim odmerkom joheksola, kar je enostavna tehnika za zdravstveno osebje in

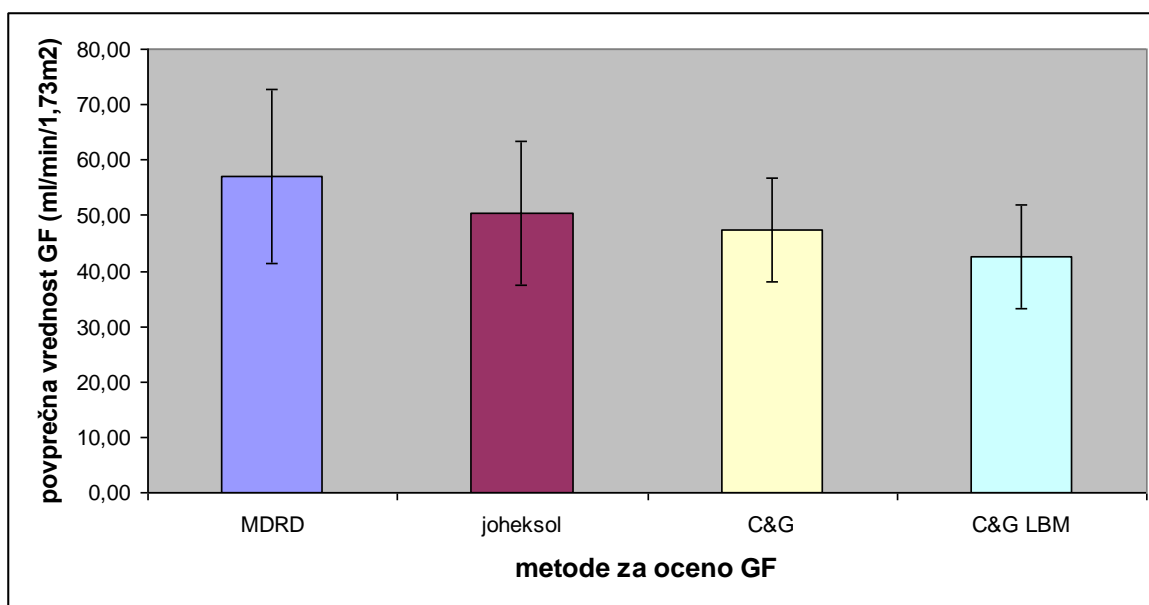
bolnike glede na ostale metode za določevanje ledvične funkcije z eksogenimi markerji, kot so določevanje očistka inulina in metode z radiološkimi kontrastnimi sredstvi, ki zahtevajo posebno rokovanje. Nizki odmerki kontrastnega sredstva (5 mL raztopine joheksola) za bolnike pomenijo manj možnosti za neželene učinke, predvsem alergijske reakcije (25) v primerjavi z odmerki, ki so potrebni za ostale diagnostične preiskave s kontrastnim sredstvom joheksolom, ki so od približno 20 do 100 mL raztopine joheksola (19). Našo metodo smo uporabili za analizo 20 vzorcev pacientov s srčnim popuščanjem. Plazemske koncentracije joheksola smo iz odzivov oz. površin pod drugim kromatografskim vrhom joheksola izračunali s pomočjo umeritve s standardom. Metoda se je izkazala za selektivno tudi pri analizi vzorcev bolnikov, kljub temu da so v njihovi plazmi prisotne še druge učinkovine. Skupaj s plazemskimi vzorci iz študije smo pridobili podatek, da so vsi bolniki iz naše študije poleg joheksola prejeli še bisoprolol in/ali ramipril, vendar teh učinkovin nismo dokazovali pri izbranih pogojih analize. V območju drugega vrha joheksola se pri analizi plazemskih vzorcev bolnikov niso pojavljale interference in plazme. Iz plazemskih koncentracij joheksola smo z namenom pridobiti podatke o ledvični funkciji pacientov, izračunali očistke joheksola. Očistki joheksola pri naših pacientih se gibljejo od 34,9 do 81,3 mL/min/1,73m², kar je skladno z literaturnimi podatki objavljenih metod, ki navajajo očistke joheksola 12,9–150,9 mL/min/1,73m² (3), 24–207 mL/min (22), 10–150 mL/min/1,73m² (16), ena izmed objavljenih metod navaja očistke 26,1, 45,2 in 69,5 mL/min (14). Pri računanju očistkov joheksola smo upoštevali Bröchner - Mortensenov popravek za izračun očistka joheksola na osnovi enoprostornega modela. Dokazana je odlična korelacija med očistki joheksola, ki jih pridobimo na osnovi enoprostornega modela z Bröchner - Mortensenovim popravkom in očistki, pridobljenimi na osnovi dvoprostornega modela (16). Za izračun očistka na osnovi enoprostornega modela pa potrebujemo manjše število vzorcev, v našem primeru dva vzorca, kar je prednost tako za bolnika kot tudi za zdravstveno osebje.

V Sloveniji se v splošni klinični praksi določevanje ledvične funkcije na osnovi očistkov inulina, kontrastnih in radioloških sredstev še ne uporablja (1). Najpogostejši način za določevanje ledvične funkcije je tako določanje koncentracije serumskega kreatinina in endogenega očistka kreatinina, ki pa pogosto nista dovolj natančna (4), saj na serumsko koncentracijo kreatinina vplivajo številni dejavniki, kot so prehranjevalne navade bolnikov, druge prisotne bolezni, mišična masa in dnevno nihanje koncentracije kreatinina,

ki pa niso povezani z ledvično funkcijo pri bolnikih. Na osnovi podatkov o serumskem kreatininu lahko s pomočjo enačb določimo oceno GF. Trenutno obstaja najmanj 46 različnih enačb za določevanje ocene GF, slabost le-teh je v tem, da za izračun ocene GF zahtevajo podatke, kot so višina, masa, starost pacienta, ki pa niso vedno na voljo (31, 32). Prav tako težavo predstavljajo različne enačbe za določitev BSA, ki je vključena v enačbe za oceno GF, in ne dajejo enakih rezultatov (31). Enačbe za BSA se uporabljajo predvsem znotraj enačb za oceno GF, prilagojeno na povprečno telesno površino odraslega človeka. Tudi mi smo uporabili dve enačbi (enačba 3 in enačba 5), ki vključujeta BSA, da smo dobili vrednosti ocen GF, skladne s tistimi, ki jih pridobimo pri izračunu GF z MDRD enačbo, torej prilagojene na povprečno telesno površino odraslega človeka. Težavo pri določevanju GF na osnovi serumskega kreatinina predstavljajo tudi različne metode za določevanje serumskega kreatinina v kliničnih laboratorijih, ki ne dajejo enakih vrednosti S_{Kr} . Pri uporabi enačb za določevanje ocene GF je pomembno, da je vrednost S_{Kr} določena na enak način, kot so jo določili pri razvoju enačbe (32).

V našem primeru smo imeli poleg plazemskih vzorcev bolnikov na razpolago tudi osnovne podatke o bolnikih in vrednosti S_{Kr} . V klinično kemijskem laboratoriju Bolnišnice Golnik, kjer so bile opravljene analize krvnih vzorcev bolnikov s srčnim popuščanjem, določajo serumske koncentracije kreatinina z metodo kinetično modificirane Jaffejeve reakcije s kompenzacijo za nekreatininske kromogene, ki daje skladne rezultate z referenčno izotopno dilucijsko masno spektrometrijo (IDMS). S pomočjo podatkov o vrednostih S_{Kr} smo izračunali ocene GF na osnovi treh najširše uporabljenih enačb, in sicer s Cockroft - Gaultovo enačbo (enačba 2), MDRD enačbo s štirimi spremenljivkami (enačba 7) in Cockroft - Gaultovo enačbo z vpeljavo mišične mase (enačba 4). MDRD enačba, ki smo jo uporabili za oceno GF v naši nalogi, je prilagojena uporabi IDMS standardiziranih vrednosti serumskega kreatinina. V razvoju C&G enačbe je bila metoda določevanja serumske koncentracije kreatinina kinetična Jaffejeva reakcija. Izmerjene vrednosti S_{Kr} po tej metodi bi bile višje od IDMS standardiziranih vrednosti S_{Kr} , ki so nam bile na razpolago. Posledično daje C&G enačba z uporabo standardiziranih vrednosti S_{Kr} višje rezultate (30). Z razvojem MDRD enačbe s štirimi spremenljivkami se je pojavila možnost, da bi klinični laboratoriji poročali oceno GF skupaj z vrednostmi S_{Kr} (31,32). Danes je MDRD enačba za oceno GF najbolj promovirana.

Očistki joheksola, ki smo jih izračunali na podlagi plazemskih koncentracij joheksola, pridobljenih z našo HPLC-UV metodo, pri nekaterih bolnikih bolj odstopajo od vrednosti ocen GF, ki smo jih dobili na osnovi serumskega kreatinina, kot pri ostalih bolnikih. Nismo pa našli nekega skupnega dejavnika, ki bi vplival na te razlike. Kot je razvidno iz preglednic XX in XXI, so vrednosti očistkov joheksola v splošnem nižje od vrednosti ocen GF, ki smo jih dobili s pomočjo MDRD enačbe, in višje od vrednosti ocen GF, ki smo jih določili na osnovi C&G in C&G LBM enačbe. Na sliki 4 so prikazane povprečne vrednosti in standardni odkloni vrednosti ocen GF na osnovi serumskega kreatinina in ocen GF na osnovi očistkov joheksola. Najvišjo povprečno vrednost ocen GF smo dobili pri uporabi MDRD enačbe za ocenjevanje GF, najnižjo povprečno vrednost ocen GF pa daje enačba C&G LBM. Kot je prikazano v preglednici XXII, se značilno razlikuje povprečna vrednost očistkov joheksola s povprečno vrednostjo ocen GF na osnovi MDRD enačbe in povprečno vrednostjo ocen GF na osnovi C&G LBM enačbe. Povprečni vrednosti ocen GF po C&G enačbi in očistkov joheksola pa se statistično ne razlikujeta.



Slika 4: Povprečne vrednosti in standardne deviacije ocen GF (n = 20)

V nadaljevanju smo ugotavljali, ali obstaja značilna povezava med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina (preglednica XXIV) oz. katera od enačb daje najbolj skladne ocene GF z ocenami GF na osnovi očistkov joheksola, pridobljenih z našo metodo. Korelacije med ocenami GF na osnovi serumskega kreatinina in očistki joheksola smo primerjali tako, da smo določili Pearsonov (r) in determinacijski (r^2) koeficient.

Najvišji Pearsonov koeficient, in sicer $r = 0,757$ smo dobili pri paru MDRD-CI joheksol, v naši populaciji vzorcev pa najslabšo korelacijo izkazuje par C&G LBM-CI joheksol (preglednica XXIII). Rezultati sovpadajo z literaturnimi podatki, kjer so izvajali podobne primerjave. V študiji na pacientih s presajeno ledvico so prav tako določali očistke joheksola in ocene GF s pomočjo različnih enačb. Določili so Pearsonov koeficient korelacije med očistki joheksola in ocenami GF po MDRD enačbi, dobili so $r = 0,769$, kar je blizu našega rezultata $r = 0,757$. V primeru korelacije očistkov joheksola in ocen GF po C&G enačbi pa navajajo višji Pearsonov koeficient kot mi, in sicer $r = 0,757$, mi pa smo določili $r = 0,626$ (33).

S Fisherjevim testom za primerjavo Pearsonovih koeficientov (preglednica XXV in XXVI) smo pokazali, da ni značilne moči povezave med katerokoli kombinacijo parov CI joheksol - MDRD, CI joheksol - C&G in CI joheksol - C&G LBM. Pri uporabi C&G enačbe za oceno GF smo dobili najbližjo povprečno vrednost glede na povprečno vrednost očistkov joheksola, vendar pa ocene GF s pomočjo C&G enačbe ne izkazujejo najboljših korelacij z očistki joheksola. Znano je, da C&G enačba daje manj točne rezultate pri starejših bolnikih in pri bolnikih z višjim ITM (10), med bolniki, vključenimi v študijo, iz katere izhajajo naši plazemski vzorci, pa je veliko starostnikov in nekaj bolnikov s prekomerno telesno maso. Najvišji Pearsonov korelacijski koeficient smo dobili pri primerjavi ocen GF na osnovi MDRD enačbe in očistkov joheksola, povprečna vrednost ocen GF na osnovi MDRD enačbe pa je višja ne samo od povprečne vrednosti očistkov joheksola, ampak tudi od povprečnih vrednosti ocen GF na osnovi C&G in C&G LBM enačbe. Enačba C&G LBM pri izračunu ocene GF namesto spremenljivke za maso upošteva idealno telesno maso oz. mišično maso. V naši populaciji vzorcev je bilo kar nekaj bolnikov s prekomerno telesno maso, a smo v primeru te enačbe vseeno dobili najslabšo korelacijo z očistki joheksola. Razlog za to je lahko to, da C&G LBM enačba upošteva idealno telesno maso, pri izračunu očistkov joheksola pa smo znotraj enačbe za oceno volumna porazdelitve (ECV) upoštevali telesno maso bolnikov, kot navaja enačba za izračun ECV. S statistično primerjavo rezultatov ne moremo določiti, katera enačba na osnovi serumskega kreatinina je najboljši nadomestek za oceno GF s pomočjo očistka joheksola. Sklepamo lahko, da izbira enačbe za določitev ocene GF na osnovi serumskega kreatinina nima prevelikega pomena, pomembneje je, da nobena od enačb za določevanje GF ne more biti siguren nadomestek za direktno merjenje GF s pomočjo eksogenih markerjev, saj je prisotna velika

variabilnost znotraj ocen GF, ki jih dobimo s pomočjo različnih enačb, ki temeljijo na S_{Kr} (33).

Določevanje GF je pomembna preiskava znotraj klinične prakse, saj ledvična funkcija upada s starostjo, navadno je prizadeta pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi, tudi pri bolnikih s sladkorno boleznijo in pri številnih drugih. Kot smo že omenili, določevanje ledvične funkcije v Sloveniji temelji na določevanju S_{Kr} . Znano je, da pri večini bolnikov z okrnjeno ledvično funkcijo S_{Kr} prestopi zgornjo mejo referenčnega intervala šele, ko je GF zmanjšana že za več kot 50 % (10). Določevanje GF s pomočjo eksogenih markerjev predstavlja bolj zanesljivo preiskavo, saj se z uporabo teh izognemo dejavnikom, kot so dnevno nihanje kreatinina, različna mišična masa bolnikov, prehranjevalne navade, in drugim, ki vplivajo na vrednost endogenega markerja za določevanje ledvične funkcije, S_{Kr} . Določevanje plazemskega očistka kontrastnega sredstva joheksola in ocenjevanje GF na osnovi le-tega predstavlja možnost za rutinsko preiskavo s pomočjo eksogenih markerjev v klinični praksi, saj je določevanje ledvične funkcije z joheksolom veliko enostavnejše kot določevanje očistka inulina in bolj praktično kot metode, ki temeljijo na ocenjevanju GF s pomočjo radioloških sredstev. Optimizirana in validirana metoda za analizo plazemskih vzorcev je enostavna, tudi standard joheksola, ki je potreben za umeritev metode, je dostopen na trgu (14). Z uporabo joheksola kot eksogenega markerja za določevanje ledvične funkcije zadostimo priporočilom za uporabo eksogenih markerjev za določevanje ledvične funkcije, ker dajejo manj variabilne rezultate kot ocene GF na osnovi enačb (33).

6 SKLEP

V sklopu diplomske naloge smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Za določanje joheksola z optimizirano in validirano HPLC-UV metodo smo uporabili reverzno-fazno kolono Synergi Hydro C18, 250 × 4,60 mm, 4 μm (Phenomenex, ZDA), mobilno fazo, sestavljeno iz 50 mM fosfatnega pufrs s pH 3 in acetonitrila v razmerju 94 : 6 (v/v), detekcija je potekala pri 254 nm.
- Priprava plazemskih vzorcev za analizo je enostavna, vključuje obarjanje plazemskih proteinov s 5 % perklorno kislino, vorteksiranje, sonifikacijo vzorcev v ultrazvočni kadički, centrifugiranje in pufranje supernatanta z 2,5 % amonijakom.
- Za izračun plazemskih koncentracij joheksola iz odzivov smo upoštevali površino pod drugim kromatografskim vrhom joheksola.
- Validirana analizna metoda je točna, ponovljiva, selektivna in linearna v območju od 2,5 do 500 μg/mL. Izkoristek ekstrakcije joheksola je približno 85 % in je ponovljiv (KV = 2,88 %) pri različnih plazemskih koncentracijah joheksola.
- Joheksol je v plazemskem vzorcu ustrezno stabilen po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja, 4 ure na sobni temperaturi in 6 ur v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C.
- Pri analizi realnih vzorcev z validirano analizno metodo smo dobili primerljive plazemske koncentracije joheksola, kot jih navajajo v literaturi. Na osnovi enoprostornega modela in z upoštevanjem Bröchner - Mortensenovega popravka smo izračunali očistke joheksola za oceno GF.
- Dokazali smo značilno korelacijo med očistki joheksola in ocenami GF na osnovi S_{Kr} s tremi najpogosteje uporabljenimi enačbami, in sicer MDRD enačbe s štirimi spremenljivkami, Cockroft - Gaultove enačbe in Cockroft - Gaultove enačbe z vpeljavo mišične mase.
- Najboljšo korelacijo z očistki joheksola dajejo ocene GF na osnovi MDRD enačbe, povprečna vrednost očistkov joheksola pa je najbližje povprečju ocen GF na osnovi Cockroft - Gaultove enačbe. Pri nobenem od parov Cl joheksol - MDRD, Cl joheksol - C&G in Cl joheksol - C&G LBM korelacija ni značilno boljša, kar pomeni, da izbira enačbe za oceno GF na osnovi S_{Kr} nima večjega pomena.
- Uporabo joheksola lahko predstavlja dobro alternativo za določevanje ledvične funkcije s pomočjo eksogenih markerjev.

7 LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina 4.izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2011: 1011-16.
2. Gorenjak M: Določitev kreatinina in ocena glomerulne filtracije, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2009: 4-8.
3. Pucci L, Bandinelli S, Penno G, Nannipieri M, Rizzo L, Navalesi R: Iohexol plasma clearance in determining glomerular filtration rate in diabetic patients. *Ren Fail* 1998; 20(2): 277-84.
4. Hojs R, Bevc S., Ekart R, Gorenjak M, Puklavec L: Ocena glomerulna giltracije – primerjava serumskega kreatinina, serumskega cistatina C in enačb za izračun očistka kreatinina. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75: 455–62.
5. Bevc S, Ekart R, Hojs R: Serumski cistatin C – nov označevalec glomerulne filtracije. *Medicinski razgledi* 2005; 45: 293-299.
6. Luque M, de Rivas B, Divisón JA, Márquez E, Sobreviela E; HICAP Study Group Investigators: Relationship between renal function and heart failure in hypertensive patients. *Intern Med J* 2010; 40(1): 76-9.
7. Hillege HL, Nitsch D, Pfeffer MA, Swedberg K, McMurray JJ, Yusuf S, Granger CB, Michelson EL, Ostergren J, Cornel JH, de Zeeuw D, Pocock S, van Veldhuisen DJ: Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure. *Circulation* 2006; 113(5): 671-8.
8. Lamb EJ, Tomson CR, Roderick PJ; Clinical Sciences Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry: Estimating kidney function in adults using formulae. *Ann Clin Biochem* 2005; 42(Pt 5): 321-45.
9. Anderson SC, Cockayne S: *Clinical chemistry: Concepts and applications*, Mc Graw – Hill Companies, Inc., 2003: 373-382.
10. Thomas L, Huber AR: Renal function - estimation of glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(11): 1295-302.
11. Benz-de Bretagne I, Le Guellec C, Halimi JM, Gatault P, Barbet C, Alnajjar A, Büchler M, Lebranchu Y, Andres CR, Vourc'h P, Blasco H: New sampling strategy using a bayesian approach to assess iohexol clearance in kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2012; 34(3): 289-97.

12. Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16(1): 31-41.
13. Saleem M, Florkowski CM, George PM, Woltersdorf WW: Comparison of two prediction equations with radionuclide glomerular filtration rate: validation in routine use. *Ann Clin Biochem* 2006; 43(Pt 4): 309-13.
14. Soman RS, Zahir H, Akhlaghi F: Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 816(1-2): 339-43.
15. Schwartz GJ, Furth S, Cole SR, Warady B, Muñoz A: Glomerular filtration rate via plasma iohexol disappearance: pilot study for chronic kidney disease in children. *Kidney Int* 2006; 69(11): 2070-7.
16. Gaspari F, Perico N, Ruggenenti P, Mosconi L, Amuchastegui CS, Guerini E, Daina E, Remuzzi G: Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6(2): 257-63.
17. Lee SY, Chun MR, Kim DJ, Kim JW: Determination of iohexol clearance by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006 Jul 24; 839(1-2): 124-9. Epub 2006 May 3. Erratum in: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(1-2): 106.
18. Product monograph, Omnipaque (iohexol injection UPS), GE Healthcare Canada Inc., 2300 Meadowvale Blvd., Mississauga, Ontario L5N 5P9, Control number 106423, November 8, 2006.
19. GE Healthcare AS Povzetek glavnih značilnosti zdravila OMNIPAQUE <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-008771.pdf&dir=smpc>, dostopano: 15.7.2012
20. <http://www.drugs.com/mmx/iohexol.html>, dostopano: 15.7.2012
21. Cavalier E, Rozet E, Dubois N, Charlier C, Hubert P, Chapelle JP, Krzesinski JM, Delanaye P: Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: validation, risk and uncertainty assessment. *Clin Chim Acta* 2008; 396(1-2): 80-5.
22. Krutzén E, Bäck SE, Nilsson-Ehle I, Nilsson-Ehle P: Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate. *J Lab Clin Med* 1984; 104(6): 955-61.

23. Gref M, Karp K: GFR determination in adults with a single-sample iohexol plasma clearance method based on the mean sojourn time. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(11): 3166-73.
24. Gaspari F, Guerini E, Perico N, Mosconi L, Ruggenti P, Remuzzi G: Glomerular filtration rate determined from a single plasma sample after intravenous iohexol injection: is it reliable? *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(12): 2689-93.
25. Sterner G, Frennby B, Hultberg B, Almen T: Iohexol clearance for GFR-determination in renal failure - single or multiple plasma sampling? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(3): 521-5.
26. Frennby B, Sterner G: Contrast media as markers of GFR. *Eur Radiol* 2002; 12(2): 475-84.
27. Brändström E, Grzegorzczak A, Jacobsson L, Friberg P, Lindahl A, Aurell M: GFR measurement with iohexol and ⁵¹Cr-EDTA. A comparison of the two favoured GFR markers in Europe. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(5): 1176-82.
28. Shihabi ZK, Constantinescu MS: Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1992; 38(10): 2117-20.
29. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and drug administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001.
30. Sabotin M: Prilaganje odmerjanja zdravil pri bolnikih z odpovedjo ledvic glede na oceno glomerulne filtracije, Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
31. Anavekar N, Bais R, Carney S, Davidson J, Eris J, Gallagher M, Johnson D, Jones G, Sikaris K, Lonergan M, Ludlow M, Mackie J, Mathew T, May S, McBride G, Meerkink M, Peake M, Power D, Snelling P, Voss D, Walker R: Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: a position statement. *Clin Biochem Rev* 2005; 26(3): 81-6.
32. Panteghini M, Myers GL, Miller WG, Greenberg N: The importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(10): 1287-92.
33. Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Centemeri E, Carrara F, Pellegrino M, Gherardi G, Gotti E, Segoloni G, Salvadori M, Rigotti P, Valente U, Donati D, Sandrini S, Sparacino V, Remuzzi G, Perico N: Performance of different prediction equations for

estimating renal function in kidney transplantation. Am J Transplant 2004; 4(11): 1826-35.